



UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE ANTIBIÓTICOS
PROGRAMA DE DOUTORADO EM BIOTECNOLOGIA RENORBIO

ZILMAR MEIRELES PIMENTA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE SUCOS PROBIÓTICOS TERMOSSONICADOS E
FERMENTADOS DE ACEROLA E GOIABA**

Recife

2020

ZILMAR MEIRELES PIMENTA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE SUCOS PROBIÓTICOS TERMOSSONICADOS E
FERMENTADOS DE ACEROLA E GOIABA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Orientadora: Prof^a. Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Coorientadora: Prof^a. Dra. Patrícia Moreira Azoubel

Recife

2020

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso
(CRB4 1728)

Barros, Zilmar Meireles Pimenta

Desenvolvimento de sucos probióticos termossônicos e fermentados de acerola e goiaba / Zilmar Meireles Pimenta Barros – 2020.

117 f.: il., fig., tab.

Orientadora: Ester Ribeiro de Andrade

Coorientadora: Patrícia Moreira Azoubel

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, 2020.
Inclui referências e anexos.

1. Suco de frutas 2. Probióticos 3. Lactobacilo I. Andrade, Ester Ribeiro de (orient.) II. Azoubel, Patrícia Moreira

663.63

CDD (22.ed.)

UFPE/CB – 2021-050

ZILMAR MEIRELES PIMENTA BARROS

**DESENVOLVIMENTO DE SUCOS PROBIÓTICOS TERMOSSONICADOS E
FERMENTADOS DE ACEROLA E GOIABA**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO), da Universidade Federal de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de Concentração: Biotecnologia Industrial

Aprovada em: 31/08/2020

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a Dra. Fernanda Araújo Honorato
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Gláucia Manoella de Souza Lima
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Jaciana dos Santos Aguiar
Universidade Federal de Pernambuco

Prof^a Dra. Tatiana Souza Porto
Universidade Federal Rural de Pernambuco

Prof^a Dra. Ester Ribeiro de Andrade
Universidade Federal de Pernambuco

À minha família e a todos que contribuíram para
a realização desse trabalho.
DEDICO.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pela Vida.

A minha família que esteve ao meu lado em todos os momentos e é nossa primeira grande escola. A todos os professores e professoras que passaram por minha vida; meus mestres.

Agradeço, em especial, a minha orientadora, professora Ester Ribeiro de Andrade pela confiança, orientação e por todos os ensinamentos que passamos juntas ao longo desses anos e todas as emoções compartilhadas. A minha coorientadora Patricia Moreira Azoubel que não mediu esforços para me ajudar e me recebeu na UFPE com carinho e confiança.

Agradeço a Alexandre Barros pelo companheirismo e por acreditar em mim e me lembrar que nossos sonhos podem ser realizados, independente da ordem cronológica e da sequência lógica do tempo.

Agradeço ao meu filho João Lucas por todo Amor que trouxe para minha vida. Gabriel, meu neto amado e Thamires. A minha filha do coração Fernanda Barros, pela lembrança que sempre podemos contar com a inquietude da galera de vinte e poucos anos.

A Selma Holanda (Embrapa Recife) pela amorosidade e preocupação em me ajudar a encontrar uma porta entreaberta na UFPE. Foi em 2012 e foi maravilhoso!

A amiga Arine Lyra por está presente na minha vida e me trazer tranquilidade e amor nas conversas, orientações e abraços.

A vida nos presenteia com anjos em forma de pessoas que chegam nos mais diversos momentos. Todos trazendo amor e ajuda. Quanta ajuda! Aliás, sem esses anjos, não chegaria até aqui, nesses agradecimentos. A lista dos seus nomes seria enorme e cheia de palavras de imensa GRATIDÃO por tanto Amor recebido. Espero conseguir citar todos. E observando bem, um anjo vai nos entregando a outros, como um elo de almas unidas pelo objetivo singular da Vida: a cooperação, ajuda, união, solidariedade. No dia a dia, eu costumo traduzir esse objetivo com uma frase: “A União faz... açúcar.” E faz mesmo!!!

Só com esse “doce compartilhar” podemos, todos nós, chegar a cada resultado que traçamos como meta.

Agradeço a todos do LABBIO: equipe maravilhosa! No LABBIO compartilhamos experimentos de bancada e vivenciamos o laboratório da Vida que é indiscutivelmente uma caixa de surpresas, como as risadas e os choros e acima de tudo o carinho e a união;

Mariana Lucena com seu sorriso e leveza; Roberta Mendes, nossa “Penélope Charmosa” do LABBIO, com sua beleza e companheirismo. A Raíssa Andrade, por sua disponibilidade e amizade.

Eloyza Rozendo, Walqueane Santos, Renata Oliveira, Ricardo Marchezan e Letícia Nogueira. Como traduzir em palavras nossa convivência? Não sei... Só posso falar do quanto compartilhamos dentro e fora do laboratório. Em duas palavras: amorosidade e companheirismo. Gratidão pelos dias, noites e madrugadas que sabíamos que apesar de qualquer perrengue, **juntos** encontraríamos a solução. Amo vocês!!!!!!!

A Ronaldo, Eduarda, Bruna e Luiz Paulo, obrigada!

Agradeço a todos do Departamento de Antibióticos. A professora Norma Gusmão e seus alunos que sempre estavam prontos para me ajudar: Pérsio, Thales e Patricia. A coordenação da Renorbio, Teresinha Silva e Rafael Ximenes; Anderson e Mateus. Betânia e Jean e nossos cafezinhos cheios de boas conversas. A professora Jaciana com seu sorriso acolhedor.

Ao meu querido amigo Iranildo Cruz por todas as ajudas e amizade. Te amo!

A Diego Marques que me ajudou com um carinho imenso. Obrigada!!! Agradeço a turma de doutorado Renorbio 2016.1: André Silva, Érima Amorim, Kátia Rufino, Vanessa Lira, Tamires Meira e Edna. Junto com vocês tudo ficou mais leve. Obrigada!

Agradeço a todos do DEQ e do LabEA: minha eterna gratidão pela acolhida de cada um que me recebeu com carinho e me proporcionou tantos aprendizados e alegria: professora Fernanda Honorato que sempre me recebia com um sorriso e ensinamentos sobre dúvidas de Química Analítica e qualquer coisa mais. Ao amigo João Henrique Fernandes; Ramon, professora Otidene, Amanda, Naiana, Gilvan (Técnico de Hialotecnica), Rafael Araújo, Chesque, Ana Maria, Santula. Meus amores: Carlos Brian, Eunice Fraga, Shirley Rupert, Edilene, Edvaldo. Gratidão!

A Rafael Medeiros, meu lindo *amigo-anjo* que num momento de desânimo meu, ligou para mim e com todo amor disse: “Sei que você está exausta, mas eu estou com você para fazermos isso juntos. Não desista!”

Gratidão a Fatinha, amiga de cafezinhos e almoços; dona de uma linda alma. Gratidão enorme pela amizade e companheirismo de Daniely Dias e Viviane Lansky.

Aos amigos sempre presentes e torcendo pelas minhas conquistas: professor André Marques Cavalcanti, Auristela, Virginia.

Ao professor Mário Adelmo Varejão-Silva e Magali Brandão Paiva por todo carinho, acolhimento e conselhos, incondicionais. Após décadas de convivência, já me considero da família. Vocês são presentes de Deus.

Ao técnico Camilo (Departamento de Nutrição) e a empresa “Flesh Fruit”, na pessoa de Régis, pela doação das polpas de fruta e por entender a importância da pesquisa acadêmica.

Agradeço à Universidade Federal de Pernambuco, ao Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos (LABBIO) e ao LabEA (Engenharia de Alimentos) pela estrutura física e equipamentos concedidos.

Ao programa de pós-graduação RENORBIO.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES). Agradeço a concessão da bolsa de estudo.

A todos que me proporcionaram alegria em está todos os dias na UFPE.

Enfim, após “vasculhar” a memória, sei que deixei de citar pessoas que contribuíram para esse momento, mas que continuarei agradecendo e pedindo a Deus que abençoe cada um.

A todos que me ajudaram a tornar esse sonho possível: GRATIDÃO!!!

“- Lucy: O que fazer com o conhecimento que estou acessando?
- Prof. Norman: Se você está me perguntando o que fazer com todo o
conhecimento que você adquiriu, eu... (pausa);
Se você pensar sobre a essência da natureza, da Vida;
Eu diria que desde o princípio, do desenvolvimento da primeira célula,
sua divisão em duas células,
O único propósito da Vida tem sido transmitir o que foi aprendido.
Não há propósito maior.
Então, para sua pergunta, eu diria: **paque adiante**, assim como qualquer
célula tem feito desde o princípio.”

(Besson, 2014)

Resumo

Termossonicação é uma tecnologia emergente que combina o uso de ultrassom e temperatura moderada, sendo reconhecida na inativação microbiana em sucos de frutas. Esta técnica não causa degradação de compostos bioativos como ocorre com a pasteurização, o que resulta em alimentos com características mais próximas àquelas do produto fresco. O objetivo deste trabalho, portanto, foi avaliar o efeito da termossonicação na produção de sucos probióticos fermentados de acerola e de goiaba usando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. A termossonicação foi realizada em um processador ultrassônico (500 W; 19 kHz) associado a um banho ultratermostatizado. Foi realizado um planejamento composto central rotacional para determinar a condição mais promissora de termossonicação para cada suco (acerola e goiaba), avaliando a influência da intensidade de potência (20–100%) e temperatura (25-65 °C) sobre inativação microbiológica, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante, ácido ascórbico, carotenoides e cor. A produção (50 % V/V de polpa) e o estoque refrigerado (28 dias) dos sucos probióticos fermentados a 37 °C, durante 24 horas foram analisados na condição selecionada de termossonicação. A termossonicação se mostrou mais eficiente quando comparada à pasteurização, com valores de viabilidade celular para o parâmetro de inativação microbiológica inferior aos da pasteurização. Os teores de compostos bioativos para ambos os sucos termossonicados nessa condição apresentaram valores superiores quando comparados às amostras pasteurizadas, exceto para teor de carotenoides. A condição de termossonicação que apresentou esses resultados foi de 60% de intensidade de potência do ultrassom, temperatura de 65 °C e tempo de termossonicação de 10 minutos, para ambos os sucos. As produtividades volumétricas máximas em relação às células e ao produto foram quase o dobro quando os sucos foram termossonicados e a sobrevivência ao estoque foi 7,5% maior. A termossonicação evidenciou maior eficiência quando comparado ao tratamento térmico convencional, resultando em um suco probiótico fermentado vegetal com potencial para comercialização, que atenderá um segmento de mercado que busca produtos com probióticos em base não láctea.

Palavras-chave: Sucos probióticos. Viabilidade celular. Ultrassom. Pasteurização. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

Abstract

Thermosonication is an emerging technology that combines the use of ultrasound and moderate temperature, being recognized for microbial inactivation in fruit juices. This technique does not cause degradation of bioactive compounds as in pasteurization, which results in foods with characteristics closer to those of the fresh product. The objective of this work, therefore, was to evaluate the effect of thermosonication on the production of acerola and guava fermented probiotic juices using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Thermosonication was performed using an ultrasonic processor (500 W; 19 kHz) associated with an ultra-thermostated bath. A central rotational composite design was carried out to determine the most promising condition for each juice (acerola and guava), evaluating the influence of power intensity (20–100%) and temperature (25–65 °C) on microbiological inactivation, total phenolics compounds, antioxidant activity, ascorbic acid, carotenoids, and color. The produced (50% v/v of pulp) and the refrigerated (28 days) probiotic juices fermented at 37 °C for 24 hours were analyzed in the selected thermosonication condition. Thermosonication was more effective compared to pasteurization, with lower cell viability values for the microbiological inactivation parameter. The contents of bioactive compounds for both juices thermosonicated in this condition showed higher values when compared to pasteurized samples, except for carotenoid content. The thermosonication condition that presented these results was 60% of the power intensity, temperature of 65 °C, and thermosonication of 10 minutes, for both juices. The maximum volumetric productivities concerning the cells and the product were almost double when the juices were thermosonicated, and the stock survival was 7.5% greater. Thermosonication showed greater efficiency when compared to conventional heat treatment, resulting in a fermented vegetable probiotic juice with potential for commercialization, which will serve a market segment that seeks products with probiotics on a non-dairy basis.

Keywords: Probiotic juices. Cell viability. Ultrasound. Pasteurization. *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

LISTA DE FIGURAS

Revisão de Literatura

- Figura 1** – Ilustração dos efeitos das bactérias probióticas na saúde humana..... 26
- Figura 2** – Representação resumida das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias do gênero *Lactobacillus*. 28

Metodologia

- Figura 3** – Esquema ilustrativo dos processos da Etapa 1..... 42
- Figura 4** – Equipamento de ultrassom, banho ultratermostatizado (à esquerda) e béquer de parede dupla (à direita, detalhe) 44
- Figura 5** – Esquema ilustrativo dos processos da Etapa 2 – Avaliação da produção e estudo de estabilidade dos sucos probióticos fermentados, termossonicados e pasteurizados 49

Resultados e Discussão

Effect of thermosonication and pasteurization on quality parameters of acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*) juices

- Figure 1** – Tukey test for the set of assay for both juices; E5_7: correspond to the central points of the dcr (a); thermosonicated assay 4 and pasteurized samples (b); and thermosonicated assay 11 and pasteurized samples(c). Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level. 64
- Figure 2** – Tukey test for the set of assay for both juices for TPC; E5_7: correspond to the central points of the dcr. Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level. 67
- Figura 3** – Tukey test for the set of assay for both juices for AC; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level 69
- Figura 4** – Tukey test for the set of assay for both juices for Ascorbic acid; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level. 71

Figura 5 – Tukey test for the set of assay for both juices for Carotenoids; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.	73
Figura 6 – Tukey test for the set of assay for both juices for parameters $L^*(a)$, $a^*(b)$, $b^*(c)$; and TCD; E5_7: correspond to the central points of the dcr. Tukey test: different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.	76

Resultados e Discussão

Effect of thermosonication on the production of acerola and guava probiotic juices

Figure 1 – Viability and ph during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4)	88
Figure 2 – Glucose concentration during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4).	89
Figure 3 – Fructose concentration during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4).....	90
Figure 4 – Viability and ph during fermentation of guava juices (initial pH adjusted to 6).	91
Figure 5 – Glucose and fructose concentrations during fermentation of guava juice (initial pH adjusted to 6).	92

LISTA DE TABELAS

Revisão de Literatura

Tabela 1 – Compilação sobre as principais exigências para certificação de probióticos	21
Tabela 2 – Populações estudadas em ensaios clínicos, com uso de probióticos e toxicidade observada	24
Tabela 3 – Principais microrganismos considerados como probióticos	25
Tabela 4 – Especificações do meio de cultura MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) para <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	29
Tabela 5 – Principais definições de alimentos funcionais em outros países	31
Tabela 6 – Valor das exportações do agronegócio e de suco no Nordeste por Estado em 2018 (em us\$)	33
Tabela 7 – Composição nutricional de 100 g de polpa de fruta	34
Tabela 8 – Adequação de algumas espécies de <i>Lactobacillus</i> em diferentes tipos de sucos de frutas, com relação à sua tolerância a ambientes ácidos.	35

Metodologia

Tabela 9 – Variáveis independentes para o tratamento termossônico (tempo constante e igual a 10 minutos)	44
Tabela 10 – Planejamento experimental codificado e decodificado do tratamento termossônico	45

Resultados e Discussão

Effect of thermosonication and pasteurization on quality parameters of acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*) juices

Table 1 – Experimental design and response values of acerola juice: microbiological inactivation (Inat), Total Phenolic Compounds (TPC), Antioxidant Capacity (AC), Ascorbic acid content (Ascorbic acid), Carotenoid content (C), Total Color Difference (TCD) and color parameters	59
---	----

Table 2 – Experimental design and response values of acerola juice: microbiological inactivation (Inat), Total Phenolic Compounds (TPC), Antioxidant Capacity (AC), Ascorbic acid content (Ascorbic acid), Carotenoid content (C), Total Color Difference (TCD) and color parameters 60

Table 3 – Regression coefficients of the Response Surface Models of thermosonicated acerola juice for microbiological inactivation (Inat), Total Phenolic Compounds (TPC), Antioxidant Capacity (AC), Ascorbic acid content (Ascorbic acid), Carotenoid content (C), Total Color Difference (TCD) and color parameters 61

Table 4 – Regression coefficients of the Response Surface Models of thermosonicated guava juice for microbiological inactivation (Inat), Total Phenolic Compounds (TPC), Antioxidant Capacity (AC), Ascorbic acid content (Ascorbic acid), Carotenoid content (C), Total Color Difference (TCD) and color parameters 62

Resultados e Discussão

Effect of thermosonication on the production of acerola and guava probiotic juices

Table 1 – Comparison of Kinetic parameters of fermentations varying the fruit, the initial pH, and the type of treatment of the pulp. 93

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

AC	Antioxidant Capacity
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BAL	<i>Lactic Acid Bacteria</i>
C	Carotenoid content
CB/UFPE	Centro de Biociências da UFPE
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health</i>
CFU	<i>Colony Forming Unit</i>
CIELAB	<i>Commission Internationale de l'Eclairage</i> ; $L^*a^*b^*$, também conhecido como espaço de cor CIELAB (L^* , a^* e b^*)
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
CTG/UFPE	Centro de Tecnologia e Geociências da UFPE
DCCR	Delineamento Composto Central Rotacional
DPPH	1'-1'Diphenyl-2'picrylhydrazyl
EFSA	<i>European Food Safety Authority</i>
EU	<i>European Union</i>
FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FFC	<i>Functional Food Center</i>
GRAS	<i>Generally Recognized As Safe</i>
HTST	High Temperature and Short Time
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
Inat	Microbiological Inactivation
IP	Intensidade de Potência
LABBIO	Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos
MRS	de Man, Rogosa & Sharpe
OMS	Organização Mundial de Saúde
RDC	Resolução da Diretoria Colegiada
RSM	Metodologia de Superfície de Resposta
T	Temperatura
TCD	<i>Total Color Difference</i>
TPC	<i>Total Phenolic Compounds</i>
TSGI	Teste de Simulação das condições Gastrointestinais <i>in vitro</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
USDA	<i>United States Department of Agriculture</i>
AC	Antioxidant Capacity
AGCC	Ácidos Graxos de Cadeia Curta
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
ATCC	American Type Culture Collection

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2.1 OBJETIVO GERAL	20
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	20
3 REVISÃO DA LITERATURA	21
3.1 PROBIÓTICOS	21
3.1.1 <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	28
3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS	30
3.2.1 Sucos	32
3.2.2 Sucos Probióticos	35
3.3 TERMOSSONICAÇÃO COMO ALTERNATIVA À PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS – VANTAGENS E DESAFIOS	36
3.3.1 Sucos termossonicados	39
4 METODOLOGIA.....	41
4.1 ETAPA 1 – TRATAMENTO TERMOSSÔNICO E ANÁLISES DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS SUCOS	42
4.1.1 Preparação dos sucos de acerola e goiaba termossonicados.....	43
4.1.2 Tratamento de pasteurização dos sucos	45
4.1.3 Análises dos parâmetros de qualidade	45
4.1.3.1 Determinação da inativação microbiológica	45
4.1.3.2 Determinação do teor de fenólicos totais	46
4.1.3.3 Determinação da capacidade antioxidante (DPPH).....	46
4.1.3.4 Determinação de ácido ascórbico	46
4.1.3.5 Determinação de carotenoides	47

4.1.3.6 Cor	47
4.2 ETAPA 2 – PRODUÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS SUCOS PROBIÓTICOS FERMENTADOS	48
4.2.1 Estudo cinético da produção dos sucos probióticos fermentados	50
4.2.2 Determinação da viabilidade celular e pH	50
4.2.3 Determinação de ácido orgânico e carboidratos.....	51
4.2.4 Análise de armazenamento refrigerado	51
4.2.5 Análise estatística.....	51
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	52
5.1 Effect of thermosonication and pasteurization on quality parameters of acerola (<i>Malpighia emarginata</i>) and guava (<i>Psidium guajava</i>) juices.....	52
5.2 Effect of thermosonication on the production of acerola and guava probiotic juices	82
6 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	99
REFERÊNCIAS	100
ANEXOS	116
Anexo 1 – Comprovante de submissão do artigo 1.....	116
Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo 2.....	117

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos que quando são administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006). No mercado, as bebidas probióticas lácteas são mais disponíveis ao consumidor, restando poucas opções à parcela da população que não consome produtos de origem láctea.

Bebidas probióticas não lácteas, principalmente feitas com matriz vegetal, como os sucos de frutas, crescem em estudos e demanda. Esse crescimento se explica por razões como o aumento do número de pessoas com problemas de alergia às proteínas do leite, níveis altos de colesterol, intolerância à lactose e segmentos de mercado que consomem exclusivamente produtos de origem vegetal (ANDRADE et al., 2019). Além disso, os sucos de frutas se destacam na indústria alimentícia por serem avaliados pelos consumidores como práticos, saudáveis e refrescantes. Nas pesquisas biotecnológicas, comprovam possuir condições ideais para serem utilizados como meios de cultura de probióticos, uma vez que são ricos em nutrientes como compostos antioxidantes, vitaminas, fibras dietéticas e minerais (PEREIRA et al., 2011; RAWSON et al., 2011; CORONA et al., 2016; SOARES, 2018).

No Brasil, a região Nordeste se destaca na produção e consumo de frutas. A goiaba (*Psidium guajava*) e a acerola (*Malpighia emarginata* DC) apresentam produção expressiva, com destaque para Pernambuco dentre estados como Bahia, Ceará e Paraíba (IBGE, 2019; EMBRAPA, 2017). Essas frutas apresentam grande aceitação no mercado consumidor de sucos de frutas tropicais, associadas aos aspectos cultural e sensorial. Acerola é uma fruta nativa da América central, conhecida por seu alto teor de compostos bioativos e nutricionais, principalmente pelo seu elevado teor de ácido ascórbico (ANTUNES et al., 2013). A goiaba é originária da América tropical, apresenta relevância pelo seu valor nutricional e aspectos sensoriais como cor, aroma e sabor, sendo rica em carotenoides (CAMPOLI et al., 2018). Assim, os sucos dessas frutas apresentam características que os tornam potenciais veículos para cultivo de probióticos (ESPÍRITO-SANTO et al., 2015).

Os probióticos pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os mais utilizados em alimentos. A espécie *Lactobacillus rhamnosus* é utilizada na produção de alimentos probióticos de origem vegetal e estudos confirmam sua resistência a condições ácidas de fermentação (FARIAS et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016).

A linhagem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 vem sendo utilizada em sucos probióticos fermentados e não fermentados, sendo estudados com diversas matrizes vegetais

como maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) e goiaba (*Psidium guajava*) (FARIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2017; ANDRADE et al., 2019).

Dentre as características tecnológicas das bactérias probióticas estão: a) propriedades sensoriais agradáveis; b) resistência aos bacteriófagos; c) viabilidade durante o processamento; e d) estabilidade do produto e prolongamento do tempo de armazenamento refrigerado. Esse prolongamento de tempo se faz por meio da aplicação de calor, utilizada como tecnologia de conservação de alimentos. Entretanto, devido à degradação sensorial e nutricional que o calor pode promover nos alimentos, especialmente nos termosensíveis, como o ácido ascórbico, a indústria alimentícia vem buscando alternativas para substituir o tradicional tratamento térmico realizado por meio da pasteurização por tecnologias alternativas inovadoras (BALLUS et al., 2010).

O ultrassom se destaca como uma alternativa ao tratamento convencional. Vem sendo muito utilizado em sucos de frutas para assegurar a qualidade de seus compostos bioativos e inativação de enzimas (DIAS et al., 2015). Pode ser associado à temperatura moderada, convencionalmente chamada de termossonicação, que se apresenta como alternativa eficiente e inovadora para a inativação microbiana e a preservação dos compostos nutricionais e bioativos de sucos de frutas, quando comparada ao processo de pasteurização tradicional. Além disso, a tecnologia de termossonicação apresenta eficiência, é reprodutível e ecologicamente correta (ABID et al., 2014; SAEEDUDDIN et al., 2015).

Assim, o objetivo desse estudo foi o desenvolvimento de sucos probióticos de acerola e goiaba termossonicados e fermentados, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Inicialmente, foi investigada a influência da termossonicação na inativação microbiológica, em parâmetros de qualidade e cor dos sucos. A etapa seguinte compreendeu a produção e estudo da estabilidade durante o estoque dos sucos probióticos termossonicados e fermentados de acerola e goiaba utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Elaborar sucos probióticos termossonicados e fermentados de acerola e goiaba utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a influência da termossonicação dos sucos de acerola e goiaba sobre a inativação microbiológica e os compostos bioativos;
- Selecionar a condição mais promissora da termossonicação dos sucos quanto à eficácia da inativação microbiológica e preservação dos compostos bioativos;
- Comparar os efeitos da termossonicação e da pasteurização sobre a inativação microbiológica e os compostos bioativos;
- Determinar pH, viabilidade celular do microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, concentrações de glicose, frutose e ácido lático nas fermentações dos sucos termossonicados ou pasteurizados;
- Estudar a estabilidade e sobrevivência ao TSGI durante armazenamento refrigerado de 28 dias dos sucos probióticos viáveis, de acordo com os resultados dos parâmetros do objetivo anterior.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROBIÓTICOS

A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, sigla do inglês “Food and Agriculture Organization”) e a Organização Mundial de Saúde (OMS), em relação às diretrizes sobre as propriedades de saúde e nutricionais dos probióticos definiu os probióticos como “Microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro” (FAO, 2002).

A FAO/OMS ainda criaram diretrizes para a avaliação dos probióticos na alimentação e elencou as exigências mínimas para condição de probióticos. No Brasil, a ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária) é o órgão responsável pela legislação que regulamenta alimentos. Estudos diversos avaliaram os probióticos quanto as condições exigidas para serem considerados probióticos de uso seguro (Tabela 1).

Tabela 1 – Compilação sobre as principais exigências para certificação de probióticos

Exigência, critério e definição para assegurar probióticos	Fonte
Avaliação da identidade da linhagem (gênero, espécie e variedade);	
Testes <i>in vitro</i> , como resistência à acidez gástrica, ao ácido biliar e às enzimas digestivas, atividade antimicrobiana em relação a bactérias possivelmente patogênicas;	
Avaliação de segurança: exigências para comprovação de que uma cepa probiótica é segura e não está contaminada em sua forma de administração	FAO/WHO (2002)
Estudos <i>in vivo</i> para comprovação dos efeitos sobre a saúde no hospedeiro-alvo;	
Possuir a capacidade de resistir às variações de pH dos sucos gástrico e entérico	
Estudos <i>in vivo</i> para comprovação dos efeitos sobre a saúde no hospedeiro-alvo.	

continua

continuação

Caracterização do micro-organismo quanto ao gênero, espécie e linhagem

Produção de toxinas e bacteriocinas;

Perfil de resistência a antimicrobianos e informações sobre a base genética da resistência antimicrobiana, conforme metodologia descrita pela European Food Safety Authority (EFSA);

Estudos disponíveis na literatura que descrevam efeitos adversos observados com a linhagem em questão;

ANVISA (2002; 2008)

Demonstração de eficácia (produzir efeito desejado);

10^8 a 10^9 log Unidades Formadoras de Colônia (UFC) / porção do produto;

Viabilidade (capacidade de crescimento, desenvolvimento).

Ser de origem humana;

Não ser patogênico;

Resistir aos processos tecnológicos permanecendo viáveis e com os aspectos funcionais presentes;

Apresentar estabilidade ao meio ácido do estômago e sais biliares;

Aderir ao tecido epitelial;

FERREIRA (2012)

Possuir habilidade para persistir dentro do trato gastrointestinal através do antagonismo aos patógenos e da capacidade de colonização;

Produzir substâncias antimicrobianas;

Apresentar habilidade de modular o sistema imune através da estimulação ou supressão da resposta imunológica;

Influenciar atividades metabólicas;

Devem ser capazes de proliferar e colonizar o trato digestivo, devem ser seguros e manter a sua eficácia durante o prazo de validade do produto.

SAAD (2013)

Neutralizar possíveis disfunções e antagonizar patógenos existentes.

CEAPA et al. (2013; 2015)

continua

continuação

Possuir imunoestimulação, mas não efeito pró-inflamatório.	MATTILA-SANDHOLM et al. (2002)
Atividade antagonística em relação a patógenos, tais como <i>Helicobacter pylori</i> , <i>Salmonella</i> spp., <i>Listeria monocytogenes</i> e <i>Clostridium difficile</i> .	SCHILLINGER et al. (2005)
Propriedades antimutagênicas e anticarcinogênicas.	MARAGKOUDAKIS et al., (2006)
Documentação clínica e efeitos validados com relação aos benefícios à saúde	BORCHERS et al. (2009)

Os probióticos têm sido usados com segurança em alimentos e o interesse tem aumentado nas últimas décadas, devido ao seu uso para prevenir, mitigar ou tratar doenças específicas como síndrome do intestino irritável, disbiose, infecções urogenitais, dentre outras (DORON et al., 2015). De acordo com Patel e Underwood (2018), é importante a investigação e a comprovação dos efeitos funcionais dos probióticos, com estudos e fortes evidências científicas.

De acordo com a *European Union* (UE), os probióticos devem ser autorizados para uso após uma avaliação científica ter sido feita pelo Painel dos Produtos Dietéticos, Nutrição e Alergias (NDA) da *European Food Safety Authority* (EFSA) [Regulamentação (EC) nº 1924/2006] (VANDENPLAS et al., 2015).

Na Tabela 2 apresenta estudo de casos de ensaios clínicos, em que as populações foram observadas e foram relatados os eventos quanto à toxicidade dos probióticos. Verifica-se que na maioria dos trabalhos citados, com controle rígido de investigação e monitoramento, os ensaios clínicos demonstram sua baixa toxicidade.

