



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

TATIANA COLOMBO PIMENTEL

**SUCO CLARIFICADO DE MAÇÃ COM LACTOBACILLUS  
PARACASEI SSP. PARACASEI E OLIGOFRUTOSE OU**

**SUCRALOSE:**

ASPECTOS SENSORIAIS E ESTABILIDADE FÍSICO-  
QUÍMICA, PRE E PROBIÓTICA EM ARMAZENAMENTO  
REFRIGERADO

TATIANA COLOMBO PIMENTEL

**SUCO CLARIFICADO DE MAÇÃ COM LACTOBACILLUS  
PARACASEI SSP. PARACASEI E OLIGOFRUTOSE OU  
SUCRALOSE:  
ASPECTOS SENSORIAIS E ESTABILIDADE FÍSICO-  
QUÍMICA, PRE E PROBIÓTICA EM ARMAZENAMENTO  
REFRIGERADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Prudencio.

Londrina  
2014

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da  
Universidade Estadual de Londrina**

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**

P644s	<p>Pimentel, Tatiana Colombo. Suco clarificado de maçã com <i>Lactobacillusparacasei</i> ssp. <i>paracasei</i> e oligofrutose ou sucralose : aspectos sensoriais e estabilidade físico-química, pre e probiótica em armazenamento refrigerado / Tatiana Colombo Pimentel. - Londrina, 2014. 153 f. : il.</p> <p>Orientador: Sandra Helena Prudencio. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2014. Inclui bibliografia.</p> <p>1. Suco de frutas – Avaliação sensorial – Teses. 2. Suco de maçã – Purificação – Teses. 3. Bebidas – Avaliação sensorial – Teses. 4. Bebidas – Embalagens – Teses. 5. Lactobacilo – Teses. I. Prudencio, Sandra Helena. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.</p> <p style="text-align: right;">CDU 663.8/9</p>
-------	--

TATIANA COLOMBO PIMENTEL

**SUCO CLARIFICADO DE MAÇÃ COM LACTOBACILLUS  
PARACASEI SSP. PARACASEI E OLIGOFRUTOSE OU  
SUCRALOSE: ASPECTOS SENSORIAIS E ESTABILIDADE FÍSICO-  
QUÍMICA, PRE E PROBIÓTICA EM ARMAZENAMENTO  
REFRIGERADO**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina como requisito para obtenção do título de Doutor em Ciência de Alimentos.  
Orientadora: Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Prudencio.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Sandra Helena Prudencio  
UEL – Londrina – PR

---

Prof Dr. Adriano Gomes da Cruz  
IFRJ – Rio de Janeiro – RJ

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Grasielle Scaramal Madrona  
UEM – Maringá – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Maria Antônia Pedrine Colabone Celligoi  
UEL – Londrina – PR

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Wilma Aparecida Spinosa  
UEL – Londrina – PR

Londrina, 07 de Abril de 2014

## **Dedico**

Aos meus pais, irmão e noivo, pelo apoio incondicional, força, incentivo e amizade sem igual. Sem eles nada disto seria possível.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, que por sua presença, luz e força sempre me abençoa e capacita para as provas da vida.

À Professora Dra. Sandra Helena Prudencio, não só pela constante orientação neste trabalho, mas, sobretudo pela amizade e paciência durante todos os anos de pós-graduação.

À minha mãe Glaci pelo apoio emocional e incondicional em todas as etapas desta tese e em todos os obstáculos da vida. Pela companhia e auxílio nos finais de semana para a execução deste projeto. Sem você eu não teria conseguido chegar até aqui.

Ao meu pai Paulo e meu irmão Fabiano pela companhia e por me proporcionarem momentos de descontração tão importantes.

Ao meu amor, Edson Acordi, pelo companheirismo em todos os momentos, pelos sorrisos, pelo cuidado e por me mostrar que sonhos podem ser reais. Obrigada pela família maravilhosa que você me proporcionou, que me recebeu de braços abertos repletos de carinho. Aos meus sogros, Rute e Wilson, e aos meus cunhados, Roberto e Rosana, pelo apoio e amizade.

Aos meus familiares e amigos: Wilson e Sônia, Dito e Meire, Fernando, Ali e Schirley, Marcos e Fabiana, Ricardo e Eliane, e Liu e Arlindo, pela admiração e certeza de que eu conseguiria. Agradecimento especial a minha querida vó e madrinha Edi pela preocupação e orações sempre presentes e à minha prima e mestre Franciele pelo companheirismo e amizade mesmo quando a distância nos separava.

