

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

WINNIE ALENCAR LUCIANO

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.) E MANGA (*Mangifera indica* L.)
ADICIONADOS DE *Lactobacillus acidophilus* LA-3

JOÃO PESSOA – PB

2018

WINNIE ALENCAR LUCIANO

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.) E MANGA (*Mangifera indica* L.)
ADICIONADOS DE *Lactobacillus acidophilus* LA-3

JOÃO PESSOA - PB

2018

WINNIE ALENCAR LUCIANO

ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.) E MANGA (*Mangifera indica* L.)
ADICIONADOS DE *Lactobacillus acidophilus* LA-3

Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-graduação em Ciência e Tecnologia
de Alimentos, Centro de Tecnologia,
Universidade Federal da Paraíba, em
cumprimento aos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciência
e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof. Dr^a Marciane Magnani

Co-orientadora: Prof. Dr^a Estefânia Fernandes Garcia

JOÃO PESSOA

2018

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

L937e Luciano, Winnie Alencar.
ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE AÇAÍ
(Euterpe oleracea M.) E MANGA (Mangifera indica L.)
ADICIONADOS DE Lactobacillus acidophilus LA-3 / Winnie
Alencar Luciano. - João Pessoa, 2018.
93f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.
Coorientação: Estefânia Fernandes Garcia.
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CT.

1. Probióticos. 2. Bebidas funcionais. 3. Frutas
tropicais. 4. Compostos fenólicos. I. Magnani,
Marciane. II. Garcia, Estefânia Fernandes. III. Título.

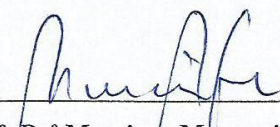
UFPB/BC

WINNIE ALENCAR LUCIANO

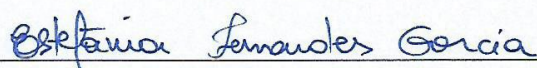
ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE
AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.) E MANGA (*Mangifera indica* L.)
ADICIONADOS DE *Lactobacillus acidophilus* LA-3

Dissertação APROVADA em 06/04/2018

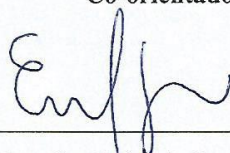
BANCA EXAMINADORA



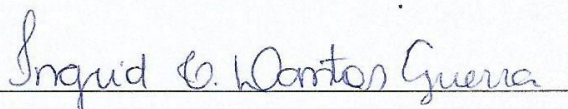
Prof. Dr.ª Marciane Magnani – DEA/CT/UFPB
Orientadora



Prof. Dr.ª Estefânia Fernandes Garcia – DG/CTDR/UFPB
Co-orientadora



Prof. Dr. Evandro Leite de Souza – DN/CCS/UFPB
Examinador Externo



Prof. Dr.ª Ingrid Conceição Dantas Guerra – DG/CTDR/UFPB
Examinador Externo

*À Deus, por me permitir vivenciar essa jornada
À minha mãe e minha avó, minhas riquezas, por
todo apoio, carinho, incentivo e dedicação
Dedico.*

AGRADECIMENTOS

À Deus, agradeço e enalteço por conduzir minha vida, me dando força, perseverança e fé diante de cada obstáculo a ser enfrentado. Por ser meu amparo e refúgio em todos os momentos e por colocar em minha vida pessoas que me ajudaram com o desenvolvimento desse trabalho.

À minha mãe, Roberta, agradeço por todos os anos de dedicação, amor, paciência, preocupação e apoio. Essa conquista é sua, pois não teria chegado até aqui sem a senhora ao meu lado. És meu espelho, minha fortaleza.

À minha avó, Antônia, o alicerce da minha família. A senhora me ensinou a seguir em frente e não desistir. Obrigada por me educar, cuidar e amar.

À minha querida tia, Lécia, por torcer verdadeiramente por essa conquista, me apoiando e incentivando sempre.

À minhas irmãs de coração e sobrinhos, vocês são a alegria da minha vida. Obrigada por tanto amor, carinho e cuidado.

À minha orientadora, Prof^a Dr^a Marciane Magnani, por ter me aceitado como orientanda e pela confiança ao me conceder o desenvolvimento desse projeto, meus sinceros agradecimentos pelos valiosos ensinamentos e direcionamento. À senhora, meu respeito e admiração profissional. Muito obrigada.

Ao Prof. Dr. Evandro Leite de Souza, pelo apoio não somente na execução desse projeto, mas também pela oportunidade me concedida anos atrás ao me confiar um projeto de iniciação científica, o qual foi fundamental para o desenvolvimento de minha vida acadêmica e ingresso no mestrado.

Aos membros da banca examinadora, pelas contribuições essenciais para a construção deste trabalho, obrigada.

À Prof^o Dr^o Estefânia Fernandes Garcia. Você me deu o privilégio imensurável de conhecer a pesquisa científica, me apresentando a esse mundo que eu tanto amo hoje. Não existem palavras para descrever toda gratidão que tenho a você. Foi uma peça chave na minha formação. Sou grata por todos os ensinamentos, carinho, conselhos, incentivos e, especialmente, por sua amizade.

Aos meus amigos, Thaís, Laiane, Adjane, Alberto, Isabel e Kamila, quero tê-los em minha vida sempre! Muito obrigada pela amizade, carinho, cumplicidade e torcida. Tudo que vivemos juntos se tornaram memórias felizes.

À minhas amigas Aline, Camila, Dayene, Elaine e Thayse, vocês foram a maior conquista que eu tive durante o mestrado. São verdadeiros presentes de Deus em minha vida. *“Com o tempo aprendes que verdadeiras amizades continuam a crescer mesmo a longas distâncias. E o que importa não é o que tens na vida, mas quem tens na vida.”* (Shakespeare). Agradeço por alegrarem minha vida e por caminharem junto comigo durante esses dois anos de convivência.

À minhas amigas de laboratório: Helena, Myrella, Whyara, Geany, Rayssa, Daniela, Suênia, Jéssica, Laênia, Adma e Flávia. Obrigada por todos os momentos compartilhados dentro e fora do ambiente do laboratório, pela ajuda durante os experimentos e pela amizade de cada uma.

À professora Dr^a Maria Lúcia da Conceição, por ter me dado o primeiro “sim”, me aceitando de coração aberto no laboratório. És um ser de luz, exemplo de humildade, inteligência e dedicação. Obrigada por exercer a profissão com maestria, sendo não só uma professora, mas também amiga e conselheira.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos pela oportunidade de cursar o mestrado, bem como a todos os professores membro do programa, pelos amplos ensinamentos durante esses dois anos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro para a realização desse trabalho.

Por fim, agradeço a todos que de alguma forma contribuíram para a realização dessa pesquisa. Meu muito obrigada a todos vocês.

RESUMO

O estudo da matriz vegetal como veículo para adição de bactérias ácido lácticas (BAL) visando a elaboração de novos produtos com características probiótica tem se intensificado nos últimos anos. Esses alimentos não lácteos com propriedades funcionais resultantes da adição de tais culturas apresentam uma alternativa para alcançar uma maior gama de consumidores, incluindo aqueles com intolerância a lactose, dislipidemias e vegetarianos. O objetivo desse trabalho foi avaliar a sobrevivência da cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-3 em *smoothies* a base de açaí (AS) e de manga (MS) e o impacto da incorporação dessa cepa nas características físico-químicas e sensoriais do produto durante 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C. Foi avaliada ainda a capacidade de sobrevivência da cepa teste incorporada nos *smoothies* durante exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal. *L. acidophilus* LA-3 manteve a viabilidade durante os 28 dias de armazenamento em ambos os *smoothies*, apresentando contagens de aproximadamente 7,5 e 8,5 log UFC/g no MS e AS, respectivamente. Quanto as características físico-químicas, não foram observadas mudanças significativas nas bebidas controle (*smoothies* sem a adição do *L. acidophilus* LA-3) durante o armazenamento, enquanto em AS e MS contendo a cepa houve redução do pH e dos sólidos solúveis totais, acompanhado de aumento na acidez titulável. Os *smoothies* contendo *L. acidophilus* LA-3 apresentaram menor conteúdo de glicose, frutose e maltose e maior quantidade de ácido láctico e succínico que os *smoothies* controles. Nas primeiras 24 horas do armazenamento, o perfil de compostos fenólicos foi alterado em AS e MS contendo *L. acidophilus* LA-3 e a redução ou aumento dos ácidos fenólicos e ou flavonoides variou nos *smoothies*. Não foram detectadas mudanças no perfil de fenólicos de AS e MS sem contendo *L. acidophilus* LA-3. Na avaliação sensorial, os *smoothies* foram descritos como bebidas de gosto doce e característico de frutas frescas, cor intensa e textura cremosa. AS e MS contendo contendo *L. acidophilus* LA-3 diferiram dos controles quanto aos atributos sabor ácido e aroma fermentado. Ao final da digestão *in vitro*, *L. acidophilus* LA-3 apresentou contagens $\geq 7,6$ log UFC/mL em ambos os *smoothies* ensaiados. Os resultados demonstram a viabilidade de incorporação de *L. acidophilus* LA-03 em AS e MS, sugerindo estes produtos como matriz alternativa para elaboração de produto probióticos não lácteos.

Palavras-chave: Probiótico, bebidas funcionais, frutas tropicais, compostos fenólicos.

ABSTRACT

The study of the vegetal matrix as vehicle for the addition of lactic acid bacteria (LAB) aiming at the elaboration of new products with probiotic characteristics has intensified in recent years. These non-dairy foods with functional properties resulting from the addition of probiotics present an alternative to reach a wider range of consumers, including those with lactose intolerance, dyslipidemia and vegetarians. The aim of this work was to evaluate the survival of the probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* LA-3 in açai (AS) and mango (MS) based *smoothies* and the impact of the incorporation of this strain on the physicochemical and sensorial characteristics of the product during 28 days cooled storage at 4 °C. The survival ability of the test strain incorporated in the *smoothies* during exposure to simulated gastrointestinal tract conditions was further evaluated. *L. acidophilus* LA-3 maintained viability during the 28 days of storage in both *smoothies*, presenting counts of approximately 7.5 and 8.5 log CFU/g in MS and AS, respectively. As for the physical-chemical characteristics, no significant changes were observed in the control beverages (*smoothies* without the addition of *L. acidophilus* LA-3) during storage, whereas in AS and MS containing the strain there was a reduction of pH and total soluble solids, accompanied by an increase in titratable acidity. *Smoothies* containing *L. acidophilus* LA-3 presented lower content of glucose, fructose and maltose and higher amounts of lactic and succinic acid than the control *smoothies*. In the first 24 hours of storage, the profile of phenolic compounds was altered in AS and MS containing *L. acidophilus* LA-3 and the reduction or increase of phenolic and/or flavonoid acids varied in *smoothies*. No changes were detected in the phenolic profile of AS and MS without containing *L. acidophilus* LA-3. In sensory evaluation, *smoothies* were described as sweet tasting beverages and characteristic of fresh fruits, intense color and creamy texture. AS and MS containing *L. acidophilus* LA-3 differed from controls for acid taste and fermented flavor attributes. At the end of the in vitro digestion, *L. acidophilus* LA-3 presented counts ≥ 7.6 log CFU / mL in both *smoothies* assayed. The results demonstrate the feasibility of incorporation of *L. acidophilus* LA-03 into AS and MS, suggesting these products as an alternative matrix for the preparation of non-dairy probiotics products.

Key words: Probiotic, functional beverages, tropical fruits, phenolic compounds.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 Ficha utilizada para teste triangular	33
Figura 2 Ficha utilizada para o teste de reconhecimento de gostos básicos	34
Quadro 1. Estudos envolvendo aspectos tecnológicos e funcionais de <i>smoothies</i>	25

ARTIGO

Figure 1 - Organic acids contents in fruit smoothies with *L. acidophilus* (LA-3) (■) and without *L. acidophilus* (LA-3) control (▨) açai based smoothies (AS) (A – C) and mango based smoothie (MS) (D – F) during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of three independent experiments. 78

Figure 2 - Sugar contents in fruit smoothies with *L. acidophilus* (LA-3) (■) and without *L. acidophilus* (LA-3) control (▨) açai based smoothies (AS) (A – C) and mango based smoothie (MS) (D – F) during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of three independent experiments..... 79

Figure 3 - (A) Principal Component Analysis (PCA) of the physicochemical (pH and viscosity) and sensory (purple color, yellow color, apparent viscosity, açai aroma, banana aroma, mango aroma, passion fruit aroma, acid aroma, fermented aroma, sweet flavor, acid flavor, fermented flavor, viscosity) parameters of fruit smoothies; (B) distribution of samples according PCA: A (açai based smoothie with *L. acidophilus* LA-3); B (açai based smoothie with *L. acidophilus* LA-3), C (mango based smoothie without *L. acidophilus* LA-3); D (mango based smoothie without *L. acidophilus* LA3) 80

Figure 4 - Survival (log cfu/g) of *L. acidophilus* LA-3 in açai (AS) based smoothie (▲) and mango (MS) based smoothie (■) during exposure to simulated gastrointestinal conditions The error bars represent the standard derivations. 81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Condições usadas em cada fase da simulação gastrointestinal dos <i>smoothies</i>	37
--	----

ARTIGO

Table 1. Counts (log CFU/mL) of <i>L. acidophilus</i> LA-3 in açai (AS) and (MS) mango based smoothies during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	82
---	----

Table 2. Contents of phenolic compounds in açai based smoothies with or without <i>L. acidophilus</i> LA-3 on day 0, 1, 14 and 28 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	83
---	----

Table 3. Contents of phenolic compounds in mango based smoothies with or without <i>L. acidophilus</i> LA-3 on day 0, 1, 14 and 28 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	84
--	----

Supplementary Table 1. Values of physicochemical parameters of açai (AS) and (MS) mango based smoothies with or without <i>L. acidophilus</i> LA-3 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	85
---	----

Supplementary Table 2. Parameters of sensory descriptive quantitative analysis (n:3, mean values, $\pm$ standard deviation) in açai (AS) based smoothies and mango (MS) based smoothies with or without <i>L. acidophilus</i> LA-3 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).	87
---	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	13
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS	15
2.2 AÇAÍ (<i>Euterpe oleracea</i> M.) E MANGA (<i>Mangifera indica</i> L.).....	19
2.3 BEBIDAS A BASE DE FRUTAS COMO MATRIZES PARA INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICOS	23
3 MATERIAIS E MÉTODOS	29
3.1 MATERIAIS.....	29
3.1.1 Cepa teste e condições de crescimento	29
3.1.2 Água de coco, frutas e polpas de frutas.....	29
3.2 MÉTODOS	30
3.2.1 Preparação dos <i>smoothies</i>	30
3.2.2 Análises microbiológicas dos <i>smoothies</i> de frutas durante o armazenamento	30
3.2.3 Parâmetros físico-químicos dos <i>smoothies</i> de frutas durante o armazenamento	31
3.2.4 Determinação de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos <i>smoothies</i> de frutas durante o armazenamento.....	32
3.2.5 Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos <i>smoothies</i> de frutas durante o armazenamento	33
3.2.6 Sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> durante simulação da digestão <i>in vitro</i>	36
3.2.7 Análises estatísticas.....	37
REFERÊNCIAS.....	38
4 RESULTADOS	52
4.1 ARTIGO	52
EFFECTS OF <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-3 METABOLISM ON PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY PARAMETERS OF AÇAÍ AND MANGO-BASED SMOOTHIES AND ITS SURVIVAL FOLLOWING SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS	52
APÊNDICE A	88
APÊNDICE B.....	89
APÊNDICE C	90
APÊNDICE D	91
ANEXO A.....	92
ANEXO B.....	93

1 INTRODUÇÃO

O reconhecimento da relação entre dieta e saúde por parte dos consumidores tem estimulado o consumo de alimentos que possam contribuir além da nutrição básica, os quais são denominados alimentos funcionais (MARTINS et al., 2013). Esses alimentos incluem nutrientes e ou não nutrientes com benefícios comprovados ao organismo humano, a exemplo dos probióticos (ABUAJAH; OGBONNA; OSUJI, 2015).

Definidos como micro-organismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem efeitos positivos ao hospedeiro, os probióticos atuam particularmente na regulação da microbiota intestinal (WHO, 2002). O gênero *Lactobacillus* é um dos mais pesquisados e explorados pela indústria de alimentos, o qual apresenta uma ampla variedade de culturas com alegação probiótica internacionalmente reconhecida, dentre elas o *Lactobacillus acidophilus*, que têm integrado variados estudos nos últimos anos (MARTINS et al., 2013).

Os probióticos representam o maior segmento do mercado de alimentos funcionais, e embora diversas matrizes possam ser utilizadas para a veiculação dessas culturas, a matriz láctea continua sendo a mais explorada e ofertada (KANDYLIS et al., 2016; SHARMA; MISHRA, 2013; VALERO-CASES; FRUTOS, 2017). Entretanto, a elaboração de produtos não lácteos probióticos, representa uma alternativa para alcançar uma maior gama de consumidores, incluindo aqueles com intolerância a lactose, dislipidemias e vegetarianos (GRANATO et al., 2010). Além disso, a ingestão diária de frutas está associada à diminuição do risco de doenças crônico-degenerativas como diabetes, obesidade e alguns tipos de câncer (PICOUET et al., 2016). Nessa perspectiva, o desenvolvimento de bebidas vegetais probióticas vem ao encontro de uma demanda atual dos consumidores por alimentos práticos e saudáveis.

Recentemente, diversos estudos abordaram o uso de sucos de frutas como matriz para a adição de probióticos (BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2015; ESPÍRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; KWAW et al. 2018; MOREIRA et al., 2017). Além de contribuir para a conservação do alimento (DI CAGNO et al., 2011), a fermentação, resultante do metabolismo bacteriano, provoca alterações nos aspectos sensoriais, com destaque para a viscosidade e aroma, e nutricionais dos produtos. Entretanto, essas modificações dependem fortemente da composição do alimento e da atividade metabólica do micro-organismo utilizado (ALVES FILHO et al., 2017).

Dentre as bebidas derivadas de frutas, os *smoothies* são tidos como alimentos saudáveis e têm ganhado popularidade entre os consumidores devido sua ampla aceitação, praticidade e

sabor (TAHMASSEBI; KANDIAH; SUKERI, 2014; PICOUET et al., 2016). Considerados uma tendência em nutrição saudável, essas bebidas apresentam naturalmente em sua composição fibras, vitaminas, minerais e compostos bioativos, a exemplo dos fenólicos (MEDINA, 2011). São alimentos preparados a partir de frutas e/ou legumes, com ou sem adição de outros componentes, que podem apresentar valor nutricional semelhante a uma porção de frutas ou vegetais *in natura* (DI CAGNO et al., 2011).

Smoothies podem representar matrizes adequadas para a adição de culturas probióticas, uma vez que possuem características físico-químicas que se assemelham a das frutas. Estudos que relatam o isolamento de bactérias potencialmente probióticas a partir da microflora epífita das frutas tem sugerido que a adaptação a estes substratos pode facilitar a sobrevivência destas bactérias em sucos e derivados durante o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal (ARGYRI et al., 2013; ASKARI et al., 2012; LI et al., 2014; VITALI et al., 2012).

Frutas tropicais como o açaí (*Euterpe oleracea* M.), que possui elevado conteúdo de compostos fenólicos têm atraído interesse da comunidade científica por suas propriedades bioativas, em especial à antioxidante (RUFINO et al., 2011). Outra fruta tropical que vem recebendo atenção dos consumidores é a manga (*Mangifera indica* L.). Amplamente consumida no Brasil e no mundo, a manga é muito apreciada por seu sabor doce e aroma característico, além de ser fonte de compostos antioxidantes, vitaminas, minerais e fibras (LÓPEZ-COBO et al., 2017). Estas frutas podem representar substratos adequados para o desenvolvimento de *smoothies* para incorporação de probióticos. Entretanto, o conhecimento acerca do potencial do açaí e da manga para tal fim permanece pouco explorado.

Considerando os aspectos supracitados, este estudo teve como objetivos: i) avaliar a sobrevivência da cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-3 durante 28 dias de armazenamento em *smoothies* a base de açaí (AS) e de manga (MS); ii) avaliar o impacto do lactobacilos nas características físico-químicas e sensoriais dos *smoothies* durante o armazenamento; e iii) avaliar a capacidade de sobrevivência da cepa adicionada a SA e SM em condições simuladas do trato gastrointestinal.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS: PROBIÓTICOS

A indústria de alimentos é um dos mais importantes nichos da economia mundial, estando sempre em busca de inovações tecnológicas que atendam satisfatoriamente às necessidades nutricionais, pessoais e sociais dos consumidores. Guiada pela consciência crítica e exigência dos consumidores por uma dieta mais equilibrada e promotora de saúde, a indústria de alimentos têm apresentado um crescimento do segmento de alimentos funcionais em todo o mundo (VELLA et al., 2014). Essa mudança tem repercutido no aumento da competitividade entre os produtores para ocupar espaço nesse setor. (KRAUS, 2015; MANJULA; BHAGATH, 2017). O comércio desses alimentos, de modo geral, é dominado pelos moderadores de saúde intestinal, em especial, os probióticos que são amplamente veiculados por matrizes lácteas (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013).

O Japão foi o primeiro país a empregar a expressão “alimentos funcionais”, sendo resultante de estudos realizados entre 1984 e 1995, acerca da relação entre nutrição, satisfação sensorial e modulação dos sistemas fisiológicos. Os alimentos funcionais passaram a ser aprovados pelo governo japonês como “Food for specified health uses (FoSHU)”, podendo ser comercializados com alegação específica de saúde (SHIMIZU, 2012). Tal designação faz referência a qualquer alimento que contenha ingredientes capazes de promover, além da nutrição básica, um efeito positivo na saúde, desempenho físico ou estado mental de um indivíduo, resultando em um estado de saúde e bem-estar e/ou reduzindo o risco de doenças (MANJULA; BHAGATH, 2017).

O efeito desses alimentos se restringe à promoção de saúde e não à cura de doenças, além disso, devem ser similares em aparência àqueles convencionalmente consumidos na dieta usual da população (BIGLIARDI; GALATI, 2013). A funcionalidade desses produtos tem como base os compostos bioativos que geralmente estão naturalmente presentes na sua composição. Entretanto, por vezes, requerem a adição de um ingrediente específico a fim de otimizar tais propriedades benéficas (FIGUEROA-GONZÁLEZ et al., 2011).