Tabela 2 - Populações estudadas em ensaios clínicos, com uso de probióticos e toxicidade observada

População	Ensaio estudado	Toxicidade observada	Fonte
Crianças [1,2]	<i>Enterococcus</i> T-1 10, <i>Clostridium butyricum</i> , <i>Bacillus mesentericus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i>	Nenhuma	[1] Huang et al. 2014; [2] Olivares et al., 2014;
Crianças hospitalizadas [3,4]	LGG, <i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> , <i>Streptococcus thermophilus</i>	Nenhuma	[3] Szajewska et al., 2001; [4] Kumar et al., 2013;
Adultos hospitalizados [5,7]	LGG, BioK+	Nenhuma	[5] Manley et al., 2007; [6] Maziade et al., 2013; [7] Gao et al., 2010;
Imuno suprimidos [8-10]	<i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Leuconostoc mesenteroides</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i> subsp. <i>paracasei</i> F19, <i>Lactobacillus plantarum</i> , LGG, <i>L. johnsonii</i> LA 1, VSL #3, <i>L. plantarum</i> 299V (liver transplant), <i>S. boulardii</i> (HIV)	Um episódio invasivo de doença (LGG)	[8] Rayes, et al., 2002; [9] Rayes et al., 2005; [10] Saint-Marc et al., 1991;
Bebês [11-14]	LGG, LC705, Bb99, <i>Propionibacterium freudenreichii</i> spp <i>shermanii</i> , Bb12, <i>L. reuteri</i>	Um episódio de asfixia relatado	[11] Majamaa et al., 1997; [12] Isolauri et al., 2000; [13] Kukkonen et al., 2008; [14] Weizman et al., 2006;
Mulheres grávidas [15-17]	LGG, LC705, Bb99 e <i>Propionibacterium freudenreichii</i> spp <i>shermanii</i>	Nenhuma	[15] Kalliomäki et al., 2001; [16] Kukkonen et al., 2008; [17] Boyle et al., 2008;
Prematuros [18-21]	LGG, <i>B. longum</i> BB536, <i>Bifidobacterium</i> Bb12	Nenhuma	[18] Rouge et al., 2009; [19] Manzoni et al., 2006; [20] Mohan et al., 2008; [21] Mohan et al., 2006;
Idosos [22]	VSL#3 (<i>Streptococcus thermophilus</i> DSM 24731, <i>Bifidobacteria</i> (<i>B. longum</i> DSM 24736, <i>B. breves</i> DSM 24732, <i>B. infantis</i> DSM 24737), <i>Lactobacilli</i> (<i>L. acidophilus</i> DSM 24735, <i>L. plantarum</i> DSM 24730, <i>L. paracasei</i> DSM 24733, <i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i> DSM 24734)	Nenhuma	[22] Pellino et al., 2013;
Doença inflamatória Intestinal [23-24]	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Lactobacillus delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i> LBY-27, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12, <i>Streptococcus thermophilus</i> STY-31, LGG	Nenhuma	[23] Ahmed et al., 2013; [24] Bousvaros et al., 2005.

Fonte: Adaptado de DORON et al. (2015)

Abreviatura: LGG, *Lactobacillus* GG.

A concepção da microbiota intestinal como um ecossistema se torna primordial para a compreensão da relevância dos probióticos na saúde dos indivíduos. Esse ecossistema é composto de cerca de 100 a 1000 diferentes espécies microbianas, e se inicia no nascimento e evolui como resultado das interações entre dieta, genoma e estilo de vida do hospedeiro (KERRY et al., 2018). Na Tabela 3 são enumerados os principais probióticos, responsáveis por inúmeros benefícios à saúde. Na maior parte dos casos, os efeitos benéficos causados pelos probióticos estão relacionados com a saúde do intestino (VANDENPLAS et. al., 2015; DINLEYICI et al., 2015; TOSCANO et al., 2017).

Tabela 3 – Principais microrganismos considerados como probióticos

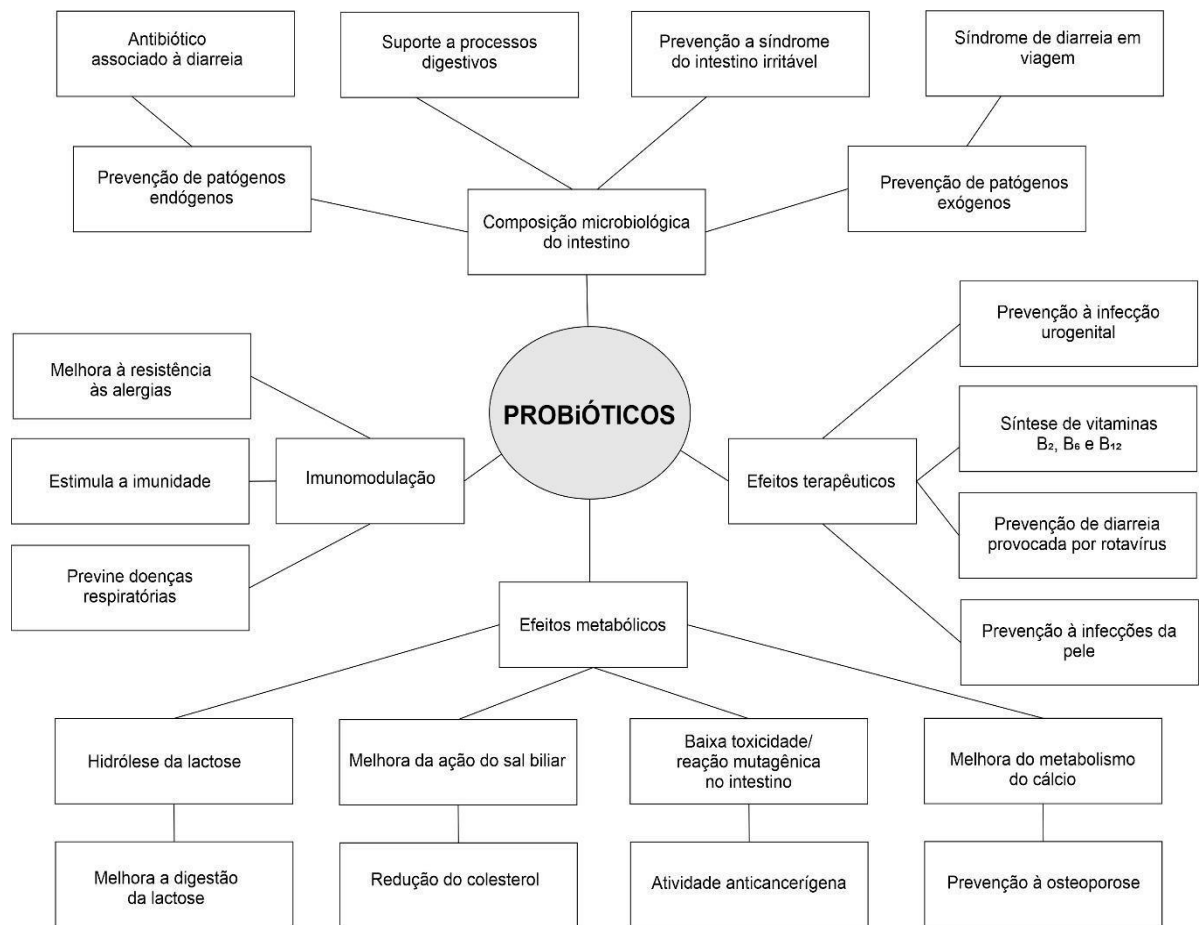
Lactobacillus	Bifidobacterium	Outras bacterias lácticas	Bacterias não lácticas
<i>L.acidophilus</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Enterococcus faecium</i>	<i>Escherichia coli</i> spp. nissle
<i>L. crispatus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>	<i>Propionibacterium</i>
<i>L. gasseri</i>	<i>B. longum</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	<i>freudenreichii</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. johnsonii</i>	<i>B. adolescentis</i>	<i>Streptococcus thermophilus</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. animalis</i>		
<i>L. plantarum</i>			
<i>L. reuteri</i>			
<i>L. rhamnosus</i>			
<i>L. bulgaricus</i>			
<i>L. salivarius</i>			
<i>L. lactis</i>			

Fonte: Syngai et al. (2016)

No Brasil, a ANVISA regulamenta e fiscaliza o uso de probióticos em alimentos por meio de guias e documentos normativos. A Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) 241/2018 trata dos requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Os probióticos aprovados pela ANVISA são: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium faecium* (BRASIL, 2018).

Quanto aos mecanismos de ação elucidados das bactérias probióticas, estão envolvidas a produção de compostos antimicrobianos, como a bacteriocina e a mucina; ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), que agem diminuindo a aderência e sobrevivência de microrganismos patogênicos, dentre outros benefícios como mostra a Figura 1 (SYNGAI et al., 2016; ANANDHARAJ et al., 2014).

Figura 1 – Ilustração dos efeitos das bactérias probióticas na saúde humana



Fonte: Adaptado de Anadharaj et al. (2014) e Syngai et. al. (2016)

O termo bactérias ácido lácticas está associado a dois grupos bacterianos filogeneticamente distintos: Lactobacillales (Firmicutes) e Bifidobacteriales (Actinobacteria). As bactérias ácido-láticas (BAL, abreviação em inglês) pertencem ao grupo de bactérias Gram-positivas, não esporuladas, anaeróbicas ou facultativas, unidas por características morfológicas, metabólicas e fisiológicas semelhantes (LEE et al., 2014).

As bactérias ácido lácticas são empregadas na produção de alimentos, como leites fermentados, iogurtes, queijos e bebidas fermentadas. No entanto, em algumas situações podem ser responsáveis pela produção de sabores e aromas indesejáveis. Essas bactérias são largamente encontradas na natureza, incluindo o trato gastrointestinal e urogenitais de humanos (intestino e vagina) e animais (PARVEZ et al., 2006; SHORI et al., 2016).

Essas bactérias constituem o grupo mais importante para o uso humano devido a sua importância na preservação dos alimentos e para aspectos benéficos à saúde dos consumidores. De acordo com Bron e Kleerebezem (2011), a grande variedade de habitats justifica a diversidade genética desse grupo. Uma característica muito importante para diferenciação desse grupo é a ausência de formação de esporos (COSTA, 2006).

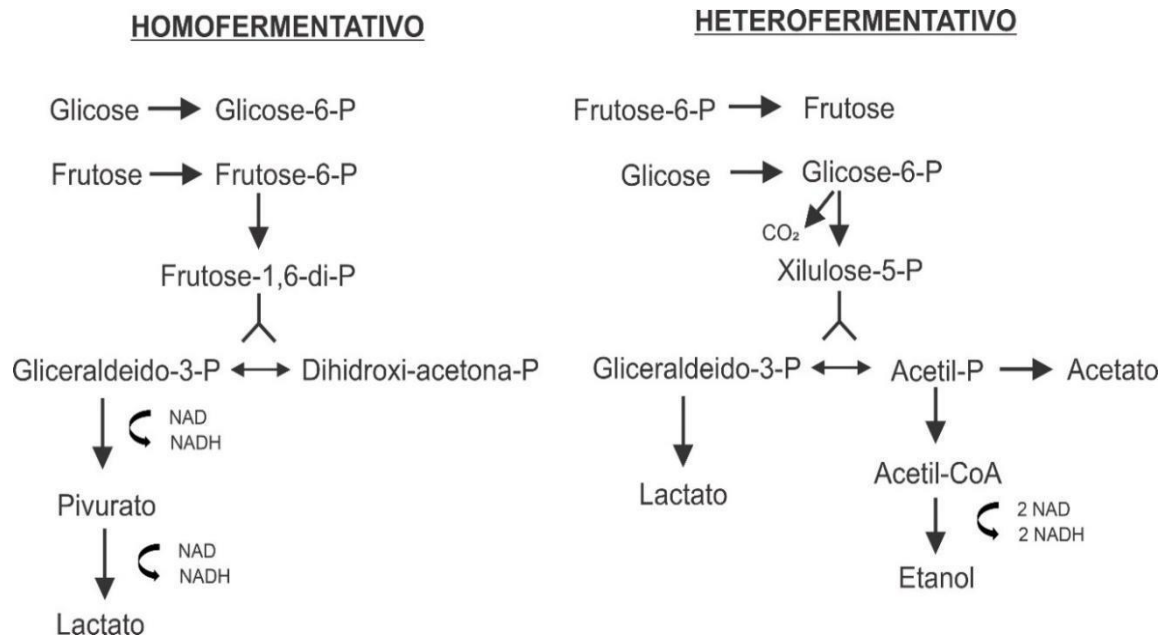
As famílias Enterococcaceae, Leuconostocaceae possuem a maioria dos gêneros e espécies que são essenciais para fermentação de alimentos, sendo usados como culturas fermentadoras. Por outro lado, duas famílias, a Aerococcaceae e a Carnobacteriaceae, estão mais relacionadas com contaminantes alimentares (KHANDELWAL et al., 2016). Para produtos probióticos, as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, são mais empregadas, pois foram isoladas de diferentes porções do trato gastrointestinal do humano saudável (SAAD, 2006; VINUSHA et al., 2018).

O principal produto da fermentação de BAL é o ácido láctico, um composto antimicrobiano, resultante do consumo de carboidratos. O critério para classificar BAL compreende morfologia celular, comportamento metabólico ou vias metabólicas utilizadas, faixa de temperatura de crescimento e padrão de utilização de açúcar (VARSHA; NAMPOOTHIRI, 2016).

O gênero *Lactobacillus* pode ser enquadrado em três grupos distintos, quanto ao modo como realizam a degradação e o consumo dos carboidratos e o modo como metabolizam o carbono (KANDLER, 1983). A classificação desse metabolismo se apresenta em três diferentes vias: 1) grupo dos lactobacilos homofermentativos obrigatórios, onde as hexoses são convertidas exclusivamente em ácido láctico pela via Embden-Meyerhof-Parnas; 2) grupo dos heterofermentativos obrigatórios, que utilizam a via 6-fosfogluconato/fosfocetolase para a fermentação de hexoses, produzindo ácido láctico, etanol e/ou ácido acético e 3) o grupo dos lactobacilos heterofermentativos facultativos, que as hexoses são fermentadas de forma similar ao grupo homofermentativo, mas apresenta limitação de glicose, sendo capazes de converterem as hexoses em ácido láctico, ácido

acético e/ou etanol (BINTSIS, 2018). As rotas metabólicas citadas podem ser observadas na Figura 2.

Figura 2 – Representação resumida das vias do metabolismo homofermentativo e heterofermentativo em bactérias do gênero *Lactobacillus*.



Fonte: Adaptado de KANDLER (1983); COSTA (2006)

3.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

A espécie *Lactobacillus rhamnosus* está entre o grupo chamado “*Lactobacillus casei*”, que compreende o conjunto: *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*. Succi et al. (2005) isolaram a linhagem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469 estudando queijo parmesão. Também, a linhagem *Lactobacillus rhamnosus* HN001 foi isolada de queijo parmesão, apresentando propriedade de melhorar o sabor do queijo (BINTSIS, 2018).

Quanto ao metabolismo do microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, este é classificado como heterofermentativo facultativo, fermentando hexoses e pentoses, utilizando fonte de carbono para produção de ácidos orgânicos como o ácido lático (DOUILLARD et al., 2013; MANDIGAN et al., 2010; BURITI; SAAD, 2007). O meio de

cultivo utilizado é o MRS (de MAN, ROGOSA, SHARPE; MERCK, Darmstadt, Alemanha), com formulação adequada para atender sua demanda nutricional, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 – Especificações do meio de cultura MRS (de Man, Rogosa, Sharpe) para *Lactobacillus rhamnosus*.

Composto	Fórmula Molecular	Quantidade	Função
Extrato de carne	-	10 g/L	Fonte de carbono, nitrogênio e vitaminas
Extrato de levedura	-	5 g/L	
Peptona	-	20 g/L	
Glicose	C ₆ H ₁₂ O ₆	20 g/L	
Acetato de Sódio	C ₂ H ₂ NaO ₂	2 g/L	Agentes inibidores e seletivos para <i>Lactobacillus</i> spp.
Citrato de amônio	C ₆ H ₁₄ O ₇ N ₂		
Sulfato de Magnésio	MgSO ₄	0,1 g/L	Fornecedores de cátions utilizados no metabolismo
Sulfato de Manganês	MnSO ₄	0,05 g/L	
Fosfato de Potássio	KH ₂ PO ₄	2 g/L	Agente tamponante responsável por equilibrar o pH
Monobásico Tween 80	-	1 mL/L	Agente surfactante que facilita a captura dos nutrientes pelos <i>Lactobacillus</i> spp.

Fonte: SANTOS (2017)

Na década de 80 foi realizado o isolamento do *Lactobacillus rhamnosus* LGG e sua certificação pela empresa finlandesa de produtos lácteos Valio®. *Lactobacillus rhamnosus* é utilizado e comercializado em mais de 30 países (FAO, 2001). Uma das características desse probiótico é a capacidade de produzir substâncias de baixo peso molecular de ação antibacteriana, e tem como vantagem combater espécies anaeróbias, tais como enterobactérias (*Escherichia coli* e *Salmonella typhi*) que estão associadas com várias enfermidades à saúde humana e animal. (SILVA et al., 1987; PITHVA et al., 2012). São ainda capazes de destruir micotoxinas e cianotoxinas (OELSCHLAEGGER, 2010). Oliveira et al. (2017) mostrou que *L. rhamnosus* tem elevada atividade imunomoduladora contra patógenos entéricos.

De acordo Cichoski et al. (2008), o microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* apresenta robustez quanto a sobrevivência e aderência à mucosa intestinal, com possível aumento da atividade imunológica e uma capacidade superior de tolerar condições adversas

do trato gastrointestinal. De acordo com Reale et al. (2015), esse probiótico tem maior habilidade de sobrevivência após fortes choques térmicos.

A espécie probiótica *Lactobacillus rhamnosus* tem recebido o termo de Presunção Qualificada de Segurança, certificada como GRAS (*Generally Regarded as Safe*) pelo *Centers for Disease Control and Prevention National Institutes of Health* (CDC, 2018; SNYDMAN, 2008; RANDAZZO et al., 2013; FDA, 2020).

Para sucos de frutas a espécie *Lactobacillus rhamnosus* tem sido muito utilizada em formulações não-fermentadas e fermentadas. De fato, resultados promissores de viabilidade e produção em sucos de frutas têm sido relatados (RANDAZZO et al., 2013; MOREIRA et al., 2016; NEMATOLLAHI et al., 2016).

A linhagem ATCC 7469 vem sendo investigada e utilizada na preparação de sucos de frutas, fermentados ou não, para produção de bebidas probióticas por 1) Farias et al. (2016), 2) Santos et al. (2017) e 3) Andrade et al. (2019). Esses estudos investigaram: 1) a otimização da viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco de maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.), utilizando modelo matemático (Delineamento Composto Central Rotacional – DCCR); 2) o comportamento do microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 no desenvolvimento de bebidas probióticas à base de polpa e pectina extraída do maracujá da Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.); e 3) o comportamento da viabilidade celular durante armazenamento refrigerado por 28 dias em suco de bebidas probióticas à base de suco de goiaba.

O uso de sucos de frutas como matriz alimentar de probiótico em alimentos industrializados tem sido estudado por possuírem atributos que os tornam atrativos do ponto de vista do mercado consumidor como alimento funcional (PREZZI, 2014; WHITE; HEKMAT, 2018).

3.2 ALIMENTOS FUNCIONAIS

A definição de alimentos funcionais, de acordo com FUNCTIONAL FOOD CENTER – FFC (Centro de Alimentos Funcionais) é “alimentos naturais ou processados que contêm compostos biologicamente ativos conhecidos ou desconhecidos que não apresentam efeitos tóxicos e que exercem benefícios clinicamente comprovados e documentados para a prevenção ou tratamento de doenças crônicas” (FFC, 2014).

No Brasil, a legislação nº 18 e 19 de 30/04/1999, aprovada pela ANVISA, não define alimentos funcionais e sim “Alegação de propriedade funcional” e “Alegação de propriedade

de saúde” (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b). A primeira diz respeito “aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções”; a segunda diz “é aquela que afirma, sugere ou implica a existência da relação entre o alimento ou ingrediente com doença ou condição relacionada à saúde” (SOARES, 2018).

A atividade de um alimento funcional é baseada em componentes bioativos, contidos naturalmente no produto (FIGUEROA-GONZÁLEZ, 2011). Porém, com a oferta de produtos funcionais ao mercado consumidor, esses podem assumir diversas denominações, como alimentos funcionais enriquecidos, adicionados de compostos bioativos adicionados como antioxidantes, fibras alimentares, vitaminas e minerais, probióticos, prebióticos, dentre outros (BALDISSERA et al., 2011; ANDRADE et al., 2019). A Tabela 5 mostra a definição de alimentos funcionais em vários países, cujo tema central é que o alimento funcional contenha substâncias e nutrientes capazes de evitar doenças e promover a saúde.

Tabela 5 – Principais definições de alimentos funcionais em outros países

Países	Definição
Canadá (Health Canada)	Componentes alimentares que, além das suas funções nutritivas básicas, fornecem benefícios fisiológicos comprovados ou reduzem o risco de doença crônica. Um alimento funcional é semelhante a um alimento convencional, e seus componentes ativos ocorrem naturalmente.
EUA (Institute of Food Technologists)	Alimentos e componentes alimentares que, além da nutrição básica, trazem benefícios à saúde de uma determinada população. Existem nessas substâncias nutrientes essenciais muitas vezes além das quantidades necessárias para manutenção, crescimento e desenvolvimento normais, e/ou outros componentes biologicamente ativos que beneficiam a saúde com efeitos fisiológicos esperados.
Japão (Japanese Department of Health)	Com base no conhecimento acerca da relação entre o alimento ou seus componentes e a saúde, são substâncias que propiciam benefícios à saúde e recebem selo de certificação com essa garantia.
União Europeia (European Commission, Health and Consumer Protection)	Alimento que, além do seu valor nutritivo, beneficia comprovadamente uma ou várias funções do organismo, de modo que melhore o estado de saúde, promova o bem-estar e/ou reduza os riscos de doença.
Austrália (National Center of Excellence in Functional Foods)	Alimentos que correspondem às demandas dos consumidores em relação à saúde e ao bem-estar gerais e que previnem ou revertem condições que comprometem a saúde.

Fonte: Adaptado de COSTA e ROSA (2016); JONES e VARADY (2008).

A oferta de probióticos em base vegetal se mostra bastante promissora, uma vez que o Brasil é um país de clima tropical, com expressiva produção de frutas e elevado consumo destas e de seus produtos como sucos, néctares e doces (ALAMAR et al., 2016). A conscientização do consumidor que busca alimentos saudáveis impulsionou a demanda por sucos: *in natura* ou seus produtos prontos para consumo (DIAS et al., 2015). Em alguns países, como o Japão, a diversidade de alimentos funcionais é muito grande (IWATANI; YAMAMOTO, 2019). No Brasil, o desenvolvimento de alimentos funcionais é promissor, pois o mercado consumidor apresenta escassez de ofertas.

No segmento de sucos de frutas funcionais, existem ofertas de produtos no mercado com “funcionalidades” específicas como suco antioxidante, energizante, calmante e detox (desintoxicar o organismo) (NAZIR et al., 2019).

Com relação à produção de bebidas probióticas à base de suco de frutas, fermentadas ou não fermentadas, sucos de frutas possuem composição nutricional que favorece as exigências nutricionais dos mesmos (RANADHEERA et al., 2010).

Portanto, sucos de frutas possuem um grande potencial para se tornarem veículos de produtos probióticos, pois apresentam características como excelente composição mineral, vitaminas e sais minerais; sendo bastante apreciados e consumidos pela grande maioria da população (MARHAMATIZADEH et al., 2012).

3.2.1 Sucos

O consumo de sucos vem crescendo nas duas últimas décadas, o mercado brasileiro está em franca expansão, acompanhando a tendência mundial de consumo de bebidas saudáveis e prazerosas. Estima-se que o mercado global de sucos de frutas alcance valores da ordem de US\$ 192 bilhões em 2020 (KAUR; SINGH, 2017).

O Brasil é o terceiro maior produtor mundial de frutas, superado apenas pela China e Índia (REETZ et al., 2015). No Nordeste do Brasil, o mercado de sucos de frutas para exportação é da ordem de US\$ 143,3 milhões, com destaque para Sergipe, Bahia, Paraíba, Ceará e Pernambuco (Tabela 6). A produção de goiaba ocupa o primeiro lugar na produção com 50,7% de contribuição dentre as cinco regiões do Brasil (GONÇALVES et al., 2020). O consumo da produção de goiaba é predominante interno, sendo comercializada *in natura*, na forma de polpa de fruta, doces, néctares e geleias; quanto consumo de acerola é muito apreciado como suco *in natura* e comercializado como polpas de fruta, apresenta expressivo consumo interno e a participação em exportação de 8% (VIDAL; XIMENES, 2019).

Tabela 6 - Valor das exportações do agronegócio e de suco no Nordeste por Estado em 2018 (Em US\$)

Estados	Agronegócio	Suco	Participação (%) ¹
Alagoas	302.432.679,0	686.387,0	0,2
Bahia	4.479.732.949,0	17.571.508,0	0,4
Ceará	557.837.697,0	59.027.052,0	10,6
Maranhão	1.924.236.292,0	6.269,0	0,0
Paraíba	32.068.986,0	4.175.672,0	13,0
Pernambuco	267.696.205,0	17.789.066,0	6,6
Piauí	691.104.708,0	-	-
Rio Grande do Norte	214.293.017,0	21.862,0	0,0
Sergipe	58.112.221,0	43.992.764,0	75,7
Nordeste	8.528.514.754,0	143.270.580,0	1,7

Fonte: VIDAL e XIMENES (2019); MDIC/MAPA (2019)

⁽¹⁾ Participação percentual de suco de frutas no total das exportações de todo o agronegócio do Estado

Sucos de frutas contêm compostos nutricionais essenciais, como carboidratos, proteínas, sais minerais e compostos bioativos, como vitamina C e carotenoides, dentre outros nutrientes vitais à saúde e equilíbrio do corpo humano (KHANDPUR; GOGATE, 2016; DIAS et al., 2015). Estudos epidemiológicos têm associado o consumo de frutas e verduras à prevenção de doenças cardiovasculares e crônico-degenerativas (SZYMCZYCHA-MADEJA et al., 2014; NAYAK et al, 2018).

De acordo com Costa (2019), a possibilidade de um alimento funcional ser aceito pelo consumidor depende de aspectos associados aos benefícios à saúde e o sabor do produto-base, ou seja, que o suco de fruta seja agradável. O sabor do produto é um atributo que merece destaque. Nesse contexto, a goiaba (*Psidium guajava L*) e a acerola (*Malpighia puniceifolia L*) são frutas tropicais que apresentam excelente aceitação do consumidor, pois estão associadas aos sucos refrescantes, saudáveis e nutricionais, com participação significativa no mercado consumidor (BRASIL,2010; BRASIL, 2012).

A acerola é uma fruta nativa da América Central, conhecida por seu alto teor de compostos bioativos, principalmente pelo seu elevado valor de vitamina C (ANTUNES et al., 2013). O composto responsável pela cor vermelha dessa fruta quando madura é a antocianina, um pigmento natural do grupo dos compostos fenólicos, ou seja, compostos bioativos. As antocianinas, pertencem ao grupo dos flavonoides, são muito instáveis do ponto de vista bioquímico, facilmente degradadas pela ação de compostos, como oxigênio,

temperatura, pH do meio e processamento inadequado. A ação de sequestrar radicais livres do organismo humano pela associação de alto teor de ácido ascórbico e antocianinas faz da acerola uma fruta de grande valor antioxidante (LIMA et al., 2005).

A goiaba (*Psidium guajava*) é originária da América tropical, apresenta relevância pelo seu valor nutricional e sensorial, sendo rica em carotenoides (CAMPOLI et al., 2018). A goiaba apresenta teor de vitamina C superior ao da laranja (TACO, 2011). A Tabela 7 apresenta as composições nutricionais das polpas de de acerola e goiaba.

Tabela 7 - Composição nutricional de 100 g de polpa de fruta

	Acerola	Goiaba
Nutriente	Teor	Teor
Energia (kcal)	22	54
Proteínas (g)	0,6	1,1
Lípidios (g)	-	0,4
Carboidratos (g)	5,5	13
Fibras (g)	0,7	6,2
Cálcio (mg)	8	4
Magnésio (mg)	9	7
Manganês (mg)	0,07	0,09
Fósforo (mg)	9	15
Ferro (mg)	0,2	0,2
Sódio (mg)	-	-
Potássio (mg)	165	198
Cobre (mg)	0,07	0,04
Zinco (mg)	0,1	0,1
Vitamina C (mg)	941,4	80,6

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO (2011)
(-) Não determinado

A variação da composição química dos sucos pode interferir no sabor e na sobrevivência de probióticos, devido ao pH, presença de compostos como peróxidos (hidrogênio e oxigênio), metabólicos, temperatura de armazenamento e tipo do probióticos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDONAVARRO, 2010).

Além disso, assegurar o consumo de um alimento funcional seguro sob o ponto de vista microbiológico é prioritário, sem esquecer os demais aspectos que garantam ao produto os critérios da regulamentação vigente. Quanto ao critério de alimento seguro, o tratamento térmico é um dos mais importantes métodos para conservação dos alimentos. Segundo

Chemat et al. (2011) é necessário um controle efetivo do tempo de aquecimento a altas temperaturas para que enzimas sejam inativadas. Entretanto, seu uso deve ser bem avaliado, pois resulta em alterações da composição dos alimentos, principalmente componentes nutricionais e sensoriais (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2014).