Aos meus eternos amigos Bruna Torraca, Caroline Zanata, Mirian Zucoloto, Mônica Guerreiro, Luana Orsini, Jacqueline Galuch, Michele Rosset, Alisson Reis,

Giovani Lippi e Leandro Sganzerla (Juninho), os quais levarei em meu coração onde quer que eu esteja.

Aos meus colegas de trabalho Emerson Rabelo, Juliana Furlan Rabelo, Max Alexandre de Paula Gonçalves, Rodrigo Barriviera, Michele Delefrati Barriviera, Onivaldo Flores Junior, Vanessa Stegani, Marco Roberto Alves dos Reis, Suzete Shiromoto, Fausto Neves Silva, Vanessa Rombola Machado, Adriane Pires Bomfim, Angélica de Sousa Hrysyk e Fernanda Crocetta Schraiber por tornarem a minha vida mais feliz e pelos momentos maravilhosos que compartilhamos.

Aos meus alunos e julgadores da equipe sensorial, sem os quais uma parte deste trabalho não seria realizada: Abikeilla Ariane Bonfim Gomes, Letícia Mazzo Portella, Jeferson Rocha Queiroz, Elton Praça, Vinícius Anacleto Lopes, Camila Garcia, Tamires Ferreira, Elysson Boeing Schmitz, Miriany Esposi Ferreira, Flávio Botter Marini, Carla Geovana Pravatto, Lucas Bueno Farias Vieira, Jaqueline Gilmara Barboza Januário, Amanda Silva de Oliveira, João Gabriel Messina, Cauê Gaffo de Miranda, Carolina Montanha Garcez e Odeci Servello Junior. Obrigada pela paciência e disposição para a realização dos testes.

À Professora Dra. Grasielle Scaramal Madrona, pela amizade e pela permissão para a utilização dos laboratórios da Universidade Estadual de Maringá.

À Professora Dra. Sandra Garcia por nos auxiliar em todas as etapas deste trabalho.

Ao Professor Dr. Adriano Gomes da Cruz, pelos ensinamentos, cooperação, apoio e incentivo desde que nos conhecemos.

Ao Instituto Federal do Paraná - Câmpus Ivaiporã, representado pelo Diretor Geral Onivaldo Flores Junior, pelo Diretor de Ensino, Pesquisa e Extensão Max Alexandre de Paula Gonçalves e pela Diretora de Planejamento e Administração Fernanda Crocetta Schraiber, pela permissão de realizar parte dos experimentos em seus laboratórios e pela compreensão de que a concretização desta etapa requeria tempo.

Aos integrantes da banca examinadora, por disponibilizarem seu valioso tempo para auxiliar na melhoria deste trabalho.

À Christian Hansen pelo fornecimento da cultura probiótica.

À Clariant pelo fornecimento da oligofrutose.

À Tovani Benzaquen Ingredientes pelo fornecimento da sucralose.

À CAPES pela bolsa de doutorado concedida.

A todos aqueles que não foram citados aqui, mas que colaboraram e torceram para que mais uma etapa da minha vida fosse vencida.

—Alguns homens veem as coisas como são e dizem: Por quê? Eu sonho com as coisas que nunca foram e digo: Por que não?

(George Bernard Shaw)

PIMENTEL, Tatiana Colombo. **Suco clarificado de maçã com *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e oligofrutose ou sucralose: aspectos sensoriais e estabilidade físico-química, pre e probiótica em armazenamento refrigerado.** 2014. 153 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina. Londrina- PR.