Embora os alimentos funcionais tenham uma definição estabelecida, estes ainda não possuem sistema de regulação unificado internacionalmente (BIGLIARDI; GALATI, 2013). Para a comunidade europeia, os alimentos funcionais são considerados um conceito e não uma

categoria de alimentos. Nos Estados Unidos são regulamentados no mesmo contexto que os alimentos convencionais, sem apresentar definição ou legislação específica. A American Dietetic Association – ADA (2009) defende que todos os alimentos são funcionais em algum nível fisiológico, uma vez que possuem nutrientes ou outras substâncias que fornecem energia, modulam o crescimento ou mantêm processos vitais. Já na Coreia do Sul, diferente da maioria dos países, os alimentos funcionais são comercializados em doses controladas, sendo considerados suplementos dietéticos (NITZKE, 2012). No Brasil, o único país da América Latina que possui legislação bem definida para essa categoria, os alimentos funcionais são regulamentados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, através de resoluções que preveem o registro e a legitimação da alegação de funcionalidade e segurança do produto através de comprovação científica (BRASIL, 1999).

A lista de nutrientes e não nutrientes com alegação de propriedades funcionais aprovada no Brasil é composta por ácidos graxos eicosapentaenoicos (EPA) e docosaexaenoico (DHA), carotenoides, luteína, zeaxantina, fibras alimentares, beta glucana, dextrina resistente, frutooligossacarídeos, goma guar parcialmente hidrolisada, inulina, lactulose, polidextrose, psyllium, quitosana, fitoesteróis, polióis, proteína de soja e probióticos (BRASIL, 2016).

Dentre os integrantes da lista de alimentos funcionais, os probióticos destacam-se como maior segmento de mercado (ANNUNZIATA; VECCHIO, 2013). Estes micro-organismos têm sido utilizado na alimentação humana durante séculos, entretanto, seus efeitos na saúde humana só foram descobertos no início do século XX, quando Eli Metchnikoff, cientista russo, sugeriu que a longevidade saudável dos camponeses búlgaros era resultante do consumo de produtos lácteos fermentados por bactérias ácido lácticas, e que esses micro-organismos agiam positivamente na regulação da microbiota intestinal, suprimindo o crescimento de bactérias proteolíticas (SYNGAY et al., 2016).

Posteriormente, durante a década de 60, o termo probiótico, derivado do grego “pro bios” que significa “para a vida”, foi introduzido por Lilly e Stillwell (1965), referindo-se à um fator de origem microbiológica que estimula o crescimento de outros organismos. Esta designação foi redefinida por Fuller, em 1989, passando a ser correspondente a culturas microbianas que afetam de forma benéfica o hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal (DILNAWAZ, 2011).

Atualmente, o conceito de probiótico internacionalmente aceito foi proposto pela Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura juntamente com a Organização Mundial de Saúde. Neste conceito os probióticos são descritos como micro-

organismos vivos, não patogênicos, capazes de conferir efeito benéfico a saúde de quem os consome, quando ingeridos em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2006).

A microbiota humana é formada por uma grande diversidade de espécies microbianas, alojadas, principalmente, no intestino (URSELL et al., 2012). Essa interação entre a microbiota intestinal e o hospedeiro gera vantagens para ambos, em uma relação de simbiose e comensalidade, onde a alta atividade metabólica dos micro-organismos resulta em um impacto significativo na saúde e bem-estar do indivíduo. Entretanto, com avanço da idade e composição da dieta, ocorrem alterações nas espécies que compõem essa microbiota, sendo tal flutuação na composição do ecossistema intestinal associada a diversas doenças (MARTINEZ; BEDANI; SAAD, 2015).

Neste cenário, os efeitos do consumo de probióticos estão relacionados, principalmente, a distúrbios intestinais e modulação imunológica bem como ao desequilíbrio do ecossistema gastrointestinal, dentre os quais pode-se citar: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota após o uso de antibióticos, controle da população de patógenos, promoção de digestão da lactose, proteção contra diarreia, infecções intestinais e constipação, melhora dos sintomas da síndrome do intestino irritável, estímulo do sistema imune, regulação do colesterol sanguíneo, distúrbios metabólicos e alergias (BUBNOV et al., 2015; HUANG et al., 2014; PAKDMAN et al., 2016).

Outros benefícios resultantes do consumo desses micro-organismos vêm sendo estudados por diversos autores. O efeito protetor que algumas culturas de *Lactobacillus* spp. possuem frente a células cancerígenas foi apresentado por Dallal e colaboradores (2015). Sharma e Shukla (2016) também abordaram essa temática, sugerindo que a administração de metabióticos (metabólitos produzidos por probióticos) pode ter efeito profilático e/ou terapêutico em casos de câncer de cólon. Existe, ainda, evidências de que a suplementação da dieta com essas culturas estaria associada à melhora nos sintomas cognitivos do Alzheimer (AKBARI et al., 2016).

As principais ações das culturas probióticas estão relacionadas às alterações no ecossistema intestinal (KECHAGIA et al., 2013). Entretanto, os mecanismos de ação pelos quais estes micro-organismos exercem seu efeito na saúde humana ainda não estão totalmente elucidados. Sabe-se que os probióticos inibem patógenos enquanto estimulam o crescimento das bactérias anaeróbias benéficas. Além disso, produzem bacteriocinas e ácidos graxos de cadeia curta, reduzem o pH do intestino e competem por nutrientes, beneficiando a função de barreira da mucosa; e modulam o sistema imunológico (WGO, 2011).

A função de defesa da barreira na mucosa intestinal é mantida por diversos mecanismos, entre eles a secreção de muco, composto por mucinas produzidas pelas células tipo cálice. O muco, dentre outras ações, confere proteção contra adesão de patógenos e ação de enzimas e toxinas. Existem evidências de que certas culturas probióticas aumentam a produção de mucina, dificultando a adesão de enterobactérias patogênicas às células intestinais (HARDY et al., 2013).

Além disso, bactérias probióticas produzem uma variedade de substâncias inibidoras de crescimento, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas capazes de atuar não somente na viabilidade, como também na produção de toxinas e no metabolismo de micro-organismos patogênicos (HASSAN et al., 2012). A atividade antagonica de bactérias ácido lácticas, em especial às pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, é descrita por diversos autores. Aoudia e colaboradores (2016) obtiveram resultado positivo ao avaliar o antagonismo de cepas de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus fermentum* frente à *Salmonella enterica* sorovar Enteritidis, *Staphylococcus aureus* e *Listeria monocytogenes*. O mesmo efeito foi observado por Tashakor et al. (2017), quando *Lactobacillus sakei* isolado de carne bovina mostrou ser capaz de inibir o crescimento de *Listeria monocytogenes*.

A produção de ácidos graxos bioativos favoráveis à saúde, como o ácido linoleico conjugado (ALC), é outro exemplo da ação benéfica de alguns micro-organismos. O ALC está associado à diversos efeitos promotores de saúde a nível local e sistêmico, incluindo propriedades anti-carcinogênicas, anti-aterogênicas e anti-adipogênicas (GOUDARZI; GOUDARZI; RASHIDAN, 2014). As culturas de *L. acidophilus* avaliadas por Wei et al. (2014) foram capazes de produzir ALC a partir de ácido linoleico. O mesmo resultado foi encontrado por Renes et al. (2017), quando *L. plantarum* e *L. casei* apresentaram boa capacidade de produção de ALC.

Dentre os efeitos à saúde citados previamente, sabe-se que os mesmos são cepa-dependente, não necessariamente podendo ser generalizados para uma mesma espécie (SYNGAI et al. 2016). Ademais, para ser utilizada em um produto, uma cultura probiótica precisa atender a critérios de segurança, estabilidade e funcionalidade. No que concerne aos aspectos de segurança, as cepas não podem ter histórico de patogenicidade nem estar associadas a outras doenças, não devem apresentar resistência transferível à antibióticos de interesse clínico (GARCIA et al., 2016). As considerações de estabilidade dos probióticos incluem: viabilidade no produto aos qual serão incorporados, resistência aos baixos valores do pH estomacal, sais biliares e ao suco pancreático, capacidade de colonização e sobrevivência *in vivo*. Dentre os critérios funcionais estão: aderência ao epitélio intestinal, antagonismo frente a

bactérias patogênicas, estimulação das bactérias benéficas, estimulação imunológica e efeitos clínicos no hospedeiro (SOCCOL et al., 2010).

Embora diversas culturas tenham alegação probiótica, a citar *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Bacillus*, *Saccharomyces*, *Candida* e *Aspergillus*, as bactérias do gênero *Lactobacillus* estão entre os micro-organismos probióticos mais pesquisados e utilizados pela indústria de alimentos (BERNARDEAU E VERMOUX, 2013; DIDARI et al., 2014; FIJAN, 2014). As bactérias pertencentes a este gênero são bastonetes Gram positivos, imóveis, não formadoras de esporos e catalase negativa. Caracterizam-se como homofermentativas pois produzem ácido lático como principal produto resultante do metabolismo dos carboidratos (FORSYTHE, 2013).

Dentre os lactobacilos estudados, o *L. acidophilus* é uma espécie amplamente reconhecida como potencialmente probiótica, possuindo atributos comprovados por diferentes estudos (DALLAL et al., 2015; HUANG et al., 2014; SINN et al., 2008). Apesar de uma maior disseminação dessa espécie em produtos lácteos, diferentes estudos têm mostrado sua viabilidade em matrizes vegetais. Vasconcelos e colaboradores (2014) incorporaram culturas de *L. acidophilus* e inulina em açaí congelado, obtendo boa viabilidade e representando uma alternativa de novo produto funcional. Ao ser incorporada em chocolate meio amargo, *L. acidophilus* LA-03 manteve-se viável por 120 dias a 25 °C. Ainda, essa matriz apresentou efeito protetor para a sobrevivência da cepa durante simulação das condições gastrointestinais (SILVA et al., 2017). Matias et al. (2016) adicionaram *L. acidophilus* LA-5 em sorvete de maçã produzido com leite de soja e analisaram a viabilidade dessa cultura quando mantida a -18 °C durante 84 dias. Ao final do armazenamento, o probiótico apresentou contagem de células viáveis superior a 7,5 log UFC/g. Dentre os produtos nos quais *L. acidophilus* já apresentou resultados satisfatórios de sobrevivência destacam-se: suco de laranja (SOHAIL et al., 2012) e bebida mista de cereais, legumes e leite de soja (MRIDULA; SHARMA, 2015), suco de cenoura com laranja (VALERO-CASES; FRUTOS, 2017) e suco de amora (KWAW et al., 2018).

2.2 AÇAÍ (*Euterpe oleracea* M.) E MANGA (*Mangifera indica* L.)

As frutas tropicais são uma fonte atrativa de vitaminas, minerais e fibras e têm seu consumo aumentado em todo o mundo. O Brasil é um dos maiores produtores mundiais de fruta

tropicais, onde dentre as principais espécies produzidas para o mercado interno e externo destacam-se a manga (*Mangifera indica* L.), abacaxi (*Ananas comosus*), abacate (*Persea americana*), banana (*Musa acuminata*) e papaia (*Carica papaya*) (OCDE/FAO, 2015). O Brasil também abriga um número considerável de espécies frutíferas tropicais exóticas, a exemplo do açaí (*Euterpe oleracea* M.) que é produzido na região da Amazônia e apresenta grande potencial para exploração comercial devido suas características sensoriais e valor nutricional (MALTA et al., 2013; RAWSON et al., 2011).

O açaí é o fruto do açaizeiro (*Euterpe oleracea* M.), palmeira nativa da região Amazônica, a qual pode atingir 15 a 30 metros de altura e produzir três a quatro cachos com três a seis quilos de frutos cada. Os frutos de formato esférico, com peso de dois a três gramas, possuem uma única semente cercada por uma fina camada de celulose e coberta por casca de cor púrpura quase preta quando madura (DEL POZO-INSFRAN; BRENES; TALCOTT, 2004). O açaí não é consumido *in natura*, mas sim após o pré-processamento de extração da polpa com adição de água, resultando em uma bebida espessa, de textura cremosa e sabor característico (EMBRAPA, 2006).

De acordo com a legislação vigente, polpa de açaí é o produto extraído da parte comestível de frutas frescas, sãs e maduras, livres de terra, sujidades, parasitas e micro-organismos que tornem o produto impróprio para consumo, após amolecimento por processo tecnológico adequado (BRASIL, 2016). A extração da polpa pode ser realizada de forma mecânica ou manual. O despulpamento manual, amplamente disseminado entre a população ribeirinha das regiões de plantio do açaizeiro, é um processo lento e inviável para produção em escala industrial, onde os frutos são imersos em água à temperatura ambiente durante uma hora, despulpados e filtrados. A extração mecânica, utilizada para a produção de polpa de açaí pelas indústrias, é realizada com uso de despulpador elétrico, resultando em maior atrito entre os frutos e rápida obtenção da polpa (EMBRAPA, 2006).

Conforme são adicionados ou não de água, o açaí pode ser classificado em: a) Polpa de açaí: polpa extraída do açaí, sem adição de água, por processo mecânico e sem filtração, a qual pode ser submetida à processo físico de conservação, b) Açaí grosso ou especial (tipo A): polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando teor de sólidos totais acima de 14% e de aparência muito densa, c) Açaí médio ou regular (tipo B): polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando teor de sólidos totais entre 11 e 14% e de aparência densa, d) Açaí fino ou popular (tipo C): polpa extraída com adição de água e filtração, apresentando teor de sólidos totais entre 8 e 11% e aparência pouco densa (BRASIL, 2016).

Nos últimos anos, houve um aumento notável no consumo de açaí, ampliando não só para outras regiões do Brasil que não a Norte, como também para países da Europa, Estados Unidos, China e Japão (YAMAGUCHI et al., 2015). A produção desse fruto é um importante pilar para a economia da região Norte do Brasil. Segundo dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), no ano de 2016 o Brasil produziu aproximadamente 215 mil toneladas do fruto de açaí, sendo aproximadamente 50% da produção proveniente do estado do Pará (IBGE, 2016). Um dos aspectos mais relevantes para o crescimento do consumo de açaí são os relatos de seus benefícios à saúde na literatura científica. Quimicamente, os frutos da espécie *E. oleracea* são compostos de diversas substâncias bioativas, como compostos fenólicos, quinonas, terpenos e ácidos graxos essenciais (YAMAGUCHI et al., 2015).

Os compostos fenólicos são amplamente distribuídos na natureza em matrizes vegetais. Eles são metabólitos secundários dos frutos, provenientes da fenilalanina, estando incluso nesse grupo uma grande diversidade de compostos de estruturas simples e complexas. Além de serem bioativos e contribuírem para o valor nutricional dos frutos, os fenólicos interferem na qualidade sensorial, sendo parcialmente responsáveis pela cor, sabor e aroma dos frutos (HOLLMAN, 2001).

As antocianinas, presentes em grande quantidade no açaí, são compostos fenólicos com atividade antioxidante, pertencentes à classe dos flavonoides, que conferem a cor roxa característica do açaí (PACHECO-PALENCIA; DUNCAN; TALCOTT, 2009). Cianidina 3-glicosídeo e cianidina-3-rutenosídeo são as antocianinas encontradas em maior quantidade no fruto do açaí maduro (CARVALHO et al., 2017; GORDON et al., 2012). Em estudo realizado por Peixoto et al. (2016), as antocianinas extraídas de açaí, além de significativa atividade antioxidante, apresentaram capacidade neuroprotetora em *Caenorhabditis elegans*, sugerindo que o açaí, assim como outras frutas ricas nesses compostos, poderia desempenhar um papel benéfico na prevenção ou controle de doenças neurodegenerativas.

Além das antocianinas, outros antioxidantes estão presentes no açaí. Em estudo realizado com polpa de açaí, Rufino e colaboradores (2011) relataram alto teor de polifenóis (com capacidade antioxidante) e de fibras dietéticas. Em concordância com a literatura, no que se diz respeito ao açaí como fonte de antioxidantes, Gordon et al. (2012) quantificaram 15 compostos fenólicos (flavonoides e ácidos fenólicos) no fruto do açaí maduro.

Assim como o açaí, a manga é uma importante fonte não somente de macro e micronutrientes, mas também de compostos promotores de efeitos benéficos à saúde humana. Os compostos fenólicos, carotenoides e vitamina C são as substâncias bioativas com capacidade antioxidante encontradas em maior quantidade nas mangas (MA et al., 2011).

Um dos frutos tropicais de maior importância econômica, a manga é apreciada por suas características de sabor e aroma, além do seu alto valor nutricional (IBARRA et al., 2015). São amplamente consumidas em sua forma fresca, entretanto seu consumo na forma de produtos desenvolvidos como sucos, néctares, fatias em conserva e “*chutneys*” têm aumentado nos últimos anos (LÓPEZ-COBO et al., 2017).

Segundo relatório bianual sobre o mercado global de alimentos elaborado pela FAO (2017), em 2017, as exportações mundiais de manga foram de cerca de 1,5 milhões de toneladas, representando um aumento de 6,3% em relação ao ano de 2016. Os principais importadores desses frutos são Estados Unidos e Europa, representando 31% e 27% da importação mundial, respectivamente. Esses números sugerem uma disponibilidade per capita de 1,3 kg de manga nos EUA e 0,8 kg na Europa. Ainda de acordo com o mesmo documento, em 2017, o Brasil produziu aproximadamente 904 mil toneladas desse fruto, sendo 227 mil toneladas destinadas à exportação, tornando-se o segundo maior país exportador de manga do mundo.

Diversos estudos relatam o perfil de fenólicos em diferentes espécies de mangas. López-Cobo e colaboradores (2017) realizaram a determinação de fenólicos hidrofílicos e lipofílicos em 3 cultivares de manga, identificando aproximadamente 90 compostos diferentes. Eles observaram ainda que a maior concentração de fenólicos livre se encontrava na casca, seguido pela semente e polpa. Os ácidos fenólicos gálico, siríngico e ferúlico; e os flavonoides rutina, quercitina e kaempferol foram encontrados nas cascas de dois cultivares de manga em estudo realizado por Ajila e Rao (2013). Quatorze compostos fenólicos foram identificados na polpa de manga Ataúlfo, sendo os ácidos clorogênico, gálico e vanílico os mais abundantes (PALAFOX-CARLOS; YAHIA; GONZÁLEZ-AGUILAR, 2012).

Apesar da capacidade antioxidante, proveniente, principalmente, dos compostos fenólicos, ser a bioatividade mais disseminada e estudada da manga, outras propriedades terapêuticas desses frutos têm sido investigadas, como poder antimicrobiano, anti-inflamatório, anticarcinogênico e antidiabético (ASIF et al., 2016). Vega-Vega e colaboradores (2013) avaliaram a capacidade antioxidante e antimicrobiana de extratos obtidos das diferentes partes de três variedades de mangas frescas, demonstrando a possibilidade da aplicação dos extratos como agentes antimicrobianos e antioxidantes. A mangiferina, uma xantona com alta atividade antioxidante, retardou a progressão de nefropatia diabética em ratos, evidenciando efeito nefroprotetor, em estudo realizado por Wang et al. (2018). Esse mesmo polifenol apresentou papel protetor em lesão de isquemia cerebral em ratos Wistar, sendo o efeito associado à

estimulação do sistema de defesa através da inibição da produção de citocinas inflamatórias e melhora na capacidade antioxidante (YANG et al., 2016).

2.3 BEBIDAS A BASE DE FRUTAS COMO MATRIZES PARA INCORPORAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A acentuada expansão de alimentos probióticos no mercado mundial têm resultado na busca por matrizes não-lácteas para a elaboração destes produtos (KUMAR; VIJAYENDRA; DERRY, 2015). Devido a crescente conscientização do papel da dieta na manutenção da saúde, o uso de frutas e vegetais como ingredientes principais para o desenvolvimento de bebidas probióticas atende a atual demanda dos consumidores por alimentos que contribuam para além da nutrição básica (KANDYLIS et al., 2016).

Alguns estudos têm relatado que o baixo pH e a presença de compostos fenólicos são fatores que limitam a sobrevivência dos probióticos em sucos de fruta (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Entretanto, por apresentarem elevados teores de fibras, vitaminas e minerais, estes produtos também têm sido sugeridos como substratos adequados para desenvolvimento de novos produtos incorporados de probióticos. Uma das vantagens da incorporação de probióticos em sucos de fruta é a rápida passagem dos sucos pelo estômago, diminuindo o tempo de exposição dos micro-organismos probióticos à acidez elevada e, resultando em maior viabilidade no hospedeiro (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Frutas como laranja, maçã, uva, melão, caju, manga, pera e abacaxi têm sido utilizadas para a elaboração de bebidas probióticas (COSTA et al., 2013; ESPÍRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; MOREIRA et al., 2016; ALVES FILHO et al., 2017). Em estudo realizado por da Costa e colaboradores (2017), *Lactobacillus paracasei* (*L. casei*-01) manteve-se viável em suco de laranja, apresentando contagens superiores a 8 log UFC/mL durante 28 dias de armazenamento refrigerado (4 °C). Gandomi et al. (2016) avaliaram a viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e encapsulado em suco de maçã durante 90 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. Os pesquisadores observaram maior taxa de sobrevivência da cepa quando encapsulada, entretanto, a cultura manteve-se viável durante todo o armazenamento em ambas as formas estudadas.

Misturas de sucos de frutas e vegetais também têm sido estudadas como matrizes alternativa para incorporação de probióticos. Sharma e Mishra (2013) avaliaram a viabilidade

de *L. plantarum* NCDC 414 e *L. acidophilus* NCDC 11 em bebida de melão, abóbora verde e cenoura durante 4 semanas de armazenamento refrigerado a 4 °C. No período do estudo, *L. plantarum* and *L. acidophilus* apresentaram contagens de células viáveis superiores a 7 log UFC/mL e de aproximadamente 5 log UFC/mL, respectivamente. Todavia, em outro estudo, *L. acidophilus* CECT 903 (ATCC4356) apresentou contagens de aproximadamente 8 Log UFC/mL em suco e néctar de cenoura e laranja durante 40 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) (VALERO-CASES E FRUTOS, 2017). A viabilidade de cepas distintas da mesma ou de espécies diferentes em matrizes vegetais tem sido associada principalmente aos fatores intrínsecos do alimento como pH, atividade de água, oxigênio molecular e composição bioquímica, bem como à capacidade de cada cepa de utilizar os nutrientes do meio em que se encontra (TRIPATHI; GIRI, 2014). Assim desenhos experimentais de novos alimentos probióticos devem considerar a viabilidade da cepa em estudo na matriz proposta para incorporação.

Além dos sucos, bebidas de frutas do tipo *smoothies* vem ganhando espaço crescente no mercado, consumidor pois são percebidas como alimentos saudáveis pelos consumidores. São bebidas não alcóolicas, mistas, de consistência cremosa, preparadas a partir de frutas e/ou vegetais frescos ou congelados, podendo incluir em sua composição outros ingredientes como leite, iogurte, suco ou chá (RODRÍGUEZ-VERÁSTEGUI et al., 2016).