3.2.2 Sucos Probióticos

O consumo de probióticos em base vegetal, como frutas e seus produtos se mostrou emergente por existir uma demanda por alimentos com baixo teor ou isento de gordura, lactose e de origem não láctea, para consumo de vegetarianos e veganos, com a exigência de atender os critérios já existentes em legislação vigente (ESPÍRITO-SANTO et al., 2015).

Produtos não lácteos, tais como soja, cereais, frutas, vegetais e produtos à base de carne têm sido utilizados como transportadores de probióticos para o homem. Na atualidade, a pesquisa procura novos produtos e matéria-prima para encontrar soluções inovadoras para a estabilidade e viabilidade de probióticos, principalmente com relação a processos e novos meios alimentares, tais como frutas, cereais e vegetais (SHORI, 2016; WHITE; HEKMAT, 2018). Resultados propícios foram encontrados por diversos autores, quanto à adição de probióticos em sucos de frutas, assim como a determinação de processos desejáveis para elaboração de produtos (FARIAS et al., 2016; GANDOMI et al., 2016; ANDRADE et al., 2019; MOREIRA et al., 2017). A Tabela 8 mostra o comportamento de diferentes espécies de *Lactobacillus* em diferentes sucos de frutas.

Tabela 8 - Adequação de algumas espécies de *Lactobacillus* em diferentes tipos de sucos de frutas, com relação à sua tolerância a ambientes ácidos.

Suco	Resultados observados
Morango ¹	Efeitos negativos nos probióticos, exceto para <i>L. casei</i>
Abacaxi ¹	Sobrevivência prolongada de <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> , <i>L. paracasei</i> e <i>L. reuteri</i>
Kiwi ¹	Perda de viabilidade em <i>L. plantarum</i>
Pêssego ¹	Nenhum efeito nos probióticos
Laranja ¹	Sobrevivência prolongada em <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. paracasei</i>

continua

	continuação
Cranberry ¹	Sobrevivência reduzida de <i>L. casei</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. paracasei</i>
Romã ¹	<i>L. plantarum</i> e <i>L. delbrueckii</i> foram mais resistentes do que <i>L. paracasei</i> e <i>L. acidophilus</i>
Tomate ¹	Meio adequado para <i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. plantarum</i> e <i>L. brevis</i>
Cenoura ¹	Meio adequado para <i>B. lactis</i> , <i>B. bifidum</i> , <i>L. rhamnosus</i> e <i>Lb. delbrueckii</i> subsp. <i>bulgaricus</i>
Maracujá da caatinga (NE do Brasil) ²	Meio adequado para <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469
Goiaba ³	Meio adequado para <i>L. rhamnosus</i> ATCC 7469

Fontes: Adaptado de PERRICONE et al. (2015)¹; FARIAS, et. al. (2016)² e ANDRADE et al. (2019)³.

Observa-se que a viabilidade celular das diferentes espécies de probióticos está relacionada a cada tipo de fruta, que pode apresentar diferentes características na composição nutricional, de compostos bioativos, acidez, teor de sólidos solúveis, dentre outras (PEREIRA et al., 2013; COSTA et al., 2013). De fato, evidencia-se que a utilização e viabilidade de microrganismo *Lactobacillus* em sucos de frutas, apresentam comportamentos diversos, a depender da matriz vegetal utilizada.

3.3 TERMOSSONICAÇÃO COMO ALTERNATIVA À PASTEURIZAÇÃO NO PROCESSAMENTO DE ALIMENTOS – VANTAGENS E DESAFIOS

O processamento de alimentos surgiu prioritariamente da necessidade de conservação deles. Ao longo do tempo evoluiu do modo artesanal para o industrial, acompanhando as mudanças globais. Um dos principais objetivos para o processamento de alimentos é a inativação de microrganismos presentes nesses, os quais são responsáveis por doenças causadas pela sua ingestão (SAEEDUDDIN et al., 2015).

A conservação dos alimentos pode ser obtida por diversas tecnologias convencionais e não convencionais, como congelamento, aquecimento, uso de conservantes químicos, microfiltração, tecnologia de alta pressão hidrostática, radiação ultravioleta, uso de alta pressão e suas diversas combinações (FELLOWS, 2009; ROJAS et al., 2017; DIAS, 2019).

Em 1864, Louis Pasteur observou que o procedimento de aquecer os alimentos a temperaturas superiores a 60 °C, considerando um tempo específico e, em seguida, submetê-lo a um brusco resfriamento, evitava a deterioração dos alimentos. Assim, surgiu a pasteurização e o conceito de fazê-la empregando o binômio tempo-temperatura para assegurar a preservação e a vida útil dos alimentos. Embora seja um método muito empregado na indústria de sucos de frutas para reduzir a atividade enzimática e microbiológica, o método requer uso de altas temperaturas, em torno de 90 °C, que acabam alterando as características organolépticas do suco. A intensidade do tratamento térmico está relacionada diretamente com o pH, podendo ser os alimentos classificados em: alimentos de baixa acidez ($\text{pH} > 4,5$) e alimentos ácidos ($\text{pH} < 4,5$) (OETTERER et al., 2006).

A pasteurização pode ser dividida em dois tipos principais: a) pasteurização lenta (LTLT – low temperature and long time ou baixa temperatura e longo tempo), em torno de 65 °C por 30 minutos; e b) pasteurização rápida (HTST - high temperature and short time ou alta temperatura e curto tempo), com temperaturas superiores a 70 °C e tempo em torno de 15 segundos (VASCONELLOS; MELO FILHO, 2010). A escolha do tipo de pasteurização está relacionada às alterações de características intrínsecas de suco de fruta *in natura* (GAVA, 2008).

Fernandes et al. (2007) estudaram suco de goiaba pasteurizado e observaram perdas de nutrientes durante esse processamento, tais como de ácido ascórbico. Sancho (2006), estudou suco de caju pasteurizado e observou um decréscimo no valor de vitamina C em torno de 8%, quando comparado a amostra controle. Maia et al. (2007), analisando suco de acerola, constatou também perda de 5% de vitamina C do suco formulado após a pasteurização. Porém, os autores ressaltam que as perdas de vitamina C e antocianinas em suco de acerola estão relacionadas a presença de oxigênio e sua degradação, corroborando com o que evidenciou Aguilar et al. (2017) no estudo que avalia a degradação de vitamina em sucos termossônicos quando tratados na presença de oxigênio ou degaseificados.

Oliveira et al. (2011) relataram diferenças significativas em parâmetros de cor na polpa de umbu em função do aumento da temperatura de pasteurização. Dutra et al. (2012) também observaram degradação nos conteúdos de vitamina C, carotenoides totais e capacidade antioxidante no suco de tangerina. Estudos também corroboram com a demonstração de que o uso da pasteurização provoca perdas nutricionais em sucos de frutas (KHOO et al., 2011; LESPINARD et al., 2012; AAMIR et al., 2013; TARAZONA-DÍAZ; AGUAYO, 2013; LING et al., 2015; SINGH; SHARMA, 2017).

Assim, observa-se o aumento de estudos que buscam métodos alternativos à tecnologia tradicional, com o objetivo de minimizar os efeitos indesejáveis da exposição do produto a alta temperatura e tempo prolongado de processamento. Dentre estas tecnologias, surge o uso do ultrassom e suas associações com uso de vácuo, pressão e temperatura. Esta última é denominada termossonicação, a qual se apresenta como uma tecnologia promissora para inativação microbiológica (KNORR et al., 2004; CHANDRAPALAA et al., 2012; ROJAS et al., 2017). A termossonicação associa o uso do ultrassom com a temperatura moderada, preservando os compostos nutricionais e bioativos, resultando num alimento com características mais próximas do produto *in natura*, como sucos de frutas (RAWSON et al., 2011).

A técnica do ultrassom foi observada, de início, em sistemas naturais. Em 1794, Lazzaro Spallanzini constatou que em animais a audição era mais usada que a visão, como os morcegos. Em 1900, o estudo sobre o uso do ultrassom foi sistematizado. Na navegação marítima foi utilizada como sonar para prevenção de acidentes de embarcações e icebergs. Os estudos se intensificaram e o ultrassom foi utilizado na Segunda Guerra Mundial para antever a presença de exército inimigo. Em 1958, foi publicado o primeiro trabalho de imagem de ultrassonografia na medicina (MASON, 1999; FELLOWS, 2009).

O ultrassom pode ser definido como ondas sonoras, em frequências que ultrapassam a audição humana (inaudíveis ao ouvido humano) que tem como característica vibrações de pressão no ar, que dependendo da frequência, podem ser utilizadas para limpar, misturar e acelerar processos químicos. É considerada uma tecnologia inovadora que vem sendo utilizada para processamento em alimentos, com o objetivo de melhorar a qualidade e a segurança alimentar (AWAD et al., 2012).

O equipamento que gera as ondas ultrassônicas é o transdutor e apresenta a princípio duas variáveis que conferem propriedades diferentes para o seu uso: potência e frequência. Assim, pode ser utilizada como tecnologia no diagnóstico médico (ultrassonografia) ou como fonte de energia em tecnologia de alimentos (sonoquímica). No primeiro caso, seu uso resulta da combinação de alta frequência e baixa potência; no segundo, baixa frequência e alta potência que provocam mudanças na estrutura do objeto submetido a sonicação ocasionadas pela cavitação acústica (MASON et al., 2005).

As bolhas formadas em ciclos subsequentes de compressão e descompressão colapsam violentamente e essa energia se propaga na matriz alimentar processada (CHEMAT et al., 2011; KENTISH; FENG, 2014; DIAS et al., 2015). Para induzir alterações nas propriedades físicas, químicas e bioquímicas dos alimentos, normalmente se utiliza alta

energia, na frequência entre 20 e 100 kHz com potência superior a 1 W/cm^2 , numa faixa aproximada entre 10 e 1000 W/cm^2 (PARREIRAS, 2019). Nessa condição, se gera energia suficiente para romper ligações intermoleculares e produzir efeitos nos alimentos (ALVES et al., 2013). Tais efeitos são: alterações na microestrutura desses, com mudanças na textura de produtos gordurosos, emulsificação, modificações das propriedades funcionais de proteínas alimentares, inativação da atividade enzimática e de microrganismos patogênicos e facilitação da extração de compostos bioativos dos alimentos (SORIA; VILLAMIEL, 2010; ARVANITOYANNIS et al., 2015; AWAD et al., 2012).

Em recentes aplicações, o ultrassom tem sido utilizado como tecnologia complementar para conservação de alimentos (CRUZ-CANSINO et al., 2015). É uma tecnologia não térmica considerada como uma das mais promissoras, quando comparada com outras tecnologias, tais como, o uso de pressão, ultravioleta, campo elétrico pulsado e alta pressão hidrostática. (CONDÓN; PAGÁN, 2005).

A utilização do ultrassom pode ser demonstrada em diversos estudos, como em líquidos (PANIWNYK et al., 2017), suco de morango (TOMADONI et al., 2016), suco de aspargo verde (CHENG et al., 2012), extração de compostos bioativos (AGCAM et al., 2017; CHEMAT et al., 2017), transferência de massa (KNORR et al., 2011), pré-tratamento e secagem; desidratação (SILVA et al., 2016; MEDEIROS et al., 2016), inativação enzimática (DIAS et al., 2015; BALTACIOGLU et al., 2017) e em matrizes alimentares, como vegetais e emulsões (CHEMAT et al., 2011; CHANDRAPALA et al., 2012; ALVES et al., 2013).

De acordo com Schuina (2014) é inequívoco que apenas o ultrassom pode não alcançar a inativação ideal, tanto microbiológica quanto enzimática. Porém, quando utilizado ultrassom associado com temperatura moderada – a termossonicação, torna-se uma alternativa viável para substituir o tratamento térmico convencional (DEMIRDÖVEN; BAYSAL, 2014; AWAD et al., 2012; PARREIRAS, 2019).

3.3.1 Sucos termossonicados

A tecnologia da termossonicação apresenta potencial para ser utilizada na indústria de sucos de frutas por sua eficácia em inativar microrganismos e manter a qualidade nutricional e sensorial dos produtos (JAMBRAK et al., 2018). De acordo com Anaya-Esparza et al. (2017), a termossonicação pode ser classificada em subletal (temperatura $< 45 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e

letal (temperatura > 45 °C), sendo considerada uma tecnologia alternativa excelente para o tratamento térmico de sucos de frutas (ABID et al., 2014; CHEMAT et al., 2011).

A associação de ultrassom e calor moderado (termossonicação) tem sido empregada no processamento de sucos de frutas com resultados superiores quanto à preservação da qualidade desses quando comparados aos tratamentos térmicos convencionais (DINÇER; TOPUZ, 2014; JABBAR et al., 2015; NAYAK et al., 2018). De acordo com Dias (2019), além de oferecer vantagens em termo de produtividade e rendimento, a termossonicação é considerada uma tecnologia ambientalmente mais sustentável, por oferecer menor gasto de energia e água (CAO et al., 2018).

A termossonicação foi utilizada na inativação microbiana e preservação dos parâmetros de qualidade de suco de abacaxi, uva e *cranberry* (BERMUDES-AGUIRRE et al., 2012), manga (KIANG et al., 2012), maçã (ABID et al., 2014), amora preta (DINÇER; TOPUZ, 2015), pera (SAEEDUDDIN et al., 2015), cenoura (JABBAR et al., 2015) e laranja vermelha (RAJU; DEKA, 2018). Porém, estudo conjunto de utilização do ultrassom associado à temperatura (termossonicação), como tecnologia de processamento de matriz vegetal (suco de frutas) para produção de bebida fermentada probiótica utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, não foi encontrado em periódicos consultados até o presente momento.

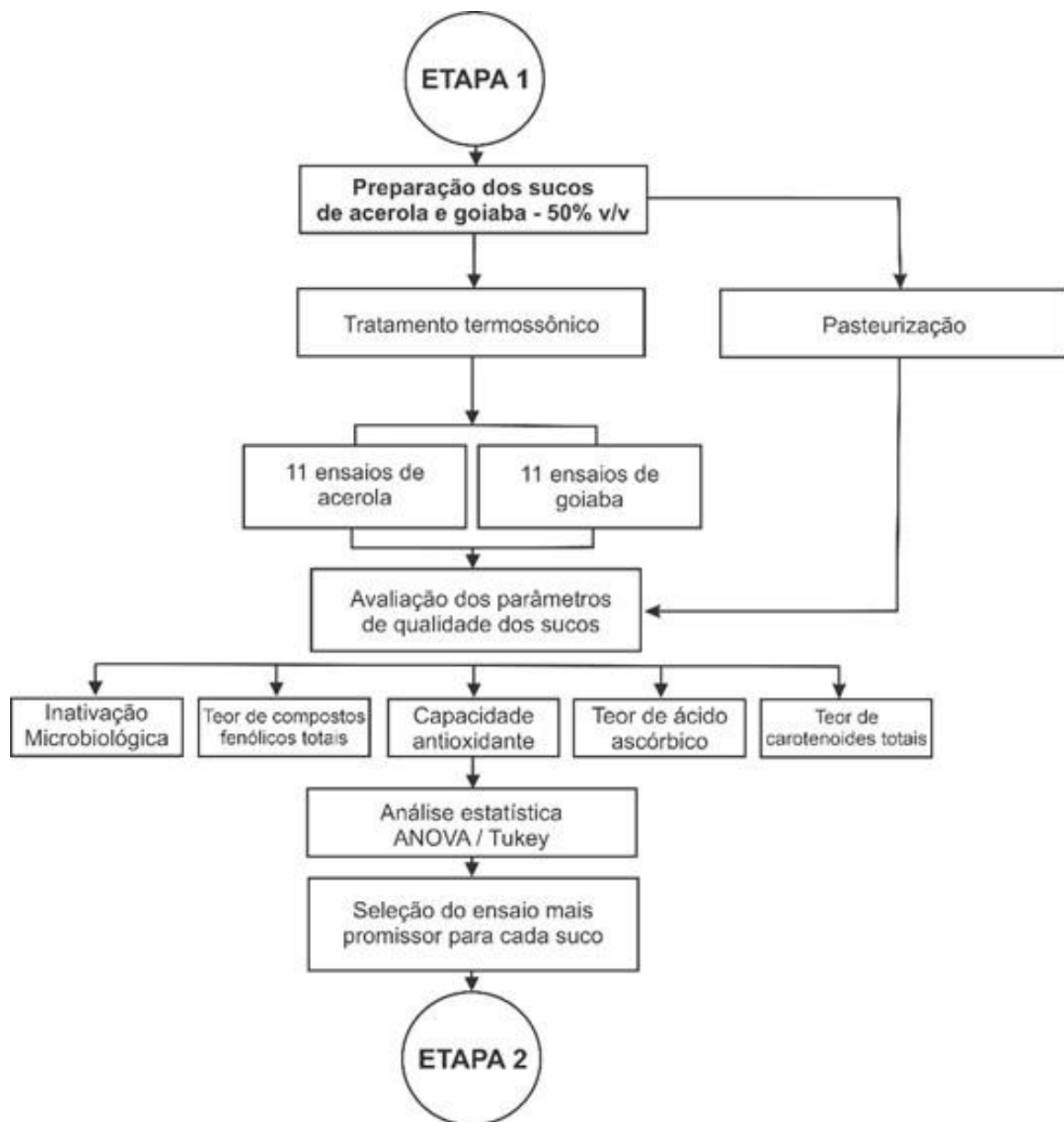
4 METODOLOGIA

O presente trabalho foi realizado em duas etapas: a) etapa 1 - tratamento termossônico e análises de parâmetros de qualidade dos sucos de acerola e goiaba, nas condições termossônicas, pasteurizados e sem tratamento (*in natura*). As análises foram realizadas em triplicata, exceto cor que foi em quintuplicata; b) etapa 2 – produção e estudo da estabilidade dos sucos probióticos termossônicos e pasteurizados de acerola e goiaba, utilizando *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469; realizados em duplicata; e avaliação de viabilidade em placas de Petri em triplicata. Os experimentos foram realizados nos laboratórios do Departamento de Engenharia Química – CTG/UFPE (Laboratório de Engenharia de Alimentos) e Departamento de Antibióticos – CB/UFPE (Laboratório de Bioprocessos e Bioprodutos – LabBio).

4.1 ETAPA 1 – TRATAMENTO TERMOSSÔNICO E ANÁLISES DE PARÂMETROS DE QUALIDADE DOS SUCOS

A Figura 3 apresenta um esquema ilustrativo dos processos realizados na etapa 1.

Figura 3 – Esquema ilustrativo dos processos da etapa 1 - Tratamento termossônico e análises de parâmetros de qualidade dos sucos



Fonte: O autor (2020)

4.1.1 Preparação dos sucos de acerola e goiaba termossonicados

As polpas de frutas utilizadas na formulação dos sucos de acerola e goiaba foram não pasteurizadas e não diluídas em água, sendo doadas pela empresa “Flesh Fruit”, localizada em Recife/PE. Os sucos foram preparados pela diluição das polpas em água destilada (proporção de 1:1, v/v) e foram armazenados a 4 °C antes do processamento.

Para a termossonicação dos sucos de acerola e goiaba foi utilizado um processador ultrassônico de 500 W, com uma sonda de 1,3 cm de diâmetro e frequência constante de 19 kHz (Unique, DES500, Brasil) e um banho ultratermostatizado, com faixa de temperatura de - 10 a 100 °C (SOLAB® SL-152/157, Brasil). A intensidade da potência do ultrassom que é dissipada pela sonda foi calculada pela equação (1):

$$I = \frac{P}{\pi r^2} \quad (\text{Eq. 1})$$

Onde: r = raio da ponteira de titânio (cm) e P = nível de potência aplicada (W).

A potência aplicada foi controlada por meio da conversão de amplitude e seus níveis foram ajustados entre 20 e 100% da potência de entrada (500 W). As intensidades de potência calculadas estavam entre 75 e 373 (W/cm²).

As amostras dos sucos (150 mL) foram colocadas em béquer de parede dupla de 250 mL e a sonda foi submersa a uma profundidade de 25 mm. O tempo de termossonicação foi constante e igual a 10 minutos, sendo iniciado quando o sistema alcançava a temperatura desejada. Foi considerado o intervalo de temperatura entre 25 a 65 °C (ABID et al., 2013; SAEEDUDDIN et al., 2015). A temperatura da água no sistema foi monitorada com auxílio de termômetro digital.

Para estudar os efeitos da temperatura (T em °C) e intensidade da potência do ultrassom (IP em %) sobre a inativação microbiológica, compostos bioativos e cor, foi utilizado um planejamento composto central rotacional 2^2 (DCCR), com triplicata no ponto central (nível 0) e pontos axiais (níveis $\pm\alpha$), de acordo com as Tabelas 9 e 10. As faixas de variação entre o limite inferior e superior de cada variável foram estabelecidas com base na literatura (CHENG et al., 2012; DIAS et al., 2015). Os valores calculados para as variáveis independentes T e IP foram considerados inteiros, sem valores decimais, quando necessário, para viabilizar os valores nos equipamentos utilizados (ultrassom de sonda e banho ultratermostatizado), conforme Figura 4.

Figura 4 - Equipamento de ultrassom, banho ultratermostatizado (à esquerda) e béquer de parede dupla (  direita, detalhe)



Fonte: O autor (2020)

Foi considerada uma função matemática de correlação entre variáveis dependentes e independentes (Equação 2) (KHURI e CORNELL, 1996).

$$Y = \varphi(I, t) = \beta_o + \beta_1 i + \beta_2 t + \beta_{11} i^2 + \beta_{22} t^2 + \beta_{12} it \quad (\text{Eq. 2})$$

Tabela 9 - Variáveis independentes para o tratamento termossônico (tempo constante e igual a 10 minutos)

Variável (codificada)	-1,41	-1	0	+1	+1,41
Intensidade da potência (W/cm ²)	75	118	224	330	373
Temperatura (�C)	25	31	45	59	65

Fonte: O autor (2019)

Tabela 10 - Planejamento experimental codificado e decodificado do tratamento termossônico

Ensaio	Intensidade da potência (%)	Temperatura (°C)	Intensidade de potência (%)	Temperatura (°C)
01	-1	-1	30	31
02	+1	-1	90	31
03	-1	+1	30	59
04	+1	+1	90	59
05	0	0	60	45
06	0	0	60	45
07	0	0	60	45
08	-1,41	0	20	45
09	+1,41	0	100	45
10	0	-1,41	60	25
11	0	+1,41	60	65

Fonte: O autor (2020)

A análise dos dados estatísticos e os gráficos de superfície de resposta foram feitas usando o programa Statistica 7.0. Valores experimentais foram ajustados a um modelo polinomial de segunda ordem, sendo considerado preditivo o modelo que apresentasse regressão significativa ao nível de 95% de confiança e alto valor de coeficiente de determinação (R^2).

4.1.2 Tratamento de pasteurização dos sucos

Para esta etapa foi feita pasteurização lenta dos sucos de acerola e goiaba, sendo conduzida à 67 °C por 35 minutos, seguido de choque térmico em banho gelado por 5 minutos (FELLOWS, 2009; FARIAS et al., 2016; SANTOS et al., 2017; MADIGAN et al., 2010).

4.1.3 Análises dos parâmetros de qualidade

4.1.3.1 Determinação da inativação microbiológica

A avaliação da inativação microbiológica (Inat) nos sucos foi determinada por meio da viabilidade celular utilizando-se a técnica de contagem de unidades formadoras de colônias (UFC). O meio de cultura foi o caldo nutritivo (8 g/L) acrescido de ágar (20 g/L).

As placas foram incubadas a 37 °C por 24 horas. Foram avaliadas amostras controle (suco *in natura*), termossonicadas e pasteurizadas dos dois sucos. Os resultados foram expressos em Log UFC/mL.

4.1.3.2 Determinação de compostos fenólicos totais

O teor de compostos fenólicos totais (TPC) foi determinado de acordo com metodologia de Singleton et al. (1999). Os resultados foram expressos como µg de equivalente ao ácido gálico por 100 mL de suco.

Foi realizada extração fenólica com mistura de alíquota de 15 mL de suco e 25 mL de metanol, em erlenmeyer, em mesa agitadora por 15 minutos. Em seguida, a mistura foi centrifugada a 11000 rpm por 10 minutos, em centrífuga (Novatecnica, NT 812, Brasil). O sobrenadante foi transferido para frasco âmbar e armazenado a 4 °C. A reação foi conduzida misturando 0,5 mL de extrato fenólico, 2, 5 mL de reagente de Folin-Ciocalteu a 10% (Sigma-Aldrich, Germany) em seguida foram adicionados 2 mL de carbonato de sódio à 4%. A mistura foi mantida no escuro por 2 horas. Em seguida, as amostras foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS (Spectroquant® Pharo 300) a 760 nm. Foi utilizada curva analítica padrão de ácido gálico (5 a 100 µg/mL).

4.1.3.3 Determinação do teor de capacidade antioxidante

A capacidade antioxidante (AC) foi determinada pela análise do sequestro de radical livre, usando o reagente 2,2-difenil-1- picril-hidrazil (DPPH) (Brand-Williams et al. 1995). Values were expressed as percent inhibition of DPPH.

4.1.3.4 Determinação do teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico foi determinado de acordo com metodologia de Strohecker e Henning (1967). Os valores foram expressos em mg de ácido ascórbico por 100 g de suco.

Amostras de 15 mL de suco foram diluídas em 100 mL de ácido oxálico 0,5% em balão volumétrico, homogeneizadas e em seguida foram filtradas em papel de filtro Whatman (no.1). A seguir, alíquotas de 5 mL do filtrato foram tituladas com 2,6-dichlorophenol iodophenol (DCPIP) até atingir o ponto de equivalência, quando a solução apresentou coloração rosa claro.

4.1.3.5 Determinação de carotenoides

O teor total de carotenoides (C) foi mensurado segundo Rodriguez-Amaya (1999), expresso em µg de carotenoides por grama de suco. Foi realizada a extração com alíquotas de 5 mL de suco e 40 mL de acetona, seguido de agitação em mesa agitadora por durante 1 (uma) hora. A seguir a mistura foi filtrada e transferida para funil de separação com adição de 45 mL de éter de petróleo. Seguiu-se a separação e diluição em éter de petróleo da fração contendo os carotenoides. Ao final, foram lidas em espectrofotômetro UV-VIS (Spectroquant® Pharo 300) a 470 nm.

4.1.3.6 Cor

A cor das amostras (TCD) foi avaliada por meio do sistema de leitura de três parâmetros, CIELAB. Os parâmetros L^* , a^* e b^* foram obtidos utilizando-se um colorímetro (Minolta, CR400, Japão) previamente calibrado. Por meio desses parâmetros, foi calculada a diferença total de cor (TCD) entre a amostra dos sucos antes e após a termossonicação, segundo a equação 4.

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_o^*)^2 + (a^* - a_o^*)^2 + (b^* - b_o^*)^2} \quad (\text{Eq. 4})$$

Onde:

TCD é a diferença total de cor;

L_o^* e L^* são as luminosidades das amostras antes e após a termossonicação, respectivamente;

a_o^* e a^* são as intensidades das cores vermelhas (valor positivo) e verde (valor negativo) das amostras antes e após a termossonicação, respectivamente;

b_o^* e b^* são as intensidades das cores amarelas (valor positivo) e azul (valor negativo) das amostras antes e após a termossonicação, respectivamente.

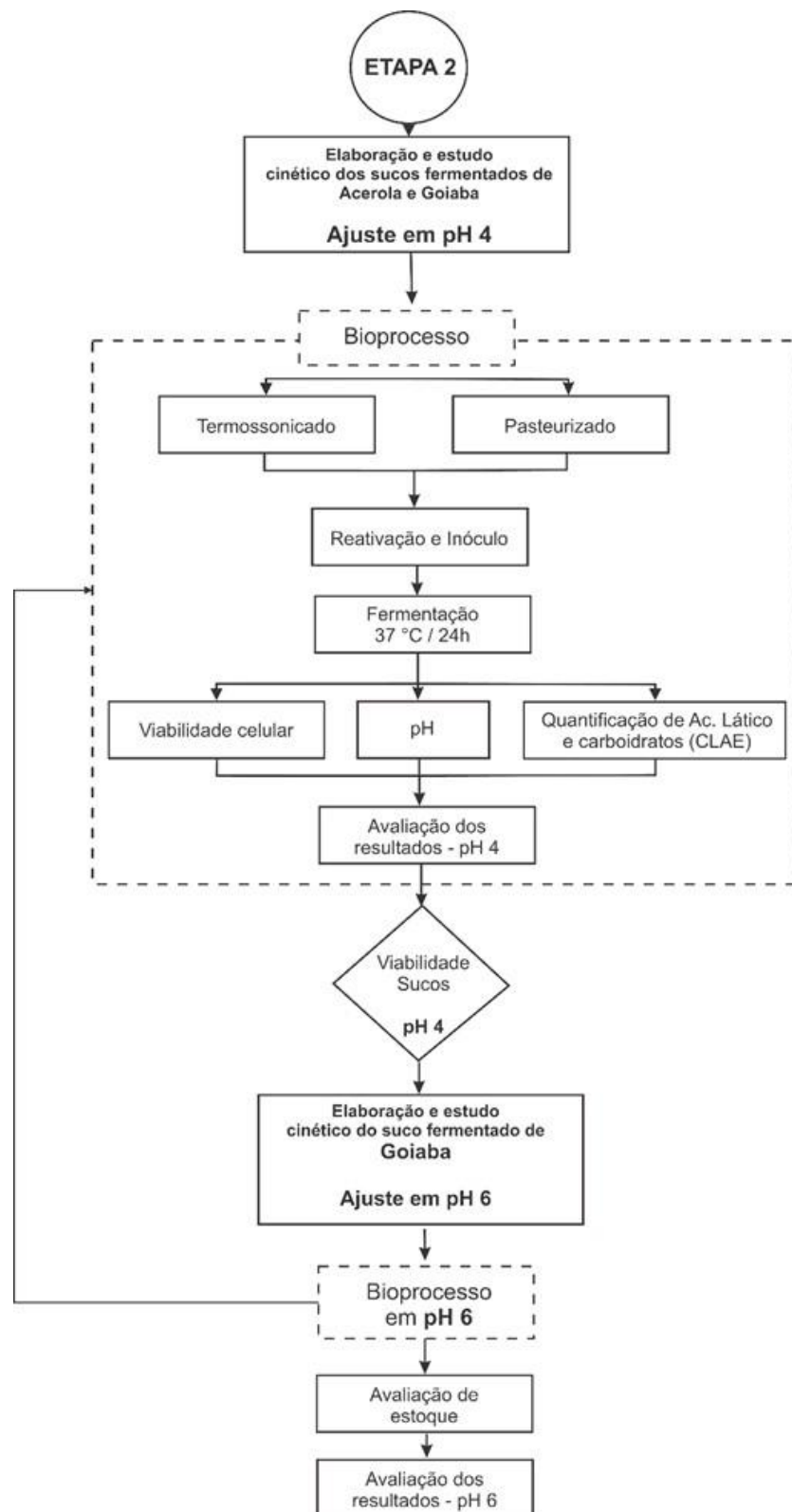
Após termossonicação dos sucos, seguida das análises de parâmetros de qualidade e cor; e análise estatística (Statistica 7.0), utilizando a metodologia de superfície de resposta (RSM), foi selecionado o ensaio mais promissor para cada suco, considerando o conjunto das análises realizadas.