## RESUMO

O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um suco clarificado de maçã simbiótico, avaliando-se o efeito nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como probiótico, e/ou oligofrutose como substituto de açúcar e prebiótico, e determinando o impacto do tipo de embalagem nos parâmetros avaliados. A utilização de sucralose como substituto de açúcar também foi estudada. Sucos adicionados de cultura probiótica apresentaram composição química, densidade e aceitabilidade semelhantes ao produto sem adição; porém, maior acidez titulável, turbidez (avaliação física e sensorial) e cor vermelha (avaliação instrumental). A adição de oligofrutose a sucos puros não alterou as características físico-químicas e estabilidade ao armazenamento dos produtos; e exerceu efeito protetor às culturas probióticas, aumentando sua sobrevivência à estocagem. Com relação à aceitabilidade, sucos adicionados de oligofrutose foram igualmente aceitos aos adicionados de sacarose. Porém, tiveram menor intensidade de gosto doce, demonstrando que, quando adicionada em concentração suficiente para o efeito prebiótico, a oligofrutose atua como substituto parcial do açúcar. Sucos de maçã armazenados em embalagens de vidro apresentaram maior viabilidade da cultura probiótica do que os armazenados em embalagem de plástico, não havendo efeito da embalagem nas características físico-químicas e na aceitabilidade dos produtos. A adição de sucralose a sucos resultou em produtos com cor mais clara (avaliação sensorial) e com intensidade de gosto doce e aceitação semelhantes à de sucos com sacarose, demonstrando o efeito de substituição de açúcar deste edulcorante. Foi possível desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico que apresentou composição química, perfil sensorial (exceto turbidez e presença de partículas) e aceitação semelhantes ao suco com sacarose. Portanto, em conjunto com a cultura probiótica, a oligofrutose atuou como um substituto total do açúcar, pois sucos simbióticos apresentaram intensidade do gosto doce semelhante ao suco com sacarose. Contudo, os produtos apresentaram maior acidez titulável e turbidez (avaliação física e sensorial). O tempo de vida dos sucos com cultura probiótica, baseado na quantidade mínima recomendada de probióticos, seria de 14 a 28 dias em refrigeração (4°C), dependendo do tipo de embalagem e da presença de oligofrutose. Usando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi possível verificar que a aceitação de sucos clarificados de maçã é dirigida de forma positiva pelo gosto doce, aroma doce e gosto residual amargo; e negativamente pelo sabor de maçã, aroma de maçã, cor mais escura e gosto ácido.

**Palavras-chave:** Suco de fruta. Prebiótico. Probiótico. Embalagem. Edulcorante. *Malus domestica* BORKH

PIMENTEL, Tatiana Colombo. **Clarified apple juice with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose or sucralose**: sensory aspects, and physicochemical, pre and probiotic stability in refrigerated storage. 2014. 153 p. Thesis (Doctor's Degree in Food Science) - University of Londrina. Londrina- PR.

## ABSTRACT

The objective of this study was to develop a synbiotic clarified apple juice by evaluating the effect on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* as probiotic and / or oligofructose as prebiotic and sugar substitute, and determining the impact of the type of packaging on the evaluated parameters. The use of sucralose as a substitute for sugar was also studied. Probiotic juices showed chemical composition, density and acceptability similar to the product without supplementation, but higher titratable acidity, turbidity (physical and sensory evaluation) and red color (instrumental evaluation). Supplementation with oligofructose did not alter the physicochemical characteristics and storage stability of pure juices, and exerted a protective effect on probiotic cultures, increasing their survival during storage. Regarding acceptability, juices with added oligofructose were as accepted as the juices added sucrose. However, they had lower intensity of sweet taste, showing that, when added in sufficient concentration for the prebiotic effect, oligofructose acts as a partial substitute for sugar. Apple juices stored in glass packages showed higher viability of probiotic cultures than those stored in plastic packages with similar physicochemical characteristics and acceptability. The addition of sucralose to apple juices resulted in products with lighter color (sensory evaluation) and similar intensity of sweet taste and acceptability to the juice with sucrose, demonstrating the effect of this sweetener as sugar substitute. It was possible to develop a potentially synbiotic apple juice which showed similar chemical composition, sensory profile (except turbidity and presence of particles) and acceptability to the juice with sucrose. Therefore, together with the probiotic culture, oligofructose acted like a total sugar substitute, because synbiotic juices showed similar intensity of sweet taste to juice with sucrose. However, the products had higher titratable acidity and turbidity (physical and sensory evaluation). The shelflife of the juices with probiotic culture, based on the recommended minimum amount of probiotics, would be 14 to 28 days under refrigeration (4°C), depending on the type of packaging and the presence of oligofructose. Using partial least squares regression (PLS) it was verified that the acceptance of clarified apple juice is driven positively by sweet taste, sweet aroma and bitter aftertaste, and negatively by apple flavor, apple aroma, darker color and sour taste.