Por apresentarem níveis consideráveis de substâncias antioxidantes, vitaminas e fibras naturalmente presentes na fruta base da bebida, os *smoothies* unem conveniência, sabor e frescor, representando uma opção para obtenção dos benefícios decorrentes do consumo de frutas (TAHMASSEBI; KANDIAH; SUKERI, 2014; PICOUET et al., 2016). Devido a sua composição nutricional, essas bebidas podem ser explorados como matriz para a veiculação de culturas probióticas. Na literatura são escassos os estudos envolvendo a elaboração de *smoothies* com culturas probióticas. Di Cagno et al. (2011) avaliaram o efeito do metabolismo de *L. plantarum* Pr3, *L. plantarum* K3, *L. plantarum* F6 e *L. pentosus* P1 isolados de frutas em *smoothies* de cereja, tomate, amora e ameixa, e de kiwi, espinafre, erva-doce e papaia. Durante 30 dias de armazenamento, ambas as cepas avaliadas mantiveram as contagens em aproximadamente 9 log UFC/mL. Alguns estudos que envolveram o desenvolvimento de *smoothies* ou bebidas similares em consistência, geralmente descritas como “purê”, formuladas com diferentes frutas ou avaliação de aspectos tecnológicos destas bebidas estão apresentados no Quadro 1.

Quadro 1. Estudos envolvendo aspectos tecnológicos de *smoothies*.

Formulação do smoothies	Aspectos estudados	Principais resultados	Referência
Tomate, pimentão vermelho, brócolis e cenoura	Efeito do tratamento térmico (80 °C/30 min) na atividade enzimática e nos componentes bioativos durante o armazenamento a 5 °C e 20 °C.	O tratamento térmico resultou em inativação das enzimas polifenoloxidase, peroxidase e pectinametilesterase durante 40 dias quando armazenados a 20 °C e 58 dias a 5 °C. Além disso, o tratamento térmico não induziu alteração na capacidade antioxidante e no conteúdo total de fenólicos das bebidas.	RODRÍGUEZ-VERÁSTEGUI et al. (2016)
Uva e mirtilo	Absorção e biodisponibilidade de antocianinas e ácidos fenólicos provenientes do consumo de <i>smoothie</i> e sucos por homens e mulheres com idade entre 23 e 27 anos	Nos testes in vivo, as antocianinas apresentaram maior biodisponibilidade em <i>smoothie</i> do que no suco, que foram sugeridos como fonte de compostos bioativos promotores de saúde	KUNTZ et al. (2015)
Maçã, morango, banana e laranja	Efeito do tratamento térmico (80 °C/7 min) e processamento de	O tratamento de alta pressão resultou em maior preservação dos parâmetros sensoriais	PICOUET et al. (2016)

	alta pressão (350 Mpa/5 min) nos parâmetros físico-químicos, microbiológicos e sensoriais do <i>smoothie</i> durante 21 dias de armazenamento refrigerado (4 °C)	comparado ao tratamento térmico, entretanto, não reduziu a atividade de enzimas oxidativas.	
Cereja e suco de maçã, pera e marmelo	Alterações ocorridas nos atributos sensoriais, nos teores de compostos fenólicos e na atividade antioxidante de formulações de <i>smoothies</i> com diferentes teores de sucos durante seis meses de armazenamento refrigerado (4 °C)	Os <i>smoothies</i> com maiores concentrações de suco de marmelo e de maçã apresentaram alto teor de fenólicos e atividade antioxidante. A análise dos atributos sensoriais caracterizou as bebidas como atrativas.	NOWICKA et al. (2016)
Maçã, cenoura, laranja, folhas de beterraba e suco de laranja	Otimização dos parâmetros de tempo e temperatura do processamento de alta pressão objetivando a inativação de micro-	Os resultados evidenciaram a eficácia do processamento utilizado, onde o tratamento com alta pressão reduziu a contagem de micro-organismos	FERNANDEZ et al. (2018)

	organismos e enzimas.	deteriorantes e a atividade enzimática. Além disso, não houveram alterações nos parâmetros de qualidade físico-química avaliados, sugerindo que a utilização de 627,5 MPa/6,4 min resultaria em um produto com elevada qualidade.	
Pepino, brócolis, repolho roxo, uvas roxas e açúcar de beterraba	Avaliação por meio de modelos matemáticos do comportamento de diferentes concentrações de inóculo de <i>Listeria monocytogenes</i> em <i>smoothies</i> e em meio de cultura armazenados a 5, 10, 15 e 25 °C, em diferentes valores de pH	Os <i>smoothies</i> armazenados em temperaturas acima de 10 °C apresentaram contagens <i>L. monocytogenes</i> entre 7 e 8 log UFC/mL, enquanto no meio de cultura essa bactéria foi detectada somente na temperatura de 25 °C. Os resultados obtidos podem permitir a projeção de modelos matemáticos que predizem condições seguras para a produção de <i>smoothie</i>	GONZÁLEZ-TEJEDOR et al. (2018)

Considerando as informações apresentadas na presente revisão, estudos que avaliem bebidas tipo *smoothies* de frutas como matrizes para incorporação de culturas probióticas

podem contribuir para a geração de novos alimentos probióticos não lácteos, atendendo uma demanda crescente do mercado de alimentos funcionais.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 MATERIAIS

Os experimentos foram conduzidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos, Centro de Tecnologia, Universidade Federal da Paraíba (UFPB); no Laboratório de Técnica Dietética, Departamento de Nutrição, Centro de Ciências da Saúde, UFPB; e no Laboratório de Química de Alimentos – LAQA, Departamento de Engenharia de Alimento, Centro de Tecnologia, UFPB.

3.1.1 Cepa teste e condições de crescimento

A cultura probiótica comercial liofilizada de *L. acidophilus* LA-3 foi selecionada para esse estudo por ser reconhecida como probiótico (SILVA et al., 2017), sendo obtida junto à Sacco (Campinas, Brasil). A cepa estoque foi mantida sob congelamento a -18 °C em caldo Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, Índia) contendo glicerol a 20% (v/v) (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA). Para obtenção do inóculo, culturas crescidas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda, Wade Road, UK) durante 24 h à 37 °C em caldo MRS foram suspensas em solução salina estéril (0,85% de NaCl v/v). Após a suspensão, as culturas foram centrifugadas (4500 g/ 15 minutos, 4 °C), lavadas duas vezes com solução salina estéril e após nova centrifugação o pellet foi ressuspensão, obtendo-se densidade óptica (OD_{660 nm}) de 1,5 (absorbância) correspondente a contagem de células viáveis de aproximadamente 9 log.UFC/mL (DE ALBUQUERQUE et al., 2017).

3.1.2 Água de coco, frutas e polpas de frutas

As frutas banana (*Musa paradisiaca* L.) e maracujá (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*), comprados em comércio local (João Pessoa, Brasil), foram selecionados quanto à uniformidade de tamanho e coloração, ausência de danos mecânicos aparentes e sinais visíveis de infecção.

A superfície de cada fruto foi sanitizada por imersão durante 5 minutos em solução de hipoclorito de sódio (150 ppm, pH 7,2, ajustado usando NaOH 1 mM/L), seguido por lavagem com água destilada esterilizada e secagem em cabine de biossegurança por 30 minutos. As polpas de açaí (*Euterpe oleracea* M.) e manga (*Mangifera indica* L.) foram adquiridas logo após o processamento industrial (Pé de fruta[®], João Pessoa, Brasil).

3.2 MÉTODOS

3.2.1 Preparação dos *smoothies*

Foram produzidas duas formulações de *smoothies* sob mesmas condições de processamento. O *smoothie* à base de açaí (SA) foi preparado com banana em uma proporção 80:20 (v/v), enquanto o *smoothie* à base de manga (SM) foi formulado com maracujá em uma proporção de 60:40 (v/v). Para tal, as frutas foram descascadas assepticamente, picadas e misturados com água de coco resfriada da Aqua-coco[®] (Maxaranguape, Rio Grande do Norte, Brasil) (proporção 2:1) usando um liquidificador doméstico por 3 min. O °Brix mínimo da polpa de banana foi de 18 e o de maracujá foi de 11, estando de acordo com o limite estabelecido pela legislação brasileira para polpas de frutas (BRASIL, 2016). Posteriormente, as polpas elaboradas foram homogeneizadas juntamente com polpas comerciais nas proporções previamente citadas utilizando um liquidificador doméstico por 3 minutos. Os SA e SM foram distribuídos em frascos de vidro estéreis de 250 mL, pasteurizados durante 10 min à 80 °C, resfriados até temperatura ambiente e adicionados dos inóculos ajustados de *L. acidophilus* LA-3 (contagens viáveis finais de 9 log UFC/mL) e armazenados a 4 °C. *Smoothies* não adicionados de *L. acidophilus* LA-3 foram preparados de forma semelhantes e usados como controle.

3.2.2 Análises microbiológicas dos *smoothies* de frutas durante o armazenamento

As células viáveis de *L. acidophilus* LA-3 foram enumeradas nos *smoothies* nos dias 0 (imediatamente após a preparação), 1, 7, 14, 21 e 28 do armazenamento refrigerado a 4 °C. Para

cada tempo de armazenamento pré-estabelecido, uma alíquota de 25 g foi homogeneizada em 250 mL de solução salina (0,85% de NaCl) utilizando um vórtex durante um minuto e diluída em série (10^{-1} - 10^{-8}) com o mesmo diluente. Posteriormente, alíquotas de 20 μ L foram distribuídas em ágar MRS utilizando a técnica de microgota (HERIGSTAG; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas a 37 °C durante 48 h em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e os resultados das contagens foram expressos em log UFC/mL. Nos mesmos intervalos de tempo das contagens de *L. acidophilus* LA-3 os *smoothies* foram analisados quanto à segurança e higiene microbiológica em relação aos padrões exigidos pela legislação brasileira (IN 12, 2001) e europeia (EC 1441, 2007), através do teste de presença/ausência de *Salmonella* spp. e enumeração de coliformes termotolerantes (Número Mais Provável/mL), seguindo procedimentos descritos pela APHA (2001).

3.2.3 Parâmetros físico-químicos dos *smoothies* de frutas durante o armazenamento

Os parâmetros cor, viscosidade, pH, acidez titulável (AT) e sólidos solúveis totais (SST) dos *smoothies* foram medidos nos dias 0 (imediatamente após a preparação), 1, 7, 14, 21 e 28 do armazenamento refrigerado, seguindo procedimento padrão (AOAC, 2016). O colorímetro CR-300 (Minolta Co., Osaka, Japão) foi utilizado para avaliação instrumental da cor, através da determinação dos parâmetros L^* , a^* e b^* , onde L^* representa a luminosidade e a^* e b^* as coordenadas cromáticas, seguindo o sistema CIE lab (CIE, 1986). Os valores de L^* , a^* e b^* foram também convertidos em ΔE (diferença total de cor) utilizando a equação 1 (DI CAGNO et al., 2011). A viscosidade aparente foi determinada a 50 rpm em viscosímetro (modelo VT550, Thermo Haake, Karlsruhe, Alemanha) equipado com spindle nº 3 e expressa em mPa.s (MARKOWSKI et al., 2017). Os valores de pH foram determinados utilizando pHmetro digital calibrado (Quimis, São Paulo, Brasil) (981. 12), AT foi medida pela titulação de 5g das amostras diluídas em água destilada com NaOH 0,1 N (expresso em porcentagem de ácido cítrico), utilizando a fenolftaleína como indicador (942. 15) e SST (°Brix) foi medido usando refratômetro digital (HI 96801, São Paulo, Brasil) a 25 ± 1 °C seguindo (932.12).

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

Equação 1.

3.2.4 Determinação de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos nos *smoothies* de frutas durante o armazenamento

Extratos solúveis em água dos *smoothies* de frutas foram obtidos imediatamente após a preparação (dia 0) e nos dias 1, 14 e 28 do armazenamento refrigerado para a quantificação de açúcares (maltose, glicose e frutose) e ácidos orgânicos (cítrico, láctico, málico, succínico e tartárico). A duração do intervalo de tempo para estas análises foi definida como 14 dias considerando resultados de experimentos preliminares os quais mostraram mudanças não significativas nos teores de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos em intervalos mais curtos (dados não apresentados). Para a obtenção dos extratos, as amostras de cada *smoothie* foram diluídas em 20 mL de água ultrapura e homogeneizadas por 10 minutos utilizando mini-Turrax. Após centrifugação (4000 g x 15 min x 4 °C) as amostras foram filtradas através de filtro Millex de 0,45 µm (Millipore Co., Bedford, MA). A determinação dos açúcares e ácidos orgânicos foi realizada em um cromatógrafo líquido Agilent (modelo 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, EUA) acoplado com um detector de disposição de diodo (DAD) e um detector de índice de refração (DIR) seguindo metodologia descrita por Coelho et al. (2018). As condições analíticas foram: coluna Agilent Hi-Plex H (7,7 x 300 mm, 8 µm); fase móvel H₂SO₄ 4 mmol/L em água ultrapura (tempo de retenção 0,5 mL/min).

Para a quantificação do perfil de compostos fenólicos, as amostras de *smoothies* foram diluídas em metanol a 30% (v/v) e filtradas em filtros de polipropileno de 0,45 µm (Chromafil® Xtra, Macherey-Nagel, Alemanha) e 20 µL foram injetados de acordo com metodologia de Padilha et al. (2017) com modificações. A separação cromatográfica para os compostos fenólicos foi realizada em coluna Zorbax Eclipse Plus RP-C18 (100 x 4,6 mm, 3,5 µm) e pré-coluna Zorbax C18 (12,6 x 4,6 mm, 5µm). A temperatura da coluna foi ajustada para 35 °C. As fases móveis foram: água acidificada com ácido fosfórico 0,1 M (pH = 2,0, fase A) e metanol acidificado com 0,5% de ácido fosfórico (fase B); com tempo de retenção de 0,8 mL/min. A detecção ocorreu no DAD e as aquisições dos dados foram realizadas usando software OpenLAB CDS ChemStation Edition™ (Agilent Technologies).

Os picos cromatográficos das amostras de açúcares, ácidos orgânicos e compostos fenólicos foram identificados comparando o tempo de retenção obtido de padrões externos. As amostras foram injetadas em duplicata e as áreas médias dos picos foram utilizadas para quantificação.

3.2.5 Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos *smoothies* de frutas durante o armazenamento

A ADQ foi realizada seguindo o método descrito por Stone e Sidel (1993). Para a realização, o presente estudo teve a aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital Universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba sob o número de protocolo 79489917.6.0000.5183 (Anexo A).

O teste foi realizado em cinco etapas, a saber: recrutamento, seleção dos provadores, desenvolvimento da terminologia descritiva, treinamento e avaliação das amostras.

3.2.5.1 Recrutamento de provadores e pré-seleção

Para a aplicação da ADQ, foi realizado inicialmente um recrutamento de 20 provadores, com idade média de 25 anos, todos não fumantes, os quais demonstraram interesse em participar da pesquisa e dispunham de tempo e afinidade pelo produto.

Foi realizado teste triangular (figura 1), aplicado aos 20 provadores, para verificar sua sensibilidade ao gosto ácido (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). Para tal, foram utilizadas soluções de ácido cítrico com concentrações de 0,07% e 0,14%. Os provadores receberam três amostras contendo 25 mL de cada solução, ofertadas em copos plásticos descartáveis (TOLEDO, 2013).

Figura 1 Ficha utilizada para teste triangular

TESTE TRIANGULAR		
NOME: _____ DATA: ____/____/____		
Você está recebendo três amostras codificadas. Duas são iguais e uma é diferente. Por favor, prove as amostras da esquerda para a direita com intervalo de 20 segundos entre elas e indique a amostra DIFERENTE, fazendo um círculo ao redor do código.		
_____	_____	_____

O teste foi conduzido em cabines individuais, sob luz branca, longe de ruídos e odores. Os painelistas foram informados que duas soluções eram iguais e uma era diferente. Foi solicitado que a prova das amostras ocorresse da esquerda para a direita e que se identificasse a amostra diferente.

Em seguida, foi realizado o teste de reconhecimento de gostos básicos (Figura 2). Para essa etapa, foram ofertadas 25 mL de soluções quimicamente puras dos gostos básicos, a saber: doce (2% de sacarose), ácido (0,07% de ácido cítrico), salgado (0,2% de cloreto de sódio) e amargo (0,07% de cafeína) (TOLEDO, 2013).

Figura 2 Ficha utilizada para o teste de reconhecimento de gostos básicos

RECONHECIMENTO DE GOSTOS BÁSICOS	
NOME: _____ DATA: ____/____/____	
Você está recebendo uma série de amostras apresentando os sabores básicos: doce, salgado, amargo e ácido. Prove cada solução da esquerda para a direita e identifique o gosto da solução de cada copo codificado. Enxague a boca com água antes e degustar e também entre uma amostra e outra, e aguarde alguns segundos para provar a próxima solução.	
CÓDIGO	GOSTO
_____	_____
_____	_____
_____	_____
_____	_____

Por fim, foi avaliada a habilidade dos provadores no uso de escalas não estruturadas através da expressão de proporcionalidade (Anexo B). Um total de 15 provadores, os quais obtiveram 100% de acerto em todos os testes, foram selecionados para a próxima etapa.

3.2.5.2 Levantamento e agrupamento dos termos descritores

O levantamento da terminologia descritiva foi definido apresentando as amostras de *smoothie* SA, SM e seus respectivos controles, aos pares, juntamente com uma ficha de avaliação (MOSKOWITZ, 1983). Os provadores foram solicitados a descrever as similaridades e diferenças entre os pares apresentados.

Após cada provador ter criado seus próprios termos, foi realizada uma discussão em grupo sob supervisão de um moderador. Ao final, foi elaborada uma lista consensual de atributos que melhor descreviam o produto, considerando os descritores que apareceram o maior número de vezes, eliminando os termos sinônimos ou redundantes e ainda os que apareceram em menor frequência, juntamente com materiais de referência para servir de apoio na avaliação das amostras (apêndice A). Com os termos descritores foi gerada uma ficha descritiva, associando os termos a escala não estruturada de nove centímetros ancoradas nos extremos esquerdo/direito (pouco/muito) (apêndice B). Essa etapa foi realizada em 4 sessões.

3.2.5.3 Treinamento e seleção dos provadores

Os provadores pré-selecionados foram treinados com as amostras de *smoothie* SA e SM e seus controles, as referências e com a ficha de avaliação em 6 sessões de uma hora de duração, cada.

Após o treinamento, uma nova seleção dos provadores foi realizada, a fim de verificar se os mesmos apresentavam boa discriminação entre as amostras, boa reprodutibilidade e resultados consensuais juntamente com a equipe. Nessa seleção, as amostras de *smoothies* foram avaliadas através da ficha de avaliação elaborada para a ADQ, sendo permitido consultar a qualquer momento a lista de definições e referências. Os resultados dessa etapa foram submetidos à análise de variância (ANOVA) utilizando o programa SigmaStat 3.5. Foram selecionados para compor a equipe descritiva final aqueles provadores que demonstraram bom poder discriminativo ($p_{amostra} < 0,05$) e boa reprodutibilidade nos julgamentos ($p_{repetição} > 0,05$).

3.2.5.4 Avaliação das amostras por ADQ

Doze provadores selecionados avaliaram as amostras de *smoothies* de acordo com os atributos previamente definidos como mais característicos. Essa etapa foi realizada em 5 sessões, onde 20 mL das amostras foram servidas de forma aleatória, em copos plásticos com capacidade para 50 mL, codificados com números de três dígitos, aleatórios, monadicamente. As análises foram feitas em cabines individuais, em ambiente com iluminação e temperatura controladas e longe de ruídos.

3.2.6 Sobrevivência de *L. acidophilus* durante simulação da digestão *in vitro*

A cultura de *L. acidophilus* incorporada em SA, SM ou caldo MRS (contagens viáveis finais de 9 log UFC/g ou mL) foi exposta às condições gastrointestinais simuladas após 24h do preparo, de acordo com o descrito por De Albuquerque et al. (2017). Cada etapa desse experimento está descrita na tabela 1, incluindo os compostos usados e os intervalos de tempo. Inicialmente, 25 mL de cada amostra foi exposta às condições esofágicas e gástricas, onde 25mg/mL de pepsina (Sigma-Aldrich) foi adicionada em alíquotas iguais a cada passo dessa fase. Paralelamente, o pH do meio foi gradativamente diminuído até 2,0 usando HCl 1M. O duodeno foi simulado utilizando 2g/L de pancreatina (Sigma-Aldrich) e 12g/L de sais de bile (Sigma-Aldrich). Por fim, o pH foi aumentado até 6,5 utilizando solução de NaHCO₃ 0,1 M, simulando o íleo. *Smoothies* de frutas e caldo MRS inoculados com LA-3 mantidos a 37 °C sem exposição às simulações foram usados como controle.

Todas as soluções enzimáticas foram preparadas minutos antes de serem usadas, sendo mantidas em banho de gelo durante as etapas da simulação. Foi utilizada agitação mecânica para simular os movimentos peristálticos e as amostras foram mantidas durante todo o teste em temperatura de 37 °. Após cada fase da simulação, uma alíquota de 100 µL de cada *smoothies* ou caldo MRS e seus respectivos controles foi diluída serialmente em solução salina (0,85% de NaCl), plaqueada em ágar MRS e incubada por 48 horas a 37 °C em condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid). As células viáveis foram enumeradas como descrito no item 2.4.

Tabela 1Condições usadas em cada fase da simulação gastrointestinal dos *smoothies*

Fase	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH final	Tempo de exposição (min)
Esôfago-estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
			2,0	20
Duodeno	Pancreatina + sais de bile	45	5,0	30
Íleo		45	6,5	60

3.2.7 Análises estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes e os resultados foram expressos como média dos ensaios. A análise estatística foi realizada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre amostras, utilizando ANOVA seguido pelo teste Tukey ou teste t de Student. A Análise de Componentes Principais (PCA) foi realizada para integrar dados sensoriais e físicoquímicos significativos. A análise estatística foi realizada utilizando o software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, Califórnia).