4.2 ETAPA 2 – PRODUÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE DOS SUCOS PROBIÓTICOS FERMENTADOS

A Etapa 2 foi a produção dos sucos probióticos fermentados, a partir da condição de tratamento termossônico selecionada como mais promissora para cada suco. Foi utilizado o *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. As amostras controle fermentadas foram os sucos de acerola e goiaba pasteurizados. As bebidas probióticas elaboradas na Etapa 2 foram: suco de acerola termossônico (AT); suco de acerola pasteurizado (AP); suco de goiaba termossônico (GT) e suco de goiaba pasteurizado (GP). A condição de termossônica mais adequada foi utilizada na preparação dos sucos termossônicos. A pasteurização lenta foi utilizada como método convencional para comparação com a termossônica. A cultura probiótica utilizada foi o *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469.

A Figura 5 apresenta um esquema ilustrativo dos processos utilizados na etapa 2.

Figura 5 – Esquema ilustrativo dos processos da etapa 2 – Avaliação da produção e estudo de estabilidade dos sucos probióticos fermentados, termossonicados e pasteurizados



Fonte: O autor (2020)

4.2.1 Estudo cinético da produção dos sucos probióticos fermentados

Inicialmente, a linhagem *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi cultivada em meio MRS (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 37 °C. Após 24 horas foi realizada a transferência de 10 % (v/v) da suspensão microbiana, para outro frasco contendo o mesmo meio, o qual foi incubado nas mesmas condições. Em seguida, novamente foi realizada a transferência da mesma quantidade de inóculo para a próxima etapa, isto é, para a obtenção dos sucos probióticos. Os frascos de Erlenmeyer contendo os sucos e a suspensão microbiana foram incubados novamente em estufa bacteriológica a 37 °C, por 24 horas.

O estudo cinético foi realizado sob as seguintes condições: foram coletadas alíquotas das fermentações incubadas a cada 4 (quatro) horas (zero, 6, 12, 18 e 24). Essas alíquotas foram retiradas numa proporção inferior a 10% do volume total da amostra em processo de fermentação para não comprometer o equilíbrio dos parâmetros cinéticos e foram utilizados para estudo do comportamento do pH, da viabilidade e posterior análise em CLAE do consumo de açúcares e produção de ácido lático, nos cinco diferentes momentos da cinética de fermentação.

A análise de armazenamento refrigerado por 28 dias foi conduzida conforme descrito no primeiro parágrafo desse item e após 24 horas de incubação, os sucos probióticos fermentados foram armazenados em refrigeração, a 4 °C.

Os sucos de acerola e goiaba (50% V/V de polpa) foram submetidos ao ajuste do pH para 4 ou 6, antes da termossonicação ou pasteurização. Esses valores de pH tinham como objetivo investigar a robustez do *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em pH 4, em meio de estresse ácido e também estabilizar a coloração do suco de acerola que em pH 6 apresentava alteração de coloração, alterando suas propriedades organolépticas.

Foram realizadas seis condições de fermentação para a produção dos sucos probióticos fermentados: suco de acerola termossonicado (pH 4), suco de acerola pasteurizado (pH 4), suco de goiaba termossonicado (pH 4), suco de goiaba pasteurizado (pH 4), suco de goiaba termossonicado (pH 6) e suco de goiaba pasteurizado (pH 6).

4.2.2 Determinação da viabilidade celular e pH

A viabilidade celular do microrganismo *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 foi realizada pela técnica de contagem de células viáveis em placas. As amostras foram diluídas serialmente e essas diluições foram plaqueadas (100 µL) em placas de Petri com meio de

cultura MRS acrescido de ágar, pelo método do espalhamento. As placas foram incubadas a 37 °C, durante 24 horas. A determinação do pH foi realizada em potenciômetro (3510, Jenway).

4.2.3 Determinação de ácido orgânico e carboidratos

A determinação do ácido láctico foi realizada por cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), utilizando um sistema Shimadzu, equipado com detector de arranjo de diodos. O software para verificação dos dados foi o LC Solutions (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). Uma coluna de exclusão iônica (Aminex Biorad HPX87H⁺, Bio-Rad, USA) foi utilizada. A fase móvel foi uma solução de ácido sulfúrico 5 mmol L⁻¹, a vazão foi 0,6 mL/min e a temperatura da coluna foi 28 °C (FARIAS et al., 2016). A determinação de glicose e frutose também foi por CLAE, mas utilizando-se um detector por índice de refração. Neste caso, a temperatura da coluna foi 60 °C. Para cada analito foi construída uma curva de calibração.

4.2.4 Análise de armazenamento refrigerado

Os sucos probióticos fermentados foram armazenados em refrigerador a 4°C, por 28 dias. A viabilidade celular, o pH, as concentrações de glicose, frutose e ácido láctico foram determinadas no início e no final do armazenamento. Além destas análises, também foi realizado o Teste de Simulação das condições Gastrointestinais *in vitro* – TSGL, nos tempos de armazenamento inicial (dia zero) e ao final, com 28 dias de armazenamento (BURITI et al., 2010).

4.2.5 Análise estatística

Nas etapas descritas do estudo, foram utilizados os softwares Microcal Origin 6.0 para Windows e o Statistica versão 7.0. Foi realizado teste de Tukey para determinação da significância estatística dos resultados obtidos.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Effect of thermosonication and pasteurization on quality parameters of acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*) juices

Zilmar Meireles Pimenta Barros ^a, Thays Lucena Vieira de Melo ^a, João Henrique Fernandes da Silva ^b, Ester Ribeiro ^a, Patrícia Moreira Azoubel ^{b,1*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brazil.

^bUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-521, Brazil.

^{1*} Corresponding author: Tel.: +55-81-2126-8583; fax: +55-81- 2126-7298.
E-mail address: pazoubel@gmail.com

Effect of thermosonication and pasteurization on quality parameters of acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*) juices

ABSTRACT. Thermosonication is an emerging technology that combines the use of ultrasound and moderate temperature and it is being considered as a potential technology for reducing microorganisms in fruit juices without causing the degradation of bioactive compounds that occurs with pasteurization. Acerola (*Malpighia emarginata*) and guava (*Psidium guajava*) juices were submitted to thermosonication and pasteurization. Thermosonication was performed in an ultrasonic processor (500 W; 19 kHz). Pasteurization was carried out at 67°C for 35 min. Experiments were made to evaluate the influence of the power intensity (20–100%) and temperature (25-65 °C) on the microbiological inactivation, total phenolic compounds, antioxidant activity, ascorbic acid, carotenoids, and color. After thermosonication, the microbiological inactivation of the juices was increased, higher than with pasteurization. Higher microbiological inactivation was present under the conditions of 60% of ultrasound power intensity and temperature of 65 °C, than with pasteurization. These conditions were also seen to be most promising for both juices. Thermosonication appears as emerging technology and could be an alternative to the conventional heat treatment that results in a loss of quality of the final product.

Keywords: Bioactive compounds, color, juice, microbial inactivation, thermal treatment, thermosonication.

1. Introduction

Juices are sources of important nutritional and bioactive compounds. Their consumption has grown over the past two decades because of the increased awareness of consumers of their benefits, such as reducing the risk of chronic degenerative diseases. This concern has driven the production of more nutritious foods (Chaudhary et al. 2015). The bioactive compounds in these foods, such as the phenolic compounds, comprise a group of natural antioxidants responsible for beneficial effects to human health, being a primary factor in the fight against free radicals that promote chronic-degenerative diseases (Dias et al. 2015; Aadil et al. 2013).

Fruit juices are subject to deterioration associated with the presence of microorganisms such as yeasts; fungi and acid-tolerant bacteria (Elvira 2014). Microbiological inactivation guarantees a safe food product for the consumer, being an indispensable part of food processing (Roobab et al. 2018). Traditional methods of microbiological inactivation, however, affect the nutritional composition and bioactive compounds (Abid et al. 2014).

Emerging technologies and alternatives to conventional treatments have been studied and reported as promising. The use of ultrasound is reported as technology for processing fresh vegetables and their products. It has water and energy savings as advantages and is considered “green” or environmentally friendly (sustainable) technology, being used alone or associated with other technologies (Nicolau-Lapeña et al. 2019). Fonteles et al. (2013) studied the fermentation kinetics of sonicated cantaloupe melon juice, using *Lactobacillus casei* B-442 as a probiotic bacterium. The cell viability of this fermentation was evaluated and demonstrated that sonication improved the fermentation of cantaloupe melon juice with maintenance of cell viability required by law and without microbial deterioration for a storage period of 42 days.

Thermosonication is an emerging technology that combines the use of ultrasound and moderate temperature. It is been considered as a potential technology for reducing microorganisms in fruit juices (Cervantes-Elizarrarás et al. 2017; Cruz-Cansino et al. 2015) without causing the degradation of bioactive compounds that occurs with conventional heat treatments (Aguilar et al. 2017; Zafra-Rojas et al. 2013). Thermosonication has been used for microbial inactivation and preservation of quality parameters of pear juice (Saeeduddin et al. 2015), as well as pineapple, grape, and cranberry (Bermudes-Aguirre et al. 2012), mango (Kiang et al. 2012), and apple juices (Abid et al. 2014). Although these studies have assessed the effects of thermosonication, its effect on quality parameters still needs investigation. Thus, this present work aims to investigate the effects of thermosonication on microbiological inactivation, bioactive compounds, and color of acerola and guava juices, evaluating the behavior of these different thermosonicated vegetable matrices, with the perspective of being used as a substrate for the study of probiotic fermented juices.

2. Material and methods

2.1 Juice preparation

Malpighia emarginata (acerola) and *Psidium guajava* (guava) juices were prepared from the non-pasteurized frozen pulp without the addition of preservative or water, as produced by Flesh Fruit company (Recife, Brazil). The juices were prepared by diluting the pulp in distilled water (1:1 ratio), and then processed.

2.2 Thermosonication and pasteurization

Thermosonication treatment was conducted with 500 W ultrasound equipment with a 1.3 cm probe diameter and a constant frequency of 19 kHz (Unique, DES500, Brazil). An

ultrathermostatized bath (SOLAB® SL-152/157, Brazil) was used to maintain the juice processing temperature. The juice samples (150 mL) were placed in a 250 mL thermostated vessel (8.5 cm diameter) and an ultrasonic probe was immersed to 2.5 cm below the surface of the juice. All trials lasted 10 minutes and started when the pre-set temperature was reached by the system, being recorded by a digital thermometer for calibration (Abid et al. 2013; Saeeduddin et al. 2015). The temperature of the jacket water was maintained according to the experimental design described below.

The intensity of the ultrasound power dissipated by the probe (IP) was calculated by Equation (1), where: r = titanium tip radius (cm) and P = applied power level (W):

$$IP = \frac{P}{\pi r^2} \quad (1)$$

The applied power was controlled by the amplitude conversion and power levels were adjusted between 20 and 100% of the input power (500 W). The calculated power intensities were maintained between 75 and 373 (W/cm²).

2.3 Experimental design

The effects of temperature and ultrasound power intensity were studied on microbiological inactivation, bioactive compounds and color using a composite central complete factorial design 2², with the central points (level 0) and axial points (levels ± α), according to Tables 1 and 2. The range of variation between the lower and upper limits of each variable was established based on the literature (Dias et al. 2015). Analysis of statistical data were performed using Statistica 7.0. Tukey test was used to evaluate the statistical significance of tests for acerola and guava juices.

The pasteurization treatment of the juices was conducted at 67 °C for 35 minutes, followed by thermal shock in an ice-water bath for 5 minutes (Fellows 2009; Farias et al. 2016; Santos et al. 2017; Madigan et al. 2010).

2.4 Microbiological inactivation, quality parameters and color analyses

Microbiological inactivation, total phenolic compounds content, antioxidant capacity, ascorbic acid content, carotenoids and color of the treated samples were investigated. The analyzes were performed in triplicate. The determination of color in quintuplicate.

The evaluation of viability for microbiological inactivation (Inat) in juices was determined by the spread plate method. Aliquots of 0.1 mL of the samples were plated, in triplicate, in nutrient MRS broth (Merck, KGaA Germany) containing agar 2% w/V (KASVI, São Paulo, Brazil). The plates were incubated upside-down at 37 °C for 24 h. Plates containing between 30 and 300 colonies were measured and recorded as colony forming units (CFU) per mL of solution. Control (without treatment), pasteurized, and sonicated samples of the two juices were also evaluated.

The content of total phenolic compounds (TPC) was determined according to the methodology of Singleton et al. (1999). The results were expressed as mg of gallic acid equivalent (GAE) per 100 mL of sample.

The antioxidant activity (AC) was determined by the analysis of the free radical sequestration capacity, using the reagent 1'-1'Diphenyl-2'picrylhydrazyl (DPPH) (Brand-Williams et al. 1995). Values were expressed as percent inhibition of DPPH.

Ascorbic acid content was determined according to the methodology of Strohecker and Henning (1967). The values were expressed as mg of AA per 100 g of juice.

The total carotenoid content (C) was measured according to Rodriguez-Amaya (1999), expressed as µg of carotenoids per gram of juice.

The color of the samples (TCD) was evaluated by means of the three parameters reading system, CIELAB. The parameters L^* , a^* and b^* were obtained using a previously calibrated colorimeter (Minolta, CR400, Japan). By means of these parameters, the total color difference (TCD), between the juice samples before and after the thermosonication, was calculated according to Equation (3):

$$TCD = \sqrt{(L^* - L_o^*)^2 + (a^* - a_o^*)^2 + (b^* - b_o^*)^2} \quad (3)$$

where:

TCD is the total color difference;

L_o^* and L^* are the luminosities of the samples before and after thermosonication, respectively;

a^* and a_o^* are the intensity of the red (positive value) and green (negative value) values of the samples before and after thermosonication, respectively.

b^* and b_o^* are the intensity of the yellow (positive value) and blue (negative value) values of the samples before and after the thermosonication, respectively.

3. Results and discussion

For the two juices, the set of the results for each dependent variable with its determination coefficient, in relation to the independent variables power intensity (IP) and temperature (T), are presented in Tables 3 and 4 (acerola and guava, respectively). A polynomial model of the correlation between dependent and independent variables was tested but it did not present significant regression. Thus, the Tukey test was chosen to evaluate the statistical significance of tests (1 to 11) for acerola and guava juices observed as values in Tables 1 and 2, respectively.

Table 1 – Experimental design and response values of acerola juice: microbiological inactivation (Inat), total phenolic compounds (TPC), antioxidant capacity (AC), Ascorbic acid content (Ascorbic acid), carotenoid content (C), total color difference (TCD) and color parameters

Assay	IP (%)	T (°C)	Inat (log UFC/mL)	TPC (mg GAE/100mL)	AC (%Inhibition DPPH)	Ascorbic acid (mg AA/100 g)	‘C (µg/g)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	TCD
Control	---	---	*INC	499.68 ± 2.05	70.68 ± 0.00	598.31 ± 3.16	3.30 ± 0.00	41.53 ± 1.99	8.80 ± 0.34	20.04 ± 1.34	-
1	30	31	2.36 ± 1.41	457.97 ± 8.63	70.24 ± 0.00	551.43 ± 0.00	3.36 ± 0.00	42.22 ± 1.178	6.68 ± 0.20	20.18 ± 1.85	2.24
2	90	31	2.36 ± 1.13	367.89 ± 4.84	67.69 ± 0.00	544.73 ± 3.16	3.50 ± 0.00	42.94 ± 0.68	7.02 ± 0.09	20.79 ± 1.07	2.39
3	30	59	2.11 ± 1.41	373.63 ± 0.00	48.66 ± 0.01	560.36 ± 3.16	3.43 ± 0.00	40.28 ± 0.93	6.77 ± 0.09	18.88 ± 0.53	2.66
4	90	59	2.17 ± 0.88	522.84 ± 1.12	75.98 ± 0.02	609.47 ± 0.00	3.39 ± 0.00	42.32 ± 0.94	6.68 ± 0.07	20.65 ± 0.66	2.35
5	60	45	2.16 ± 2.12	257.84 ± 3.72	42.35 ± 0.00	589.38 ± 0.00	3.71 ± 0.00	43.06 ± 1.28	7.34 ± 0.21	21.02 ± 0.58	2.33
6	60	45	2.41 ± 0.71	246.53 ± 2.23	43.16 ± 0.02	598.31 ± 3.16	3.90 ± 0.00	42.60 ± 0.75	7.84 ± 0.16	20.95 ± 1.42	1.70
7	60	45	2.29 ± 2.12	236.00 ± 5.95	43.08 ± 0.01	609.47 ± 3.16	3.90 ± 0.00	40.12 ± 1.31	8.00 ± 0.16	18.85 ± 0.71	2.02
8	20	45	2.36 ± 0.00	509.16 ± 3.72	52.67 ± 0.02	605.01 ± 3.16	3.01 ± 0.00	42.67 ± 1.45	5.72 ± 0.26	19.84 ± 1.09	3.29
9	100	45	2.38 ± 2.83	382.32 ± 1.54	52.83 ± 0.04	618.40 ± 0.00	3.41 ± 0.00	43.18 ± 0.58	7.55 ± 0.34	21.92 ± 1.40	2.80
10	60	25	2.41 ± 0.71	499.95 ± 4.14	60.53 ± 0.03	616.17 ± 3.16	3.23 ± 0.00	43.36 ± 0.74	8.35 ± 0.24	21.70 ± 1.51	2.51
11	60	65	1.70 ± 0.00	525.47 ± 5.96	75.43 ± 0.01	640.73 ± 0.00	2.86 ± 0.00	43.12 ± 1.02	7.90 ± 0.19	21.69 ± 1.37	2.46
P	-	-	2.04 ± 1.41	483.90±11.91	64,58 ± 0.01	526.87 ± 0.00	3.94 ± 0.00	42.73 ± 0.92	7.27 ± 0.32	20.04 ± 1.05	1.95

*INC: countless (log UFC/mL >300);

IP: intensity of the ultrasound power dissipated by the probe; T: temperature.

P: Pasteurized.

Table 2 – Experimental design and response values of guava juice: microbiological inactivation (Inat), total phenolic compounds (TPC), antioxidant capacity (AC), ascorbic acid content (Ascorbic acid), carotenoid content (C), total color difference (TCD) and color parameters

Assay	IP (%)	T (°C)	Inat (log UFC/mL)	TPC (mg GAE/100mL)	AC (%Inhibition DPPH)	Ascorbic acid (mg AA/100 g)	C (µg/g)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	TCD
Control	---	---	*INC	46.06 ± 1.23	66.06 ± 0.00	10.72 ± 0.00	33.38± 0.01	38.84± 0.90	15.57 ± 0.42	7.86 ± 0.42	---
1	30	31	2.48 ± 2.83	45.88 ± 0.60	55.48 ± 0.00	5.13 ± 0.32	21.64± 0.00	39.62± 1.45	10.50 ± 0.44	11.27± 0.95	6.16
2	90	31	2.23 ± 2.83	40.93 ± 1.19	55.22 ± 0.00	6.25 ± 0.00	21.48± 0.00	38.80± 0.56	11.64 ± 0.16	10.16± 0.18	4.55
3	30	59	2.11 ± 1.41	43.04 ± 0.74	56.27 ± 0.00	8.93 ± 0.00	26.83± 0.00	38.62± 1.01	13.94± 0.836	8.27 ± 0.87	1.69
4	90	59	1.74 ± 0.71	41.25 ± 0.34	54.18 ± 0.00	9.82 ± 0.00	26.19± 0.00	38.64± 0.72	13.94 ± 0.32	8.95 ± 0.42	1.97
5	60	45	2.42 ± 0.71	45.35 ± 0.56	52.09 ± 0.01	8.93 ± 0.00	27.45± 0.00	37.70± 0.79	14.20 ± 0.61	6.84 ± 0.62	2.05
6	60	45	2.32 ± 2.12	44.77 ± 0.37	53.26 ± 0.00	8.93 ± 0.00	28.06± 0.00	39.30± 0.82	12.19 ± 0.27	9.49 ± 0.43	3.78
7	60	45	2.32 ± 2.12	44.14 ± 0.15	51.87 ± 0.01	8.93 ± 0.00	39.42± 0.00	37.17± 0.42	14.84 ± 0.30	7.78 ± 0.29	1.83
8	20	45	2.51 ± 2.83	39.77 ± 0.07	53.72 ± 0.00	5.36 ± 0.00	21.81± 0.00	39.04± 0.72	10.84 ± 0.18	10.74± 0.28	5.53
9	100	45	2.43 ± 1.41	38.80 ± 0.11	50.72 ± 0.00	4.47 ± 0.00	26.14± 0.01	44.22± 1.11	9.91 ± 0.36	13.61± 0.81	9.69
10	60	25	2.83 ±10.61	46.72 ± 0.74	62.21 ± 0.01	8.93 ± 0.00	30.86± 0.00	40.61± 0.75	12.19 ± 0.18	12.09± 0.28	5.69
11	60	65	1.60 ± 0.00	40.91 ± 0.26	63.64 ± 0.00	8.04 ± 0.00	30.00± 0.01	40.35± 1.90	10.32 ± 0.55	11.44± 1.22	6.53
P	-	-	2.22 ± 2.12	36.48 ± 0.34	59.66 ± 0.00	6.25 ± 0.00	31.70 ± 0.01	39.86 ± 0.73	12.34 ± 0.27	12.33 ± 0.50	5.60

*INC: countless (log UFC/mL >300)

IP: intensity of the ultrasound power dissipated by the probe; T: temperature.

P: Pasteurized.

Table 3 – Regression coefficients of the response surface models for microbiological inactivation (Inat), total phenolic compounds (TPC), antioxidant capacity (AC), ascorbic acid content (Ascorbic acid), carotenoid content (C), total color difference (TCD) and color parameters and color parameters of thermosonicated acerola juice

Factor	Inat (log CFU/mL)	T (mg GAE/100mL)	AC (%Inhition DPPH)	Ascorbic acid (mg AA/100 g)	C (µg/g)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	TCD
Interception (β_0)	2.29	246.99	42.84	599.27	3.83	41.93	7.78	20.28	2.02
Linear									
Power intensity (β_1)	-	-	3.13	-	-	-	-	-	-
Temperature (β_2)	-	-	0.97	-	-	-	-	-	-
Quadratic									
Power intensity (β_{11})	-	87.39	6.28	-	-0.24	-	-0.71	-	-
Temperature (β_{22})	-	121.07	13.95	-	-0.32	-	-	-	-
Interactions									
β_{12}	-	59.82	7.47	-	-	-	-	-	-
R^2	0.83	0.88	0.84	0.33	0.66	0.30	0.53	0.46	0.69

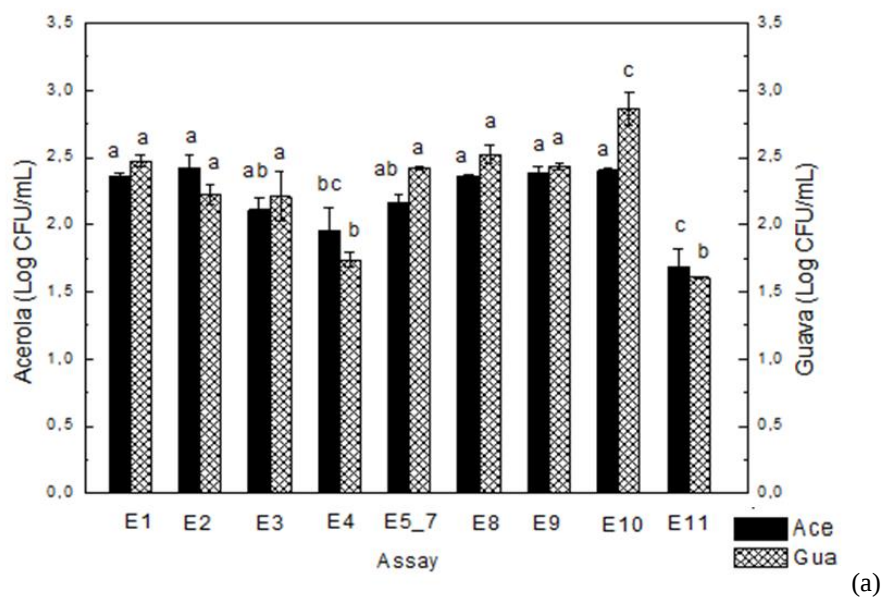
Table 4 – Regression coefficients of the response surface models for microbiological inactivation (Inat), total phenolic compounds (TPC), antioxidant capacity (AC), ascorbic acid content (Ascorbic acid), carotenoid content (C), total color difference (TCD) and color parameters of thermosonicated guava juice

Fator	Inat (log UFC/mL)	TPC (mg GAE/100mL)	AC (%Inhiition DPPH)	Ascorbic acid (mg AA/100 g)	C (µg/g)	<i>L</i> *	<i>a</i> *	<i>b</i> *	TC D
Interception (β_0)	2.36	44.60	51.78	8.93	31.65	38.07	13.74	8.05	2.56
Linear									
Power intensity (β_1)	-0.09	-1.02	-	-	-	-	-	-	-
Temperature (β_2)	-0.32	-1.34	-	-	-	-	-	-	-
Quadratic									
Power intensity (β_{11})	-	-2.40	-	-	-	-	-	-	-
Temperature (β_{22})	-0.12	-	4.90	-	-	-	-	-	-
Interactions									
β_{12}	-	-	-	-	-	-	-	-	-
R^2	0.82	0.80	0.87	0.67	0.50	0.43	0.38	0.55	0.40

3.1 Effects of thermosonication on microbiological inactivation

The results of the microbiological inactivation (Inat) for the thermosonication acerola juice (Table 1) show that the set of tests performed presented a high reduction when compared to the control sample (without treatment), that is, there was a reduction from uncountable to 2 logs. The thermosonicated guava juice (Table 2) showed similar behavior.

In the set of assays, for both juices, test 11 presented the most promising result, with an Inat increase of 17% and 28% for acerola and guava juices, respectively, when compared to the pasteurized sample (Tables 1 and 2). It was observed that for acerola juice, the conditions 60% - 65 °C (test 11) and 90%/- 59 ° C (test 4) presented the lowest values of cell viability, with no significant difference between these conditions. Similar behavior was observed for guava juice. However, when the thermosonicated samples from test 11 were compared with the pasteurized samples from both juices, a significant difference between values was observed, evidencing that this test is most promising (Figure 1).



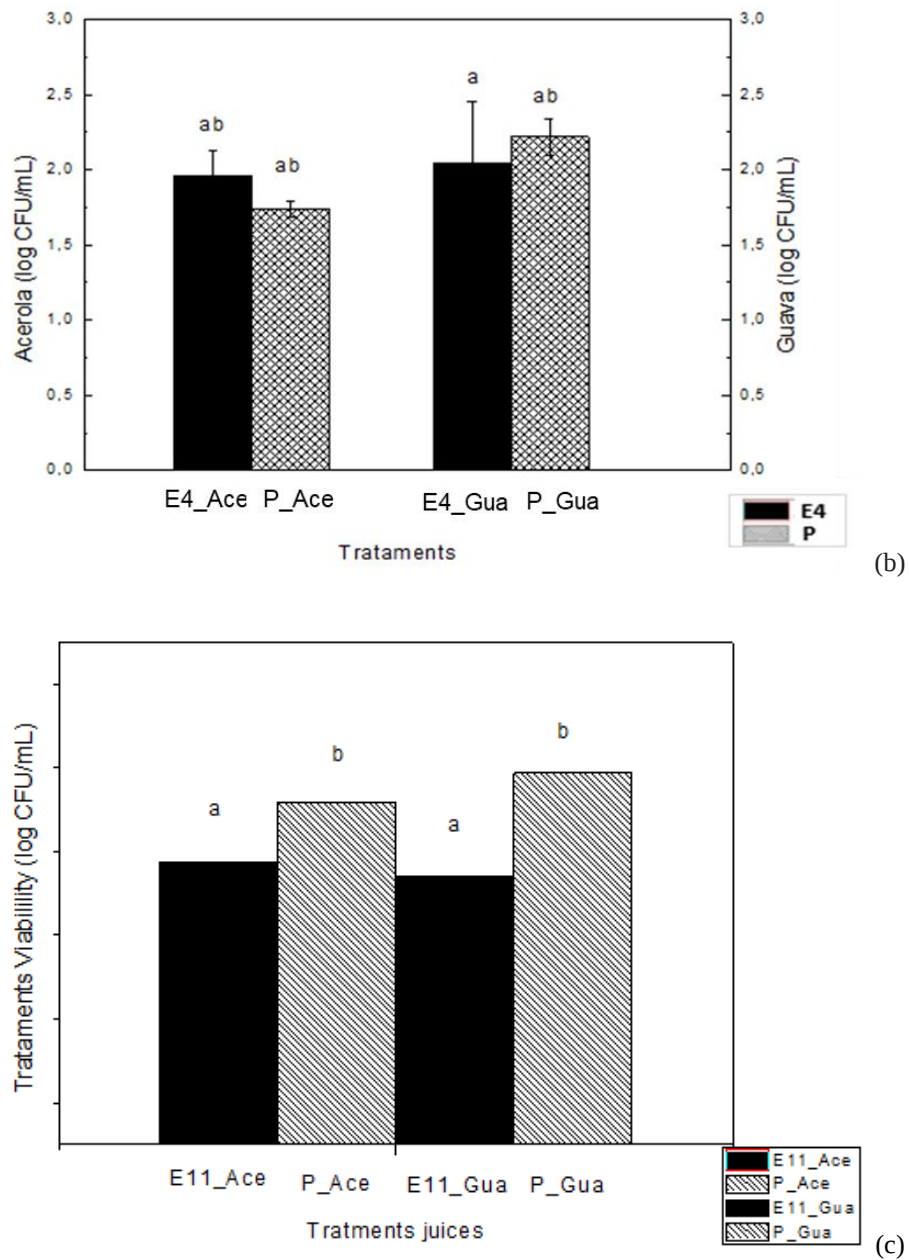


Figure 1 – Tukey test for the set of assay for both juices; E5_7: correspond to the central points of the DCCR (a); thermosonicated assay 4 and pasteurized samples (b); and thermosonicated assay 11 and pasteurized samples(c). Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.