**Keywords:** Fruit juice. Prebiotic. Probiotic. Packaging. Sweetener. *Malus domestica* Borkh.

## LISTA DE QUADROS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAL E MÉTODOS

<b>Quadro 1</b> – Micro-organismos utilizados como probióticos .....	21
<b>Quadro 2</b> – Ocorrência natural de frutanos tipo inulina em alimentos .....	34
<b>Quadro 3</b> – Permeabilidade de alguns materiais poliméricos* .....	51

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAL E MÉTODOS

<b>Figura 1</b> – Processamento de suco clarificado de maçã probiótico .....	30
<b>Figura 2</b> – Suco de maçã bruto (a) e clarificado (b).....	31
<b>Figura 3</b> – Chicória ( <i>Cichorium intybus</i> ) .....	35
<b>Figura 4</b> – Estrutura química de frutanos tipo inulina (n=número de monossacarídeos) .....	36
<b>Figura 5</b> – Estrutura química da sucralose.....	40
<b>Figura 6</b> – Tipos de escalas para teste de aceitação: (a) escala hedônica de 9 pontos, (b) escala hedônica linear; (c) escala hedônica híbrida.....	44
<b>Figura 7</b> – Formulações de suco clarificado de maçã.....	53
<b>Figura 8</b> – Esquema de avaliação dos sucos clarificados de maçã.....	54
<b>Figura 9</b> – Formulações de suco clarificado de maçã.....	55
<b>Figura 10</b> – Ficha para teste de reconhecimento de gostos básicos .....	60
<b>Figura 11</b> – Ficha para teste de reconhecimento de odores básicos.....	61
<b>Figura 12</b> – Ficha para levantamento de terminologia descritiva .....	62
<b>Figura 13</b> – Ficha utilizada para avaliação dos atributos levantados na Análise Descritiva Quantitativa de formulações de suco clarificado de maçã .....	66
<b>Figura 14</b> – Ficha para teste afetivo de formulações de suco clarificado de maçã.....	70

### ARTIGO CIENTÍFICO 1

<b>Figura 1</b> – Conteúdo de oligofrutose (g/100mL) nas formulações de suco clarificado de maçã (PRE-V, SIMB-V, PRE-P e SIMB-P) durante armazenamento refrigerado (4°C)*.....	98
<b>Figura 2</b> – Viabilidade (log UFC/mL) de <i>Lactobacillus paracasei</i> ssp. <i>paracasei</i> nas formulações de sucos clarificados de maçã (PRO-V, SIMB-V, PRO-P e SIMB-P) durante armazenamento refrigerado (4°C)* .....	102

### ARTIGO CIENTÍFICO 2

<b>Figura 1</b> – Mapa sensorial de componentes principais após transformação VARIMAX (D): atributos (vetores) e formulações (círculos) de suco clarificado de maçã. (A) D1 versus D2; (B) D1 versus D3* .....	124
--	-----

<b>Figura 2</b> – Coeficientes de regressão da PLS de formulações de suco clarificado de maçã* .....	132
<b>Figura 3</b> – Mapa de Preferência Externo de formulações de suco clarificado de maçã* .....	134
<b>Figura 4</b> – Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) para preferência de formulações de suco clarificado de maçã. (A) Formulações; (B) Consumidores* .....	135

## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAL E MÉTODOS

<b>Tabela 1</b> – Atributos, definições e amostras de referência desenvolvidos pela equipe sensorial para formulações de suco clarificado de maçã .....	63
<b>Tabela 2</b> – Perfil dos consumidores .....	69

### ARTIGO CIENTÍFICO 1

<b>Tabela 1</b> – Composição química e densidade dos sucos clarificados de maçã* .....	94
<b>Tabela 2</b> – Parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável e SST) dos sucos clarificados de maçã* .....	96
<b>Tabela 3</b> – Parâmetros de cor ( $L^*$ , $a^*$ e $b^*$ ) e turbidez dos sucos clarificados de maçã* .....	100
<b>Tabela 4</b> – Aceitabilidade e intenção de compra dos sucos clarificados de maçã* .....	105

### ARTIGO CIENTÍFICO 2

<b>Tabela 1</b> – Atributos, definições e amostras de referência desenvolvidos pela equipe sensorial para formulações de suco clarificado de maçã .....	118
<b>Tabela 2</b> – Valores médios de intensidade dos atributos sensoriais da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) de formulações de suco clarificado de maçã* .....	126
<b>Tabela 3</b> – Aceitabilidade de formulações de sucos clarificados de maçã* .....	129