REFERÊNCIAS

- ABUAJAH, C. I.; OGBONNA, A. C.; OSUJI, C. M. Functional componentes and medicinal properties of food: a review. **Journal Food Science and Technology**, v. 52, n. 5, p. 2522-2529, 2015.
- AJILA, C. M.; RAO, U. J. S. P. Mango peel dietary fibre: Composition and associated bouns phenolics. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 444-450, 2013.
- AKBARI, E. et al., Effect of probiotic supplementation on cognitive functions and metabolic status in Alzheimer's disease: A randomized, double-blind and controlled trial. **Frontiers in Aging Neuroscience**, v. 8, 2016.
- ALVES FILHO, E. G.; RODRIGUES, T. H. S.; FERNANDES, G. A. N.; PEREIRA, A. L. F.; NARAIN, N.; DE BRITO, E. S.; RODRIGUES, S. Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. *Food Research International*, v. 99, p. 461-468, 2017.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA. 2001, p. 676.
- AMERICAN DIETETIC ASSOCIATION (ADA). Position of the American Dietetic Association: Functional Foods. *Journal of the American Dietetic Association*, 2009.
- ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, p. 348-355, 2013.
- AOUDIA, N.; RIEU, A.; BRIANDET, R.; DESCHAMPS, J.; CHLUBA, J.; JEGO, G.; GARRIDO, C.; GUZZO, J. Biofilms of *Lactobacillus plantarum* and *Lactobacillus fermentum*: effect on stress responses, antagonistic effects on pathogen growth and immunomodulatory properties. **Food Microbiology**, v. 53, p. 51-59, 2016.
- ARGYRI, A. A.; ZOUMPOPOULOU, G.; KARATZAS, K. G.; TSAKALIDOU, E.; NYCHAS, G. E.; PANAGOU, E. Z.; TASSOU, C. C. Selection of potential probiotic lactic

acid bacteria from fermented olives by *in vitro* tests. **Journal of Food Microbiology**, v. 33, p. 282-291, 2013.

ASIF, A. et al. Therapeutic potentials of bioactive compounds from mango fruit wastes. **Trends in Food Science & Technology**, v. 53, p. 102-112, 2016.

ASKARI, G. A. et al. Screenings of lactic acid bacteria isolated from dried fruits and study of their antibacterial activity. **Middle-East Journal of Scientific Research**, v. 11, n. 2, p. 209-215, 2012.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS INTERNATIONAL - AOAC. **Official Methods of Analysis of Official Methods of Analysis of the Associations of Official Analytical Chemist**. Method No. 932.12, Method, No. 981.12, Method No. 942.15. 20th ed. AOAC International, Washington. 2016.

ANNUNZIATA, A.; VECCHIO, R. Consumer perception of functional foods: A conjoint analysis with probiotics. **Food Quality and Preference**, v. 28, p. 348-355, 2013.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P. Overview of differences between microbial feed additives and probiotics for food regarding regulation, growth promotion effects and health properties and consequences for extrapolation of farm animal results to humans. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 19, n. 4, p. 321-330, 2013.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 118-129, 2013.

BRASIL. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Regulamento Técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos**. Brasília: ANVISA, 1999.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília: ANVISA, 2001.

BRASIL. AGENCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde**. Brasília: ANVISA, 2016.

BRASIL. MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, PECUÁRIA E ABASTECIMENTO (MAPA). Portaria nº 58 de 30 de agosto de 2016. Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade para Polpas de Frutas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2016.

BRECHT, J.; YAHIA, E. M. Postharvest physiology. In: LITZ, R. (Ed). **The mango: botany, production and uses**. 2 ed. Wallingford: CAB International, p. 484-528, 2009.

BUBNOV, R. V. et al. Probiotics na ummunity:provisional role for personalized diets and disease prevention. **The EPMA Journal**, v. 6, n. 14, 2015.

CARVALHO, A. V.; DA SILVEIRA, T. F. F.; MATTIETTO, R. A.; OLIVEIRA, M. S. P.; GODOY, H. T. Chemical composition and antioxidant capacity of açai (*Euterpe oleracea*) genotypes and comercial pulps. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, p. 1467-1474, 2017.

COMMISSION INTERNATIONALE DE L'ÉCLAIRAGE – CIE. **Colourimetry**. 3nd ed. Vienna: CIE, 2004.

COELHO, E. M.; PADILHA, C. V. S.; MISKINIS, G. A.; DE SÁ, A. G. B.; PEREIRA, G. E.; AZEVÊDO, L. C.; LIMA, M. S. Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 66, p. 160-167, 2018.

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

DA COSTA, G. M.; SILVA, J. V. C.; MINGOTTI, J. D.; BARÃO, 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.

DALLAL, M. M. S.; MOJARRAD, M.; BAGHBANI, F.; RAOOFIAN, R.; MARDANEH, J.; SALEHIPOUR, Z. Effects of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* on colorectal tumor cells activity (CaCo-2). **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 3, 2015.

DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; GARCIA, E. F.; ARAÚJO, A. O.; MAGNANI, M.; SAARELA, M. In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing by-products as potential probiotics. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, 2017.

DEL POZO-INSFRAN, D.; BRENES, C. H.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and pigment stability of Acai (*Euterpe oleracea* Mart.). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 6, p. 1539-1545, 2004.

DI CAGNO, R. et al. Effect of lactic acid fermentation on antioxidante, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. **Food Microbiology**, v. 28, p. 1062-1071, 2011.

DIDARI, T.; SOLKI, S.; MOZAFFARI, S.; NIKFAR, S.; ABDOLLAHI, M. A systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 2, p. 227-239, 2014.

DILNAWAZ, P. A review on probiotic. **International Research Journal of Pharmacy**, v. 2, n. 7, p. 26-33, 2011.

EMBRAPA AMAZÔNIA ORIENTAL. Sistemas de produção do açaí. Sistemas de produção, 4 - 2ª Edição. ISSN 1809-4325. Versão Eletrônica Dez./2006. Disponível em <http://sistemasdeproducao.cnptia.embrapa.br/FontesHTML/Acai/SistemaProducaoAcai_2ed>.

ESPÍRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. 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**, v. 78, p. 352-360, 2015.

EUROPEAN UNION. COMMISSION REGULATION (EC). **Microbiological criteria for foodstuffs**. Official Journal of the European Union, 2007.

FERNANDEZ, M. V.; DENOYA, G. I.; AGÜERO, M. V.; JAGUS, R. J.; VAUDAGNA, S. R. Optimization of high pressure processing parameters to preserve quality attributes of a mixed fruit and vegetable smoothie. **Innovative Food Science & Emerging Technology**, v. 47, p. 170-179, 2018.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS – FAO. **Food outlook biannual report on global food markets**. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION - FAO/WHO. **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba, 2006.

FIGUEROA-GONZÁLEZ, I.; QUIJANO, G.; RAMÍREZ, G.; CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and prebiotics – perspectives and challenges. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, v. 91, p. 1341-1348, 2011.

FIJAN, S. Microorganisms with claimed probiotic properties: An overview of recent literature. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 11, p. 4745-4767, 2014.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2013.

FULLER, R. Probiotic in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365-378, 1989.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MASAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG

during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT – Food Science and Technology**, v. 69, p. 365-371, 2016.

GARCIA, E. F. et al. Identification of lactic acid bacteria in fruit pulp processing byproducts and potential probiotic properties of selected *Lactobacillus* strains. **Frontiers in Microbiology**. V. 7, 2016.

GIANG, N. T. T. et al. Cashew apple juice *Anacardium Occidentale* L. probiotic fermented from *Lactobacillus acidophilus*. **European Journal of Sustainable Development**, v. 2, p. 99-108, 2013.

GONZÁLEZ-TEJEDOR, G. A.; GARRE, A.; ESNOZ, A.; ARTÉS-HERNÁNDEZ, F.; FERNÁNDEZ, P. S. Effect of storage conditions in the response of *Listeria monocytogenes* in a fresh purple vegetable smoothie compared with an acidified TSB médium. *Food Microbiology*, v. 72, p. 98-105, 2018.

GORDON, A. et al. Chemical characterization and evaluation of antioxidant properties of Açai fruits (*Euterpe oleracear* Mart.) during ripening. **Food Chemistry**, v. 133, p. 256-263, 2012.

GOUDARZI, M.; GOUDARZI, H.; RASHIDAN, M. N. Probiotics: an update on mechanisms of action and clinical applications. **Novelty in Biomedicine**, v. 2, p. 22-30, 2014.

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and productis. **Comprehensive Reviews in Food Science and Fools Safaty**, v. 9, 2010.

HARDY, H.; HARRIS, J.; LYON, E.; BEAL, J.; FOEY, A. D. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal diferences: Homeostasis and immunopathology. **Nutrients**, v. 5, p. 1869-1912, 2013.

HASSAN, M.; KIOS, M.; NES, I. F.; DIEP, D. B.; LOTFIPOUR, F. Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic asistance. *Journal of Applied Microbiology*, v. 113, n. 4, p. 723-736, 2012.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121-129, 2001.

HOLLMAN, P. C. H. Evidence for health benefits of plant phenols: local or systemic effects?. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 81, p. 842-852, 2001.

HUANG, Y. et al. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 prevents atherosclerosis via inhibition of intestinal cholesterol absorption in apolipoprotein E-knockout mice. **Journals ASM**, v. 80, n. 24, 2014.

IBARRA, I.; RAMOS, P.; HERNANDEZ, C.; JACOBO, D. Effects of postharvest ripening on the nutraceutical and physicochemical properties of mango (*Mangifera indica* L. cv Keitt). **Postharvest Biology and Technology**, v. 103, p. 45-54, 2015.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA -IBGE. **Produção e extração vegetal e da silvicultura - 2016**. Disponível: <<http://www.ibge.gov.br>>. Acesso em março de 2018.

JUVONEN, R.; HONKAPÄÄ, K.; MAINA, N. H.; SHI, Q.; VILJANEN, K.; MAAHEIMO, H.; VIRKKI, L.; TENKANEN, M.; LANTTO, R. The impact of fermentation with exopolysaccharide producing lactic acid bacteria on rheological, chemical and sensory properties of pureed carrots (*Daucus carota* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 207, p. 109-118, 2015.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, v.7, p. 58-63, 2016

KECHAGIA, M. et al. Health benefits of probiotics: A review. **International Scholarly Research Notices Nutrition**, DOI: 10.5402/2013/481651, 2013.

KRAUS, A. Factors influencing the decisions to buy and consume functional food. **British Food Journal**, v. 117, p. 1622-1636, 2015.

KUMAR, B. V.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products – a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

KUNTZ, S. et al. Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothie *in vitro* and *in vivo*. **British Journal of Nutrition**, v. 113, p. 1044-1055, 2015.

KWAW, E.; MA, Y.; TCHABO, W.; APALIYA, M. T.; WU, M.; SACEY, A. S.; XIAO, L.; TAHIR, H. E. Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidant activities of lactic-acid-fermented mulberry juice **Food Chemistry**, v. 250, p. 148-154, 2018.

LI, X. F. et al. Complete genome sequence of probiotic *Lactobacillus plantarum* strain FMNP01, isolated from mango fruit. **Journals ASM**, v. 2, 2014.

LILLY, D.M., STILLWELL, R.H. Probiotics: growth-promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v. 147, p. 747e748, 1965.

LÓPEZ-COBO, A.; VERARDO, V.; DIAZ-DE-CERIO, E.; SEGURA-CARRETO, A.; FERNÁNDEZ-GUTIÉRREZ, A.; GÓMEZ-CARAVACA, A. M. Use of HPLC- and GC-QTOF to determine hydrophilic and lipophilic phenols in mango fruit (*Mangifera indica* L.) and its by-products. **Food Research International**, v. 100, p. 423-434, 2017.

MA, X.; WU, H.; LIU, L., YAO, Q.; WANG, S.; ZHAN, R.; XING, S.; ZHOU, Y. Polyphenolic compounds and antioxidant properties in mango fruits. **Scientia Horticulturae**, v. 129, p. 102-107, 2011.

MALTA, L. G. et al. Assessment of antioxidant and antiproliferative activities and the identification of polyphenolic compounds of exotic Brazilian fruits. **Food Research International**, v. 53, p. 417-425, 2013.

MANJULA, K.; BHAGATH, Y. B. New generation functional foods – A prospectus on processing technology assistance in development and production – A review. **Carpathian Journal of Food Science and Technology**, v. 9, n. 2, p. 64-76, 2017.

MARKOWSKI, J.; CELEJEWSKA, K.; ROSLONEK, A.; KOSMALA, M. Impact of different thermal preservation Technologies on the quality of apple-based smoothies. **LWT - Food Science and Technology**, 2017.

MARTINEZ, R. C. R.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. Scientific evidence for health effects attributed to the consumption of probiotics and prebiotics: an update for current perspectives and future challenges. **British Journal of Nutrition**, v. 114, p. 1992-2015, 2015.

MARTINS, E. M. et al. A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764-770, 2013.

MATIAS, N. S. et al. A probiotic soy-based innovative product as an alternative to *petit-suisse* cheese. **LWT – Food Science and Technology**, v. 59, p. 411-417, 2014.

MATIAS, N. S.; PADILHA, M.; BEDANI, R.; SAAD, S. M. I. In vitro gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83-93, 2016.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory evaluation techniques**. 3 ed. New York: CRC, 1999.

MOSKOWITZ, H. R. Product testing and sensory evaluation of foods. **Westport: Food and Nutrition Press**, 1983.

MRIDULA, D.; SHARMA, M. Development of non-dairy probiotic drink utilizing sprouted cereals, legume and soymilk. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, p. 482-487, 2015.

NITZKE, J. A. **Agronegócio: panorama, perspectivas e influência do mercado de alimentos certificados**. Curitiba: Appris, 2012.

NOWICKA, P.; WOJDYLO, A.; TELESZKO, M.; SAMOTICHA, J. Sensory attributes and changes of physicochemical properties during storage of smoothies prepared from selected fruit. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 102-109, 2016.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111-117, 2011.

ORGANIZAÇÃO PARA A COOPERAÇÃO E DESENVOLVIMENTO ECONÔMICO/
FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS –
OCDE/FAO. **Perspectivas Agrícolas 2015-2014**, 2015.

PACHECO-PALENCIA, L. A.; DUNCAN, C. E.; TALCOTT, S. T. Phytochemical composition and thermal stability of two commercial acai species, *Euterpe oleracea* and *Euterpe precatoria*. **Food Chemistry**, v. 115, n. 4, p. 1199-1205, 2009.

PADILLHA, C. V.; MISKINIS, G. A.; DE SOUZA, M. E.; PEREIRA, G. E.; DE OLIVEIRA, D.; BORDIGNON-LUIZ, M. T.; LIMA, M. D. Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. **Food Chemistry**, v. 228, p. 106-115, 2017.

PAKDAMAN, M. N. et al. The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance – a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. **Nutrition Journal**, DOI: 10.1186/s12937-016-0172-y. 2016.

PALAFOX-CARLOS, H.; YAHIA, E. M.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Identification and quantification of major phenolic compounds from mango (*Mangifera indica*, cv. Ataulfo) fruit by HPLC–DAD–MS/MS–ESI and their individual contribution to the antioxidant activity during ripening. **Food Chemistry**, v. 135, p. 105-111, 2012.

PAZ, M. et al. Brazilian fruit pulps as functional foods and additives: Evaluation of bioactive compounds. **Food Chemistry**, v. 172, p. 462-468, 2015.

PEIXOTO, H.; ROXO, M.; KRSTIN, S.; WANG, X.; WINK, M. Anthocyanin-rich extract of Acai (*Euterpe precatoria* Mart.) mediates neuroprotective activities in *Caenorhabditis elegans*. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 385-393, 2016.

PICOUET, P. A. et al. Effects of thermal and high-pressure treatments on the microbiological, nutritional and sensory quality of a multi-fruit smoothie. **Food Bioprocess Technology**, 2016.

RANDAZZO, W. et al. Development of new non-dairy beverages from Mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. **Food Microbiology**, v. 54, p. 40-51, 2016.

RAWSON, A. et al. Effect of thermal and non thermal processing technologies on the bioactive content of exotic fruits and their products: Review of recent advances. **Food Research International**, 44, p. 1875–1887, 2011.

RENES, E.; LINARES, D. M.; GONZÁLEZ, L.; FRESNO, J. M.; TORNADIJO, M. E.; STANTON, C. Study of the conjugated linoleic acid synthesis by *Lactobacillus* strains and by different co-cultures designed for this ability. **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 74-80, 2017.

RODRÍGUEZ-VERÁSTEGUI, L. L. et al. Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetable smoothies during storage. **Food Bioprocess and Technology**, v. 9, p. 137-146, 2016.

RUFINO, M. S.; PÉREZ-JIMÉNEZ, J.; ARRANZ, S.; ALVES, R. E.; BRITO, E. S.; OLIVEIRA, M. S. P.; SAURA-CALIXTO, F. Açaí (*Euterpe oleraceae*) ‘BRS Pará’: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. **Food Research International**, v. 44, p. 2100-2106, 2011.

SHARMA, V.; MISHRA, H. N. Fermentation of vegetable juice mixture by probiotic lactic acid bacteria. **Nutrafoods**, v. 12, p. 17-22, 2013.

SHARMA, M.; SHUKLA, G. Metabiotics: One step ahead of probiotics; an insight into Mechanisms Involved in Anticancerous Effect in Colorectal Cancer. **Frontiers in Microbiology**, v. 7, 2016.

SHIMIZU, M. Functional food in Japan: Current status and future of gut-modulating food. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 20, p. 213-216, 2012.

SINN, D. H. et al. Therapeutic Effect of *Lactobacillus acidophilus*-SDC 2012, 2013 in patients with irritable bowel syndrome. **Digestive Diseases and Sciences**, v. 53, p. 2714-2718, 2008.

SOCOL, C. R. et al. The potential of probiotics: A review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, n. 4, p. 413-434, 2010.

SOHAIL, A. et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, p. 162-166, 2012.

STONE, H.; SIDEL, J. L. **Sensory evaluation practices**. San Diego: Academic Press, 1993.

SYNGAI, G. G.; GOPI, R.; BHARALI, R.; DEY, S.; LAKSHMANAN, G. M. A.; AHMED, G. Probiotics – the versatile functional food ingredients. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 921-933, 2016.

TAHMASSEBI, J. F.; KANDIAH, P.; SUKERI, S. The effects of fruit smoothies on enamel erosion. **European Archives of Paediatric Dentistry**, v. 15, p. 175-181, 2014.

TASHAKOR, A.; HOSSEINZADEHEHKORDI, M.; EMRUZI, Z.; GHOLAMI, D. Isolation and identification of a novel bacterium, *Lactobacillus sakei* subsp. dgh strain 5, and optimization of growth condition for highest antagonistic activity. **Microbial Pathogenesis**, v. 106, p. 78-84, 2017.

TOLEDO, N. M. V. Aproveitamento de subprodutos da industrialização do maracujá para elaboração de iogurte. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Universidade de São Paulo. São Paulo, 2013.

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

URSELL, L. K.; CLEMENTE, J. C.; RIDEOUT, J. R.; GEVERS, D.; CAPORASO, J. G.; KNIGHT, R. The interpersonal and intrapersonal diversity of human-associated microbiota in key body sites. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, v. 129, n. 5, p. 1204-1208, 2012.

VASCONCELOS, B. G. et al. Innovative Açaí (*Euterpe oleracea*, Mart., Arecaceae) functional frozen dessert exhibits high probiotic viability throughout shelf-life and supplementation with inulin improves sensory acceptance. **Food Science and Biotechnology**, v. 23, n. 5, p. 1843-1849, 2014.

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*, b. 81, p. 136-143, 2017.

VEGA-VEGA et al. Antimicrobial and antioxidant properties of byproduct extracts of mango fruit. **Journal of Applied Botany and Food Quality**, v. 86, p. 205-211, 2013.

VELLA, M. N.; STRATTON, L. M.; SHEESHKA, J.; DUNCAN, A. M. Functional food awareness and perceptions in relation to information sources in older adults. **Nutrition Journal**, v. 13, n. 44, 2014.

VITALI, B. et al. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, p. 116-125, 2012.

WANG, X. et al. Mangiferin prevents diabetic nephropathy progression and protects podocyte function via autophagy in diabetic rat glomeruli. **European Journal of Pharmacology**, 2018.

WEI, M.; DING, X. L.; XUE, Z. L.; ZHAO, S. G. Production of conjugated linoleic acid by permeabilized *Lactobacillus acidophilus* cells. **Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic**, v. 108, p. 59-63, 2014.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION – WGO. **Guias práticas da OMGE: Probióticos e prebióticos**, 2011.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**, 2002.

YAMAGUCHI, K. K. L.; PEREIRA, L. F. R.; LAMARÃO, C. V.; LIMA, E. S.; VEIGA-JUNIOR, V. F. Amazon Açaí: chemistry and biological activities: a review. **Food Chemistry** v. 179, p. 137-151, 2015.

YANG, Z.; WEIAN, C.; SUSU, H.; HANMIN, W. Protective effects of mangiferin on cerebral ischemia-reperfusion injury and its mechanisms. **European Journal of Pharmacology**, v. 771, p. 145-151, 2016.

4 RESULTADOS

4.1 ARTIGO

EFFECTS OF *Lactobacillus acidophilus* LA-3 METABOLISM ON PHYSICOCHEMICAL AND SENSORY PARAMETERS OF AÇAÍ AND MANGO-BASED SMOOTHIES AND ITS SURVIVAL FOLLOWING SIMULATED GASTROINTESTINAL CONDITIONS

Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 metabolism on physicochemical and sensory parameters of açai and mango-based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions

Running title: Characterization of probiotic fruit smoothies

Abstract

This study evaluated the survival of the probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA3 in açai (AS) and mango based smoothies (MS), and the effects of the added probiotic metabolism on the physicochemical and sensory aspects of these products during 28 days of refrigerate storage. The survival of *L. acidophilus* in AS and MS under simulated human gastrointestinal conditions was also evaluated. The counts of *L. acidophilus* LA-3 in AS and MS were approximately 7.5 and 8.5 log CFU/mL, respectively, during the storage period evaluated. AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 presented lower ($p < 0.05$) contents of glucose, fructose and maltose, as well as higher ($p < 0.05$) contents of lactic and succinic acids than AS and MS without *L. acidophilus* LA-3 over time. Contents of phenolics increased or decreased ($p < 0.05$) on day 1 of storage in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3, while no changes ($p \geq 0.05$) in phenolic contents were observed in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3. The smoothies were described as sweet taste, fresh fruit aroma, intense color and creamy beverages. *L. acidophilus* LA-3 metabolism increased the acidic flavor and fermented aroma in AS and MS. At the end of an in vitro digestion, the counts of *L. acidophilus* LA-3 in AS or MS were ≥ 7.6 log CFU/mL. These results demonstrate the feasibility of incorporating *L. acidophilus* LA-3 into AS or MS and suggest these fruit beverages as alternative matrices for formulation of non-dairy probiotic beverages.