According to Cervantes-Elizarrarás et al. (2017), thermosonication was effective in the microbiological inactivation of mulberry juice. The values found showed total inactivation for yeasts, lactic acid bacteria (BAL) and Enterobacteriaceae when compared with control and thermosonicated samples. Similar results were observed in apple, pineapple and grape juices (Abid et al. 2014; Tiwari et al. 2008; Tiwari et al. 2009).

Inactivation of microorganisms responsible for foodborne disease is the main objective of food processing. Inactivation of microorganisms was observed when thermosonication was performed at 65 °C for 10 minutes (20 kHz ultrasonic processor) compared to the pasteurized sample at 95 °C for 2 minutes (Saeeduddin et al. 2015). Similar results were found in pineapple, red blueberry and mandarin juices (Bermúdez-Aguirre et al. 2012).

A study on the effect of pathogenic bacteria on soursop nectar showed that there was a reduction in the microbiological viability of the analyzed samples after thermosonication when compared to the untreated sample. It was observed that one condition (test number 9), showed lethality reduction greater than the 5 logs, FDA (Food and Drug Administration) stipulated value (Anaya-Esparza et al. 2017). Orange juice sonicated at mild temperature and different times (1, 10, 20 and 30 minutes) showed a significant reduction of the microbiological load. It was observed that the reduction increased with increasing temperature and that the samples treated for 30 minutes showed total decontamination. The observed effects are attributed to the combined physical and chemical mechanisms that occur during cavitation (Guerrouj et al. 2016).

D'Amico et al. (2006) reported on the use of ultrasound with or without moderate heat (thermosonication). They noted that the reduction of cell viability of pathogenic bacteria in milk and apple cider occurred under both conditions. However, effective reduction and in accordance with the requirements of current food law was achieved by the use of thermosonication. In the case of apple cider, the inactivation was observed for *E. coli* O157: H7, with a reduction of 5 logs. This study, thermosonicated acerola and guava juices presented a reduction in microbiological inactivation of the initial microbial load from uncountable to 1.70 and 1.60 logs (acerola and guava, respectively).

A thermosonicated carrot juice study showed a value of 1.85 ± 0.02 for total counts of bacteria in log CFU/mL; under conditions of time and temperature processing between 5 to 6.5 minutes and 52 to 60 °C, respectively (Adiamo et al. 2018). The results of treatment 11 (IP 60% and T of 65 °C) for Inat of both juices, acerola, and guava heat-treated (Table 3 and 4) presented similar values.

In the study by Adiamo et al. (2018), an ultrasound bath was used, with variations of time and temperature. In our study, an ultrasound probe was used with temperature and power variations. The results observed for microbiological inactivation in both studies, however, suggested that the efficacy of this inactivation by thermosonication is similar. This fact supports the undeniable action of acoustic cavitation, among other effects of this processing.

3.2 Effects of thermosonication on total phenolic compounds

The results of the TPC analysis for the thermosonicated acerola juice (Table 1) showed a reduction of this content from 3% to 48%, except for tests 4, 8 and 11 which showed an increase, without registering a statistical difference on the Tukey test. Experiment 11 presented the highest value of TPC, with an increase of 5.2% and 8.6% when compared to the control sample (fresh juice) and pasteurized sample, respectively.

For guava juice (Table 2), the results showed a reduction between 2 to 15% in the content of TPC. From the tests carried out, only assay 10 failed to present a reduction when compared to the control sample (*without treatment*). The pasteurized sample had a reduction of around 21% when compared to the control sample. Figure 2 presents the results for the Tukey test for both juices. Figure 2 shows the high content of TPC in acerola juice when compared to guava. Among the two treatments for each juice, acerola and guava, there was no significant difference.

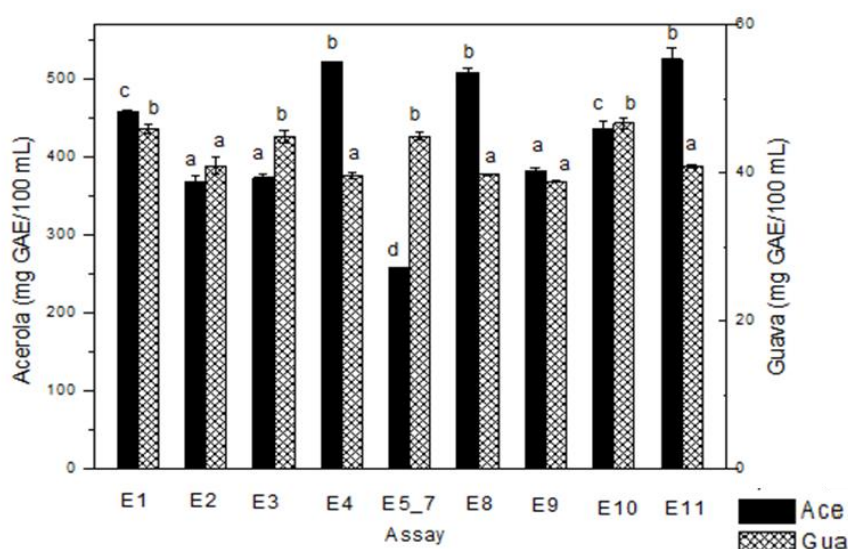


Figure 2 – Tukey test for the set of assays for both juices for TPC; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.

The phenolic compounds comprise a group of natural antioxidants responsible for beneficial effects on human health, being a primary factor in the fight against free radicals that promote chronic-degenerative diseases such as cancer, cardiovascular, metabolic syndrome, among others (Dias et al. 2015; Aadil et al. 2013).

Santhirasegaram et al. (2013) observed an increase between 30 and 35% in sonicated mango juice when compared to a control sample. This increase can be attributed to the reaction between the aromatic ring of the polyphenols and the free radicals generated in the sonication, which contributes to the increase of the antioxidant capacity (Ashokkumar et al. 2008). Sonication removes oxygen dissolved in the juice, contributing to greater bioavailability of the phenolic compounds (Masuzawa et al. 2000).

As for the reduction, this may be associated with the formation of free radicals, which may have affected the total phenolic compounds of the juice, since -OH radicals formed during the application of ultrasound may affect bioactive compounds such as phenolics (Wan et al. 2005).

The observed behavior of an increase or decrease in the content of bioactive compounds suggests a synergic effect resulting from the combination of independent variables used (power intensity and temperature) in the experimental design, effects of acoustic cavitation such as oxygen depletion, release of intracellular medium compounds and formation of free radicals (Saeeduddin et al. 2015). The behavior of the bioactive compounds, when submitted to different processes, is related to the food matrix (fruits and their products) (Campoli et al. 2018), synergic effect among independent variables, acoustic cavitation effects with oxygen elimination, the release of compounds from the intracellular environment and formation of free radicals. These changes (increase or decrease) in TPC depend on the composition of the different types of phenolic acids present in the juice and on the occurrence of isomerization reactions (Saikia et al. 2015; Anaya-Esparza et al. 2017).

3.3 Effects of thermosonication on antioxidant capacity

The results of the antioxidant capacity (AC) analysis for the acerola juice (Table 1) showed a reduction in the antioxidant activity of the experiments performed and of the pasteurized sample, except for tests 4 and 11 that presented AC values around 6% higher than the control (*without treatment*) with no significant difference between these two treatments (Figure 3).

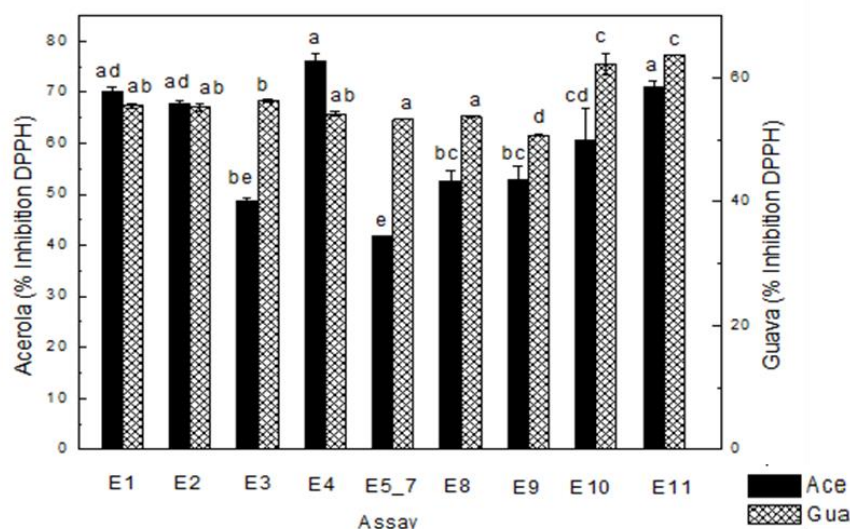


Figura 3 – Tukey test for the set of assays for both juices for AC; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level

For the thermosonicated guava juice (Table 2), a reduction in AC content was observed in all trials. The lowest reduction was observed in test 11, around 3% when compared to the control sample (*without treatment*). The pasteurized sample had a reduction of 9% when compared to the control sample. Figure 3 (Tukey test) shows results for both juices under different processing conditions, comparing the juice samples of acerola and guava juice under both thermosonicated and pasteurized conditions. There was no significant difference between the juices; however, in absolute values, experiment 11 shows values higher for the thermosonicated over the pasteurized.

The antioxidant activity of plants and their products is related to the content of antioxidant compounds they present, which have different mechanisms of action with synergistic interactions (Perez-Jimenez et al. 2008). Thermosonicated purple cactus juice presented higher antioxidant capacity by the sequestration of the DPPH free radical when compared to control and pasteurized (Cruz-Cansino et al. 2015). Alteration of antioxidant activity in fruit juices have been reported with retention of 90 to 100% (Abid et al. 2014). The stability of AC in sonicated juices may be associated with the elimination of the

dissolved oxygen present in the medium during cavitation (Anaya-Esparza et al. 2017; Cruz-Cansino et al. 2015).

3.4 Effects of thermosonication on Ascorbic acid content

The thermosonicated acerola juice presented ascorbic acid content values higher than the control sample. Experiment 11 presented the highest ascorbic acid increase, around 7% when compared to the control sample. The pasteurized sample showed a 12% reduction of this compound when compared to the control sample (without treatment) (Table 1). Wang et al. (2019a) found more activity in the bioactive compounds of sonicated strawberry juice samples than in the control sample. Observations by scanning electron microscopy (SEM) have demonstrated that this behavior is associated with changes that acoustic cavitation causes in cells, such as damage to the cell wall causing ruptures that release intracellular content, also giving rise to microchannels in the plant cell structure. Alterations in the microstructure of the food matrix and bioavailability of the bioactive compounds can be directly related.

Changes in bioactive compounds of different plant matrices present different responses after thermosonication processing. Acerola juice is a source of ascorbic acid, a water-soluble bioactive compound; while guava juice is rich in carotenoids, a liposoluble bioactive compound. This may be the reason for the different responses observed in this study.

The ascorbic acid content of guava juice (Table 2) showed a reduction in all the experiments, with values higher than those observed for acerola juice (Table 1), between 18 and 59%, when compared to the control sample (*without treatment*), except for experiment 4 that presented a significant reduction. The pasteurized sample presented a reduction of 45% when compared to the control sample. Figure 4 presents the results for the Tukey test for both

juices. For both juices, all experiments presented differences significant enough to group the results into several test subgroups. For acerola juice, trials 3, 5, 7 and 10 were the largest subgroup, with values of ascorbic acid content around 400. The Tukey test confirmed a significant difference between trial 11 and the others, showing the highest value (640 mg AA/100 g). For guava juice, the behavior was similar to acerola in the distribution of subgroups with significant differences. Assays 4, 9 and 10 formed a subgroup of about 13 mg AA/100g; the other trials showed significant differences among themselves and confirmed what Table 2 registers.

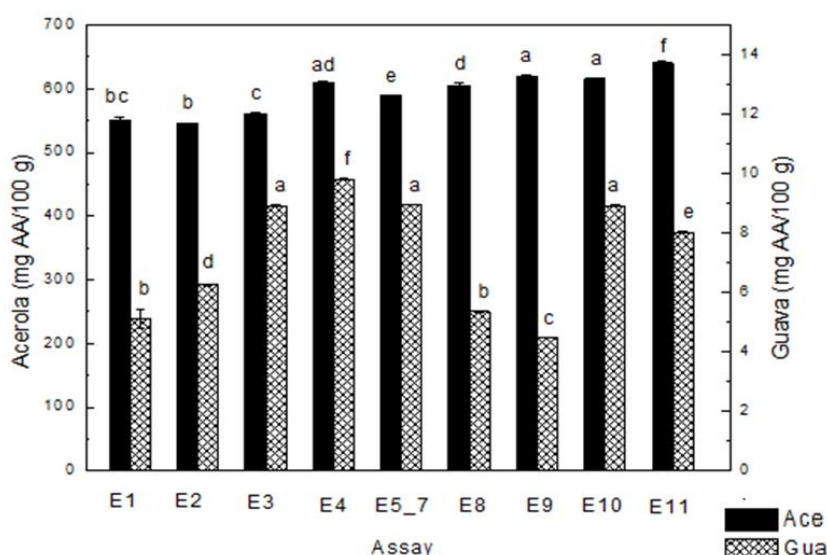


Figura 4 – Tukey test for the set of assays for both juices for Ascorbic acid; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.

A study carried out on thermosonication of tangerine and grapefruit juices suggested synergism in their action mechanisms, such as free radical formation, oxygen elimination, and intracellular membrane rupture (Aguilar et al. 2017, Khandpur et al. 2015).

Ascorbic acid is used as an indicator of nutritional value and as an index for estimating quality deterioration in processed products (Lima et al. 2010). It is a compound of potent antioxidant activity, involved in the prevention of chronic-degenerative diseases (Dias et al.

2015). The process of aerobic oxidation of ascorbic acid is a reaction whose mechanism of action involves factors such as temperature and presence of oxygen. In fruit juices, the presence of oxygen along the processing chain contributes to the degradation of the ascorbic acid content of the same. The use of sonication in fruit juices favors the release of the oxygen present in these juices and contributes to the preservation of the nutritional quality of these juices. The deaeration of fruit juices is shown as an important procedure in their processing step to prevent or minimize the degradation of ascorbic acid (Abid et al. 2014, Aguilar et al. 2017).

3.5 Effects of thermosonication on carotenoid content

The thermosonicated acerola juice presented increased carotenoid content (C), around 15% when compared to the control (*without treatment*). The pasteurized sample had an increase of carotenoids around 16% when compared to the control sample (Table 1).

The thermosonicated guava juice presented a reduction in all the trials, with the highest values observed in tests 1, 2 and 8; around 33% and decreases between 21 and 6% for others. The pasteurized sample presented a reduction of 5% when compared to the control sample. Tests 10 and 11 presented the least reductions, with values close to the pasteurized sample (Table 2). Guava juice presented higher levels of carotenoids than those of acerola juice. Figure 5 presents the results of the Tukey test, for both juices. This demonstrated that the ascorbic acid content in the juices had the opposite behavior with respect to carotenoid content. In this case, the guava had ten times higher levels of carotenoids than acerola. In the set of guava juice experiments, however, tests 10 and 11 presented higher values than the others.

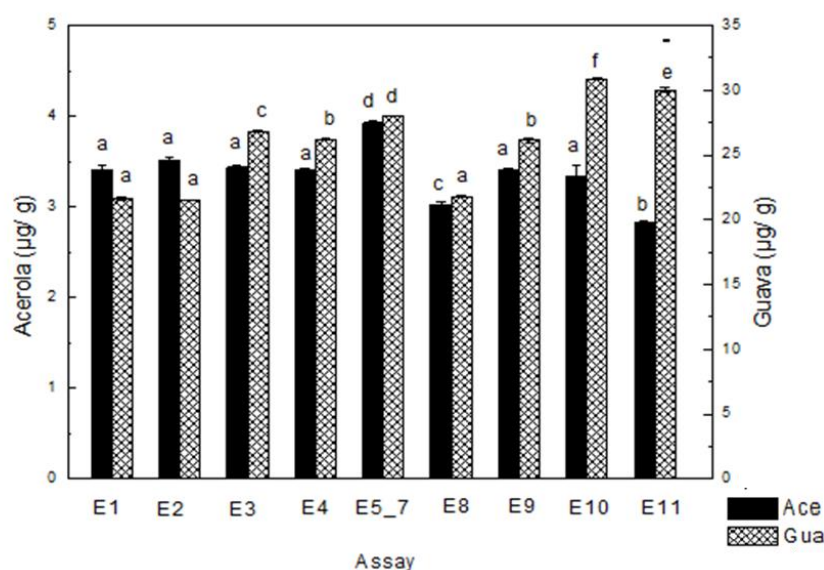


Figura 5 – Tukey test for the set of assays for both juices for Carotenoids; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.

Carotenoids are pigments present in plants and play important roles in human metabolisms such as immunology, regulation of the cellular mechanism and as antioxidants (Santhirasegaram et al. 2013). During food processing, the generation of free radicals is a fact. These radicals react with lipids, proteins, and sugars. The kinetics of the reaction is determined by the velocity of process and can present different rates for different reaction mechanisms, involving competition between hydroxyl radicals, and oxydryl and its substrates. Moreover, when oxidation involves temperature increase, the free radicals produced tend to react primarily with the solvents from the medium rather than the lipids (Pingret et al. 2013).

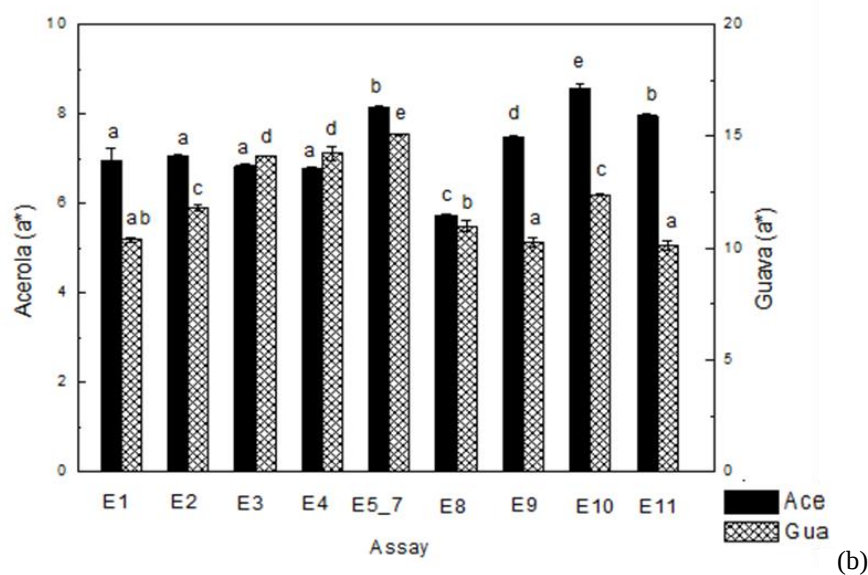
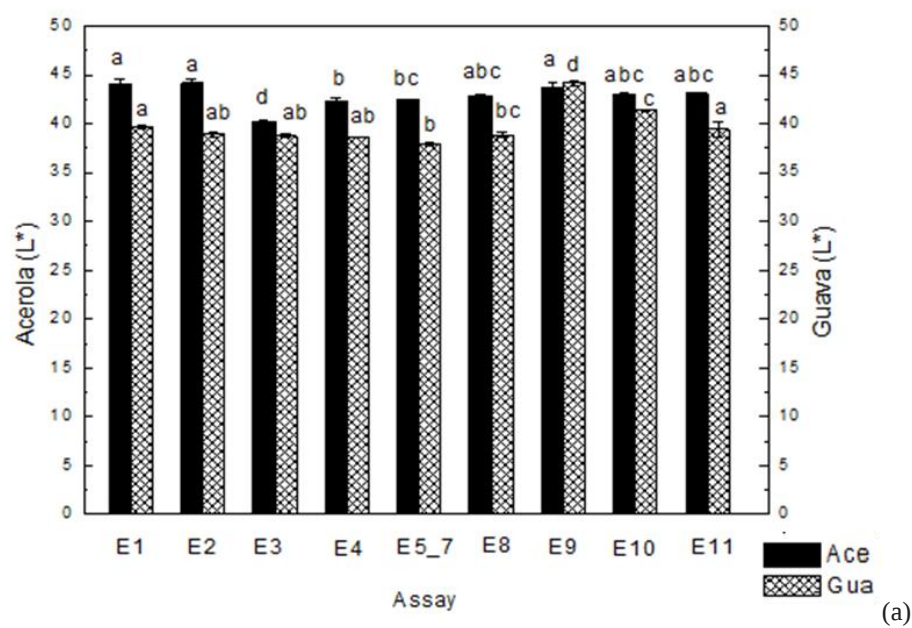
Carotenoids are liposoluble compounds. In this study, a discrete increase of carotenoids in the acerola juice was noted, with a carotenoid content of 3.30 µg/g for the control sample. The thermosonicated guava juice, with a carotenoid content of 33.38 µg/g (control sample), presented a significant decrease in carotenoid content. Thus, the behavior observed in the sonication treatments of the two juices suggests that there were divergent

mechanisms at work and the possible contribution of several factors, such as temperature, the presence of oxygen, and different nutritional composition of each processed food matrix. Lee et al. (2005) observed that the carotenoid content in orange juice was reduced by around 10% after manothermosonication (use of ultrasound associated with the use of heat and pressure). However, in a stock study, the sonicated samples presented superior stability in carotenoid content when compared to the control samples which presented a rapid degradation of the compound.

In this study, the contribution of the carotenoid content of the thermosonicated acerola suggested that carotenoids contribute synergistically to the activity of bioactive compounds. , since vegetables have been identified as sources of this compound, for example buriti (*Mauritia vinifera*) and carrots (*Daucus carota*), which present approximately 360 µg/g and 20 µg/g β-carotene, respectively (Rodriguez-Amaya et al. 2008). Carotenoid content was observed to be similar to that observed in acerola juice, with non-significant differences between the thermosonication and pasteurization treatments (Adiamo et al. 2018).

3.5 Effects of thermosonication on Color

For the thermosonicated acerola juice, test 8 presented the highest value of TCD, with the value of a* presenting a reduction of 35% when compared to the control sample. An increase in the values of L* was observed in experiments 9, 10 and 11; without a significant difference between 10 and 11 (Figure 6), evidencing an increase in luminosity. As for the pasteurized sample, there was a non-significant alteration in luminosity (around 3%), a* (17%) reduction and the maintenance of the b* value. The tests showed a tendency to increase luminosity from medium to high power intensity.



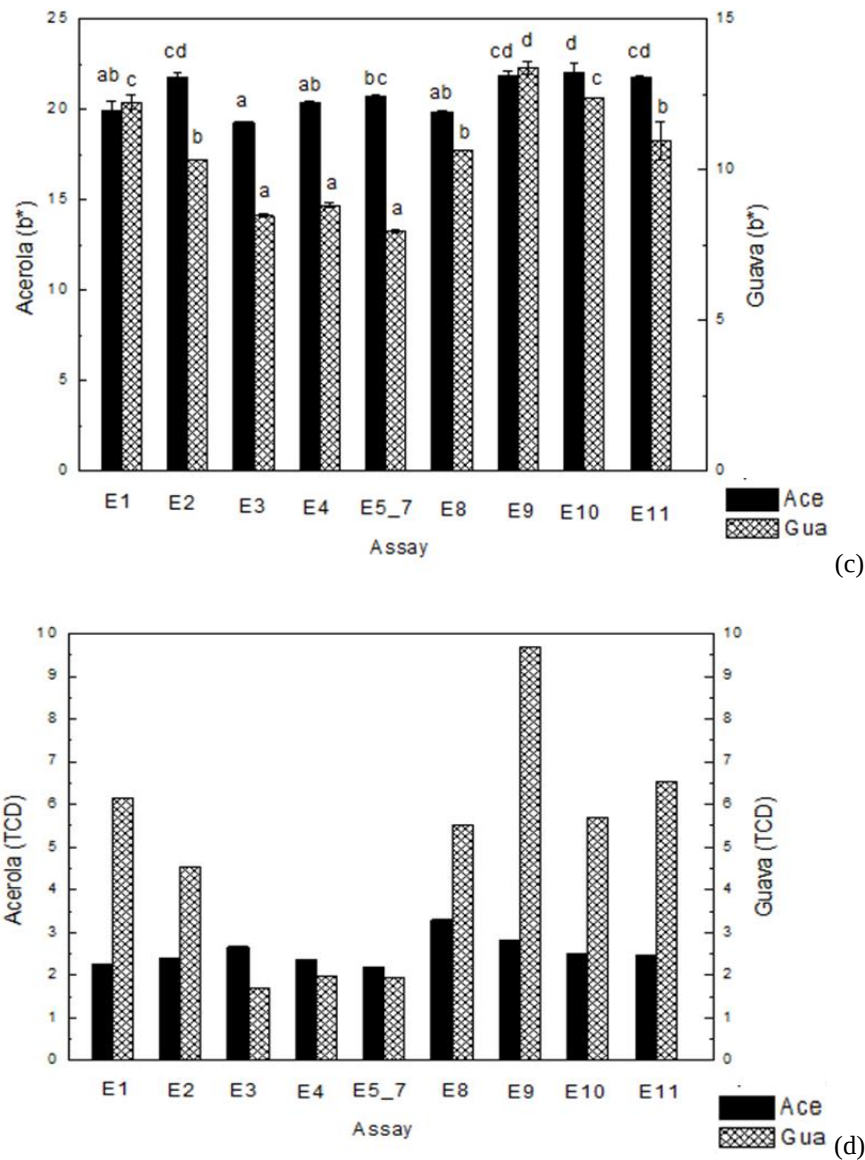


Figura 6 – Tukey test for the set of assays for both juices for parameters L*(a), a*(b), b*(c); and TCD; E5_7: correspond to the central points of the DCCR. Tukey test: Different letters indicate a significant difference between tests at the 5% level.

For guava juice, the tests showed no significant changes when compared to the control sample, except for test 9, which showed an increase of 11% in the value of L* and 14% in the value of b*. The pasteurized sample had an increase in the value of b* around 36% and a non-significant alteration of luminosity.

As for the total color variation, for acerola juice, values of the TCD between 1.70 to 3.29 were observed for the sonicated sample; and 1.95 for the pasteurized sample (Table 1).

For guava juice, values of the TCD were between 1.69 to 9.69, and 5.60 for the pasteurized sample (Table 2).

Changes in the color parameters of the thermosonicated fruit juices suggest activity of pigment release mechanisms located inside the cells (Aadil et al. 2013; Bhat et al. 2011), associated with the conditions used in the thermosonication, such as time, temperature, food matrix and the different reactions that occurred in the treatment (Anaya-Esparza et al. 2017). The study of color variation in foods is important because it affects consumers' acceptability and willingness to buy, being a visual indicator of judgment (Dias et al. 2015). Conventional heat treatments such as pasteurization cause darkening of the juice, while thermosonication improves brightness (Abdullah and Chin 2014), as observed in our study.

Sonicated mango juice (Santhirasegaram et al. 2013) showed an increase of L^* similar to that observed in our study for both juices. Kiwi fruit juice sonicated at different times (4, 8, 12 and 16 minutes) presented an increase in luminosity value, except at 16 minutes, when it suffered a reduction of 7% (Wang et al. 2019b). Thermosonicated apple and guava juices presented TCD considered to be perceptible and related to the fact that cavitation caused the release of pigments such as carotenoids (Saad et al. 2013).