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>18</b>
2.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	18
2.2	PROBIÓTICOS .....	18
2.2.1	Critérios de Seleção.....	19
2.2.2	Lactobacillus Paracasei ssp. Paracasei (L. casei-01) e Benefícios à Saúde.....	22
2.3	PRODUTOS NÃO LÁCTEOS PROBIÓTICOS.....	25
2.3.1	Suco de Fruta Probiótico.....	26
2.3.1.1	Suco de maçã probiótico.....	29
2.4	PREBIÓTICOS.....	33
2.5	SIMBIÓTICOS.....	37
2.6	SUBSTITUTOS DE AÇÚCAR .....	38
2.6.1	Oligofrutose.....	39
2.6.2	Sucralose .....	40
2.7	ANÁLISE SENSORIAL DE SUCOS DE FRUTA FUNCIONAIS.....	42
2.7.1	Testes Afetivos .....	43
2.7.2	Testes Descritivos.....	45
2.7.3	Metodologias de Tratamento de Dados em Análise Sensorial.....	46
2.8	EMBALAGEM DE PRODUTOS FUNCIONAIS.....	48
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>52</b>
3.1	OBJETIVO GERAL .....	52
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	52
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>53</b>
4.1	MATERIAL.....	55
4.2	MÉTODOS .....	56
4.2.1	Obtenção da Cultura Probiótica Ativada .....	56
4.2.2	Preparação dos Sucos de Maçã .....	56
4.2.3	Avaliações Físico-Químicas.....	57

4.2.4	Avaliações Microbiológicas.....	58
4.2.5	Avaliação Sensorial .....	58
4.2.5.1	Condições de teste .....	58
4.2.5.2	Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos sucos clarificados de maçã.....	59
4.2.5.2.1	<i>Pré-seleção dos julgadores.....</i>	59
4.2.5.2.2	<i>Desenvolvimento da terminologia descritiva.....</i>	61
4.2.5.2.3	<i>Treinamento dos julgadores.....</i>	67
4.2.5.2.4	<i>Seleção final dos julgadores.....</i>	67
4.2.5.2.5	<i>Avaliação das formulações .....</i>	67
4.2.5.3	Teste de aceitação.....	68
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	70
<b>REFERÊNCIAS.....</b>		<b>72</b>
<b>5</b>	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO .....</b>	<b>86</b>
5.1	Artigo Científico 1 .....	86
5.2	Artigo Científico 2 .....	113
<b>CONCLUSÕES.....</b>		<b>141</b>
<b>ANEXOS .....</b>		<b>143</b>
<b>ANEXO A –</b> Aprovação do projeto pelo comitê de ética .....		<b>144</b>
<b>ANEXO B –</b> Ficha de recrutamento de julgadores para teste descritivo.....		<b>145</b>
<b>ANEXO C –</b> Termo de consentimento livre e esclarecido para teste descritivo .....		<b>148</b>
<b>ANEXO D –</b> Ficha de recrutamento de julgadores para teste de aceitação.....		<b>150</b>
<b>ANEXO E –</b> Termo de consentimento livre e esclarecido para teste de aceitação.....		<b>152</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Os consumidores estão cada vez mais preocupados com a dieta e esperam ingerir alimentos que, além de saborosos e atrativos, sejam seguros e saudáveis. Procuram ainda, melhoria do bem-estar e da saúde, o que pode ser conseguido por meio da ingestão de alimentos adicionados de componentes funcionais, como os probióticos e prebióticos (QIANG; YONGLIE; QIANBING, 2009).

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem efeito benéfico ao indivíduo, quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). As culturas probióticas são tradicionalmente adicionadas a leites fermentados e outros produtos lácteos, contudo, bebidas como sucos de fruta podem representar um meio alternativo de veicular essas culturas benéficas aos humanos (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007).

Sucos de fruta contêm naturalmente nutrientes benéficos à saúde, como minerais, vitaminas, fibra alimentar e antioxidantes; e não possuem alergênicos, como os produtos lácteos, os quais impedem o seu consumo por alguns segmentos da população (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004a). Além disso, apresentam perfil de sabor considerado agradável a todas as faixas etárias; são percebidos como bebidas saudáveis e refrescantes; e são consumidos regularmente (AWAISHEH, 2012).

No entanto, possuem elevada acidez e podem conter naturalmente inibidores de crescimento microbiano ou serem adicionados de aditivos; como corantes e saborizantes, características associadas à perda de viabilidade dos probióticos (VASUDHA; MISHRA, 2013). Sensorialmente, sucos adicionados de culturas probióticas têm apresentado perfis de sabor diferenciados, sendo menos aceitos pelos consumidores do que os produtos convencionais (SAEED; ZAHID; SATTAR, 2013).

O consumo de alimentos com baixo teor de açúcar tem aumentado como consequência da maior consciência dos consumidores de que a ingestão de grandes quantidades dessas biomoléculas promove o risco de aparecimento de doenças, tais como doenças coronárias, hipertensão arterial, hipercolesterolemia, diabetes, obesidade e alguns tipos de câncer (AKESOWAN; CHOONHAHIRUN, 2013). Uma variedade de edulcorantes/adoçantes de alta intensidade está disponível no mercado para utilização pelas indústrias de alimentos, incluindo a sacarina, acessulfame-K, aspartame, estévia e sucralose. Além disso, outros compostos têm sido avaliados como substitutos de açúcar, como as oligofrutoses (JAIN et al., 2013).