Keywords: functional beverages, probiotics, lactobacilli, fruit phenolics

1. Introduction

The sufficient daily intake of fruit has been associated with decreased risk of a variety of chronic-degenerative diseases, such as obesity and diabetes (Kuntz et al., 2015; Rodríguez-Verástegui et al., 2016). Because fruit need to be washed, peeled and/or cut before consumption, there is an increased demand of consumers for ready-to-eat/drink or take-away fruit derived products (Picouet et al., 2016).

Smoothies are blended beverages containing fruit or fruit juice with a typical semi-liquid or smooth consistency. These products are perceived as healthy and refreshing non-alcoholic drinks by consumers and represent a convenient alternative to promote fruit consumption (Rodríguez-Verástegui et al., 2016). Considered “superfoods”, fruit smoothies are one of the latest trends in healthy nutrition that combine good nutritional quality with the physiological functionalities of bioactive compounds (e.g., phenolics, minerals and fibers) naturally present in these matrices (Medina, 2011). In addition, fruit smoothies have been considered suitable matrices for incorporation of probiotic cultures, which are live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host (Morelli & Capurso, 2012). In the gut, probiotics help the host by assisting in maintenance of normal mucosal homeostasis and protecting the mucosa from injurious factors, such as toxins, allergens and pathogens (Rao & Samak, 2013).

Among probiotics, lactobacilli are the most studied for application in fruit-fermented products (De Albuquerque et al., 2017). Recent studies have reported that fruit fibers and phenolic compounds may affect positively the growth and metabolism of probiotic lactobacilli (Espírito-Santo et al., 2012). In turn, through fermentative metabolism probiotic lactobacilli may improve the nutritional, sensory and safety aspects of fruit products, as well as extend their shelf-life (Di Cagno, Minervini, Rizzello, De Angelis, & Gobbetti, 2011; Özcan & Ekinici, 2016).

Açaí (*Euterpe oleracea* Mart) is a rich-phenolic berry native from the Brazilian Amazon. The grape-shape purple açaí berries have attracted interest worldwide because their exotic flavor and bioactive properties, including antioxidant and anti-inflammatory effects (Rufino et al., 2011). The açaí pulp is consumed raw as a daily side dish in certain areas around the Amazon rainforest, but the major consumption of açaí pulp is in the form of shakes or mixed with guarana syrup (Menezes, Deliza, Chan, & Guinard, 2011). Because the high amounts of amino acids, medium chain fatty acids and phenolics açaí pulp is considered a natural energy booster and a good food choice for athletes (Sadowska-Krępa et al., 2015). The potential of açaí pulp or açaí-derived beverages to carry probiotic lactobacilli remains unknown.

Another tropical fruit largely cultivated in Brazil and consumed worldwide is mango (*Mangifera indica* L.). Mango possesses a sweet and soft taste and is largely consumed *in natura*, mixed in salads or in drinks, such as juices or smoothies (López-Cobo et al., 2017). Rich in antioxidants compounds, mango also provides good quantities of water, sugars, fibers, minerals and vitamins (Torres-León et al., 2016). Despite the numerous studies about the use of mango in formulation of functional products, studies focusing on the development of mango probiotic smoothies are scarce.

The aim of this study was firstly to manufacture açaí and mango based smoothies with the well-known probiotic strain *L. acidophilus* LA-3 (Silva et al., 2017) and to assess the survival of the test probiotic when incorporated into the manufactured AS and MS during their refrigerated storage. Secondly, this was to evaluate the effects of the added probiotic strain on the physicochemical and sensory parameters of the obtained smoothies during refrigerated storage, as well as to assess the survival of the tested probiotic in AS and MS during exposure to simulated human gastrointestinal conditions.

2. Material and methods

2.1 Test strain and growth conditions

A freeze-dried commercial of *L. acidophilus* LA-3 (R-704, batch 3122631) was obtained from Sacco Brasil (Campinas, São Paulo, Brazil). Stock cultures were maintained in cryovials at -80 °C in de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (HiMedia, Mumbai, India) containing glycerol 20% v/v (Sigma Aldrich, St. Louis, USA). The inoculum of the test strain was obtained after preparing suspensions in sterile saline solution (0.85% NaCl w/v) from overnight cultures grown in MRS broth at 37 °C. Cells were harvested through centrifugation (4500 *g* x 15 min, 4 °C), washed twice in sterile saline solution and re-suspended to obtain standard cell suspensions at which the OD reading at 660 nm (OD₆₆₀) was 1.5 to provide viable cell counts of approximately 10 log CFU/mL (De Albuquerque et al., 2017).

2.2 Coconut water, fruit and fruit pulps

The banana (*Musa paradisiaca* L.) and passion (*Passiflora edulis* f. *Flavicarpa*) fruit were purchased from a local wholesale distributor (João Pessoa, Brazil). The fruit were selected for similar shape and uniform color, with absence of mechanical damage and visible sign of infection. The fruit were surface disinfected through immersion in a sodium hypochlorite solution (150 ppm, pH 7.2 adjusted using 1 mM/L NaOH) for 5 min, washed with sterile distilled water and dried for 30 min in a biosafety cabinet. Afterwards, the fruit were aseptically peeled, chopped and mixed (2:1 v/v) with coconut water purchased from Aqua-coco® (Rio Grande do Norte, Brazil) using a domestic blender (for 3 min). The obtained fruit pulp in coconut water was frozen (-20 °C) and always used to prepare the smoothies in the same day. The total soluble solids (TSS) of banana and passion fruit pulp was 18 and 11 °Brix, which were in accordance with the Brazilian Legislation for description of fruit pulps (Brazilian Legislation, NI 12, 2003).

Frozen pulps of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) and mango (*Mangifera indica* L.) were obtained from Pé de Fruta® (João Pessoa, Brazil) just after industrial processing. The pulps were produced by pressing the edible portion of fresh and cleaned fruit, which were free of dirt, plant or animal debris and parasites. After processing, the TSS of the açai and mango pulp was ≥ 40 and 12 °Brix, respectively. The pulps were used in experiments in the same day of processing.

2.3 Production of fruit smoothies

Two distinct smoothies were formulated. The açai based-smoothie (AS) was prepared with banana (80:20 v/v) and mango based-smoothie (MS) was formulated with passion fruit (60:40 v/v). To prepare the smoothies, pulps were mixed using a domestic blender (for 3 min). The AS and MS were dispensed into sterile glass bottles, pasteurized at 80 °C for 10 min, cooled to room temperature and added of *L. acidophilus* LA-3 inoculum (final viable counts of 9 log CFU/mL) and stored at 4 °C for assays. Smoothies without *L. acidophilus* LA-3 were prepared similarly.

2.4 Survival of *L. acidophilus* LA-3 in fruit smoothies during storage

The viable cells of *L. acidophilus* LA-3 were enumerated in smoothies just after the manufacture (days zero), as well as on day 1, 7, 14, 21 and 28 of storage at 4 °C. At each pre-established storage time period, 250 mL of sterile saline solution were mixed with 25 g of smoothies samples, homogenized using a vortex for one min and serially diluted (10^{-1} – 10^{-8}) in sterile saline solution. Subsequently, 20- μ L aliquots of each dilution were dispensed onto MRS agar to enumerate *L. acidophilus* LA-3 using a microdrop inoculation technique (Herigstad, Hamilton, & Heersink, 2001). The plates were incubated at 37 °C for 48 h under anaerobiosis (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) and the results were expressed as log

CFU/mL. At the same time intervals of *L. acidophilus* LA-3 counts the smoothies were checked for compliance of current microbiological standards (Brazilian Legislation, NI 12, 2001; European Commission Regulation EC 1441, 2007) following standard procedures described elsewhere (APHA, 2001).

2.5 Physicochemical parameters of fruit smoothies during storage

The pH, titratable acidity (TA), total soluble solids (TSS), color and viscosity of fruit smoothies were measured on the day 0 (just after the manufacture), 1, 7, 14, 21 and 28 of the storage following standard procedures (AOAC, 2016). The pH values were determined using digital pHmeter (Quimis, São Paulo, Brazil) (981.12). TA was measured by titrating the samples with 0.1 N NaOH (expressed as percent of citric acid) (942.15). TSS (°Brix) were measured using digital refractometer (HI 96801, São Paulo, Brazil) at 25 ± 1 °C (932.12). A CR-300 colorimeter (Minolta Co., Osaka, Japan) was used for the instrumental colour evaluation. The L*(lightness) a* and b* (chromatic coordinates) parameters were determined following the CIE Lab system (CIE, 1986). Values of L*, a* and b* were also converted into ΔE^* (total color difference) using the equation 1 (Di Cagno et al., 2011). The apparent viscosity was determined at 50 rpm using a viscosimeter (model VT550, Thermo Haake, Karlsruhe, Germany) equipped with a n° 3 spindle and expressed in mPa.s (Markowski, Celeiewska, Roslonek, & Kosmala, 2017).

$$\Delta E = [(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)]^{1/2} \quad \text{Equation 1.}$$

2.6 Sugars, organic acids and phenolic compounds in fruit smoothies during storage

Water-soluble extracts from smoothies were obtained just after the manufacture (day zero), as well as on day 1, 14 and 28 of refrigerated storage to quantify sugars and organic acids. The time interval duration was defined as 14 days considering the results of preliminary

experiments with shorter storage time showed the lack of changes in sugar, organic acids and phenolic compounds in shorter intervals (data not shown). To obtain the extracts, samples of each smoothie were diluted in 20 mL of ultra-pure water and mixed for 10 min using a mini-Turrax. After centrifugation (4000 g x 15 min) samples were filtered through a 0.45 µm Millex-HA filter (Millipore Co., Bedford, MA). The determination of sugars and organic acids was performed as previously described (Coelho et al., 2018) using an Agilent chromatograph (model 1260 Infinity LC, Agilent Technologies, USA) coupled with a diode arrangement detector (DAD) and a refractive index detector (RID). The analytic conditions were: an Agilent Hi-Plex H column (7.7 × 300 mm, 8 µm); and mobile phase H₂SO₄ 4 mmol/L in ultrapure water (flow rate 0.5 mL/min).

For quantification of phenolic compounds, smoothie samples were diluted in methanol 30% v/v, filtered through a 0.45 µm polypropylene filter (Chromafil® Xtra, Macherey-Nagel - Germany) and injected (20 µL) as previously described (Padilha et al., 2017). Chromatographic separation for phenolic compounds was performed using a Zorbax Eclipse Plus RP-C18 column (100 × 4.6 mm, 3.5 µm) and Zorbax C18 pre-column (12.6 × 4.6mm, 5 µm). The column temperature was set at 35 °C and the mobile phases were: acidified water (pH 2) with 0.1 mM/L phosphoric acid (phase A) and acidified methanol with 0.5% phosphoric acid (phase B), using a flow rate of 0.8 mL/min. The DAD data acquisitions were performed using OpenLAB CDS ChemStation Edition™ software (Agilent Technologies).

The peaks of sugars, organic acids and phenolics were identified by comparing the retention times obtained with those of standards (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) and the average area of duplicate injections was used for quantification.

2.7 Quantitative Descriptive Analysis (QDA) of fruit smoothies during storage

The sensory characteristics of fruit smoothies were studied using QDA (Meilgaard, Civille, & Carr, 1999) after approval by National Committee in Research Ethics under a protocol number 79489917.6.0000.5183. The analyses were performed on day 1, 7, 14, 21 and 28 of refrigerated storage with 12 panelists selected based on their habits of consuming smoothies. The panelists were trained through six training sessions (each session lasting one hour) to develop their descriptive terminology and become familiar with the reference materials. The attributes evaluated included the appearance (yellow color and purple color, apparent viscosity), aroma (açaí aroma, banana aroma, mango aroma, passion fruit aroma, acid or fermented aroma), flavor (sweet, acid and fermented) and texture (viscosity). An unstructured scale ranging from 0 (poor) to 9 (strong), which anchored the minimal and maximal values, was used to assess the intensity of each described attribute. The smoothies were evaluated in individual booths with controlled temperature and lighting. The samples were served at the refrigeration temperature in disposable dishes coded with three random digits and accompanied by mineral water and crackers.

2.8 Survival of L. acidophilus LA-3 during in vitro digestion

L. acidophilus LA-3 incorporated in AS, MS or MRS broth (final viable counts $9 \log$ CFU/mL) was exposed to the simulated gastrointestinal conditions (De Albuquerque et al., 2017). The test was performed in an incubator at 37 °C and mechanical agitation was used to simulate the peristaltic movements, with rotation adjustment in each phase (esophagus-stomach, duodenum and ileum). The esophagus-stomach was simulated using 25 mg of pepsin diluted in 1 mL of 0.1 mM/L HCl, added at a rate of 0.05 mL/mL, pH with gradual decrease using 1 mM/L HCl (pH 5.5/10 min; pH 4.6/10 min; pH 3.8/10 min; pH 2.8/20 min; pH 2.3/20 min and pH 2.0/20 min) under stirring (130 rpm). Duodenal conditions were simulated with 2 g pancreatin/L of 0.1 mM/L NaHCO₃ and 12 g bovine bile salts/L of 0.1 mM/L NaHCO₃, pH

adjusted for 5.0 with 0.1 mM/L NaHCO₃ and exposure time of 30 min under stirring (45 rpm); and ileal conditions with pH adjusted to 6.5 using 0.1 mM/L NaHCO₃, exposure time of 60 min under stirring (45 rpm). All the enzymes and bovine bile salts were purchased from Sigma Aldrich (St. Louis, USA). Fruit smoothies not inoculated with *L. acidophilus* LA-3 and MRS broth maintained at 37 °C without exposure to the simulations conditions were used as controls. After each phase of simulation, 100 µL of AS, MS or MRS broth were serially diluted in sterile saline solution and plated on MRS agar. After an incubation period of 48 h at 37 °C under anaerobic conditions (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid), the viable cells were enumerated as described above (section 2.4).

2.9 Statistical analysis

All assays were performed in triplicate in three independent experiments and the results were expressed as an average of the assays. Statistical analysis was performed to determine significant differences ($p < 0.05$) using ANOVA followed by Tukey or Student t test. Principal Component Analysis (PCA) was performed to integrate significant sensory and physicochemical data. Statistical analyses were performed using the software Sigma Stat 3.5 (Jandel Scientific Software, San Jose, California).

3. Results

3.1 Survival of *L. acidophilus* LA-3 in fruit smoothies during storage

Initial counts of *L. acidophilus* LA-3 on day 1 of storage were approximately 8.5 log CFU/mL in AS and 7.5 log CFU/mL in MS. No further decreases in counts were observed on days 7, 14, 21 and 28 of storage. Over the storage time assessed, counts of *L. acidophilus* LA-3 in AS were higher ($p < 0.05$) than in MS (Table 1). Over the storage period assessed, AS and MS fruit smoothies samples had < 0.3 MPN/g of total and thermotolerant coliforms, absence of

coagulase-positive *Staphylococcus* and *Salmonella* spp., and counts of mesophilic bacteria < 6 log CFU/mL (data not shown).

3.2 Physicochemical parameters of fruit smoothies during storage

On day 1 day of storage, the TA increased in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3, while no change in TA was observed in smoothies without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1). The pH decreased in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 on day 1 of storage and no changes ($p \geq 0.05$) were observed in further time intervals evaluated. In AS or MS without *L. acidophilus* LA-3, pH values did not vary ($p \geq 0.05$) over the storage period evaluated (Supplementary Table 1). TSS values increased ($p < 0.05$) on day 7 day of storage in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3. No changes ($p \geq 0.05$) in TSS values were observed during the storage period evaluated in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1). The apparent viscosity decreased ($p < 0.05$) on day 7 and 14 of storage in AS or MS with *L. acidophilus* LA-3, respectively, but did not change ($p \geq 0.05$) in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1).

Values of L^* , a^* or b^* parameters varied in AS and MS over the storage period evaluated (Supplementary Table 1). The L^* (luminosity) value decreased ($p < 0.05$) on day 14 of storage in AS with and without *L. acidophilus* LA-3. In MS with and without *L. acidophilus* LA-3 the L^* value decreased ($p < 0.05$) only on day 21 of storage. The a^* value (red color) decreased ($p < 0.05$) over the storage time assessed in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3, but did not change ($p \geq 0.05$) in AS and MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1). Otherwise, the b^* value (yellow color) increased ($p < 0.05$) on days 1 and 7 of storage in AS with and without *L. acidophilus*, respectively. In MS with *L. acidophilus* LA-3, the b^* value decreased ($p < 0.05$) on day 1 of storage but did not vary ($p \geq 0.05$) in MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1). The ΔE value varied in AS and MS with and without *L.*

acidophilus LA-3. On day 28 of storage all evaluated smoothies presented ΔE values of ≥ 2.8 , with the exception of MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 1).

3.3 Sugars and organic acids contents in fruit smoothies during storage

Lactic acid contents increased ($p < 0.05$) over time in AS and MS with *L. acidophilus*. This organic acid was not detected in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 (Fig. 1). The contents of malic acid decreased ($p < 0.05$) up to the day 14 of storage in AS and MS with *L. acidophilus*, and no changes ($p \geq 0.05$) were observed from this storage time interval onward (Fig. 1). Otherwise, no changes ($p \geq 0.05$) were observed in malic acid contents in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 over the storage time assessed (Fig. 1).

Succinic acid increased ($p < 0.05$) over the storage time evaluated in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3. No changes ($p \geq 0.05$) in contents of this organic acid were observed in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 (Fig. 1). Contents of tartaric acid increased ($p < 0.05$) on day 1 of storage in AS with *L. acidophilus* LA-3 and did not change ($p \geq 0.05$) in further time intervals evaluated (Fig. 1). No changes ($p \geq 0.05$) in contents of this organic acid were observed in AS without *L. acidophilus* LA-3 over the storage period evaluated. Tartaric acid was not detected in MS with or without *L. acidophilus*.

The contents of glucose, fructose and maltose decreased ($p < 0.05$) during the 28 days of storage in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3. No changes ($p \geq 0.05$) were observed in contents of these sugars in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3 (Fig.2).

3.4 Phenolic compounds in fruit smoothies during storage

A total of 16 phenolic compounds, being (4 phenolic acids and 12 flavonoids, were identified in AS with or without *L. acidophilus* LA-3 (Table 2), while 8 phenolic compounds, being one phenolic acid and 7 flavonoids, were identified in MS with or without *L. acidophilus*

LA-3 just after manufacture, i.e. time zero of storage (Table 3). Pelargonidin glucoside and peonidin 3-glucoside were the phenolics detected in highest ($p < 0.05$) and lowest amounts in AS with or without *L. acidophilus* LA-3 (Table 2). In MS with or without *L. acidophilus* LA-3, catechin was the phenolic detected in highest ($p < 0.05$) amounts, while epicatechin was that detected in lowest ($p < 0.05$) amounts (Table 3).

An increase ($p < 0.05$) in contents of procyanidin B1 and B and catechin, as well as a decrease ($p < 0.05$) in contents of *p*-coumaric acid, quercetin 3-glucoside, malvidin 3-glucoside, epicatechin galate and cyanidin 3-glucoside was observed in AS with *L. acidophilus* LA-3 on day 1 of storage. No changes ($p \geq 0.05$) were observed in amounts of these phenolics in AS without *L. acidophilus* LA-3 over the storage time evaluated (Table 2).

On day 14 of storage, the amounts of epicatechin gallate decreased ($p < 0.05$) in AS with *L. acidophilus* LA-3, but did not change ($p \geq 0.05$) in AS without *L. acidophilus* LA-3 (Table 2).

An increase ($p < 0.05$) in contents of hesperidin, catechin, cis-resveratrol and procyanidins A2, B1 and B2, as well as a decrease ($p < 0.05$) in contents of gallic acid were observed in MS with *L. acidophilus* LA-3 on day 1 of storage (Table 3). No changes ($p \geq 0.05$) in amounts of these phenolics were observed in MS without *L. acidophilus* LA-3 over the storage time evaluated. Contents of procyanidin B1 and cis-resveratrol decreased ($p < 0.05$) on day 14 of storage in MS without *L. acidophilus* LA-3 (Table 3).

3.5 Quantitative descriptive analysis

The AS and MS with or without *L. acidophilus* LA-3 were considered beverages with a sweet taste, fresh fruit aroma, intense color and creamy texture (Supplementary Table 2). The attributes acidity, viscosity and fermented aroma showed differences ($p < 0.05$) between smoothies (AS and MS) with and without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 2).

AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 received higher ($p < 0.05$) scores for attributes acid flavor and fermented aroma than AS and MS without *L. acidophilus* LA-3, respectively (Supplementary Table 2). Otherwise, AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 received lower scores for apparent viscosity than AS and MS without *L. acidophilus* LA-3 (Supplementary Table 2).

The scores attributed to color and aroma decreased ($p < 0.05$) in AS and MS with or without *L. acidophilus* LA-3. After the characteristics of AS and MS had been studied, PCA was used to assess the principal components that defined each fruit smoothies during the 28 days of refrigerated storage. The PC1, which explained 82.71% of the variance between the samples, clearly separated the purple color, banana aroma and açai aroma from the yellow color, mango aroma, passion fruit aroma and acid flavor. PC2, which explained 12.65% of the variance between the samples, was defined by apparent viscosity and fermented aroma (Fig. 3A).

3.6 Survival of *L. acidophilus* during in vitro digestion

The exposure to 1st digestive step (pH 5.5, 10 min) did not decrease ($p \geq 0.05$) the viable counts of *L. acidophilus* LA-3 in AS, MS or MRS broth. *L. acidophilus* LA-3 showed similar ($p \geq 0.05$) counts in AS, MS and MRS broth during the in vitro digestion (Fig 4).

No decreases ($p \geq 0.05$) were observed in counts of *L. acidophilus* LA-3 in MRS broth, AS or MS until exposure to 5th digestive step (stomach, pH 2.3, 20 min). After exposure to the 6th digestive step (stomach pH 2.0, 20 min), a decrease ($p < 0.05$) of 1.3 log CFU/mL in counts of *L. acidophilus* LA-3 was observed in AS (Fig. 4). Under these same conditions, no changes ($p \geq 0.05$) in counts of *L. acidophilus* LA-3 were observed in MS (Fig. 4). The exposure to the 7th (duodenum, pH 5.0, 30 min) and 8th digestive step (ileum, pH 6.5, 60 min) did not decrease ($p \geq 0.05$) the counts of *L. acidophilus* LA-3 in AS, MS or MRS broth. At the end of the in vitro

digestion (after the 8th digestive step; pH 6.5, 60 min) counts of *L. acidophilus* LA-3 were 7.6 log CFU/mL in AS, 8.6 log CFU/mL in MS and 8.6 CFU/mL in MRS broth (Fig. 4).