4. Conclusion

The microbiological inactivation, bioactive compounds and color evaluated in all the trials showed that test 11 (60% - 65 °C) was considered the most promising for both juices. The fruit juices obtained had a nutritional value closer to fresh juice when compared to those treated by pasteurization. Acerola and guava juices showed behaviors that demonstrated a direct relation with the food matrix and its intrinsic characteristics. The study demonstrated that thermosonication is an alternative and a potentially successful technique for the

processing of acerola and guava juices of nutritional value, superior to the pasteurized samples of both juices.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge UFPE (Federal University of Pernambuco); this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), for the financial support that made this research possible and CNPq (Scientific and Technological Development) for the fellowships. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

References

- Aadil, R.M., Zeng, X.A., Han, Z., Sun, D.W. (2013). Effect of ultrasound treatments on quality of grapefruit juice. *Food Chemistry*, 141, 3201-3206.
- Abdullah, N., & Chin, N.L. (2014). Application of Thermosonication Treatment in Processing and Production of High Quality and Safe-to-Drink Fruit Juices. *Agriculture and Agricultural Science Procedia*, 2, 320 – 327.
- Abid, M., Jabbar, S., Hua, B., Hashim, M.M., Wua, T., Lei, S., Khan, M.A., Zeng, X. (2014). Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. *Ultrasonic Sonochemistry*, 21, 984–990.
- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M. M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1182-1187.
- Adiamo, O.Q., Ghafoor, K., Al-Juhaimi, F., Babiker, E.E., Ahmed, I.A.M. (2018). Thermosonication process for optimal functional properties in carrot juice containing orange peel and pulp extracts. *Food Chemistry*, 245, 79-88.
- Aguiar, K., Garvín, A., Ibarz, A., Augusto, P.E.D. (2017). Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 375–381.
- Anaya-Esparza, L.M., Méndez-Robles, M.D., Sayago-Ayerdi, S.G., García-Magaña, M.L., Ramírez-Mares, M.V., Sánchez-Burgos, J.A., Montalvo-González, E. (2017). Effect of thermosonication on pathogenic bacteria, quality attributes and stability of soursop nectar during cold storage. *Cyta – Journal of food*, 15(4), 592-600.

- Ashokkumar, M., Sunartio, D., Kentish, S., Mawson, R., Simons, L., Vilkh, K., Versteeg, C. (2008). Modification of food ingredients by ultrasound to improve functionality: a preliminary study on a model system. *Innovation in Food Science and Emerg. Technology*, 9, 155-160.
- Bermúdez-Aguirre, D., & Barbosa-Cánovas, G. V. (2012). Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. *Journal of Food Engineering*, 108, 383-392.
- Bhat, R., Kamaruddin, N.S.B.C., Min-Tze, L., Karim, A.A. (2011). Sonication improves kasturi lime (*Citrus microcarpa*) juice quality. *Ultrasonics Sonochemistry*, 18, 1295–1300.
- Brand-Williams, W., Cuvelier, M.E., Berset, C. (1995). Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. *Food Science and Technology*, 289(1), 25-30.
- Campoli, S.S., Rojas, M.L., Amaral, J.E.P.G., Canniatti-Brazaca, S., Augusto, P.E.D. (2018). Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene in vitro accessibility. *Food Chemistry*, 268, 594-601.
- Cervantes-Elizarrarás, A., Piloni-Martini, J., Ramírez-Moreno, E., Alanís-García, E., Güemes-Vera, N., Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N.S. (2017). Enzymatic inactivation and antioxidant properties of blackberry juice after thermoultrasound: Optimization using response surface methodology. *Ultrasonics Sonochemistry*, 34, 371–379.
- Chaudhary, P.R., Jayaprakasha, G.K., Patil, B.S. (2015). Ethylene degreening modulates health promoting phytochemicals in Rio Red grapefruit. *Food Chemistry*, 188, 77–83.
- Cruz-Cansino, N.S., Ramirez-Moreno, E., Leon-Rivera, J.E., Delgado-Olivares, L., Alanis-Garcia, E., Ariza-Ortega, J.A., Manriquez-Torres, J.J., Jaramillo-Bustos, D.P. (2015). Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. *Ultrasonics Sonochemistry*, 27, 277–286.
- D'Amico, D.J., Silk, T.M., Wu, J., Guo, M. (2006). Inactivation of Microorganisms in Milk and Apple Cider Treated with Ultrasound. *Journal of Food Protection*, 69(3), 556–563.
- Dias, D.R.C., Barros, Z.M.P., Carvalho, C.B.O., Honorato, F.A., Guerra, N.B., Azoubel, P.M. (2015). Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT Food Science and Technology*, 62(1), 883-889.
- Elvira, L., Durán, C.M., Urréjola, J., Espinosa, F.R.M. (2014). Detection of microbial contamination in fruit juices using noninvasive. *Ultrasound Food Control*, 40, 145-150.
- Farias, N., Soares, M., Gouveia, E. (2016). Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 149-154.
- Fellows, P.J. (2009). *Food processing technology: principles and practice*, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 895pp.
- Fonteles, T.V., Costa, M.G.M., de Jesus, A.L.T., Fontes, C.P.M.L., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S. (2013). Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2860–2869. DOI 10.1007/s11947-012-0962-y.

Guerrouj, K., Sánchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R.M., Marín-Iniesta, F. (2016). Sonication at mild temperatures enhances bioactive compounds and microbiological quality of orange juice. *Food and Bioprocess Processing*, 99, 20-28.

Khandpur, P., & Gogate, P.R. (2015). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetables juices. *Ultrasonic Sonochemistry*, 27, 125–136.

Kiang, W.S., Bhat, R., Rosma, A., Cheng, L.H. (2012). Effects of thermosonication on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in mango juice. *Letters in Applied Microbiology*, 56, 251–257.

Lima, J.R., Elizondo, N.J., Bohuon, P.P. (2010). Kinetics of ascorbic acid degradation and colour change in ground cashew apples treated at high temperatures (100 – 180 °C). *International Journal of Food Science Technology*, 45, 1724–1731.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª. Edição. Porto Alegre: Artmed, 1160p.

Martínez-Flores, H.E., Garnica-Romo, M.G., Bermúdez-Aguirre, D., Pokhrel, P.R., Barbosa-Cánovas, G.V. (2015). Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage *Food Chemistry*, 172, 650–656.

Masuzawa, N., Ohdaira, E., Ide, M. (2000). Effects of ultrasonic irradiation on phenolic compounds in wine, *Japanese Journal of Applied Physics*, 39, 2978–2979.

Nicolau-Lapeña, I., Lafarga, T., Viñas, I., Abadías, M., Bobo, G., Aguiló-Aguayo, I. (2019). Ultrasound Processing Alone or in Combination with Other Chemical or Physical Treatments as a Safety and Quality Preservation Strategy of Fresh and Processed Fruits and Vegetables: A Review. *Food and Bioprocess Technology*, 12, 1452–1471. <https://doi.org/10.1007/s11947-019-02313-y>.

Pérez-Jiménez, J., Arranz, S., Tabernero, M., Díaz-Rubio, M.E., Serrano, J., Goñi, I., Saura-Calixto, F. (2008). Updated methodology to determine antioxidant capacity in plant foods, oils and beverages: Extraction, measurement and expression of results. *Food Research International*, 41, 274–285.

Pingret, D., Fabiano-Tixier, A., Chemat, F. (2013). Degradation during application of ultrasound in food processing: A review. *Food Control*, 31, 593-606.

Rodrigues-Amaya, D. *A guide to carotenoids analysis in food*. Washington: Internacional Life Sciences Institute Press, 1999. 64p.

Rodrigues-Amaya, D.B., Kimura, M., Amaya-Farfan, J. *Fontes brasileiras de carotenoides: tabela brasileira de composição de carotenoides em alimentos*. Brasília, MMA/SBF, 2008, 100p.

Roobab, U., Aadil, R.M., Madni, G.M., Bekhit, A.E. (2018). The Impact of Nonthermal Technologies on the Microbiological Quality of Juices: A Review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 17, 437-457.

- Saad, S.M., Elaleem, I.M.A., Foda, F.F.A., Eissa, H.A., Abdelmoniem, G.M., Ibrahim, W.A. (2013). Effects of thermosonication on apple and guava juices quality. *Journal of Applied Sciences Research*, 9(8), 5323-5336.
- Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, A., Wu, T., Hashim, M.M., Awad, F.N., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2015). Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT Food Science and Technology*, 64, 452-458.
- Saikia, S., Mahnot, N.K., Mahanta, C.L. (2015). A comparative study on the effect of conventional thermal pasteurisation, microwave and ultrasound treatments on the antioxidant activity of five fruit juices. *Food Science and Technology International*, 22(4), 288–301.
- Santhirasegaram, V., Razali, Z., Somasundram, C. (2013). Effects of thermal treatment and sonication on quality attributes of Chokanan mango (*Mangifera indica* L.) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1276–1282.
- Santos, E., Andrade, R., Gouveia, E. (2017). Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience*, 20, 56-61.
- Singleton, V.L., Orthofer, R., Lamuela, R.M. (1999). Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin-Ciocalteu reagent. *Methods in Enzymology*, 299, 52-178.
- Strohecker, R., & Henning, H. *Analisis de vitaminas: métodos comprobados*. Madrid: Paz Montalvo, 1967, 28p.
- Tiwari, B.K., O' Donnell, C.P., Cullen, P. J. (2009). Effect of non-thermal processing technologies on the anthocyanin content of fruit juices. *Trends Food Science Technology*, 20, 137–145.
- Tiwari, B.K., O' Donnell, C.P., Muthukumarappan, K., Cullen, P. J. (2008). Effect of ultrasound processing on quality of fruit juices. *Stewart-Post Harvest Review*, 4(5), 1-6.
- Wan, J., Mawson, R., Ashokkumar, M., Ronacher, K., Coventry, M.J., Roginski, H. (2005). Emerging processing technologies for functional foods. *Australian Journal of Dairy Technology*, 60, 167–169.
- Wang, J., Ye, J., Vanga, S.K., Raghavan, V. (2019a). Influence of high-intensity ultrasound on bioactive compounds of strawberry juice: Profiles of ascorbic acid, phenolics, antioxidant activity and microstructure. *Food control*, 96, 128-136.
- Wang, J., Ye, J., Vanga, S.K., Raghavan, V. (2019b). High-intensity ultrasound processing of kiwifruit juice: Effects on the ascorbic acid, total phenolics, flavonoids and antioxidant capacity. *LWT – Food Science and Technology*, 107, 299 – 307.
- Zafra-Rojas, Q.Y., Cruz-Cansino, N., Ramírez-Moreno, E., Delgado-Olivares, L., Villanueva-Sánchez, J., Alanís-García, E. (2013). Effects of ultrasound treatment in purple cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1283–1288.

5.2 Effect of thermosonication on the production of acerola and guava probiotic juices

Zilmar Meireles Pimenta Barros^a, Renata de Oliveira Nascimento Silva^a, Patricia Moreira Azoubel^b, Ester Ribeiro^{a,2*}

^aUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Biociências, Departamento de Antibióticos, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, Cidade Universitária, Recife-PE, 50670-901, Brazil.

^bUniversidade Federal de Pernambuco, Centro de Tecnologia e Geociências, Departamento de Engenharia Química, Av. Prof. Arthur de Sá, s/n, Cidade Universitária, Recife-PE, 50740-521, Brazil.

Abstract

The objective of this work was to evaluate the effect of thermosonication on the production of fermented probiotic juices of acerola and guava using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. The production (50% V / V of pulp) and the refrigerated stock (30 days) of probiotic juices fermented at 37 °C for 24 hours were analyzed by thermosonication at 60% ultrasound power intensity and temperature at 65 °C. The maximum volumetric productivities in relation to the cells and the product were almost double when the juices were thermosonicated and the survival during the refrigerated storage was higher (7.5%). Thermosonication was as effective as pasteurization in microbial inactivation, with the advantage of keeping the bioactive compounds more available which favored the growth of the probiotic.

Keywords: *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, probiotic juices; cell viability; ultrasound; thermosonication; pasteurization.

^{2*} Corresponding author: Tel.: +55-81-2126-8583; fax: +55-81- 2126-7298.
E-mail address: ester.ribeiro@ufpe.br

Introduction

Brazil is the third-largest fruit producer in the world with 35% for exportation (Embrapa 2020). Fruit juices contain essential nutritional components, such as carbohydrates, proteins, minerals, vitamins, and carotenoids for the equilibrium of the human body (Khandpur and Gogate, 2016; Dias et al. 2015). Guava (*Psidium guajava* L) and acerola (*Malpighia puniceifolia* L) are tropical fruits, which have excellent consumer acceptance and command a significant participation in the Brazilian market (Embrapa, 2020; IBGE 2019; Campoli et al. 2018).

The consumption of plant probiotics, such as fruits and their products, has emerged because there is a demand for low-fat or lactose-free foods (Fonteles et al. 2013). There has been an increasing number of studies of non-dairy probiotic drinks, mainly made from a vegetable matrix, such as fruit juices. This growth is explained by such reasons as the increase in the number of people allergic to milk proteins, or who have high cholesterol levels, and lactose intolerance. As well, there are market segments that consume only products of plant origin (Andrade et al. 2019).

Probiotic fruit juices have a lower sugar content since lactic acid bacteria consume sugar during fermentation (White and Hekmat, 2018). The production of probiotic fruit juices is strongly influenced by parameters such as pH, nutritional composition, cell viability, and survival in refrigerated storage (Fonteles et al. 2013). Some studies have shown that fruit juices can serve as a medium for *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 (Nematollahi et al. 2016; Farias et al. 2016; Santos et al. 2017; Andrade et al. 2019).

The *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 has been used in fermented and non-fermented probiotic juices, being studied with several plant matrices such as passion fruit of the Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.) and guava (*Psidium guajava*) (Farias et al. 2016; Santos et al. 2016; Santos et al. 2017; Andrade et al. 2019).

Pasteurization has been used as heat treatment to ensure microbiological safety in food production, despite the nutritional and sensory losses of the product. The Ultrasound makes a good alternative to conventional treatment and has been used in the production of fruit juices to ensure the quality of its bioactive compounds (Dias et al. 2015; Jambrak et al. 2018). The use of ultrasound associated with temperature (thermosonication) becomes a viable alternative to replace conventional thermal treatments, such as pasteurization. Studies have shown the advantages of thermosonication towards microbiological inactivation and preservation of nutritional and bioactive compounds, resulting in food with characteristics closer to the fresh product, for example, fruit juices (Rawson et al. 2011; Sanchez-Rubio et al. 2016; Evelyn and Silva, 2016; Evelyn et al. 2016; Jabbar et al. 2015).

This study aimed to evaluate the effect of thermosonication on the production of probiotic juices from the acerola and guava fruits using *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. Pasteurization was used as the traditional method.

Material and Methods

2.1 Juice preparation

Malpighia emarginata (acerola) and *Psidium guajava* (guava) juices were prepared from non-pasteurized frozen pulp without the addition of preservatives or water, produced by Fresh Fruit Company (Recife, Brazil). The juices were prepared by diluting the pulp in distilled water (1:1 ratio) and then processed, as described below (Section 2.2). Before thermosonication or pasteurization, the pH of the juices was adjusted with 2 mol L⁻¹ NaOH (Dinâmica, São Paulo, SP, Brazil) using a potentiometer (Tecnal model Tec-3MP).

2.2 Thermosonication and pasteurization

Thermosonication treatment was conducted with using 500 W ultrasound instrument with a 1.3 cm probe diameter and a constant frequency of 19 kHz (Unique,

DES500, Brazil). An ultrathermostated bath (SOLAB® SL-152/157, Brazil) was used to maintain the juice at the processing temperature. The juice samples (150 mL) were placed in a 250 mL thermostated vessel (8.5 cm diameter) and an ultrasonic probe was immersed to 2.5 cm below the surface of the juice. The thermosonication lasted 10 minutes and started when the pre-set temperature was reached by the system, as recorded by a digital thermometer for calibration (Abid et al. 2013; Saeeduddin et al. 2015). The temperature of the jacket water was maintained in 65°C and the intensity of the ultrasound power dissipated by the probe was maintained at 224 W/cm².

The pasteurization treatment of the juices was conducted at 67 °C for 35 minutes, followed by thermal shock in an ice-water bath for 5 minutes (Fellows 2009; Madigan et al. 2010; Farias et al. 2016; Santos et al. 2017; Andrade et al. 2019).

Afterward, microbiological inactivation of the treated samples was investigated, in triplicate, by the spread plate method using nutrient agar (KASVI, São Paulo, Brazil). The plates were incubated upside-down at 37 °C for 24 h. Plates containing between 30 and 300 colonies were measured and recorded as colony forming units (CFU) per mL of solution. Control (without treatment), pasteurized, and thermosonicated samples of the two juices were evaluated.

2.3. Microorganism and inoculum

Lactobacillus rhamnosus ATCC 7469 was purchased from The American Type Culture Collection (ATCC, Manassas, VA, USA). The strain was stored at -20°C (Model DC49A, Electrolux, Recife, PE, Brazil) in 10% (v/v) glycerol (Farias et al. 2016). For inoculum preparation, the stock culture was subcultured in 25 mL of MRS (De MAN, ROGOSA, and SHARPE) broth (Merck, Darmstadt, Germany) and was incubated (Model

SP-101, Splabor, Presidente Prudente, SP, Brazil) at 37°C for 24h. The 10% (v/v) bacterial suspensions, in MRS broth, were inoculated into the fruit juices (item 2.4).

2.4 Kinetic study of the production of probiotic juices of acerola and guava

The bacterial cells (Section 2.3) were aseptically added to the pasteurized or thermosonicated juices and were incubated at 37°C (Model SP-101, Splabor, Presidente Prudente, SP, Brazil). Six different fermentations were carried out during 24h. Two of these were acerola juices with pH adjusted to 4, pasteurized (PA4), or thermosonicate (TA4). Concerning guava juices, four conditions were established: PG4 (pasteurized guava and pH adjusted to 4), TG4 (thermosonicated guava and pH adjusted to 4), PG6 (pasteurized guava and pH adjusted to 6) and TG6 (thermosonicated guava and pH adjusted to 6). Samples were collected every each six hours. All fermentations were performed in duplicate. Viability, pH, and glucose, fructose, and lactic acid concentrations were determined. The fermented juices were dispensed into sterile tubes, stoppered and stored at 4 °C in a refrigerator. Viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469 was determined at the initial time and at 28 days of refrigerated storage.

2.5 Determination of the viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469

Serial dilutions of the probiotic acerola and guava juices in a 0.9% (w/v) saline solution were carried out for viable cell count using a spread plate method in MRS broth (Merck, KGaA Germany) containing agar 2% w/V (KASVI, São Paulo, Brazil). The plates were incubated upside down at 37°C for 48h. Viability was measured as CFU/mL of suspension.

2.6 Determination of pH, glucose, fructose, and lactic acid

The pH of the juices measured a potentiometer (Tecnal model Tec-3MP). High-performance liquid chromatography (HPLC) was used to determine glucose, fructose, and

lactic acid concentrations (Farias et al. 2016). A Shimadzu system (Model Prominence LC-20AD, Kyoto, Japan) equipped with a Shimadzu diode array detector (Model SPD20A) for lactic acid or refractive index detector (Model RID-10A) for glucose and fructose was used. A 300×7.8mm ionic exchange column (Aminex® HPX-87H, Bio-Rad, Hercules, CA, USA), with a 9µm particle size, was used at 28 °C (lactic acid) or 40 °C (glucose and fructose). The mobile phase was a solution of sulfuric acid (5 mM) prepared in ultrapure water (Model MS 2000, Gehaka, São Paulo, SP, Brazil) at a flow rate of 0.6mL/min in isocratic elution. The samples were filtered with a 0.22µm membrane (Durapore, Merck) and diluted in the mobile phase at a 1:10 ratio. Different volumes (10, 20, 30, 40, and 50µL) of standards of lactic acid, glucose, and fructose (Sigma Aldrich) at a concentration of 1g/L were put through the HPLC to obtain each linear calibration curve; the correlation coefficients of all calibration curves were ≥ 0.999 . The retention times of the standards and their peak area were used to identify and quantify the compounds. The data were obtained using the software LabSolutions LC solutions that came with the instrument.

2.7 Statistical analysis

The mean values of variables were obtained from two experimental replicates. Data were analyzed using a one-way analysis of variance (ANOVA) followed by the Tukey test using Statistica 7.0 at a 5% significance level.

3. Results and Discussion

3.1 Production of fermented probiotic juices varying fruit, pulp treatment and pH

Initially, four different fermentation conditions were established with the acerola and guava juices with initial pH adjusted to 4: pasteurized acerola (PA4), thermosonicated acerola (TA4), pasteurized guava (PG4) and thermosonicated guava (TG4). The initial pH was

adjusted to 4 so that it was closer to the natural pH of the juices of these fruits. This adjustment enabled evaluation of the robustness of the *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 and made it possible to compare the results with those reported by Nematollahi et al. (2016). These authors adjusted the pH of cornelian cherry juice to 3.5 in the production of unfermented probiotic juices, using *Lactobacillus* strains, including *L. rhamnosus* ATCC 7469. Figure 1 shows the viability of *L. rhamnosus* ATCC 7469 and the pH during the fermentation.

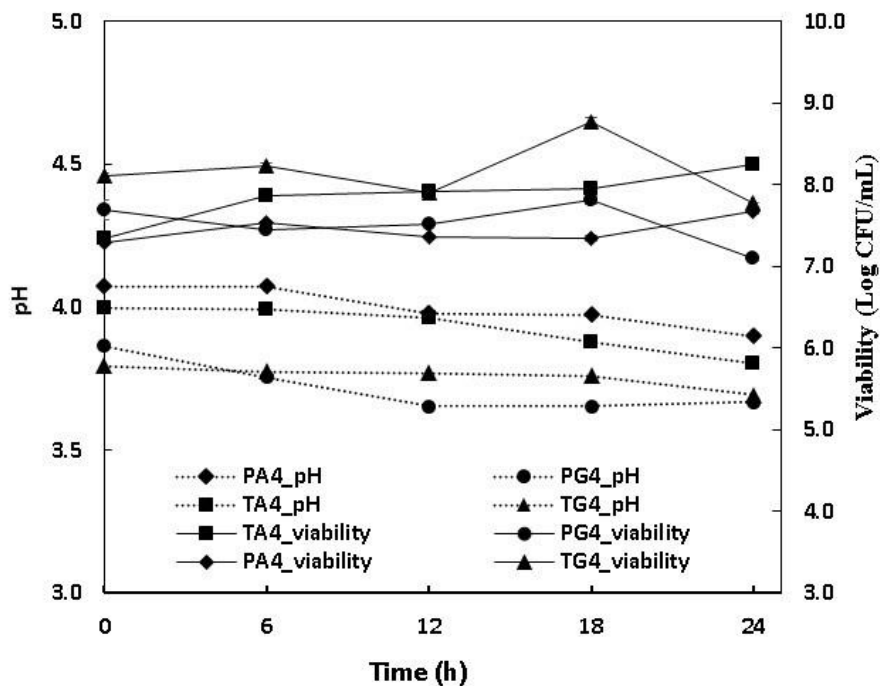


Figure 1 – Viability and pH during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4)

There was a decrease in pH between 3 and 5%. Maximum viability was observed in the fermentation using the thermosonicated juice, both for acerola and guava. Higher growth was observed in the fermentation of the guava pulps. The stationary phase seems to have occurred between 18 and 24 hours in the fermentation of guava juice. There was a decrease in viability at 24 hours, indicating that the microorganism was in the death phase. On the

other hand, in fermentation of acerola juices, the microorganism was probably still in the exponential phase at 24 hours.

Maximum volumetric productivity in cells (P_x) was calculated from the difference between the maximum viability value subtracted from the value at the initial time. The result was divided by the time of maximum viability. In fermentation of thermosonicated juices, the maximum volumetric productivities (0.04 and 0.037 Log CFU / mL.h for TA4 and TG4, respectively) were four times higher than those achieved in the fermentation of pasteurized juices (0.014 and 0.007 Log CFU / mL.h for PA4 and PG4, respectively), for both pulps. There was a significant difference between the values obtained in the four fermentation conditions. The initial glucose concentrations (Figure 2) in the juices of each pulp (considering both treatments) were higher in the fermentations of pasteurized juices.

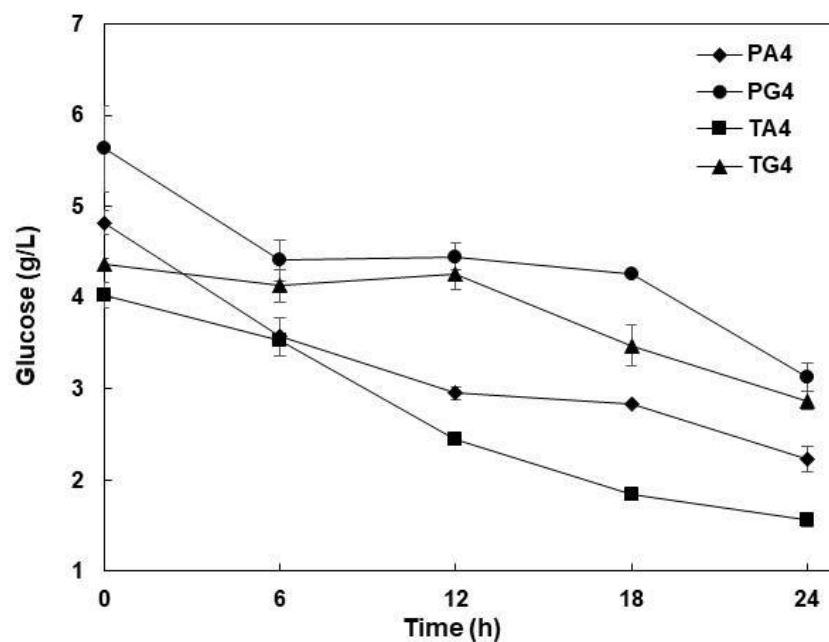


Figure 2 – Glucose concentration during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4).

Although the initial glucose concentration in the pasteurized guava juice was 22% higher than in the thermosonicated juice, the 24-hour concentrations were similar, with a

difference of 8%. This was because glucose consumption was faster in the first six hours in the fermentation of pasteurized juice. Concerning the fermentations of acerola juices, there was higher consumption of glucose between six and 24 hours for the thermosonicated juice, which favored a difference in the final concentrations obtained in these fermentations. The final glucose concentration in the fermentation of thermosonicated acerola juice, therefore, was 30% lower than in the fermentation of the pasteurized acerola juice.

As observed for the glucose concentration, the initial fructose concentrations (Figure 3) in pasteurized juices were higher than in the thermosonicated juices. Fructose consumption was more pronounced in the first six hours in the fermentation of pasteurized juices.

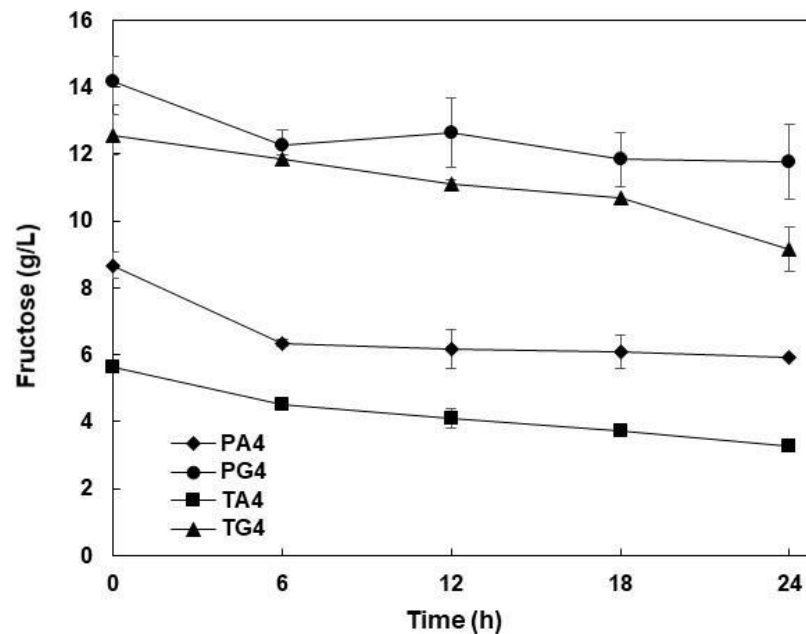


Figure 3 – Fructose concentration during fermentation of acerola and guava juices (initial pH adjusted to 4)

The highest consumption of glucose and fructose was found in the fermentation of the thermosonicated acerola juice. On the other hand, in the fermentation of guava juice, the highest consumption of glucose was obtained with pasteurized juice, and the highest consumption of fructose in the fermentation of thermosonicated juice.

The kinetic study of fermentations with the initial pH adjusted to 6 was performed only with guava juices; adjustment of pH to this value in the acerola juice would have changed the color of the juice to “greenish-brown”. This pH value was chosen based on studies with *L. rhamnosus* ATCC 7469, where the production of probiotic juices was carried out at pH adjusted to close to 6 (Chang and Liew, 2013, Farias et al. 2016, Santos et al. 2017, Andrade et al. 2019). Figure 4 shows the pH and viability during the fermentation of guava juices with the initial pH adjusted to 6.

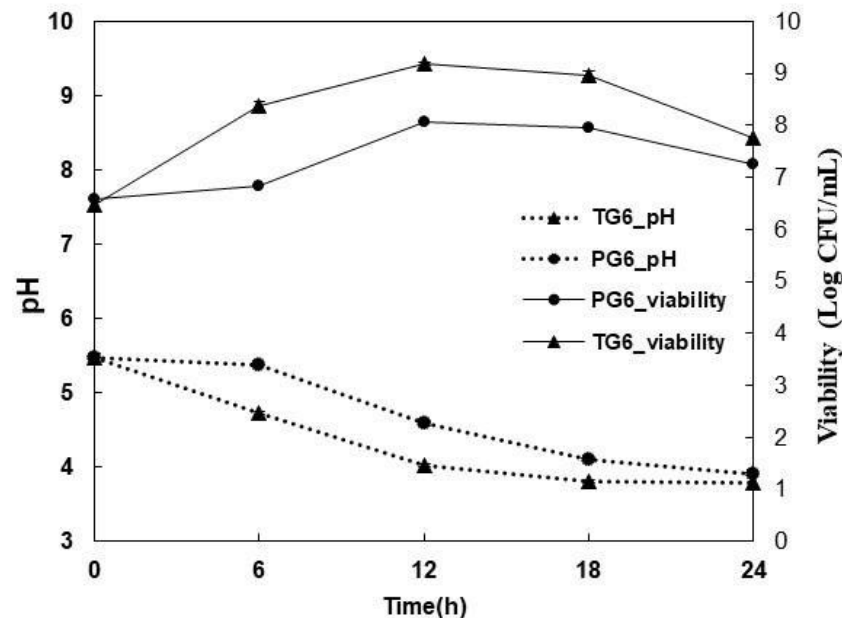


Figure 4 – Viability and pH during fermentation of guava juices (initial pH adjusted to 6).