Prebióticos, como as oligofrutoses, são componentes alimentares não viáveis, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro associados à modulação de sua microbiota (FAO/ AGNS, 2007). As oligofrutoses são obtidas por meio de hidrólise enzimática da inulina e apresentam propriedades tecnológicas comparáveis à da sacarose e xaropes de glicose. Contudo, o poder adoçante da oligofrutose pura é de 30% a 60% quando comparado ao da sacarose (APOLINÁRIO et al., 2014; FRANCK, 2002; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

A sucralose é um adoçante não nutritivo produzido pela substituição de três grupos hidroxila por três átomos de cloro na molécula de sacarose, tendo como características: segurança para consumo; alto poder adoçante (600 vezes maior do que o da sacarose); leve gosto residual amargo; e estabilidade a altas temperaturas e à acidez (AL-DABBAS; MAHER; AL-QUDSI, 2012). A sucralose tem sido considerada o edulcorante que melhor substitui o açúcar, já que ocasiona poucas alterações sensoriais nos produtos quando comparada a outros edulcorantes (CADENA et al., 2013).

A embalagem em alimentos probióticos e prebióticos tem como função a manutenção de um número adequado de micro-organismos vivos e/ou de um teor mínimo do prebiótico ao longo da vida útil do produto (FARIA; WALTER; CRUZ, 2011). O uso de embalagens de vidro favorece a sobrevivência de culturas probióticas, devido à sua permeabilidade ao oxigênio ser extremamente baixa. Por outro lado, o alto custo do vidro e os riscos inerentes à sua manipulação tornam o seu uso restrito. Por essa razão, as indústrias de alimentos preferem comercializar os seus produtos em embalagens de plástico (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

O potencial de sinergia entre probióticos e prebióticos desencadeou o desenvolvimento de alimentos contendo combinações desses ingredientes, sendo denominados de simbióticos (CRITTENDEN et al., 2001). Os simbióticos promovem o crescimento de micro-organismos benéficos já existentes no cólon, assim como aumentam a sobrevivência, implantação e crescimento dos micro-organismos que estão sendo adicionados com o produto (LIONG; SHAH, 2005).

Intencionando-se apresentar uma opção de alimento funcional para os consumidores em geral, e principalmente, para aqueles que não apreciam ou não podem consumir derivados do leite, como os intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite, hipercolesterolêmicos e vegetarianos estritos, o presente trabalho teve por objetivo desenvolver um suco clarificado de maçã simbiótico, avaliando-se o efeito nas características físico-químicas, microbiológicas e sensoriais, durante o armazenamento refrigerado, da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como probiótico e/ou oligofrutose como

substituto de açúcar e prebiótico, e determinando o impacto do tipo de embalagem nos parâmetros avaliados. A utilização de sucralose como substituto de açúcar também foi estudada.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimentos funcionais são alimentos que possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional; podendo atuar de forma relevante na melhoria do bem-estar e saúde e/ou redução do risco de doença. Um alimento funcional deve permanecer como um alimento e demonstrar seus efeitos em quantidades que podem ser normalmente consumidas na dieta; não é uma pílula ou cápsula, mas parte de uma dieta normal. Além disso, seu efeito se restringe à promoção da saúde e não à cura de doenças (RoBERFRoiD, 2005; PRADO et al., 2008).

Mundialmente, foi estimado um crescimento no total de vendas de alimentos funcionais de 75 bilhões de dólares em 2007 para 130 bilhões de dólares em 2015 (GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS, 2012). No Brasil, o mercado de alimentos funcionais representa cerca de 15% do mercado de alimentos, com crescimento anual de aproximadamente 20%. Embora promissor, esse mercado tem como grande desafio conquistar a confiança do consumidor quanto às suas alegações funcionais, assegurando que não se trata simplesmente de uma estratégia de marketing para justificar o aumento no preço do produto (RosA; CosTA, 2010).

Dentre os componentes funcionais adicionados a alimentos tem-se: fibras alimentares; vitaminas, carotenoides e minerais; fitoquímicos; peptídeos bioativos; ácidos graxos insaturados ômega-3; probióticos, prebióticos, entre outros.