4. Discussion

L. acidophilus LA-3 showed viable counts of > 7 log CFU/mL in MS and > 8 log CFU/mL in AS during the 28 days of refrigerated storage. An earlier study reported that, after an initial decrease (0.3 log CFU/mL), counts (> 9 log CFU/mL) of mixed probiotic lactobacilli (*L. plantatum* Pr3, K3 and F6, and *L. pentosus* P1) did not change in red (cherries, tomatoes, blackberries and prunes) or green (kiwifruits, fennels, spinach and papaya) smoothies during 30 days of refrigerated storage (Di Cagno et al., 2011). The decrease in viable counts of *L. acidophilus* observed on day 1 of storage in AS and MS could be related to the lower pH of these matrices (AS 4.6; MS 3.8) compared to MRS broth (pH 5.4), where the probiotic strain was grown to obtain the pre-inoculum (Kapasob, Kerdchoenchuen, Laohakunjit, Sarkar, & Shetty, 2017). The pH has been cited as the primary factor associated with decreased survival of probiotics in fruit beverages (Nuallkaekul, & Charalampopoulos, 2011). However, it should be considered that AS presented higher pH than MS and on day 1 of storage the counts of *L. acidophilus* LA-3 were 1 log CFU/mL higher in MS than in AS. The differences in specific fruit constituents (e.g., fibres, minerals and vitamins) in AS and MS may have defined the behaviour of *L. acidophilus* LA-3 in these matrices. After a short adaptation period and recovery of injured cells in an environment with high nutrient availability (as that provided by AS and MS) the strain was able to maintain its viability over time.

The increase in lactic and succinic acids and the decrease in malic acid contents during storage in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 could be related with the metabolic features of the incorporated strain. *L. acidophilus* LA-3 metabolizes carbohydrates with the production of ATP, which is subsequently used for biosynthesis of lactic acid (Kapasob et al., 2017).

Moreover, *L. acidophilus* can produce lactic acid or succinic acid from malic acid depending on the nutrients available in grown environment (Kanaeuchi, Seki, & Komagata, 1988). The influence of other nutrients on organic acid metabolism of lactobacilli could explain the lower content of malic acid in AS than in MS with *L. acidophilus* LA-3. AS presented lower TSS (12.5 °Brix) than MS (15 °Brix) and typically the decarboxylation of malic acid by lactobacilli increases as the sugars content decreases (Valero-Cases & Frutos, 2017). Overall, the contents of citric acid, which was only detected in MS, decreased during storage in MS with *L. acidophilus* LA-3. *L. acidophilus* is capable of using citric acid as a metabolic carbon source; Valero-Cases & Frutos, 2017).

The observed decrease in glucose and fructose contents over time in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 could be associated with the metabolic activity of the added strain since no changes were observed in AS or MS without *L. acidophilus* LA-3. Sugars could be directly used for lactic fermentation by lactobacilli (Kaprassob et al., 2017). The capability of *L. acidophilus* to metabolize maltose could also explain the decrease in contents of this disaccharide in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 (Nakai et al., 2009).

Despite de changes in AS and MS with or without *L. acidophilus* LA-3, the smoothies with the tested probiotic strain showed greater ΔE than those without the tested probiotic strains, which could be probably related to differences in L^* values. These results are in agreement with the findings of previous studies mulberry juice with *L. acidophilus* LA-14TM (ATCC SD5212) (Kwaw et al., 2018). During the bacterial fermentation in non-anaerobic environments (as performed in this study) oxidative enzymes can be activated and favor the browning of fruit-derived products (Randazzo et al., 2016). Furthermore, cells of probiotic cultures incorporated in beverages could be likely suspended as particles in the solution, which were too small to precipitate but large enough to refract light (Pimentel, Madrona, Garcia, & Prudencio, 2015).

The viscosity of AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 decreased during storage. Previous studies have associated the increase of viscosity in juices with probiotic lactobacilli to the ability of some lactobacilli species to produce exopolysaccharides (Salazar et al., 2009). In contrast, some lactobacilli strains (e.g., *L. casei* HNK10, *L. casei* L1-8 and *L. plantarum* LC-5) have also been shown to produce pectinases, such as polygalacturonase and/or pectin-esterase (Karam & Belarbi, 1995). Thus, the viscosity in formulated smoothies could be a result of the breakdown of the açai- or mango-pectin present in AS and MS, respectively, by *L. acidophilus* LA-3 cells. However, there is no specific report in literature on the capability of *L. acidophilus* LA-3 to produce pectinase.

The phenolic compounds detected in AS and MS with or without *L. acidophilus* LA-3 are naturally present in the fruit used for their manufacture (AS: açai and banana; MS: mango and passion fruit) (Da Silveira et al., 2017; Singh, Singh, Kaur, & Singh 2016; López-Cobo et al., 2017; Corrêa et al., 2016). The metabolism of phenolic compounds by lactobacilli is not fully characterized and seems to be strain-specific (Filannino, Bai, Di Cagno, Gobbettu, & Gänzle, 2015). Through decarboxylation, dehydroxylation or cleavage probiotic lactobacilli can transform phenolic compounds into more bio-active and/or available forms (Özcan & Ekinici, 2016). In the present study, the increases or decreases of specific phenolics observed only in AS or MS with *L. acidophilus* LA-3 in the earlier 24 h of storage clearly indicate the capability of the studied strain to metabolize phenolics. The capability of different lactobacilli (*L. plantarum* C2 and C5, *L. spicheri* Lp38, *L. fermentum* FUA3165 and *L. reuteri* FUA3168) to catabolize phenolic compounds (e.g. p-coumaric, protocatechuic and caffeic acids) in the earlier 24 h of fermentation was observed in broccoli puree and cherry juice (Filannino et al. 2015). In their research, Kwaw et al. (2018) observed an increase in total amounts of phenolic compounds in mulberry juice with *L. plantarum* Lp-115TM (ATCC SD5209), *L. acidophilus* La-14TM (ATCC SD5212) and *L. paracasei* Lpc-37TM (ATCC SD5275) over 36 h of

fermentation. Additional studies focusing specifically on the pathways used by *Lactobacillus* species to metabolize phenolic compounds could help to clarify these differences.

To be successfully incorporated into a food, probiotics should ideally retain their viability during passage through the human gastrointestinal tract and reach the colon (Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, 2014). After a decrease in viable counts when exposed to the simulated high-acidic stomach conditions, *L. acidophilus* LA-3 maintained viable counts of 7.6 log CFU/mL in AS and of 8.6 log CFU/mL in MS, which were similar to those found in MRS broth. The higher sensitivity of *L. acidophilus* LA-3 in AS and MS to the acidic conditions during the in vitro digestion could be related to the lower pH of the former compared to AS. The adaptation of *L. acidophilus* LA-3 to the MS acidic conditions may result in higher survival rates during exposure to pH-stomach conditions (De Albuquerque et al., 2017; Barbosa, Borges, & Teixeira 2015). Overall, in both AS and MS the counts of *L. acidophilus* LA-3 were higher than the minimum counts of viable cells per gram required (6 log CFU/mL) in a foods portion at the moment of intake to ensure a favorable effect on the consumers health (Meira et al., 2015).

The sensory perception of panelists for attributes acid flavor, fermented aroma and viscosity was in accordance with the physicochemical data. The stronger acid flavor and fermented aroma perceived by panelists in AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 was most likely the result of the bacterial production of acid and aromatic compounds via fermentation (Smid, & Kleerebezem, 2014). Additionally, the instrumentally measured lower apparent viscosity of AS and MS with *L. acidophilus* LA-3 resulted in lower scores given by panelists for viscosity in sensory analysis.

The PCA is a mathematical tool that allows the visualization of the underlying structure in experimental data and relationships among data collected for distinct samples. The first main component of PCA explains most of the variance and reflects the agreement of the panelists on

attributes description (PC1). The second (PC2) is orthogonal to the PC1 and should cover the remaining variation. In the present study, PC1 explained more than 80% of the total variance between AS and MS. The parameters defining the PC1 were primarily related to the particular characteristics of fruit used in AS or MS, i.e. the purple color and banana aroma. PC2 was defined by attributes related to the *L. acidophilus* LA-3 metabolism, such as fermented aroma and viscosity, explaining the attributes that separate AS or MS with *L. acidophilus* LA-3 from those without this strain.

5. Conclusions

This study showed that AS and MS are good fruit-derived matrices for incorporation of *L. acidophilus* LA-3. The probiotic increased the acid flavor and fermented aroma in AS and MS. These changes could be most likely related to the metabolism of *L. acidophilus* LA-3, causing lower sugar and higher acid contents in formulated smoothies. Moreover, the incorporation of *L. acidophilus* LA-3 altered the amounts of different phenolic compounds in AS and MS, changing in phenolic profile of these beverages already in the beginning of storage. *L. acidophilus* LA-3 showed good ability to survival in AS and MS during refrigerate storage, as well as when exposed to stressful conditions imposed by simulated gastrointestinal conditions. *L. acidophilus* LA-3 survived better in MS than in AS on day 1 of storage, as well as when exposed to the most acidic condition of the in vitro digestion, suggesting that MS might be a better food matrix than AS for delivering *L. acidophilus* LA-3.

Acknowledgements

The authors would like to thank the CNPq (Brazil) for financial support and scholarship awarded to the first author (W.A. Luciano).

References

AOAC (2016). *Official Methods of Analysis*. 20th ed. AOAC Intl., Gaithersburg, MD. 20th ed. AOAC Intl., Gaithersburg, MD.

American Public Health Association (APHA). 2001. Compendium of methods for the microbiological examination of foods. 4th ed. Washington: APHA. 676p.

Barbosa, J., Borges, S., & Teixeira, P. (2015). Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. *Food Microbiology*, 52, 77-83.

Brazilian Legislation, Normative Instruction (2001). Ordinance N°. 12 Technical Bulletin of Microbiological Analyses in Foods. Available at: <http://www.anvisa.gov.br>. Accessed on: March 12, 2018.

Brazilian Legislation, Normative Instruction (2003). Ordinance N°. 12 Technical Bulletin for the Establishment of Identity and Quality Standards of Tropical Juices. Available at: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/insumos-agropecuarios/insumos-agricolas/sementes-e-mudas/legislacao>. Accessed on: March, 10, 2018.

Coelho, E. M., Padilha, C. V. S., Miskinis, G. A., de Sá, A. G. B., Pereira, G. E., Azevêdo, L. C., & Lima, M. S. (2018). Simultaneous analysis of sugars and organic acids in wine and grape juices by HPLC: Method validation and characterization of products from northeast Brazil. *Journal of Food Composition and Analysis*, 66, 160-167.

Commission Internationale de L'éclairage (CIE). Colourimetry. 3rd ed. Vienna: CIE, 2004. European Commission Regulation EC1441/2007 Microbiological criteria for foodstuffs. <https://publications.europa.eu/en/publication-detail/-/publication/da6af822-3c2b-4ba2-85aa-8fabaac106e4/language-en> (2018.03 last accessed).

Corrêa, R. C. G., Peralta, R. M., Haminiuk, C. W. I., Maciel, G. M., Bracht, A., & Ferreira, I. C. F. R. (2016). The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (Passion fruit). *Trends in Food Science & Technology*, 58, 79-95.

- Da Silveira, T. F. F., De Souza, T. C. L., Carvalho, A. V., Ribeiro, A. B., Kuhnle, G. G. C., & Godoy, H. T. (2017). White açai juice (*Euterpe oleracea*): Phenolic composition by LC-ESI-MS/MS, antioxidant capacity and inhibition effect on the formation of colorectal cancer related compounds. *Journal of Functional Foods*, 36, 215-223.
- De Albuquerque, T. M. R., Garcia, E. F., Araújo, A. O., Magnani, M., Saarela, M., & De Souza, E. L. (2017). In vitro characterization of *Lactobacillus* strains isolated from fruit processing byproducts as potential probiotics. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, DOI 10.1007/s12602-017-9318-2.
- Di Cagno, R., Minervini, G., Rizzello, C. G., De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2011). Effect of lactic acid fermentation on antioxidant, texture, color and sensory properties of red and green smoothies. *Food Microbiology*, 28, 1062-1071.
- Espírito-Santo, A. P., Cartolano, N. S., Silva, T. F., Soares, F. A. S.M., Gioielli, L. A., Perego, P., Converti, A., & Oliveira, M. N. (2012). Fibers from fruit by-products enhance probiotic viability and fatty acid profile and increase CLA content in yoghurts. *International Journal of Food Microbiology*, 154, 135–144.
- Filannino, P., Bai, Y., Di Cagno, R., Gobbetti, M., & Gänzle, M. G. (2015). Metabolism of phenolic compounds by *Lactobacillus* spp. During fermentation of cherry juice and broccoli puree. *Food Microbiology*, 46, 272-279.
- Herigstad, B., Hamilton, M., & Heersink, J. (2001). How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. *Journal of Microbiological Methods*, 44 (2), 121-129.
- Kanaeuchi, C., Seki, M., & Komagata, K. (1988). Production of succinic acid and related acids by *Lactobacillus* strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 54 (12), 3053-3056.
- Kaprasob, R., Kerdchoenchuen, O., Laohakunjit, N., Sarkar, D., & Shetty, K. (2017). Fermentation-based biotransformations of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. *Process Biochemistry*, 59, 141-149.

- Karam, N. E., & Belarbi, A. (1995). Detection of polygalacturonases and pectin esterases in lactic acid bacteria. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, 559-536.
- Kwaw, E., Ma, Y., Tchabo, W., Apaliya, M. T., Wu, M., Sackey, A. S., Xiao, L., & Tahir H. E. (2018). Effect of *Lactobacillus* strains on phenolic profile, color attributes and antioxidante activities of lactic-acid-fermented mulberry juice. *Food Chemistry*, 250, 148-154.
- Kuntz, S., Dudloff, S., Asseburg, H., Borsch, C., Fröhling, B., Unger, F., Dold, S., Spengler, B., Römpf, A., & Kunz, C. (2015). Uptake and bioavailability of anthocyanins and phenolic acids from grape/blueberry juice and smoothies *in vitro* and *in vivo*. *British Journal of Nutrition*, 113, 1044-1055.
- López-Cobo, A., Verardo, V., Diaz-de-Cerio, E., Segura-Carretero, A., Fernández-Gutiérrez, A., & Gómez-Caravaca, A. M. (2017). Use of HPLC- and GC-QTOF to determine hydrophilic and lipophilic phenols in mango fruit (*Mangifera indica* L.) and its by-productis. *Food Research International*, 100, 423-434.
- Markowski, J., Celejewska, K., Roslonek, A., & Kosmala, M. (2017). Impact of diferente termal preservation Technologies on the quality of apple-based smoothies. *LWT - Food Science and Technology*, 85, 470-473.
- Medina, M. B. (2011). Determination of the total phenolics in juices and superfruits by a novel chemical method. *Journal of Functional Foods*, 3, 79 – 87.
- Meilgaard, M., Civille, G.V., & Carr, B.T. (1999). *Sensory evaluation techniques*. 3th ed. Boca Raton: CRC.
- Meira, Q. G. S., Magnani, M., Júnior, F. C. M., Queiroga, R. C. R. E., Madruga, M. S., Gullón, B., Gomes, A. M. P., Pintado, M. M. E., De Sousa, E. L. (2015). Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterioum lactis* probiotic on the quality characteristic of goat ricota and their survival under simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 76, 828-238.

- Menezes, E., Deliza, R., Chan, H. L., & Guinard, J. X., (2011). Preferences and attitudes towards açai-based products among North American consumers. *Food Research International*, 44, 1997-2008.
- Morelli, L., & Capurso, L. (2012). FAO/WHO Guidelines on probiotics: 10 years later. *Journal of Clinical Gastroenterology*, 46, S1-S2.
- Nakai, H. Baumann, M. J., Petersen, B. O., Westphal, Y., Schols, H., Dilokpimol, A., Hachem, M. A., Lahtinen, S. J., Duus, J. O., & Syensson, B. (2009). The maltodextrin transport system and metabolism in *Lactobacillus acidophilus* NCFM and production of novel alpha-glucosides through reverse phosphorolysis by maltose phosphorylase. *FEBS Journal*, 276 (24), 7353-65.
- Nualkaekul, S., & Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 146, 111-117.
- Özcan, E., & Ekinici, F. (2016). Mechanisms underlying the effects of lactic acid bacteria (LAB) on phenolic compounds. *International Journal of Food and Biosystems*, 1, 7-15.
- Padilha, C. V., Miskinis, G. A., De Souza, M. E., Pereira, G. E., De Oliveira, D., Bordignon-Luiz, M. T., & Lima, M. D. (2017). Rapid determination of flavonoids and phenolic acids in grape juices and wines by RP-HPLC/DAD: Method validation and characterization of commercial products of the new Brazilian varieties of grape. *Food Chemistry*, 228, 106-115.
- Picouet, P. A., Hurtado, A., Jofré, A., Bañón, S., Ros, J. M., & Guàrdia, M. D. (2016). Effects of thermal and high-pressure treatments on the microbiological, nutritional and sensory quality of a multi-fruit smoothies. *Food Bioprocess Technology*, 9, 1219-1232.
- 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.

- Randazzo, W., Corona, O., Guarcello, R., Francesca, N., Germanà, M. A., Erten, H., Moschetti, G., & Settanni, L. (2016). Development of new non-dairy beverages from mediterranean fruit juices fermented with water kefir microorganisms. *Food Microbiology*, 54, 40-51.
- Rao, R. K., & Samak, G. (2013). Protection and restitution of gut barrier by probiotics: Nutritional and clinical implications. *Current Nutrition and Food Science*, 9 (2), 99-107.
- Rodríguez-Verástegui, L. L., Martínez-Hernández, G. B., Castillejo, N., Gómez, P. A., Artés, F., & Artés-Hernández, F. (2016). Bioactive compounds and enzymatic activity of red vegetables smoothies during storage. *Food Bioprocess & Technology*, 9, 137-146.
- Rufino, M. S. M., Pérez-Jiménez, J., Arrans, S., Alves, R. E., De Brito, E. S., Oliveira, M. S. P., & Saura-Calixto, F. (2011). Açaí (*Euterpe oleracea*) ‘BRS Pará’: A tropical fruit source of antioxidant dietary fiber and high antioxidant capacity oil. *Food Research International*, 44, 2100-2106.
- Sadowska-Krepa, E., Klapcinska, B., Podgórski, T., Szade, B., Tyl, K., & Hadzik, A. (2015). Effects of supplementation with acai (*Euterpe oleracea* Mart.) berry-based juice blend on the blood antioxidant defense capacity and lipid profile in junior hurdlers. A pilot study. *Biology of Sport*, 32 (2), 161-168.
- Salazar, N., Prieto, A., Leal, J. A., Mayo, B., Bada-Gancedo, J. C., De los Reyes-Gavilán, C. G., & Ruas-Madiedo, P. (2009). Production of exopolysaccharides by *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains of human origin, and metabolic activity of the producing bacteria in milk. *Journal of Dairy Science*, 92, 4158-68.
- Silva, M. P., Tulini, F. L., Marinho, J. F. U., Mazzocato, M. C., De Martinis, E. C. P.; Luccas, V., & Favaro-Trindade, C. S. (2017). Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation

of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 75, 640-647.

Singh, B., Singh, J. P., Kaur, A., & Singh, N. (2016). Bioactive compounds in banana and their associated health benefits – a review. *Food Chemistry*, 206, 1-11.

Smid, E. J., & Kleerebezem, M. (2014). Production of aroma compounds in lactic fermentations. *Annual Reviews Food Science and Technology*, 5, 313-26.

Torres-León, C., Rojas, R., Contreras-Esquivel, J. C., Serna-Cock, L., Belmares-Cerda, R. E., & Aguilar, C. N. (2016). Mango seed: Functional and nutritional properties. *Trends in Food Science & Technology*, 55, 109-117.

Valero-Cases, E., & Frutos, M. J. (2017). 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*, 81, 136-143.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 6, 205-214.