The decrease in pH accompanied the increase in viability in both fermentation conditions (TG6 pH). This reduction, however, occurred only in the first 18 hours. On the other hand, in the fermentation of pasteurized guava juice (PG6 pH), the pH reduction occurred up to 24 hours. Between 18 and 24 hours, the stationary phase could be observed. The maximum volumetric productivity (Log CFU / mL.h) of the fermentation of thermosonicated juice was 45% higher than that of pasteurized juice.

Farias et al. (2016) observed the growth of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in fermented juice of passion fruit from Caatinga (*Passiflora cincinnata* Mast.). There was a reduction in pH from 6 to 4.5 and growth of 2 logs, reaching a maximum value of 10 Log CFU/mL. The production of lactic acid, in this case, was almost 6 g/L. Fonteles et al. (2013) found cell viability around 9 Log CFU/mL, final pH 3.9, and lactic acid concentration 1.23 g/L in the fermentation of sonicated melon juice using *Lactobacillus casei* NRRL B-442. According to Khorasani and Shojaosadati (2017), resistance to low pH values is one of the main parameters for the probiotic food industry. These results indicate that *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 adapts to an acidic medium.

The decrease in glucose concentration was similar in both fermentations of guava juices (Figure 5). Glucose consumption was 73% in the fermentation of the thermosonicated juice and 81% in the fermentation of pasteurized juice. Fructose consumption was observed after 12 hours, in both fermentations (19 %), with values lower than those obtained for glucose.

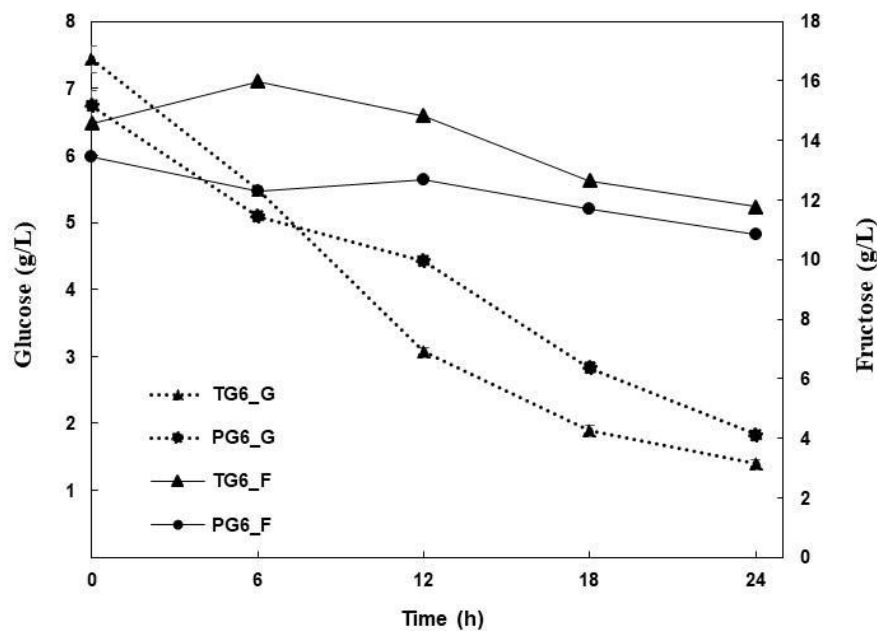


Figure 5 - Glucose and fructose concentrations during fermentation of guava juice (initial pH adjusted to 6).

3.2 Comparison of fermentations varying the initial pH of the medium of fruit juices

A higher decrease in pH was obtained in the fermentation of the samples at pH equal to 6 (Table 1). Although the pH reduction was 30% in the PG6 and TG6 fermentations, the production of lactic acid was different under these conditions. Therefore, the reduction in pH can be considered to be only an indication of acid production. Thus, it is essential to quantify lactic acid by high-performance liquid chromatography (HPLC), using a diode array detector, as was done in this work and not just by titratable acidity. When the pH reduction was equal to or less than 5%, there was no detectable lactic acid production.

Table 1 – Comparison of kinetic parameters of fermentations varying the fruit, the initial pH, and the type of treatment of the pulp.

Fermentation	pH decrease (%)	P _x (Log CFU/mL.h)	P _p (g/L.h)	Glucose (Consumption in %)	Fructose (Consumption in %)
PA4	4 ± 0.02	0.014 ± 0.000	Nd	40 ± 0.11	33 ± 0.31
TA4	5 ± 0.01	0.040 ± 0.012	Nd	50 ± 0.06	50 ± 0.13
PG4	5 ± 0.02	0.007 ± 0.001	Nd	50 ± 0.20	14 ± 0.83
TG4	2.6 ± 0.02	0.037 ± 0.003	Nd	25 ± 0.15	31 ± 0.30
PG6	30 ± 0.01	0.124 ± 0.010	0.1125 ± 0.0029	73 ± 0.08	19 ± 0.18
TG6	30 ± 0.02	0.227 ± 0.000	0.1792 ± 0.0054	81 ± 0.09	19 ± 0.23

PA4: Pasteurized Acerola in pH4; TA4: Thermosonicated Acerola in pH4; PG4: Pasteurized Guava in pH4; TG4: Thermosonicated Guava in pH4; PG6: Pasteurized Guava in pH6; TG6: Thermosonicated Guava in pH6; Nd: Not detected. P_x: maximum volumetric productivity of cells; P_p: maximum volumetric productivity of the product.

The maximum volumetric productivities in cells (P_x) were higher in fermentations with the initial pH adjusted to 6 and almost double when the juice was thermosonicated (TG6 with PG6). Similar behavior was observed for maximum volumetric productivity in the product (P_p). There was no production of lactic acid in fermentations with the pH adjusted to

4. The highest consumption of glucose also occurred in juice fermentation with the initial pH adjusted to 6. Fructose consumption did not follow this behavior.

According to the results of P_X and P_P , there is evidence that thermosonication treatment is associated with a higher bioavailability of bioactive compounds (Saeeduddin et al. 2015) and probably favoring the growth of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 and the production of lactic acid.

Farias et al. (2016) obtained a 25% decrease in pH during the fermentation of passion fruit from Caatinga juice by *L. rhamnosus* ATCC 7469. The juice was pasteurized and the initial pH was adjusted to 6. The maximum volumetric productivity in cells (P_X) and in the product (P_P) was 0.08 g/L.h and 0.22 g/L.h, respectively. The consumption of total reducing sugars was almost 100% in 24 hours.

3.3 Survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in the fermented probiotic guava juices with initial pH adjusted to 6 during refrigerated storage and simulated gastrointestinal conditions

Survival was higher than 80% for both treatments, during the 28 days of refrigerated storage. Concerning thermosonicated juices, the survival was 7.5% higher than that obtained for pasteurized juices. Viability was higher or equal to 8 Log CFU/mL in both juices. Similar survival was reported by Farias et al. (2016) for the same strain and different pulp. These authors added sucrose before the refrigerated storage. However, the presence of sucrose did not influence survival. Andrade et al. (2019) observed survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469 at around 100% with 28 days of refrigerated storage using pasteurized and fermented guava juice, with the addition of inulin and stevia.

The survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469 in unfermented cherry juice was zero in less than 2 days when the pH was not adjusted (Nematollahi et al. 2016). On the other hand, when the pH was adjusted to 3.5, survival only reached zero between 20 and 30 days of refrigerated storage. These authors attribute this reduction to the presence of phenolic compounds when the pH was adjusted to 3.5. In the present study, despite the pH of fermented guava juice being close to 4, there was almost 80% survival with 28 days. The vegetable matrix was different, however, and the content of phenolic compounds in guava juice is low, favoring greater survival, as was also observed in the study by Andrade et al. (2019).

Probiotic survival in the simulation of gastrointestinal conditions during the refrigerated storage of 28 days was around 46% for pasteurized guava juice at zero time; and it was zero at 28 days. For thermosonicated juice, the survival was zero regardless of the time. Farias et al (2016) found survival of *L. rhamnosus* ATCC 7469 only when using pH 2.7, using passion fruit from Caatinga juice with the addition of sucrose. On the other hand, Andrade et al. (2019) found gastrointestinal survival of 40 and 30%, at the beginning and at 28 days of storage, respectively, using pasteurized and fermented guava juice, with the addition of inulin and stevia. It is worth mentioning that in the present work, the juices used did not contain additives.

Conclusions

We can conclude that thermosonication is an alternative to pasteurization: when the initial pH was 4 there was a higher increase in viability than that observed for pasteurized juices. The production of fermented probiotic acerola juices was not possible with the initial pH adjusted to 6. This indicates that there is a limit to pH adjustment for fermentation of acidic fruit juices, such as acerola. The refrigerated storage of probiotic fermented guava

juices showed stability regardless of the treatment used. The simulation of gastrointestinal conditions suggests that the thermosonication process requires additional protection, such as microencapsulation. Thermosonication was as effective as pasteurization, with the advantage of keeping bioactive compounds more stable and preserved, in addition to causing microbial inactivation.

Acknowledgments

The authors gratefully acknowledge UFPE (Federal University of Pernambuco); this study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES), for the financial support that made this research possible and CNPq (Scientific and Technological Development) for the fellowships. The English text of this paper has been revised by Sidney Pratt, Canadian, MAT (The Johns Hopkins University), RSAdip - TESL (Cambridge University).

References

- Abid, M., Jabbar, S., Wu, T., Hashim, M.M., Hu, B., Lei, S., Zhang, X., Zeng, X. (2013). Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. *Ultrasonics Sonochemistry*, 20, 1182-1187,
- Aguilar, K., Garvín, A., Ibarz, A., Augusto, P.E.D. (2017). Ascorbic acid stability in fruit juices during thermosonication. *Ultrasonics Sonochemistry*, 37, 375–381.
- Andrade, R., Santos, E., Azoubel, P., Ribeiro, E. (2019). Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. *Food Bioscience*, 32, 1-8,
- Campoli, S.S.; Rojas, M.L., Amaral, J.E.P.G., Canniatti-Brazaca, S., Augusto, P.E.D. (2018). Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene in vitro accessibility. *Food Chemistry*, 268, 594-601.
- Chang, C.P., & Liew, S.L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. (2013). *Journal of Food Biochemistry*, 37, 536-543, 2013.
- Dias, D.R.C., Barros, Z.M.P., Carvalho, C.B.O., Honorato, F.A., Guerra, N.B., Azoubel, P.M. (2015). Effect of sonication on soursop juice quality. *LWT - Food Science and Technology*, 62(1), 883-889.

Embrapa – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. (2020). *Science to transform life Agricultural research results and positive impacts on the economy, the environment and on consumers' tables*. Available in: <https://www.embrapa.br/en/grandes-contribuicoes-para-a-agricultura-brasileira/frutas-e-hortalicas>. Access in 09 June 2020.

Evelyn, E., Kim, H.J., Silva, F.V.M. (2016). Modeling the inactivation of *Neosartorya fischeri* ascospores in apple juice by high pressure, power ultrasound and thermal processing. *Food Control*, 59, 530 – 537.

Evelyn, E., & Silva, F.V. (2016). High pressure processing pretreatment enhanced the thermosonication inactivation of *Alicyclobacillus acidoterrestris* spores in orange juice. *Food Control*, 62, 365 – 372.

Farias, N., Soares, M., Gouveia, E. (2016). Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 149-154.

FELLOWS, P.J. (2009). *Food processing technology: principles and practice*, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2009, 895p.

Fonteles, T.V., Costa, M.G.M., Jesus, A.L.T., Fontes, C.P.M.L., Fernandes, F.A.N., Rodrigues, S. (2013). Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. *Food and Bioprocess Technology*, 6, 2860–2869.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. (2019). *Tabela 1613 - Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes (goiaba)*. Available in: PAM – SIDRA: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Access in 18 March 2019.

Jabbar, S., Abid, M., Hu, B., Hashim, M.M., Lei, S., Wu, T. (2015). Exploring the potential of thermosonication in carrot juice processing. *Journal of Food Science and Technology*, 52, 7002–7013.

Jambrak, A.R., Vukusic, T., Donsi, F., Paniwnyk, L., Djekic, I. (2018). ReviewArticle - Three Pillars of Novel Nonthermal Food Technologies: Food Safety, Quality, and Environment. *Hindawi Journal of Food Quality*, 1-18, <https://doi.org/10.1155/2018/8619707>, 2018.

Khandpur, P., & Gogate, P.R. (2016). Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. *Ultrasonics Sonochemistry*, 29, 337–353.

Khandpur, P., & Gogate, P.R. (2015). Effect of novel ultrasound based processing on the nutrition quality of different fruit and vegetables juices. *Ultrasonic Sonochemistry*, 27, 125–136.

Khorasani, A.C., & Shojaosadati, S.A. (2017). Improvement of Probiotic Survival in Fruit juice and under gastrointestinal conditions using Pectin-Nanochitin-Nanolignocellulose as a

Novel Prebiotic Gastrointestinal-Resistant Matrix. *Applied food biotechnology*, 4(3), 179-191.

Madigan, M.T., Martinko, J.M., Dunlap, P.V., Clark, D.P. (2010). *Microbiologia de Brock*. 12ª. Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160p.

Nematollahi, A., Sohrabvandi, S., Mortazavian, A.M., Jazaeri, S. (2016). Viability of probiotic bacteria and some chemical sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. *Electronic Journal of Biotechnology*, 21, 49-53.

Rawson, A., Patras, A., Tiwari, B. K., Noci, F., Koutchma, T., Brunton, N. B. K. (2011). 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, 1875–1887.

Saeeduddin, M., Abid, M., Jabbar, A., Wu, T., Hashim, M.M., Awad, F.N., Hu, B., Lei, S., Zeng, X. (2015). Quality assessment of pear juice under ultrasound and commercial pasteurization processing conditions. *LWT Food Science and Technology*, 64, 452-458.

Sanchez-Rubio, M., Taboada-Rodríguez, A., Cava-Roda, R., López-Gómez, A., Marín-Iniesta, F. (2016). Combined use of thermo-ultrasound and cinnamon leaf essential oil to inactivate *Saccharomyces cerevisiae* in natural orange and pomegranate juices. *LWT - Food Science and Technology*, 73, 140–146.

Santos, E., Andrade, R., Gouveia, E. (2017). Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. *Food Bioscience*, 20, 56-61.

White, J., & Hekmat, S. (2018). Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. *Fermentation*, 4(27), 1-12.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A termossonicação foi tão eficaz quanto a pasteurização, garantindo a inativação microbiana exigida para consumo de um alimento seguro, com a vantagem de manter os compostos bioativos mais estáveis e preservados, como observado, os teores de: compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e ácido ascórbico que apresentaram valores superiores ao tratamento pasteurizado. O teor de carotenoides apresentou comportamento oposto, apresentando teor superior para o suco probiótico fermentado pasteurizado quando comparado ao termossonicado. Observa-se que esses pigmentos são lipossolúveis e essa característica pode ter influenciado o resultado observado entre os tratamentos, sugerindo mecanismo de reação inerente e consonante com a composição química do mesmo.

A produção de suco probiótico fermentado de acerola não foi possível com o pH inicial ajustado para 6. Isso indica que há um limite para o ajuste do pH para a produção de suco probiótico fermentado de acerola. Essa fruta apresenta alto teor de antocianinas e a alteração do seu pH natural implica em mudança sensorial indesejada. Assim, fica evidenciado que o estudo sobre essa questão se mostra um desafio e uma oportunidade de viabilizar esse produto. O armazenamento refrigerado dos sucos de goiaba apresentou estabilidade, independentemente do tratamento utilizado. A simulação das condições gastrointestinais sugere que o processo de termossonicação requer proteção adicional, como a microencapsulação.

REFERÊNCIAS

- AAMIR, M.; OVISSIPOUR, M.; SABLANI, S.S.; RASCO, B. Predicting the Quality of Pasteurized Vegetables Using Kinetic Models: A Review. **International Journal of Food Science**, v. 2013, Article ID271271, p. 1-29, 2013.
- ABID, M.; JABBAR, S.; HUA, B.; HASHIM, M.M.; WUA, T.; LEI, S.; KHAN, M.A.; ZENG, X. Thermosonication as a potential quality enhancement technique of apple juice. **Ultrasonic Sonochemistry**, v.21, p. 984–990, 2014.
- ABID, M.; JABBAR, S.; WU, T.; HASHIM, M. M.; HU, B.; LEI, S.; ZHANG, X.; ZENG, X. Effect of ultrasound on different quality parameters of apple juice. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 20, p. 1182-1187, 2013.
- AGCAM, E.; AKYILDIZ, A.; BALASUBRAMANIAM, V.M. Optimization of anthocyanins extraction from black carrot pomace with thermosonication. **Food Chemistry**, v.237, n.15, p.461-470, 2017.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. **IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 28 março de 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). **Resolução de Diretoria Colegiada - RDC nº 02, de 07 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e/ou de Saúde. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 09 jan. 2002.
- AHMED, J.; REDDY, B.S.; MOLBAK, L. et al. Impact of probiotics on colonic microflora in patients with colitis: a prospective double blind randomised crossover study. **Int J Surg**, v.11, p.1131–6, 2013.
- ALAMAR, P.D.; CARAMÊS, E.T.S.; POPPI, R.J.; PALLONE, J.A.L. Quality evaluation of frozen guava and yellow passion fruit pulps by NIR spectroscopy and chemometrics. **Food Research International**, v.85, p.209–214, 2016.
- ALVES, L. L.; CICHOSKI, A. J.; BARIN, J. S.; RAMPELOTTO, C.; DURANTE, E. C. O ultrassom no amaciamento de carnes. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.43, n.8, p.1522-1528, ago, 2013.
- ANDRADE, R.; SANTOS, E.; AZOUBEL, P.; RIBEIRO, E. Increased survival of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in guava juices with simulated gastrointestinal conditions during refrigerated storage. **Food Bioscience**, v.32, p.1-8, 2019.

ANANDHARAJ, M.; SIVASANKARI, B.; RANI, R.P. Effects of probiotics, prebiotics, and synbiotics on hypercholesterolemia: a review. **Chinese Journal of Biology**, Article ID 5727542014, 2014.

ANAYA-ESPARZA, L.M.; VELÁZQUEZ-ESTRADA, R.M.; ROIG, A.X.; GARCÍA-GALINDO, H.S.; SAYAGO-AYERDI, S.G.; MONTALVO-GONZÁLEZ, E. Thermosonication: An alternative processing for fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v.61, p.592-600, 2017.

ANTUNES, A.E.C.; LISERRE, A.M.; COELHO, A.L.A.; MENEZES, C.R.; MORENO, I.; YOTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N.C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, p. 125-131, 2013.

ARVANITOYANNIS, I. S.; KOTSANOPOULOS, K. V; SAVVA, A. G. Use of Ultrasounds in the Food Industry Methods and Effects on Quality, Safety and Organoleptic Characteristics of Foods: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 2, n. 57, p.109-128, 2015.

AWAD, T. S.; MOHARRAM, H. A.; SHALTOUT, O. E.; ASKER, D.; YOUSSEF, M.M. Applications of ultrasound in analysis, processing and quality control of food: A review. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 410-427, 2012.

BALDISSERA, A. C.; BETTA, F. D.; PENNA, A. L. B.; LINDNER, J. D. D. Alimentos funcionais: uma nova fronteira para o desenvolvimento de bebidas proteicas a base de soro de leite. **Semina: Ciências Agrárias**, Londrina, v. 32, n. 4, p. 1497-1512, 2011.

BALLUS, C.A.; KLAJN, V.M.; CUNHA, M.F.; OLIVEIRA, M.L.; FIORENTINI, A.M. Aspectos científicos e tecnológicos do emprego de culturas probióticas na elaboração de produtos lácteos fermentados: revisão. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 28, n. 1, p. 85-96, 2010.

BALTACIOGLU, H.; BAYINDIRLI, A.; SEVERCAN, F. Secondary structure and conformational change of mushroom polyphenol oxidase during thermosonication treatment by using FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 214, p.507–514, 2017.

BARROS-NETO, B.; SCARMÍNIO, I.S.; BRUNS, R.E. **Planejamento e otimização de experimentos**. Campinas, Editora da UNICAMP, 2001, 299p.

BESSON, L. **LUCY** (89 minutos). Direção de Luc Besson. EuropaCorp. Estados Unidos da América, 25 de julho de 2014.

BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments. **Journal of Food Engineering**, v. 108, p. 383-392, 2012.

BERMUDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments **Journal of Food Engineering**, v.108, p.383–392, 2012.

BERMUDEZ-AGUIRRE, D.; BARBOSA-CANOVAS, G.V. Inactivation of *Saccharomyces cerevisiae* in pineapple, grape and cranberry juices under pulsed and continuous thermo-sonication treatments **Journal of Food Engineering**, v.108, p.383–392, 2012.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria as starter cultures: An update in their metabolism and genetics. **AIMS Microbiology**, v.4, n.4, p.665–684, 2018.

BORCHERS, A.T.; SELMI, C.; MEYERS, F.J.; KEEN, C.L.; GERSHWIN, M.E. Probiotics and immunity. **Journal of Gastroenterology**, v.44, p.26–46, 2009.

BOUSVAROS, A.; GUANDALINI, S.; BALDASSANO, R.N. et al. A randomized, double-blind trial of *Lactobacillus* GG versus placebo in addition to standard maintenance therapy for children with Crohn's disease. **Inflamm Bowel Dis.**, v.1, p.833–9, 2005.

BOYLE, R.J.; MAH, L.J.; CHEN, A.; KIVIVUORI, S.; ROBINS-BROWNE, R.M.; TANG, M.L. Effects of *Lactobacillus* GG treatment during pregnancy on the development of fetal antigen-specific immune responses. **Clin Exp Allergy**, v.38, p.1882–90, 2008.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M.E.; BERSET, C. Use of free radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology**, v.28, p.25–30, 1995.

BRASIL, 1999a. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999**. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br)

BRASIL, 1999b. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução nº 19, de 30 de abril de 1999**. Diretrizes básicas para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. Brasília: Diário Oficial da União (Disponível em: www.anvisa.gov.br).

BRASIL, 2008. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

BRASIL, 2008. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 20 de dezembro de 2016.

BRASIL, 2010. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A cultura da goiaba – 2ª edição**.

BRASIL, 2012. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA). **A cultura da acerola – 3ª edição**.

BRASIL, 2016. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

BRASIL, 2016. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e/ou de saúde**. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/alegacoes>. Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

BRASIL, 2018. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA **RDC Nº 241, DE 26 DE JULHO DE 2018** - requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/resolucoes>. Acesso em: 20 de dezembro de 2018.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. **Resolução RDC N.º 2, de 7 de janeiro de 2002**. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Brasília: Diário Oficial da União - Disponível em: www.anvisa.gov.br

BRON; P.A.; KLEEREBEZEM, M. Engineering lactic acid bacteria for increased industrial functionality. **Bioengineered Bugs**, v. 2, n. 2, p. 80-87, 2011.

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

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.137, n.2-3, p.121-129, 2010.

CAMPOLI, S.S.; ROJAS, M.L.; AMARAL, J.E.P.G.; CANNIATTI-BRAZACA, S.; AUGUSTO, P.E.D. Ultrasound processing of guava juice: Effect on structure, physical properties and lycopene in vitro accessibility. **Food Chemistry**, v.268, p.594-601, 2018.

CAO, X.; CAI, C.; WANG, Y.; ZHENG, X. The inactivation kinetics of polyphenol oxidase and peroxidase in bayberry juice during thermal and ultrasound treatments. **Innovative Food Science and Emerging Technologies** 45, p.169–178, 2018.

CEAPA, C.; LAMBERT, J.; LIMPT, K.V.; WELS, M.; SMOKVINA, T.; KNOL, J.; KLEEREBEZEM, M. Correlation of *Lactobacillus rhamnosus* Genotypes and Carbohydrate Utilization Signatures Determined by Phenotype Profiling. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 81, n. 16, p. 5458 – 5470, 2015.

CEAPA, C.; WOPEREIS, H.; REZAÏKI, L.; KLEEREBEZEM, M.; KNOL, J. Influence of fermented milk products, prebiotics and probiotics on microbiota composition and health. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 27, p.139 – 155, 2013.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION NATIONAL INSTITUTES OF HEALTH – CDC. **Presunção Qualificada de Segurança, certificada como GRAS (Generally Regarded as Safe)**. Disponível em:

<https://search.cdc.gov/search/index.html?query=+GRAS&sitelimit=&utf8=%E2%9C%93&affiliate=cdc-main#content>. Acesso: 20 de dezembro de 2018.

CHANDRAPALA, J.; OLIVER, C.; KENTISH, S.; ASHOKKUMAR, M. Ultrasonics in food processing – Food quality assurance and safety. **Trends in Food Science & Technology**, v.26, p.88-98, 2012.

CHANG, C.P.; LIEW, S.L. Growth medium optimization for biomass production of a probiotic bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. **Journal of Food Biochemistry**, v.37, n.5, p.536-543, 2012.

CHAUDHARY. P.R.; JAYAPRAKASHA. G.K.; PATIL. B.S. Ethylene degreening modulates health promoting phytochemicals in Rio Red grapefruit. **Food Chemistry**, v.188, p.77-83, 2015.

CHEMAT, F.; ROMBAUT, N.; SICAIRE, A.; MEULLEMIESTRE, A.; FABIANO-TIXIER, A.; ABERT-VIAN, M. Ultrasound assisted extracion of food and natural products. Mechanisms, techniques, combinations, protocols and applications. A review. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 34, p.540-560, 2017.

CHEMAT, F.; ZILL-E-HUMA; KHAN, M.K. Applications of ultrasound in food technology: Processing, preservation and extraction. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 18, p.813-835, 2011.

CHENG, X.; XU, F.; QIN, W. MA, L.; ZHENG, Y. Optimization of Enzymatic Clarification of Green Asparagus Juice Using Response Surface Methodology. **Journal of Food Science**, v. 77, n. 6, 2012.

CHOWN, J. Probiotics and Prebiotics: A Brief Overview. **Journal of Renal Nutrition**, v.2, n.2, p. 76-86, 2002.

CICHOSKI, A.J.; CUNICO, C.; DI LUCCIO, M.; ZITKOSKI, J.; CARVALHO, R.T. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.1, p. 214-219, 2008.

CONDÓN, S.; RASO, J.; PAGÁN, R. Microbial inactivation by ultrasound. In: BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; TAPIA, M. S.; CANO, M. P. **Novel food processing technologies**. 2ª ed. Boca Raton: Editora CRC Press, cap. 19, p. 423-442, 2005.

CORONA, O.; RANDAZZO, W.; MICELI, A.; GUARCELLO, R.; FRANCESCA, N.; ERTEN, H.; MOSCHETTI, G.; SETTANNI, L. Characterization of kefir-like beverages produced from vegetable juices. **LWT - Food Science and Technology**, 66, 572 – 581, 2016.

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**, vol. 139, p. 261–266, 2013.

COSTA, M.M. **Sucos funcionais: percepções, compreensão e comportamento do consumidor**. Dissertação. Escola Superior de Propaganda e Marketing. São Paulo, 2019.

COSTA, N.M.B.; ROSA, C.O.B. **Alimentos Funcionais – Compostos Bioativos e Efeitos Fisiológicos**. Editora Rubio Ltda, Rio de Janeiro, 2016, 560p.

COSTA, V.M. **Perfil de metabólitos excretados por *Lactobacillus* isolados de processos industriais de produção de etanol, com ênfase nos isômeros óticos D (-) e L (+) do ácido láctico**. Dissertação de Mestrado apresentada na Escola Superior de Agricultura Luiz de Queiroz, São Paulo, Piracicaba, 2006, 65p.

CRUZ-CANSINO, N.S.; RAMIREZ-MORENO, E.; LEON-RIVERA, J.E.; DELGADO-OLIVARES, L.; ALANIS-GARCIA, E.; ARIZA-ORTEGA, J.A.; MANRIQUEZ-TORRES, J.J.; JARAMILLO-BUSTOS, D.P. Shelf life, physicochemical, microbiological and antioxidant properties of purple cactus pear (*Opuntia ficus indica*) juice after thermoultrasound treatment. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 27, p. 277–286, 2015.

DEMIRDÖVEN, A.; BAYSAL, T. “Optimization of Ohmic Heating Applications for Pectin Methylesterase Inactivation in Orange Juice.” **Journal of food science and technology**, v.51, n.9, p.1817–26, 2014.

DIAS, D.R.C. **Efeito da termossonicação em parâmetros de qualidade de blends de frutas e água de coco**. Tese. Universidade Federal de Pernambuco, Departamento de Nutrição, Recife, PE, Brasil, 2019.

DIAS, D.R.C.; BARROS, Z.M.P.; CARVALHO, C.B.O.; HONORATO, F.A.; GUERRA, N.B.; AZOUBEL, P.M. Effect of sonication on soursop juice quality. **LWT - Food Science and Technology**, v.62, n.1, p. 883889, 2015.

DINÇER, C.; TOPUZ, A. Inactivation of *escherichia coli* and quality changes in black mulberry juice under pulsed sonication and continuous thermosonication treatments. **Journal of food processing and preservation**, p.1-10, 2014.