Os produtos probióticos, prebióticos e simbióticos representam o maior segmento de alimentos funcionais no mercado. o interesse em seu estudo decorre do fato de que o intestino humano constitui um complexo ecossistema de microorganismos, e, com a elucidação da relação entre a estrutura da comunidade colônica e a saúde do hospedeiro, houve maior interesse na manipulação de microorganismos benéficos no intestino a fim de melhorar a saúde humana (BRUNsER; GOTTEIAND, 2010; ROSS et al., 2005).

### 2.2 PROBIÓTICOS

As bactérias ácido-láticas têm sido utilizadas há muito tempo na fermentação de leite (queijos, iogurtes); carne (embutidos secos); cereais (sourdough); vegetais (chucrute) e frutas (vinho). O objetivo inicial da fermentação era preservar os

alimentos por meio de sua acidificação; e desenvolver sabores e texturas específicas nos produtos (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Contudo, há evidências de que o consumo de bactérias ácido-láticas pode alterar a composição da microbiota endógena e proporcionar efeitos benéficos à saúde humana (CHAMPAGNE; GARDNE; ROY, 2005).

Diversas definições de probióticos já foram publicadas, entretanto, a atualmente aceita é que os probióticos são micro-organismos vivos que conferem efeito benéfico ao indivíduo, quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). Isso significa que a cultura probiótica deve estar viva e presente em grande quantidade, geralmente em número maior do que  $10^6$  células por mililitro ou miligrama do produto (DONKOR et al., 2007). De acordo com a legislação brasileira, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção diária. Valores menores do que estes podem ser aceitos desde que a empresa comprove a sua eficácia (ANVISA, 2008a). No entanto, à medida que estudos sobre o requerimento populacional das culturas probióticas para exercer efeitos benéficos à saúde do consumidor vão sendo disponibilizados, se verifica que a quantidade necessária varia em função da cepa e do efeito benéfico esperado (champagne; gardner; roy, 2005).

### 2.2.1 Critérios de Seleção

Os critérios de seleção para micro-organismos potencialmente probióticos incluem (AZIZPOUR et al., 2009; CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005; KOS et al., 2003; PRADO et al., 2008; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; SHAH, 2007):

- Critérios de segurança. A cepa selecionada deve ser segura, não invasiva, não carcinogênica, e não patogênica; e ser sensível a antibióticos, ou incapaz de transmitir genes de resistência a esses compostos;
- Propriedades biológicas. Taxas de sobrevivência adequadas no produto e no trato gastrointestinal são necessárias para permitir que a cultura probiótica desempenhe um papel biológico no intestino humano. Por isso, a sobrevivência às condições ácidas do estômago e aos sais biliares é de importância primordial;
- Propriedades tecnológicas. Do ponto de vista industrial, a cepa selecionada deve possuir rendimento de biomassa em larga escala;

- facilidade de concentração; e sobrevivência a processos tecnológicos como congelamento e secagem. Além disso, deve apresentar baixo custo, estabilidade à estocagem e facilidade de aplicação em alimentos;
- Propriedades de adesão. A adesão à superfície da mucosa pelas culturas probióticas é uma habilidade importante para a colonização do trato gastrointestinal, pois retarda a eliminação desses micro-organismos benéficos pelo peristaltismo e promove vantagens competitivas sobre os patógenos. No entanto, pesquisas acerca da ingestão de diferentes cepas probióticas demonstraram que, geralmente, quando o produto contendo probióticos deixa de ser consumido, os micro-organismos adicionados são eliminados do cólon; sugerindo a necessidade do consumo regular deste tipo de alimento;
  - Propriedades antimicrobianas. As propriedades antimicrobianas de culturas probióticas são atribuídas à competição por nutrientes e à produção de compostos inibitórios, como ácidos orgânicos, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

No Quadro 1 estão apresentados os micro-organismos aceitos como probióticos.