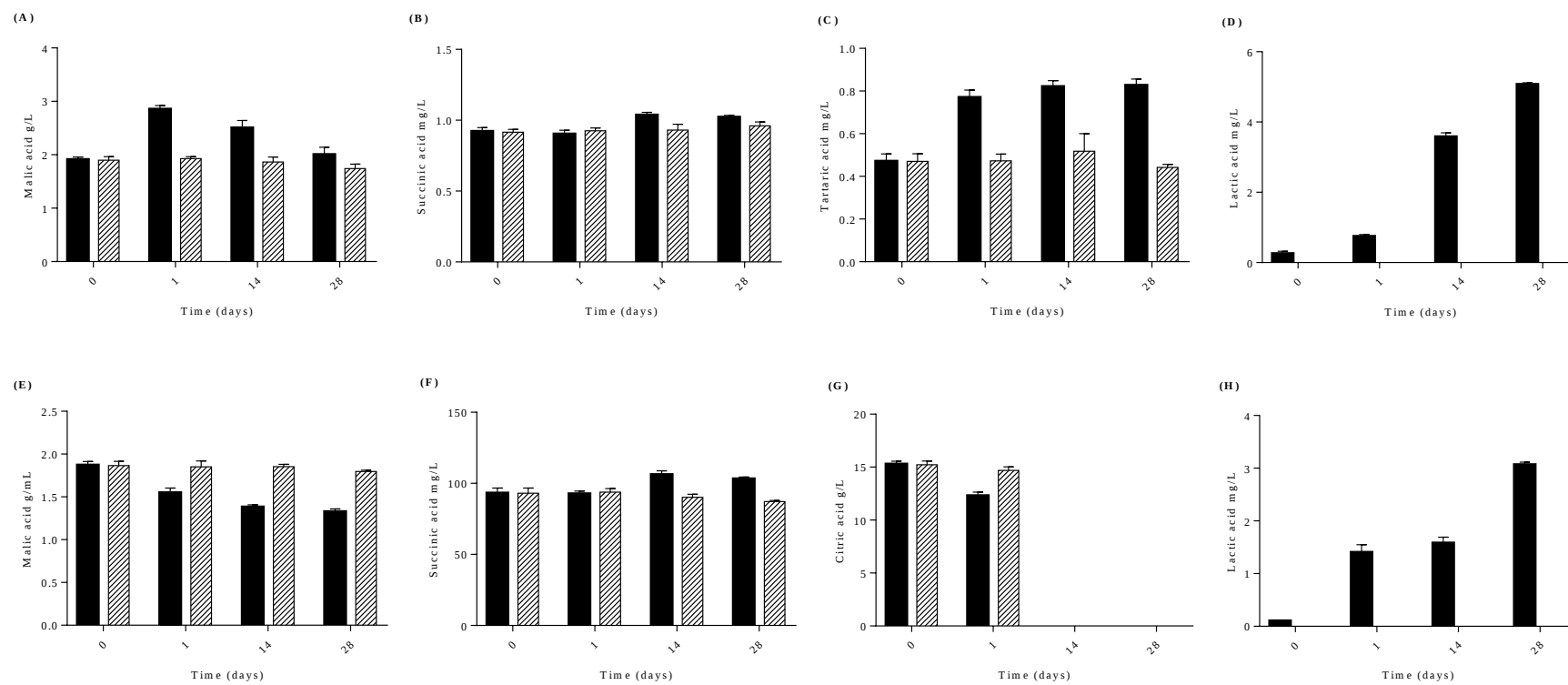
Figures

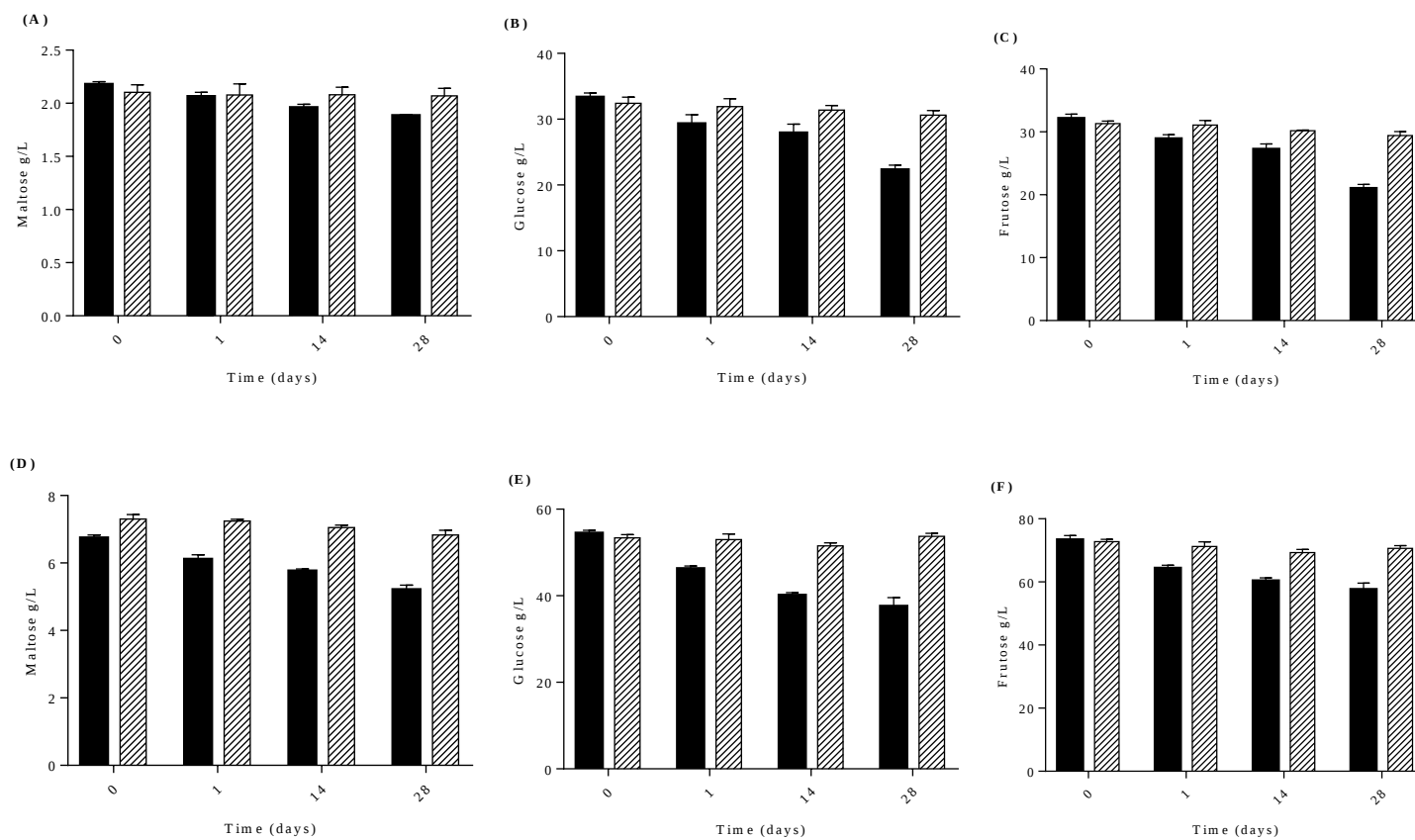
Fig. 1. Organic acids contents in fruit smoothies with *L. acidophilus* (LA-3) (■) and without *L. acidophilus* (LA-3) (▨) açai based smoothies (AS) (A – D) and mango based smoothie (MS) (E – H) during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of three independent experiments.

Fig. 2 Sugar contents in fruit smoothies with *L. acidophilus* (LA-3) (■) and without *L. acidophilus* (LA-3) (▨) açai based smoothies (AS) (A – C) and mango based smoothie (MS) (D – F) during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C). Data represent the means $\pm$ standard deviations (error bars) of three independent experiments.

Fig. 3. (A) Principal Component Analysis (PCA) of the physicochemical (pH and viscosity) and sensory (purple color, yellow color, apparent viscosity, açai aroma, banana aroma, mango aroma, passion fruit aroma, acid aroma, fermented aroma, sweet flavor, acid flavor, fermented flavor, viscosity) parameters of fruit smoothies; (B) distribution of samples according PCA: A (açai based smoothie with *L. acidophilus* LA-3); C (açai based smoothie without *L. acidophilus* LA-3), M (mango based smoothie with *L. acidophilus* LA-3); c (mango based smoothie without *L. acidophilus* LA-3).

Fig. 4. Survival (log cfu/g) of *L. acidophilus* (LA-3) in açai based smoothie (▲) and mango based smoothie (■) during exposure to simulated gastrointestinal conditions. The error bars represent the standard derivations.

**Fig. 1**

**Fig. 2**

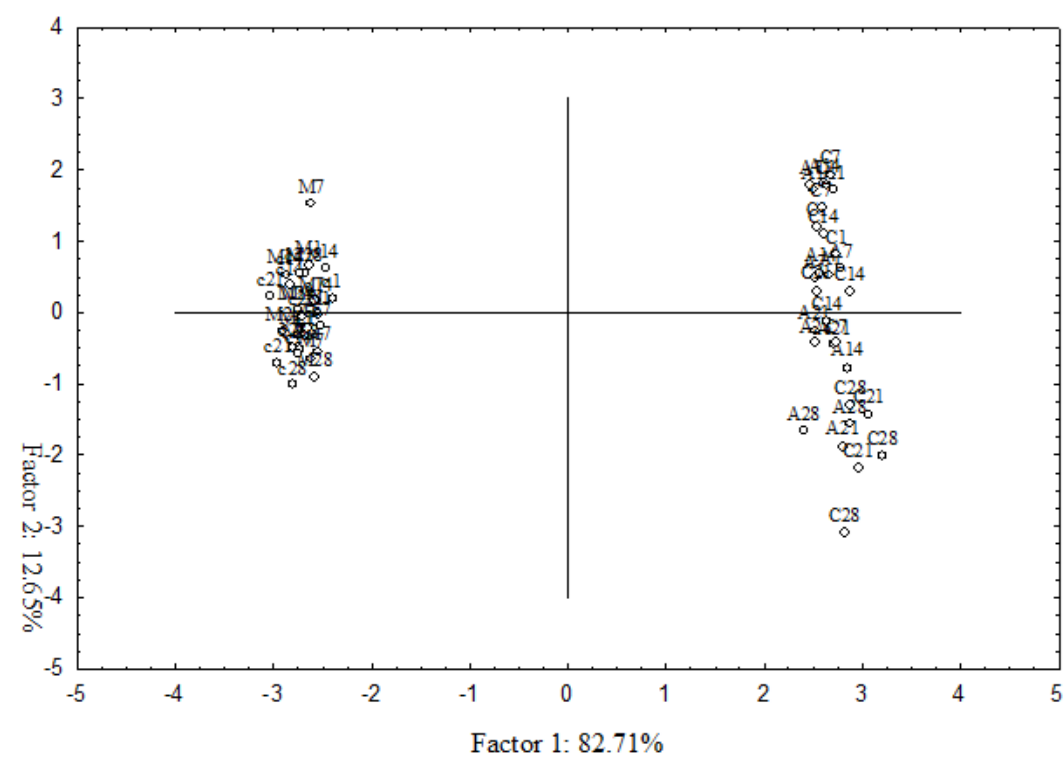
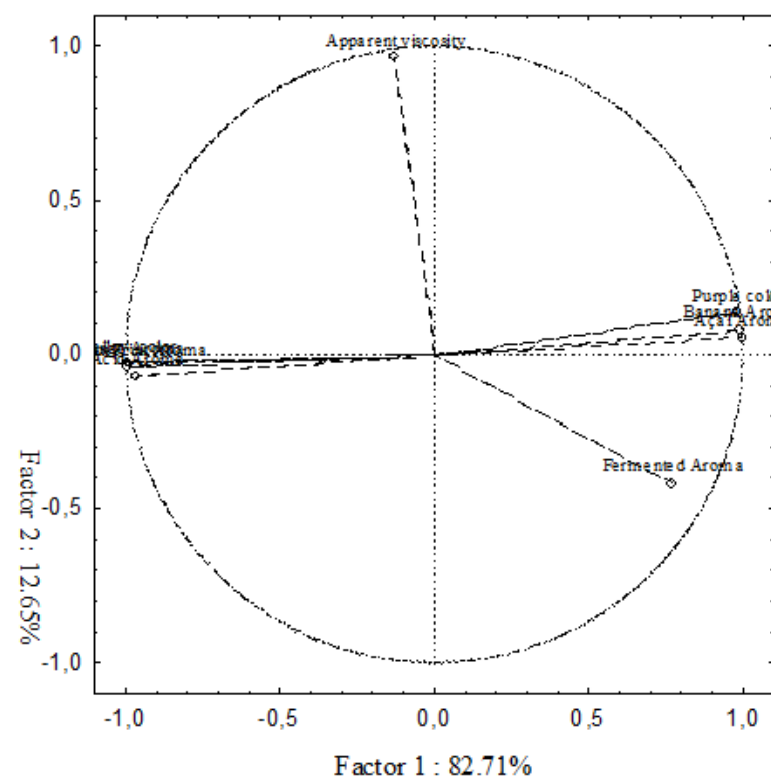


Fig. 3

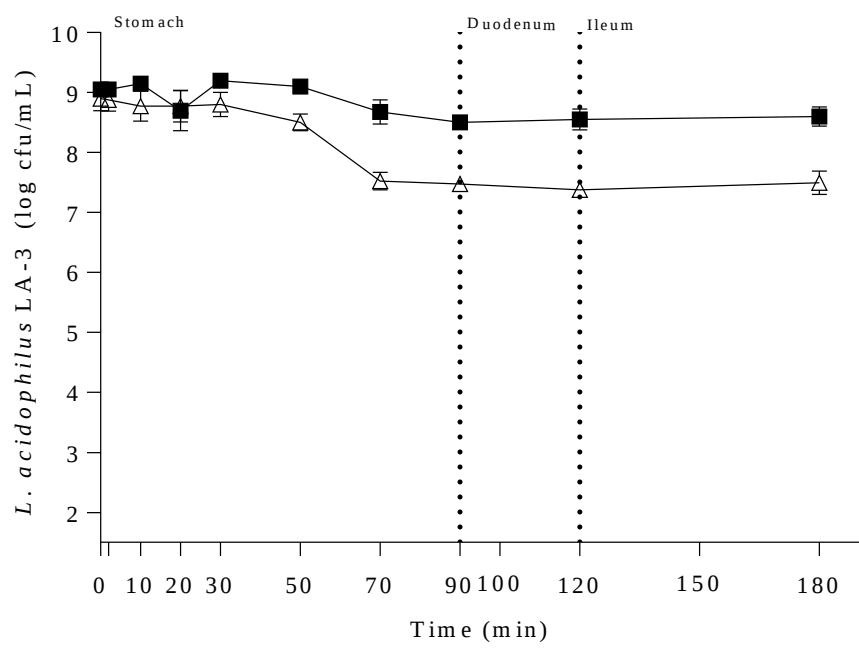


Fig. 4

Table 1. Counts (log CFU/mL) of *L. acidophilus* LA-3 in açai (AS) and (MS) mango based smoothies during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Days of storage	Mango-based smoothie	Açai-based smoothie
0	8,90±0.01 ^{B*}	9,10±0.01 ^{A*}
1	7.5±0.01 ^B	8.5±0.10 ^A
7	7.3±0.08 ^B	8.4±0.03 ^A
14	7.3±0.01 ^B	8.3±0.03 ^A
21	7.3±0.02 ^B	8.3±0.05 ^A
28	7.2±0.04 ^B	8.2±0.02 ^A

^{A-B}: different superscript capital letters in the same row for the different fruit smoothie denote differences ($p < 0.05$), based on t test; *: different superscript small letters in the same column for the same fruit smoothie at different storage time intervals denote difference ($p < 0.05$) based on student Tukey test.

Table 2. Contents of phenolic compounds in açai based smoothies with or without *L. acidophilus* LA-3 on day 0, 1, 14 and 28 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Phenolics	Smoothies	Days of storage			
		0	1	14	28
Syringic acid	Control	1.04±0.01 ^a	0.99±0.03 ^b	0.98±0.02 ^b	0.96±0.02 ^b
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.05±0.02 ^a	1.01±0.01 ^b	0.97±0.04 ^a	0.97±0.04 ^a
Epicatechin galate	Control	2.12±0.05 ^a	2.10±0.05 ^a	2.09±0.02 ^a	2.08±0.02 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	2.16±0.08 ^a	1.35±0.06 ^b	1.33±0.02 ^b	ND
Chlorogenic acid	Control	3.02±0.08 ^a	2.99±0.08 ^a	2.97±0.03 ^a	2.96±0.02 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	3.07±0.02 ^a	1.55±0.02 ^{*b}	1.55±0.04 ^{*b}	1.51±0.03 ^{*b}
Catechin	Control	7.53±0.12 ^a	7.50±0.05 ^a	7.36±0.10 ^a	7.23±0.28 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	7.50±0.08 ^b	7.96±0.07 ^{*a}	7.98±0.03 ^{*a}	7.99±0.15 ^{*a}
Procyanidin B1	Control	ND	ND	ND	ND
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	ND	1.76±0.07 ^a	1.81±0.02 ^a	1.85±0.06 ^a
Procyanidin B2	Control	6.01±0.02 ^a	6.03±0.07 ^a	6.03±0.02 ^a	6.06±0.02 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.03±0.07 ^b	6.99±0.02 ^{*a}	7.01±0.03 ^{*a}	7.03±0.02 ^{*a}
Cafeic acid	Control	0.92±0.01 ^a	0.92±0.01 ^a	0.89±0.01 ^b	0.88±0.01 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.90±0.02 ^a	0.75±0.04 ^{*b}	0.74±0.01 ^{*b}	0.71±0.03 ^{*b}
Epigallocatechin galato	Control	1.27±0.04 ^a	1.26±0.02 ^a	1.24±0.02 ^a	1.23±0.03 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.29±0.04 ^a	1.25±0.03 ^a	1.07±0.02 ^b	1.05±0.02 ^b
Epicatechin	Control	2.06±0.05 ^a	2.05±0.02 ^a	2.01±0.01 ^a	2.00±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	2.08±0.02 ^a	1.83±0.06 ^{*b}	1.79±0.02 ^{*b}	1.75±0.02 ^{*b}
p-Coumaric acid	Control	0.33±0.01 ^a	0.31±0.02 ^a	0.30±0.01 ^a	0.30±0.03 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.34±0.02 ^a	0.10±0.01 ^{*b}	0.10±0.01 ^{*b}	0.08±0.02 ^{*b}
Quercetin 3-glucoside	Control	2.03±0.05 ^a	2.01±0.01 ^a	2.00±0.03 ^a	1.98±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	2.01±0.02 ^a	1.15±0.02 ^{*b}	1.14±0.02 ^{*b}	1.12±0.01 ^{*b}
Kaempferol glucoside	Control	0.32±0.02 ^a	0.34±0.01 ^a	0.36±0.03 ^a	0.36±0.02 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.28±0.05 ^a	0.28±0.02 ^{*a}	0.30±0.02 ^{*a}	0.32±0.04 ^a
Cyanidin 3-glucoside	Control	5.34±0.13 ^a	5.26±0.25 ^a	5.24±0.11 ^a	5.21±0.03 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	5.31±0.08 ^a	1.50±0.10 ^{*b}	1.48±0.02 ^{*b}	1.44±0.01 ^{*b}
Pelargonidin glucoside	Control	16.78±0.94 ^a	5.47±0.50 ^b	5.46±0.10 ^b	5.40±0.09 ^b
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	16.75±0.85 ^a	8.28±0.58 ^{*b}	8.25±0.32 ^{*b}	8.12±0.01 ^{*b}
Peonidin 3-glucoside	Control	0.16±0.01 ^a	0.15±0.01 ^a	ND	ND
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.17±0.01 ^a	0.07±0.01 ^{*b}	ND	ND
Malvidin 3-glucoside	Control	1.29±0.04 ^a	1.26±0.01 ^a	1.25±0.02 ^a	1.25±0.03 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.28±0.02 ^a	0.19±0.01 ^{*b}	0.16±0.03 ^{*b}	ND

Control: fruit smoothie without *L. acidophilus* LA-3; *: asterisk in the same column denote difference from the control ($p < 0.05$) based on t test; a – b: different superscript lowercase letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) in the same fruit smoothie during storage time intervals based on Tukey test.

Table 3. Contents of phenolic compounds in mango based smoothies with or without *L. acidophilus* LA-3 on day 0, 1, 14 and 28 of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Phenolics	Sample	Days of storage			
		0	1	14	28
Hesperidin	Control	2.88±0.13 ^a	2.67±0.32 ^a	2.64±0.22 ^a	2.65±0.20 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	2.92±0.23 ^b	3.75±0.11 ^{*a}	3.83±0.21 ^{*a}	3.85±0.12 ^{*a}
Catechin	Control	6.03±0.21 ^a	6.01±0.23 ^a	5.97±0.42 ^a	5.93±0.21 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.24±0.42 ^b	8.54±0.12 ^{*a}	8.63±0.33 ^{*a}	8.64±0.42 ^{*a}
Cis-resveratrol	Control	0.94±0.04 ^a	0.95±0.01 ^a	0.95±0.02 ^a	0.97±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.97±0.02 ^b	2.12±0.12 ^{*a}	2.15±0.20 ^{*a}	2.16±0.21 ^{*a}
Procyanidin B1	Control	0.87±0.05 ^a	0.90±0.04 ^a	0.90±0.05 ^a	0.92±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.90±0.01 ^b	1.16±0.01 ^{*a}	1.18±0.01 ^{*a}	1.18±0.01 ^{*a}
Procyanidin B2	Control	0.95±0.04 ^a	0.97±0.03 ^a	0.97±0.01 ^a	0.98±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.94±0.04 ^b	1.35±0.22 ^{*a}	1.41±0.31 ^{*a}	1.42±0.40 ^{*a}
Procyanidin A2	Control	1.30±0.52 ^a	1.33±0.03 ^a	1.33±0.02 ^a	1.35±0.04 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.37±0.01 ^b	1.57±0.06 ^{*a}	1.61±0.08 ^{*a}	1.62±0.12 ^{*a}
Epicatechin	Control	ND	ND	ND	ND
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	ND	0.05±0.02 ^a	0.07±0.01 ^a	0.08±0.03 ^a
Galic acid	Control	9.82±0.30 ^a	9.80±0.18 ^a	9.78±0.26 ^a	9.77±0.30 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	9.80±0.27 ^a	5.15±0.10 ^{*b}	5.13±0.32 ^{*b}	5.10±0.40 ^{*b}

Control: fruit smoothie without *L. acidophilus* LA-3; *: asterisk in the same column denote differences ($p < 0.05$) from the control based on t test; a – b: different superscript lowercase letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) in the same fruit smoothie during storage time intervals based on Tukey test.