DINÇER, C.; TOPUZ, A. Inactivation of *Escherichia coli* and quality changes in blackmulberry juice under pulsed sonication and continuous thermo sonication treatments. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.39, p.1744–1753, 2015.

DINLEYICI, E.C.; DALGIC, N.; GUVENC, S.; METIND, O.; YASA, O.; KURUGOLF, Z.; TUREL, O.; TANIR, G.; YAZAR, A.S.; ARICA, V.; SANCAR, M.; KARBUZ, A.; ERENJ, M.; OZEN, M.; KARAI, A.; VANDENPLAS, Y. *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 shortens acute infectious diarrhea in a pediatric outpatient setting. **Jornal de Pediatria**, 91, 392-396, 2015.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. **Gastroenterology Clinics of North America**, Maryland Heights, v. 34 p. 483– 498, 2005.

DOUILLARD, P.F.; RIBBERA, A.; KANT, R.; PIETILÄ, E.; J’ARVINEN, M.M.; RANDAZZO, L.C.; PAULIN, L.; LAINE, P.; CAGGIA, C.; LÄHTEINEN, T.; BROUNS, J.J.; SATOKARI, R.; OSSOWSKI, I.V.; REUNANEN, A.P.; VOS, W.M. Comparative

Genomic and Functional Analysis of 100 *Lactobacillus rhamnosus* Strains and Their Comparison with Ttrain GG. **PLOS Genetic** – www.plosgenetics.org, v.9, n.8, p.1-15, 2013.

DUTRA, A.S.; FURTADO, A.A.L.; PACHECO, S.; OIANO NETO, J. Efeito do tratamento térmico na concentração de carotenoides, compostos fenólicos, ácido ascórbico e capacidade antioxidante do suco de tangerina murcote. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.15, p.198–207, 2012.

EMBRAPA – Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária: **A cultura da acerola** - Coleção Plantar, 3ª. Edição, 2012, 150p.

EMBRAPA (2019). Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Fruticultura Tropical: potenciais riscos e seus impactos**. Cruz das Almas, BA, Embrapa Mandioca e Fruticultura, 232, 28p. ISSN 1809-4996, 38.

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.

FAO/WHO. (2002). Guidelines for the evaluation of probiotics food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report**.

FARIAS, N., SOARES, M., GOUVEIA, E., Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, v.71, p.149-154, 2016.

FDA (2020) - **Generally Recognized as Safe (GRAS)**. <https://www.fda.gov/food/food-ingredients-packaging/generally-recognized-safe-gras>. Acess in 05 de abril de 2020.

FELLOWS, P.J. **Food processing technology: principles and practice**, Third Edition. Boca Raton: CRC Press, 2009, 895p.

FERNANDES, A.G.; MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.; COSTA, J.M.; FIGUEIREDO, R.W.; PRADO, G. M. Comparação dos teores em vitamina C, carotenoides totais, antocianinas totais e fenólicos totais do suco tropical de goiaba nas diferentes etapas de produção e influência da armazenagem. **Alimento e Nutrição**, v.18, n.4, p.431-438, 2007.

FERREIRA, C.L.L. **PREBIÓTICOS e PROBIÓTICOS – Atualização e Prospecção**. Editora Rubio Ltda, Rio de Janeiro, 2012, 248p.

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.

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

FOOD and AGRICULTURE ORGANIZATION (FAO). WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Report of a joint FAO/WHO expert consultation on evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** 1-4 October 2001, Córdoba, Argentina. Acesso: 18 agosto 2018. Disponível: [from:http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf).

FUNCTIONAL FOOD CENTER (FFC), 2014. **Definition for functional foods.** 17th International Conference, San Diego, Califórnia, USA. Disponível em: <http://functionalfoodcenter.net/>. Acesso em: 18 de janeiro de 2019.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOON, 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**, vol. 69, p. 365–371, 2016.

GAO, H.W.; MUBASHER, M.; FANG, C.Y. et al. Dose-response efficacy of a proprietary probiotic formula or *Lactobacillus acidophilus* CL1285 and *Lactobacillus casei* LBC80R for antibiotic-associated diarrhea and *Clostridium difficile*-associated diarrhea prophylaxis in adult patients. **Am J Gastroenterol**, v.105, p.1636–41, 2010.

GAVA, A.J.; DA SILVA, C.A.; FRIAS, J.R. **Tecnologia de Alimentos: Princípios e Aplicações**, Editora Nobel, São Paulo, 2008, 512p.

GONÇALVES, A.B.S.; AZEVEDO, C.D.V.; OLIVEIRA, M.T.; ROMUALDO, M.A.F.; FERNANDES, M.R.R. **Perfil da Fruticultura 2020 – Base de dados 2018 e 2019.** Disponível em: [http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/Perfil_Fruticultura_2020\[1\].pdf](http://www.reformaagraria.mg.gov.br/images/documentos/Perfil_Fruticultura_2020[1].pdf); Acesso em: 26 de setembro de 2020.

HUANG, Y.F.; LIU, P.Y.; CHEN, Y.Y. et al. Three-combination probiotics therapy in children with salmonella and rotavirus gastroenteritis. **Journal of the Clinical Gastroenterology**, v.48, p.37–42, 2014.

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Tabela 1613 - Área destinada à colheita, área colhida, quantidade produzida, rendimento médio e valor da produção das lavouras permanentes (goiaba).** Disponível em: PAM – SIDRA: <https://sidra.ibge.gov.br/tabela/1613#resultado>. Acesso em 18 de março de 2019.

ISOLAURI E.; ARVOLA T.; SÜTAS, Y. et al. Probiotics in the management of atopic eczema. **Clin Exp Allergy**; v.30, p.1604–10, 2000.

IWATANI, S.; YAMAMOTO, N. Food Functional food products in Japan: A review. **Science and Human Wellness**, v.8, 96–101, 2019.

JABBAR, S.; ABID, M.; HU, B.; HASHIM, M. M.; LEI, S.; WU, T.; ZENG, X. Exploring the potential of thermo sonication in carrot juice processing. **Journal of Food Science and Technology**, v.52, p.7002–7013, 2015.

JAMBRAK, A.R.; VUKUSIC, T.; DONSI, F.; PANIWNKY, L.; DJEKIC, I. ReviewArticle - Three Pillars of Novel Nonthermal Food Technologies: Food Safety, Quality, and Environment. **Hindawi Journal of Food Quality**, p.1-18, <https://doi.org/10.1155/2018/8619707>, 2018.

JONES, P.J.; VARADY, K.A. Are functional foods redefining nutritional requirements? **Appl. Physiol. Nutr. Metab.**, v.33, p.118-123, 2008.

KALLIOMÄKI, M.; SALMINEN, S.; ARVILOMMI, H. et al. Probiotics in primary prevention of atopic disease: a randomised placebo-controlled trial. **Lancet**, v.357, p.1076–9, 2001.

KANDLER, O. Acid Carbohydrate metabolism in lactic bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, Amsterdam, v.49, p.209-224, 1983.

KAUR, N.; SINGH, D.P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v.112, p.167-187, 2017.

KENTISH, S.; FENG, H. Applications of power ultrasound in food processing. **Annual Reviews Food Science Technology**, v.5, p.263-284, 2014.

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

KHANDELWAL, P., GASPAR, F. B., CRESPO, M. T. B., & UPENDRA, R. S. Lactic Acid Bacteria: General Characteristics, Food preservation and health benefits. In: Montet, d. and Ray, r. c. **Fermented Foods. Part I: Biochemistry and Biotechnology**. Londres, Editora: crc press, 2016, cap. 8.

KHANDPUR, P.; GOGATE, P.R. Evaluation of ultrasound based sterilization approaches in terms of shelf life and quality parameters of fruit and vegetable juices. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 29, p. 337–353, 2016.

KHOO, H.; PRASAD, K.N.; KONG, K.; JIANG, Y.; ISMAIL, A. Carotenoids and Their Isomers: Color Pigments in Fruits and Vegetables. **Molecules**, v.16, p.1710-1738, doi: 10.3390/molecules16021710, 2011.

KHURI, A. J.; CORNELL, F. A. **Response surfaces: Design and analyses**. New York: Mercel Dekker, 1996, 510p.

KIANG, W.S.; BHAT, R.; ROSMA, A.; CHENG, L.H. Effects of thermosonication on the fate of *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Enteritidis in mango juice. **Letters in Applied Microbiology**, v.56, p.251-257, 2012.

KNORR, D.; ZENKER, M.; HEINZ, V.; LEE, D. Applications and potential of ultrasonics in food processing. **Trends in Food Science and Technology**, v.15, n.5, p.261–266, 2004.

KUKKONEN, K.; SAVILAHTI, E.; HAAHTELA T. et al. Long-term safety and impact on infection rates of postnatal probiotic and prebiotic (synbiotic) treatment: randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Pediatrics**, v.122, p.8–12, 2008.

KUMAR, S.; SINGHI, S.; CHAKRABARTI A. et al. Probiotic use and prevalence of candidemia and candiduria in a PICU. **Pediatric Critical Care Medicine**, v.14, p.409–415, 2013.

LEE, H.B.; LIONG, M.; CHOI, S. Probiotics in health and diseases - In: **Beneficial Microbes in Fermented and Functional Foods** - Ravishankar Rai V, Jamuna A. Bai, CRC Press, 2014, 600p.

LESPINARD, A. R.; BAMBICHA, R. R.; MASCHERONI, R. H. Quality parameters assessment in kiwi jam during pasteurization. Modelling and optimization of the thermal process. **Food and Bioproducts Processing**. v.90, p. 799-808, 2012.

LIMA, V.L.A.G.; ENAYDE, A.M.; MACIEL, M.I.; PRAZERES, F.G.; MUSSER, R.S.; LIMA, D.E.S. Total phenolic and carotenoid contents in acerola genotypes harvested at three ripening stages. **Food Chemistry**, v.90, p.565–568, 2005.

LING, B.; TANG, J.; KONG, F.; MITCHAM, E.J.; WANG, S. Kinetics of Food Quality Changes During Thermal Processing: a Review. **Food Bioprocess Technology**, v.8, p.343–358, 2015.

MADIGAN, M.T.; MARTINKO, J.M.; DUNLAP, P.V.; CLARK, D.P. **Microbiologia de Brock**. 12ª Edição. Porto Alegre: Artmed, 2010, 1160 p.

MAIA, G.A.; SOUSA, P.H.M.; SANTOS, G.M.; SILVA, D.S.; FERNANDES, A.G.; PRADO, G.M. Efeito do processamento sobre componentes do suco de acerola. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.27, n.1, p.130-134, 2007.

MAJAMAA, H.; ISOLAURI E. Probiotics: a novel approach in the management of food allergy. **J Allergy Clin Immunol.**, v.99, p.179–85, 1997.

MANLEY, K.J.; FRAENKEL, M.B.; MAYALL, B.C.; POWER, D.A. Probiotic treatment of vancomycin-resistant enterococci: a randomised controlled trial. **Medicinal Journal Australia**, v.186, p.454–7. 2007.

MANZONI, P.; MOSTERT, M.; LEONESSA, M.L. et al. Oral supplementation with *Lactobacillus casei* subspecies *rhamnosus* prevents enteric colonization by *Candida* species in preterm neonates: a randomized study. **Clin Infect Dis.**, v.42, p.1735–42, 2006.

MARAGKOUDAKIS P.A.; ZOUMPOPOULOU, G.; MIARIS C.; KALANTZOPOULOS, G.; POT, B. TSAKALIDOU, E. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v.16, p189-199, 2006.

MARHAMATIZADEH, M.H.; REZAZADEH, S.; KAZEMEINI, F.; KAZEMI, M.R. The Study of Probiotic Juice Product Conditions Supplemented by Culture of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum*. **Middle-East Journal of Scientific Research**, vol. 11, n. 3, p. 287-295, 2012.

MARTÍNEZ-FLORES, H.E.; GARNICA-ROMO, M.G.; BERMÚDEZ-AGUIRRE, D.; POKHREL, P.R.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Physico-chemical parameters, bioactive compounds and microbial quality of thermo-sonicated carrot juice during storage. **Food Chemistry**, v.172, p.650–656, 2015.

MASON, T.J. Ultrasound in environmental protection – an overview. In: Technical University of Hamburg-Harburg Reports on Sanitary Engineering. **Ultrasound in Environmental Engineering**. Tiehl A.; NEIS, U. Hanburg, v.25, p.1-1-, 1999.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173–182, 2002.

MAZIADE, P.J.; ANDRIESSEN, J.A.; PEREIRA P. et al. Impact of adding prophylactic probiotics to a bundle of standard preventative measures for *Clostridium difficile* infections: enhanced and sustained decrease in the incidence and severity of infection at a community hospital. **Curr Med Res Opin**, v.29, p.1341–7, 2013.

MEDEIROS, R.A.B.; BARROS, Z.M.P.; CARVALHO, C.B.O.; FRAGA-NETA, E.G.; MACIEL, M.I.S.; AZOUBEL, P.M. Influence of dual-stage sugar substitution pretreatment on drying kinetics and quality parameters of mango. **LWT - Food Science and Technology**, v.67, p.167-173, 2016

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT J. et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on body weight, fecal acetate, lactate, calprotectin, and IgA in preterm infants. **Pediatr Res.**, v.64, p.418–22, 2008.

MOHAN, R.; KOEBNICK, C.; SCHILDT, J. et al. Effects of *Bifidobacterium lactis* Bb12 supplementation on intestinal microbiota of preterm infants: a double-blind, placebo-controlled, randomized study. **Journal Clin Microbiology**, v.44, p.4025–31, 2006.

NAYAK, P.K.; CHANDRASEKAR, C.M.; KESAVAN, R.K. Effect of thermosonication on the quality attributes of star fruit juice. **Journal of food process engineering**, v.41, p.1-10, 2018.

NAZIR, M.; ARIF, S.; KHAN, R.S.; NAZIR, W.; KHALID, N. Opportunities and challenges for functional and medicinal beverages: Current and future trends. **Trends in Food Science & Technology**, v.88, p.513–526, 2019.

NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A.M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, vol. 21, p. 49-53, 2016.

OELSCHLAEGGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **Int. J. Med. Microbiol.**, v.300, p.57–62, 2010.

OETTERER, M.; D'ARCE, M.A.B.; SPOTO, M.H. **Fundamentos de ciência e tecnologia de alimentos**. Editora Manolo, São Paulo, 2006, 632p.

OLIVARES, M.; CASTILLEJO, G.; VAREA, V.; SANZ Y. Double-blind, randomised, placebo-controlled intervention trial to evaluate the effects of *Bifidobacterium longum* CECT 7347 in children with newly diagnosed coeliac disease. **Brazil Journal of the Nutritional**, v.112, p.30–40, 2014.

OLIVEIRA, E.A.; BORGES, S.V.; FURTADO, Â.A.L.; MODESTA, R.C.; GODOY, R. D. Heat processing (HTST) of umbu (*Spondias tuberosa* Arruda Câmara) pulp. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.31, p.923–928. 2011.

OLIVEIRA, F.E.; ROSSONI, R.D.; DE BARROS, P.P.; BEGNINI, B.E.; JUNQUEIRA, J.C.; JORGE, A.O.C.; DE OLIVEIRA, L. D. Immunomodulatory effects and anti- *Candida* activity of *Lactobacilli* in macrophages and in invertebrate model of *Galleria mellonella*. **Microbial Pathogenesis**, v.110, p.603–611, 2017.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; AH KANG, S.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal Appl Microbiol.** v.100, p.1171–1185, 2006.

PARVEZ, S.; MALIK, K.A.; KANG, A.H.; KIM, H.Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v.100, p.1171–1185, 2006.

PATEL, R. M.; UNDERWOOD, M. A. Probiotics and necrotizing enterocolitis. **Seminars in Pediatric Surgery**, v.27, p.39–46, 2018.

PELLINO, G.; SCIAUDONE, G.; CANDILIO, G. et al. Early postoperative administration of probiotics versus placebo in elderly patients undergoing elective colorectal surgery: a double-blind randomized controlled trial. **BMC Surg.**, v.13, S57, 2013.

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

PEREIRA, C.T.M.; SILVA, C.R.P.; LIMA, A.; PEREIRA, D.M.; COSTA, C.N.; NETO, A.C. Obtenção, caracterização físico-química e avaliação da capacidade antioxidante in vitro da farinha de resíduo de acerola (*Malpighia glabra* L.). **Acta Tecnológica**, v.8, n.2, p.50 - 56, 2013.

PERRICONE, M., BEVILACQUA, A., ALTIERI, C., SINIGAGLIA, M., CORBO, M. R. Challenges for the production of probiotic fruit juices. **Beverages**, v.1, p.95-103, 2015.

PITHVA, S.; AMBALAM, P.; DAVE, J.M.; VYAS, B.R. Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives. **INTECH Open Access Publisher**, 2012.

RANDAZZO, C.L.; PITINO, I.; LICCIARDELLO, F.; MURATORE, G.; CAGGIA, C. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* probiotic strains in peach jam during storage at different temperatures. **Food Science Technology**, Campinas, v.33, n.4, p. 652-659, 2013.

RAWSON, A.; PATRAS, A.; TIWARI, B.K.; NOCI, F.; KOUTCHMA, T. N. BRUNTON. 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**, v.44, p.1875–1887, 2011.

RAYES, N.; SEEHOFER, D.; HANSEN, S. et al. Early enteral supply of *Lactobacillus* and fiber versus selective bowel decontamination: a controlled trial in liver transplant recipients. **Transplantation**, v.74, p.123–7, 2002.

RAYES, N.; SEEHOFER, D.; THERUVATH, T. et al. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation: a randomized, double-blind trial. **Am Journal Transplant**, v.5, p.125–30, 2005.

REALE, A.; Di Renzo, T.; ROSSI, F.; ZOTTA, T.; IACUMIN, L.; PREZIUSO, M.; PARENTE, E.; SORRENTINO, E.; COPOLLA, R. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, 721-728. 2015.

REETZ, E. R.; KIST, B. B.; SANTOS, C. E.; CARVALHO, C.; DRUM, M. **Brazilian fruit yearbook 2014**. Santa Cruz do Sul: Gazeta Santa Cruz, 2015.

RODRIGUES-AMAYA, D. (1999) **A guide to carotenoids analysis in food**. Washington: Internacional Life Sciences Institute Press, 1999. 64p.

ROJAS, M. L.; MIANO, A. C.; AUGUSTO, P. E. Ultrasound processing of fruit and vegetable juices. **Ultrasound: Advances for food processing and preservation**, p.181–199, Elsevier, 2017.

ROUGE, C.; PILOQUET, H.; BUTEL, M.J. et al. Oral supplementation with probiotics in very-low-birth-weight preterm infants: a randomized, double-blind, placebo-controlled trial. **Am J Clin Nutr.**, v.89, p.1828–35, 2009.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J.M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT- Food Science and Technology**, vol. 50, p. 1-16, 2013.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas - Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, vol.42, P.1-16, n.1, 2006.

SAEEDUDDIN, M.; ABID, M.; JABBAR, A.; WU, T.; HASHIM, M.M.; AWAD, F.N.; HU, B.; LEI, S.; ZENG, X. Quality assessment of pear juice under ultrasound and comercial pasteurization processing conditions. **LWT Food Science and Technology**, v. 64, p.452458, 2015.

SAINT-MARC, T.; ROSSELLO-PRATS, L.; TOURAINE, J.L. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* in the treatment of diarrhea in AIDS. **Ann Med Interne (Paris)**, v.5, p.142-64, 1991.

SANCHO, S.O. **Efeito do processamento sobre características de qualidade do suco de caju (*Anacardium occidentale* L.)**. Dissertação. [Mestrado em Tecnologia de Alimentos] - Universidade Federal do Ceará; 2006.

SANTOS, E.; ANDRADE, R.; GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v.20, p.56-61, 2017.

SARKAR, S. Potentiality of probiotic yoghurt as a functional food – a review. **Nutrition & Food Science**, v.49, n.2, p.182-202, 2019.

SCHILLINGER, U.; GUIGAS, C.; HOLZAPFEL, W.H. In vitro adherence and other properties of lactobacilli used in probiotic yoghurt-like products. **Int Dairy J**, v. 15, p.1289–1297, 2005.

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

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

SIES, H.; STAHL, W. Vitamins E and C, β -carotene, and other carotenoids as antioxidants. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.62, n.6, p.1315-1321, 1995.

SILVA, G.D.; BARROS, Z.M.P.; MEDEIROS, R.A.B.; CARVALHO, C.B.O.; BRANDÃO, S.C.R.; AZOUBEL, P.M. Pretreatments for melon drying implementing ultrasound and vacuum. **LWT - Food Sci. Technol. (Lebensmittel-Wissenschaft - Technol.)**, v.74, p.114–119, 2016.

SILVA, M.; JACOBUS, N.V.; DENEKE, C.; GORBACH, S.L. Antimicrobial substance from a human *Lactobacillus* strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.31, n.8, p.1231–1233; doi: 10.1128/aac.31.8.1231, 1987.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTÓS, M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin Ciocalteu reagent. **Methods in Enzymology**, Orlando, v. 299, p. 152–178, 1999.

SNYDMAN, D.R. The Safety of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases**, v.104, n.2, p. 104-111. Disponível em https://academic.oup.com/cid/article-abstract/46/Supplement_2/S104/276784. Acesso em 06 abril de 2020.

SOARES, E.R.; MONTEIRO, E.B.; SILVA, R.C.; SOBREIRA, A.B.F.; MATTOS, T.; COSTA, C.A.; DALEPRANE, J.B.; COSTA, C.A. Compostos bioativos em alimentos, estresse oxidativo e inflamação: uma visão molecular da nutrição. **Revista do Hospital Universitário Pedro Ernesto – HUPE**, v.14, n.3, p. 64-72, 2015.

SOARES, M.L. **Utilização de passiflora cincinnata, um fruto da caatinga, na produção de bebida probiótica**. 2018. 102 p. Tese (Doutorado em Biotecnologia Industrial – Renorbio) – Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2018.

SORIA, A.C.; VILLAMIEL, M. Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v.21, n.7, p.323–331, 2010.

STROHECKER, R.; HENNING, H. **Análisis de vitaminas: métodos comprobados**. Madrid: Paz Montalvo, 1967, 28p.

SUCCI, M.; TREMONTE, P.; REALE, A.; SORRENTINO, E.; GRAZIA, L.; PACIFICO, S.; COPPOLA, R. Bile salt and acid tolerance of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from Parmigiano Reggiano cheese. **Microbiology Letters**, v.244, p. 129-137, 2005.

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

SZAJEWSKA, H.; KOTOWSKA, M.; MRUKOWICZ, J.Z. et al. Efficacy of *Lactobacillus* GG in prevention of nosocomial diarrhea in infants. **Journal Pediatric**, v.5, p.138-361, 2001.

SZYMCZYCHA-MADEJA, A.; WELNA, M.; JEDRYCZKO, D.; POHL, P. Developments and strategies in the spectrochemical elemental analysis of fruit juices. **Trends in analytical chemistry**, v.55, p.68-80, 2014.

TACO - **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos** - 4ª edição revisada e ampliada. – Núcleo de Estudos e Pesquisa em Alimentos – NEPA – UNICAMP – Campinas, São Paulo, 2011.

TANG, R.B., CHANG, J.K., CHEN, H.L. Can probiotics be used to treat allergic diseases? **Journal of the Chinese Medical Association**, v. 78, p. 154–157, 2015.

TARAZONA-DÍAZ, M. P.; AGUAYO, E. Influence of Acidification, Pasteurization, Centrifugation and Storage Time and Temperature on Watermelon Juice Quality. **Journal of the science of food and agriculture**, v.93, n.15, p.3863–3869, 2013.

TOMADONI, B.; CASSINI, L.; PONCE, A.; MOREIRA, M. R.; AGÜERO, M.V. Optimization of ultrasound, vanillin and pomegranate extract treatment for shelf-stable unpasteurized strawberry juice. **LWT - Food Science and Technology**. v.72, p.475-484, 2016.

TOSCANO, M.; DE GRANDI, R.; MINIELLO, V.L.; MATTINA, R.; DRAGO, L. Ability of *Lactobacillus kefir* LKF01 (DSM32079) to colonize the intestinal environment and modify the gut microbiota composition of healthy individuals. **Digestive and Liver Disease**, v.49, p.261-267, 2017.

USDA - Department of Agriculture, Agricultural Research Service, 2006. **USDA National Nutrient Database for Standard Reference, Release**. 19, Nutrient Data Laboratory Home Page. Acesso em 19 de Agosto de 2019. Disponível em: <http://www.ars.usda.gov/ba/bhnrc/ndl>.

VANDENPLAS, Y.; HUYSBE, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Journal of Pediatrics**, v.91, p.6 – 21, 2015.

VARSHA, V. V. & NAMPOOTHIRI, K. M. Appraisal of lactic acid bacteria as protective cultures. **Food Control**, 69, 61 – 64, 2016.

VASCONCELOS, M.A.S.; MELO FILHO, A.B. **Técino em alimentos – Conservação de alimentos**. Caderno da Escola Técnica Aberta do Brasil: e-Tec Brasil, UFRPE/CODAI, 2010, 130p.

VIDAL, F.; XIMENES, L.F. **Comércio exterior do agronegócio do Nordeste: sucos de frutas**. **Caderno Setorial ETENE** – Banco do Nordeste do Brasil, Ano 4, n.76, 2019.
Disponível em:
https://www.bnb.gov.br/documents/80223/4961157/76_Sucos.pdf/09194df3-018e-8e30-4021-4c396eb75a91; Acesso em 28 de dezembro de 2019.

VINUSHA, K.S.; DEEPIKA, K.; JOHNSON, T.S.; AGRAWAL, N.K.; A.R. Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.14, p. 140–148, 2018.

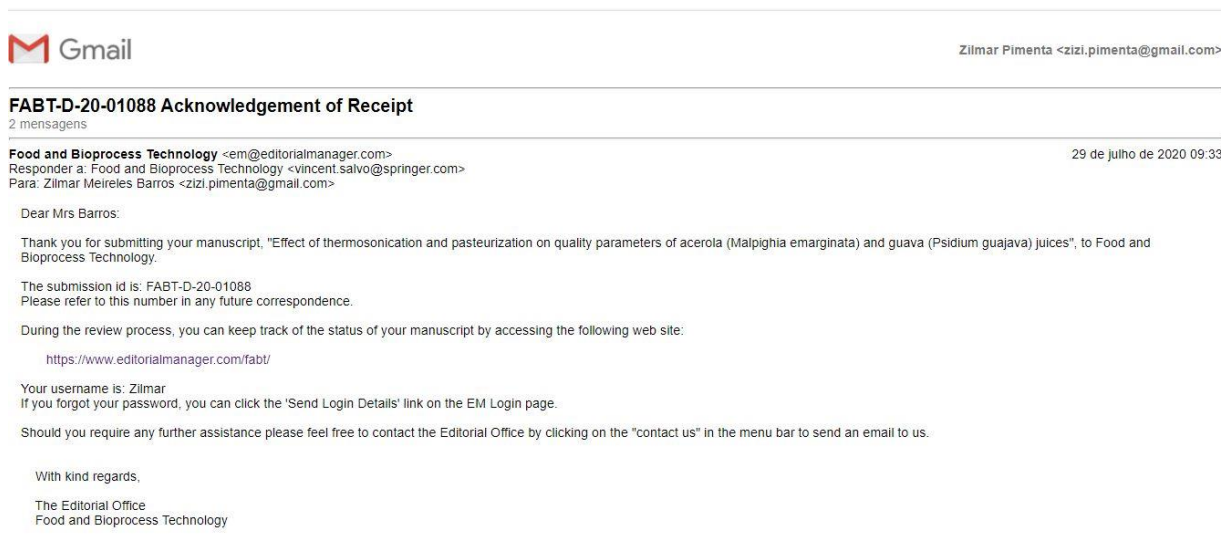
VINUSHAA, K.S.; DEEPIKAA, K.; JOHNSON, T.S.; AGRAWAL, G.K.; RAKWAL, R. Proteomic studies on lactic acid bacteria: A review. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v.14, p. 140–48, 2018.

WEIZMAN, Z.; ALSHEIKH, A. Safety and Tolerance of a Probiotic Formula in Early Infancy Comparing Two Probiotic Agents: A Pilot Study. **J AmColl Nutr**; v.25, p415–9, 2006.

WHITE, J.; HEKMAT, S. Development of Probiotic Fruit Juices Using *Lactobacillus rhamnosus* GR-1 Fortified with Short Chain and Long Chain Inulin Fiber. **Fermentation**, v.4, n.27; p.1-12, 2018.

Anexos

Anexo 1 – Comprovante de submissão do artigo 1



Anexo 2 – Comprovante de submissão do artigo 2



Zilmar Pimenta <zizi.pimenta@gmail.com>

FABT-D-20-01108 Acknowledgement of Receipt

2 mensagens

Food and Bioprocess Technology <em@editorialmanager.com>
Responder a: Food and Bioprocess Technology <vincent.salvo@springer.com>
Para: Zilmar Meireles Barros <zizi.pimenta@gmail.com>

31 de julho de 2020 22:57

Dear Mrs Barros:

Thank you for submitting your manuscript, "Effect of thermosonication on the production of acerola and guava probiotic juices", to Food and Bioprocess Technology.

The submission id is: FABT-D-20-01108

Please refer to this number in any future correspondence.

During the review process, you can keep track of the status of your manuscript by accessing the following web site:

<https://www.editorialmanager.com/fabt/>

Your username is: Zilmar

If you forgot your password, you can click the 'Send Login Details' link on the EM Login page.

Should you require any further assistance please feel free to contact the Editorial Office by clicking on the "contact us" in the menu bar to send an email to us.

With kind regards,

The Editorial Office
Food and Bioprocess Technology