Supplementary Table 1. Values of physicochemical parameters of açai (AS) and (MS) mango based smoothies with or without *L. acidophilus* LA3 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Parameters	Days of storage	Açai-based smoothie		Mango-based smoothie	
		Control	With <i>L. acidophilus</i> LA-3	Control	With <i>L. acidophilus</i> LA-3
Titratable acidity (% citric acid)	0	0.22±0.00 ^a	0.22±0.06 ^b	1.07±0.01 ^a	1.07±0.01 ^b
	1	0.22±0.01 ^a	0.27±0.01 ^{*a}	1.07±0.00 ^a	1.10±0.00 ^{*a}
	7	0.22±0.01 ^a	0.28±0.03 ^{*a}	1.07±0.01 ^a	1.10±0.00 ^{*a}
	14	0.23±0.00 ^a	0.28±0.02 ^{*a}	1.08±0.01 ^a	1.10±0.01 ^{*a}
	21	0.25±0.00 ^a	0.30±0.01 ^{*a}	1.09±0.00 ^a	1.11±0.00 ^{*a}
	28	0.25±0.01 ^a	0.30±0.01 ^{*a}	1.09±0.00 ^a	1.11±0.01 ^{*a}
pH	0	4.63±0.00 ^a	4.64±0.01 ^a	3.82±0.01 ^a	3.81±0.00 ^a
	1	4.63±0.02 ^a	4.30±0.03 ^{*b}	3.83±0.03 ^a	3.66±0.03 ^{*b}
	7	4.62±0.01 ^a	4.28±0.01 ^{*b}	3.82±0.01 ^a	3.64±0.01 ^{*b}
	14	4.62±0.01 ^a	4.26±0.02 ^{*b}	3.80±0.01 ^a	3.63±0.02 ^{*b}
	21	4.60±0.02 ^a	4.25±0.03 ^{*b}	3.80±0.02 ^a	3.63±0.01 ^{*b}
	28	4.60±0.01 ^a	4.25±0.02 ^{*b}	3.79±0.03 ^a	3.60±0.03 ^{*b}
Total Soluble Solids (°Brix)	0	12.50±0.00 ^a	12.50±0.00 ^b	15.00±0.02 ^a	15.00±0.02 ^b
	1	12.50±0.00 ^a	12.50±0.10 ^b	15.00±0.03 ^a	15.10±0.04 ^b
	7	12.60±0.00 ^a	12.70±0.00 ^b	15.10±0.04 ^a	15.30±0.01 ^{*a}
	14	12.60±0.00 ^a	12.70±0.07 ^b	15.10±0.03 ^a	15.30±0.00 ^{*a}
	21	12.62±0.00 ^a	12.75±0.05 ^b	15.10±0.04 ^a	15.30±0.00 ^{*a}
	28	12.62±0.00 ^a	12.75±0.07 ^{*a}	15.20±0.02 ^a	15.40±0.00 ^{*a}
Viscosity (mPa.s)	0	371.2±1.8 ^a	372.5±0.0 ^a	391.0±1.7 ^a	392.5±0.0 ^a
	1	370.7±1.8 ^a	372.0±3.5 ^a	387.2±3.5 ^a	385.0±1.7 ^a
	7	369.5±3.5 ^a	359.0±0.6 ^b	384.2±4.6 ^a	380.2±1.8 ^{*a}
	14	368.0±2.1 ^a	326.2±1.8 ^{*c}	381.5±0.7 ^a	350.0±0.0 ^{*b}
	21	363.7±1.7 ^a	253.7±0.5 ^{*d}	378.0±1.8 ^a	332.5±0.0 ^{*c}
	28	362.5±3.6 ^a	125.2±0.4 ^{*e}	377.0±0.7 ^a	302.7±3.8 ^{*d}
L*	0	30.7±0.44 ^a	30.2±0.66 ^a	60.3±0.10 ^a	60.0±0.20 ^a
	1	30.1±0.55 ^a	29.4±0.40 ^a	60.1±0.09 ^a	59.8±0.17 ^a
	7	28.3±0.54 ^a	28.8±0.67 ^a	59.9±0.44 ^a	59.1±0.90 ^a
	14	27.0±0.86 ^{ab}	24.7±0.83 ^{*b}	59.2±0.30 ^a	58.7±0.30 ^a
	21	23.9±0.73 ^b	20.2±0.08 ^{*c}	58.5±0.20 ^b	57.9±0.60 ^{*b}
	28	20.0±0.80 ^c	15.6±0.56 ^{*d}	58.5±0.35 ^b	57.2±0.25 ^{*b}
a*	0	9.43±0.55 ^a	9.23±0.18 ^a	1.00±0.07 ^a	1.10±0.36 ^a

	1	9.35±0.70 ^a	8.85±0.29 ^b	9.92±0.03 ^a	0.20±0.14 ^{*b}
	7	9.33±0.59 ^a	8.81±0.60 ^b	9.87±0.05 ^a	-0.41±0.16 ^{*c}
	14	9.19±0.42 ^a	8.56±0.17 ^{*c}	9.73±0.04 ^a	-0.54±0.07 ^{*c}
	21	8.97±0.63 ^a	7.44±0.65 ^{*d}	9.57±0.24 ^a	-0.66±0.02 ^{*d}
	28	8.75±0.74 ^a	6.37±0.42 ^{*e}	9.54±0.10 ^a	-0.73±0.02 ^{*e}
b*	0	3.92±0.63 ^c	3.82±0.25 ^e	54.3±0.58 ^a	54.1±0.25 ^a
	1	4.12±0.16 ^c	5.24±0.11 ^{*d}	53.4±0.42 ^a	53.7±0.30 ^b
	7	5.05±0.10 ^c	6.86±0.64 ^{*c}	53.5±0.24 ^a	53.5±0.60 ^b
	14	6.33±0.37 ^b	8.00±0.57 ^{*b}	53.2±0.60 ^a	53.4±0.22 ^b
	21	6.38±0.23 ^b	8.27±0.34 ^{*b}	53.3±0.10 ^a	53.3±0.10 ^b
	28	7.24±0.54 ^a	9.31±0.68 ^{*a}	53.3±0.15 ^a	53.3±0.30 ^b
ΔE	0	-	-	-	-
	1	0.97±0.00 ^e	1.90±0.01 ^{*d}	1.07±0.01 ^a	1.83±0.00 ^{*c}
	7	2.37±0.02 ^c	2.16±0.01 ^{*c}	0.54±0.01 ^d	2.32±0.03 ^{*b}
	14	2.96±0.01 ^a	3.20±0.02 ^{*b}	0.93±0.00 ^b	1.28±0.01 ^{*d}
	21	2.16±0.00 ^d	2.18±0.02 ^c	0.72±0.00 ^c	0.74±0.00 ^e
	28	2.81±0.02 ^b	3.49±0.01 ^{*a}	0.94±0.01 ^b	2.99±0.03 ^{*a}

Control: fruit smoothie (AS or MS) without *L. acidophilus* LA-3; *: asterisk in the same row denote difference from the control ($p < 0.05$), based on t test; ^{a-e}: different superscript small letters in the same column for the same fruit smoothie at different storage time intervals denote difference ($p < 0.05$), based on Tukey test

Supplementary Table 2. Parameters of sensory descriptive quantitative analysis (n:3, mean values, $\pm$ standard deviation) in açai (AS) based smoothies and mango (MS) based smoothies with or without *L. acidophilus* LA-3 during 28 days of refrigerated storage (4 ± 0.5 °C).

Attributes	Açai-based smoothies	Days of storage				
		1	7	14	21	28
Purple color	Control	6.70 $\pm$ 0.63 ^a	6.51 $\pm$ 0.57 ^a	6.43 $\pm$ 0.49 ^a	6.35 $\pm$ 0.39 ^a	6.23 $\pm$ 0.78 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.93 $\pm$ 0.75 ^a	6.67 $\pm$ 0.55 ^a	6.66 $\pm$ 0.52 ^a	6.51 $\pm$ 0.45 ^a	6.30 $\pm$ 0.89 ^a
Apparent viscosity	Control	5.30 $\pm$ 0.64 ^a	5.26 $\pm$ 0.52 ^a	5.13 $\pm$ 0.45 ^a	4.87 $\pm$ 0.32 ^a	4.80 $\pm$ 0.60 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	5.40 $\pm$ 0.52 ^a	5.37 $\pm$ 0.71 ^a	5.20 $\pm$ 0.64 ^a	4.96 $\pm$ 0.40 ^a	4.87 $\pm$ 0.62 ^a
Açai aroma	Control	5.00 $\pm$ 0.71 ^a	5.20 $\pm$ 0.46 ^a	5.23 $\pm$ 0.30 ^a	5.35 $\pm$ 0.54 ^a	5.60 $\pm$ 0.55 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	4.89 $\pm$ 0.85 ^a	5.10 $\pm$ 0.64 ^a	5.33 $\pm$ 0.41 ^a	5.41 $\pm$ 0.59 ^a	5.63 $\pm$ 0.64 ^a
Banana aroma	Control	4.53 $\pm$ 0.59 ^a	4.67 $\pm$ 0.81 ^a	4.66 $\pm$ 0.60 ^a	4.11 $\pm$ 0.39 ^a	4.20 $\pm$ 0.45 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	4.60 $\pm$ 0.42 ^a	4.53 $\pm$ 0.35 ^a	4.57 $\pm$ 0.58 ^a	4.26 $\pm$ 0.41 ^a	4.17 $\pm$ 0.55 ^a
Acid aroma	Control	1.10 $\pm$ 0.34 ^a	1.16 $\pm$ 0.52 ^a	1.17 $\pm$ 0.66 ^a	1.23 $\pm$ 0.52 ^a	1.30 $\pm$ 0.45 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.20 $\pm$ 0.30 ^a	1.47 $\pm$ 0.35 ^a	1.53 $\pm$ 0.31 ^a	1.57 $\pm$ 0.32 ^a	1.67 $\pm$ 0.52 ^a
Fermented aroma	Control	0.88 $\pm$ 0.53 ^a	0.96 $\pm$ 0.25 ^a	1.06 $\pm$ 0.28 ^a	1.23 $\pm$ 0.55 ^a	1.30 $\pm$ 0.62 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.05 $\pm$ 0.55 ^b	1.27 $\pm$ 0.55 ^b	1.40 $\pm$ 0.44 ^b	2.36 $\pm$ 0.50 ^{*a}	2.87 $\pm$ 0.35 ^{*a}
Sweet flavor	Control	6.25 $\pm$ 0.59 ^a	6.13 $\pm$ 0.42 ^a	5.87 $\pm$ 0.75 ^a	5.83 $\pm$ 0.75 ^a	4.69 $\pm$ 0.80 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.21 $\pm$ 0.69 ^a	6.03 $\pm$ 0.80 ^a	6.00 $\pm$ 0.40 ^a	5.40 $\pm$ 0.73 ^a	5.28 $\pm$ 0.77 ^a
Acid flavor	Control	0.55 $\pm$ 0.42 ^a	0.53 $\pm$ 0.35 ^a	0.54 $\pm$ 0.30 ^a	0.59 $\pm$ 0.44 ^a	0.63 $\pm$ 0.35 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.60 $\pm$ 0.31 ^b	0.63 $\pm$ 0.27 ^b	0.77 $\pm$ 0.41 ^b	0.85 $\pm$ 0.23 ^b	1.48 $\pm$ 0.44 ^{*a}
Fermented flavor	Control	1.00 $\pm$ 0.67 ^a	1.08 $\pm$ 0.51 ^a	1.13 $\pm$ 0.42 ^a	1.40 $\pm$ 0.43 ^a	1.53 $\pm$ 0.28 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	1.85 $\pm$ 0.77 ^a	1.90 $\pm$ 0.43 ^{*a}	1.93 $\pm$ 0.58 ^{*a}	2.07 $\pm$ 0.44 ^{*a}	2.30 $\pm$ 0.22 ^{*a}
Viscosity	Control	5.67 $\pm$ 0.66 ^a	5.73 $\pm$ 0.54 ^a	5.63 $\pm$ 0.35 ^a	5.46 $\pm$ 0.74 ^a	5.20 $\pm$ 0.66 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	5.60 $\pm$ 0.65 ^a	4.86 $\pm$ 0.66 ^a	4.40 $\pm$ 0.22 ^{*b}	3.90 $\pm$ 0.51 ^{*bc}	3.16 $\pm$ 0.81 ^{*c}
Mango-based smoothies		1	7	14	21	28
Yellow color	Control	6.43 $\pm$ 0.40 ^a	6.53 $\pm$ 0.35 ^a	6.59 $\pm$ 0.32 ^a	6.63 $\pm$ 0.78 ^a	6.70 $\pm$ 0.43 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.47 $\pm$ 0.30 ^a	6.47 $\pm$ 0.25 ^a	6.60 $\pm$ 0.20 ^a	6.63 $\pm$ 0.44 ^a	6.74 $\pm$ 0.58 ^a
Apparent viscosity	Control	5.11 $\pm$ 0.23 ^a	5.16 $\pm$ 0.39 ^a	5.20 $\pm$ 0.30 ^a	5.33 $\pm$ 0.57 ^a	5.40 $\pm$ 0.58 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	5.13 $\pm$ 0.12 ^a	5.10 $\pm$ 0.10 ^a	5.20 $\pm$ 0.36 ^a	5.25 $\pm$ 0.50 ^a	5.37 $\pm$ 0.53 ^a
Mango aroma	Control	3.40 $\pm$ 0.30 ^a	3.47 $\pm$ 0.47 ^a	3.52 $\pm$ 0.20 ^a	3.61 $\pm$ 0.63 ^a	3.60 $\pm$ 0.72 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	3.37 $\pm$ 0.32 ^a	3.43 $\pm$ 0.45 ^a	3.50 $\pm$ 0.36 ^a	3.57 $\pm$ 0.45 ^a	3.61 $\pm$ 0.83 ^a
Passion fruit aroma	Control	5.33 $\pm$ 0.49 ^a	5.40 $\pm$ 0.46 ^a	5.43 $\pm$ 0.32 ^a	5.47 $\pm$ 0.35 ^a	5.53 $\pm$ 0.69 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	5.37 $\pm$ 0.31 ^a	5.42 $\pm$ 0.50 ^a	5.47 $\pm$ 0.35 ^a	5.54 $\pm$ 0.53 ^a	5.50 $\pm$ 0.64 ^a
Acid aroma	Control	3.33 $\pm$ 0.45 ^a	3.43 $\pm$ 0.25 ^a	3.40 $\pm$ 0.46 ^a	3.60 $\pm$ 0.58 ^a	3.67 $\pm$ 0.84 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	3.39 $\pm$ 0.35 ^a	3.57 $\pm$ 0.85 ^a	3.60 $\pm$ 0.36 ^a	3.70 $\pm$ 0.68 ^a	3.73 $\pm$ 0.51 ^a
Fermented aroma	Control	0.40 $\pm$ 0.20 ^a	0.45 $\pm$ 0.22 ^a	0.47 $\pm$ 0.12 ^a	0.49 $\pm$ 0.20 ^a	0.53 $\pm$ 0.24 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.49 $\pm$ 0.25 ^a	0.67 $\pm$ 0.25 ^a	0.70 $\pm$ 0.10 ^{*a}	0.87 $\pm$ 0.25 ^{*b}	0.93 $\pm$ 0.17 ^{*b}
Sweet flavor	Control	4.63 $\pm$ 0.38 ^a	4.67 $\pm$ 0.71 ^a	4.70 $\pm$ 0.30 ^a	4.77 $\pm$ 0.41 ^a	4.73 $\pm$ 0.43 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	4.60 $\pm$ 0.66 ^a	4.68 $\pm$ 0.50 ^a	4.72 $\pm$ 0.66 ^a	4.83 $\pm$ 0.75 ^a	4.80 $\pm$ 0.40 ^a
Acid flavor	Control	4.30 $\pm$ 0.26 ^a	4.17 $\pm$ 0.31 ^a	4.20 $\pm$ 0.20 ^a	4.23 $\pm$ 0.26 ^a	4.30 $\pm$ 0.24 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	4.37 $\pm$ 0.15 ^b	5.30 $\pm$ 0.20 ^{*a}	5.27 $\pm$ 0.32 ^{*a}	5.40 $\pm$ 0.38 ^{*a}	5.43 $\pm$ 0.66 ^{*a}
Fermented flavor	Control	0.52 $\pm$ 0.45 ^a	0.50 $\pm$ 0.32 ^a	0.54 $\pm$ 0.30 ^a	0.57 $\pm$ 0.44 ^a	0.60 $\pm$ 0.30 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	0.60 $\pm$ 0.30 ^a	0.63 $\pm$ 0.25 ^a	0.67 $\pm$ 0.21 ^a	0.65 $\pm$ 0.35 ^a	0.63 $\pm$ 0.47 ^a
Viscosity	Control	6.57 $\pm$ 0.51 ^a	6.50 $\pm$ 0.66 ^a	6.23 $\pm$ 0.65 ^a	6.27 $\pm$ 0.55 ^a	6.19 $\pm$ 0.87 ^a
	<i>L. acidophilus</i> LA-3	6.63 $\pm$ 0.75 ^a	5.83 $\pm$ 0.75 ^a	4.93 $\pm$ 0.21 ^{*b}	4.13 $\pm$ 0.73 ^{*b}	4.03 $\pm$ 0.74 ^{*b}

Control: fruit smoothie (AS or MS) without *L. acidophilus* LA-3; *: asterisk in the same column denote difference from the control ($p < 0.05$) based on t test; a – c: different superscript lowercase letters in the same row denote differences ($p < 0.05$) in the same fruit smoothie (AS or MS) during storage time intervals based on Tukey test.

**Intensity of each attribute was assessed using an unstructured scale ranging from 0 (poor) to 9 (strong), which anchored the minimal and the maximal values.

APÊNDICE A

Atibutos, definições e materiais referências para análise de *smoothie* de açaí

Atributo	Definição	Referência
APARÊNCIA		
Cor característica de açaí	Cor roxa, característica de polpa de açaí em condições ideais de consumo	Fraco: polpa de açaí armazenada em temperatura ambiente durante 24h exposta ao oxigênio Forte: polpa de açaí integral
Viscosidade aparente	Capacidade de um líquido aderir às paredes do copo ao ser levemente agitado	Fraco: polpa de açaí integral descongelada Forte: polpa de açaí pronta comercial congelada
AROMA		
Característico de açaí	Refere-se ao aroma polpa de açaí integral	Fraco: água deionizada Forte: polpa de açaí integral
Característico de banana	Refere-se ao aroma de banana <i>in natura</i>	Fraco: água deionizada Forte: banana <i>in natura</i>
Ácido	Sensação olfativa de acidez, semelhante à fruta ácida	Fraco: água deionizada Forte: polpa de maracujá
Fermentado	Aroma característico de fruta com sinal de deterioração	Fraco: polpa de açaí integral Forte: polpa de açaí comercial congelada
FLAVOR		
Doce	Sabor característico de solução de sacarose em água	Fraco: polpa de açaí integral Forte: polpa de açaí comercial congelada
Fermentado	Sabor característico de fruta com sinal de deterioração	Fraco: polpa de açaí integral Forte: polpa de açaí comercial congelada
TEXTURA		
Consistência	Característica de densidade do smoothie na boca	Fraco: polpa de açaí integral descongelada Forte: polpa de açaí comercial congelada

APÊNDICE B

Atibutos, definições e materiais referências para análise de *smoothie* de manga

Atributo	Definição	Referência
APARÊNCIA		
Cor amarela	Amarelo claro a amarelo escuro sob luz branca	Fraco: polpa de maracujá Forte: suco de manga pronto para consumo
Viscosidade aparente	Capacidade de um líquido aderir às paredes do copo ao ser levemente agitado	Fraco: suco de manga diluído em água em concentração de 20% Forte: polpa de manga
AROMA		
Característico de manga	Refere-se ao aroma de manga <i>in natura</i>	Fraco: água deionizada Forte: polpa de manga
Característico de maracujá	Refere-se ao aroma de maracujá <i>in natura</i>	Fraco: água deionizada Forte: polpa de maracujá
Ácido	Sensação olfativa de acidez, semelhante à fruta ácida	Fraco: água deionizada Forte: polpa de maracujá
Fermentado	Aroma característico de fruta com sinal de deterioração	Fraco: manga <i>in natura</i> Forte: suco de manga pronto para consumo
FLAVOR		
Doce	Sabor característico de solução de sacarose em água	Fraco: polpa de maracujá Forte: suco de manga pronto para consumo
Fermentado	Sabor característico de fruta com sinal de deterioração	Fraco: manga <i>in natura</i> Forte: suco de manga pronto para consumo
Ácido	Sensação produzida por solução ácida nas papilas gustativas	Fraco: suco de manga diluído em água em concentração de 20% Forte: polpa de maracujá
TEXTURA		
Consistência	Característica de densidade do smoothie na boca	Fraco: suco de manga diluído em água em concentração de 20% Forte: polpa de manga

APÊNDICE C

FICHA DE AVALIAÇÃO

NOME: _____ DATA: __/__/__

Por favor, avalie a intensidade de cada característica utilizando a escala correspondente.

AMOSTRA: _____

APARÊNCIA

Cor característica de açaí

Pouco Muito

Viscosidade

Pouco Muito

AROMA

Característico de açaí

Pouco Muito

Característico de banana

Pouco Muito

Ácido

Pouco Muito

Fermentado

Pouco Muito

GOSTO

Açaí

Pouco Muito

Banana

Pouco Muito

Ácido

Pouco Muito

Doce

Pouco Muito

Fermentado

Pouco Muito

TEXTURA

Consistência

Pouca Muita

APÊNDICE D

FICHA DE AVALIAÇÃO SMOOTHIE DE MANGA

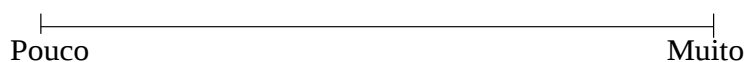
NOME: _____ DATA: __/__/__

Por favor, avalie a intensidade de cada característica utilizando a escala correspondente.

AMOSTRA: _____

APARÊNCIA

Cor amarela



Viscosidade

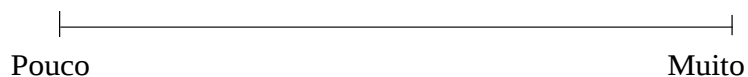


AROMA

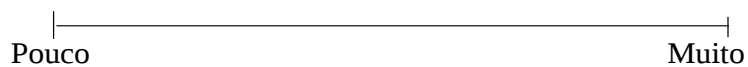
Característico de manga



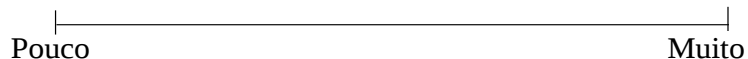
Característico de maracujá



Ácido



Fermentado

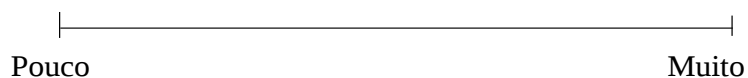


GOSTO

Característico de manga



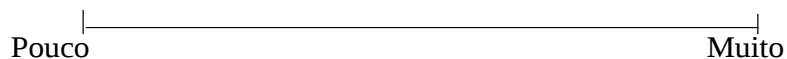
Característico de maracujá



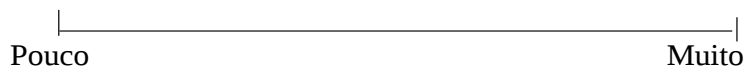
Ácido



Doce



Fermentado



TEXTURA

Consistência



ANEXO A



UFPB - HOSPITAL
UNIVERSITÁRIO LAURO
WANDERLEY DA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ELABORAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE SMOOTHIES DE FRUTAS TROPICAIS ADICIONADO DE *Lactobacillus acidophilus* (LA-05)

Pesquisador: WINNIE ALENCAR LUCIANO

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 79489917.6.0000.5183

Instituição Proponente: Programa de pós-graduação em ciência e tecnologia de alimentos

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.497.931

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Considerando que o(a) pesquisador(a) atendeu adequadamente às recomendações feitas por este Colegiado em parecer anterior a este, e que o estudo apresenta viabilidade ética e metodológica, estando em consonância com as diretrizes contidas na Resolução 466/2012, do CNS/MS, somos favoráveis ao desenvolvimento da investigação.

Considerações Finais a critério do CEP:

Ratificamos o parecer de APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa, emitido pelo Colegiado do CEP/HULW, em reunião ordinária realizada em 06 de fevereiro de 2018.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

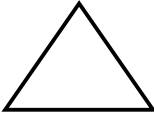
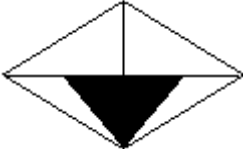
Não

JOAO PESSOA, 17 de Fevereiro de 2018

Assinado por:
MARIA ELIANE MOREIRA FREIRE
(Coordenador)

ANEXO B

TESTE DE AVALIAÇÃO DE HABILIDADE DO USO DE ESCALA NÃO
ESTRUTURADA

	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda
	NenhumaToda