**Quadro 1** – Micro-organismos utilizados como probióticos

<b><i>Lactobacillus spp.</i></b>	<b><i>Bifidobacterium spp.</i></b>	<b>Outros</b>
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Streptococcus cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. animalis</i>	<i>Streptococcus thermophilus*</i>
<i>L. delbrueckii ssp. bulgaricus*</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Streptococcus intermedius</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. longum</i>	<i>Streptococcus diacetylactis</i>
<i>L. cellobiosus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Lactococcus lactis</i>
<i>L. curvatus</i>	<i>B. thermophilum</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. breve</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. paracasei</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Propionibacterium freundenreichii</i>
<i>L. plantarum</i>	<i>B. essensis</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>L. reuteri</i>	<i>B. laterosporus</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>L. johnsonii</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides</i>
<i>L. rhamnosus</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. gasseri</i>		<i>Sporolactobacillus inulinus</i>
<i>L. crispatus</i>		<i>Bacillus cereus var. toyoi</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>E. coli</i> Nissle
<i>L. amylovorus</i>		
<i>L. gallinarum</i>		

**Fonte:** AZIZPOUR et al., 2009; SAAD et al., 2013

\*Não considerados probióticos no Brasil (ANVISA, 2008a)

Cepas probióticas de *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Saccharomyces* possuem um extenso histórico de segurança para consumo pela população saudável, sendo consideradas GRAS (generally recognized as safe -reconhecidamente seguras). Existem poucos relatos na literatura sobre reações adversas resultantes da ingestão desses micro-organismos, e, conseqüentemente, são os gêneros mais estudados como probióticos (SAAD et al., 2011).

Cepas de *Enterococcus*, *Bacillus* e *Escherichia* devem ser avaliadas intensivamente com relação à segurança, uma vez que podem ser patógenos oportunistas e/ou capazes de transferir genes que conferem resistência a antibióticos. Portanto, a segurança da cepa deve ser garantida e, quando utilizada, deve ser direcionada para indivíduos específicos (AWAISHEH, 2012; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

As espécies utilizadas na fabricação de produtos lácteos fermentados (*Lactococcus lactis*, *Streptococcus thermophilus*, *Leuconostoc mesenteroides*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*) não possuem, geralmente, comprovação de que apresentem crescimento no trato gastrointestinal e, portanto, teriam baixo potencial probiótico (ANVISA, 2008a; SHAH, 2001). Contudo, estão presentes em altas contagens nos produtos lácteos fermentados, e mesmo que não apresentem crescimento no trato gastrointestinal, podem produzir metabólitos benéficos à saúde do hospedeiro, como exopolissacarídeos ou peptídeos (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

Muitos estudos têm reportado que culturas probióticas exerceriam efeito benéfico à saúde do hospedeiro, incluindo redução nas infecções gastrointestinais; atividade antimicrobiana; melhoria no metabolismo da lactose; redução no colesterol sérico; estimulação do sistema imune; propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antidiarreicas; melhoria nos sintomas da síndrome do intestino irritável; supressão de infecções ocasionadas por *Helicobacter pylori*; e redução da obesidade e da dermatite atópica (LEE; SETO; BIELORY, 2008; AZIZPOUR et al., 2009; SAAD et al., 2013; PALACIOS et al., 2014). É importante salientar, no entanto, que os efeitos benéficos à saúde proporcionados por culturas probióticas são específicos de cada cepa, ou seja, nenhuma cepa será capaz de prover todos os benefícios relatados, sendo que nem mesmo cepas da mesma espécie serão efetivas contra condições de saúde específicas (SHAH, 2007).

## 2.2.2 *Lactobacillus Paracasei* ssp. *Paracasei* (L. casei-01) e Benefícios à Saúde

A cepa *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (L. casei-01) é uma opção de cultura probiótica a ser empregada em sucos de fruta, pois a mesma apresentou resistência a condições ácidas de iogurtes (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012a,b) e néctares de pêssego (PIMENTEL, PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011), além de proporcionar diversos benefícios à saúde que estão relatados a seguir.

A cultura *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (L. casei-01) tem apresentado benefícios à saúde, tais como: atividade antimicrobiana (THARMARAJ; SHAH, 2009); propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antioxidantes (KIM et al., 2005; LIU et al., 2011); e estimulação do sistema imune (MIRZAEI et al., 2008).

Tharmaraj e Shah (2009) avaliaram a atividade antimicrobiana de cepas probióticas, dentre elas *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*, contra microorganismos deteriorantes de alimentos e patogênicos à saúde. No experimento, diferentes meios de

cultura (caldo nutriente, caldo MRS, e caldo lactato de sódio); condições de crescimento (aerobiose e anaerobiose); e meios ágar foram avaliados. A inibição foi verificada após incubação das placas e observação de zonas de inibição e outros efeitos de supressão circundante aos poços e estrias; ou pela viabilidade do micro-organismo alvo.

Em condições aeróbicas e caldo nutriente, a cepa probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* inibiu o crescimento de *E. coli*, *S. typhimurium* e *S. aureus*, fato atribuído à sua tolerância à presença de oxigênio no meio e à capacidade de produzir substâncias inibitórias mesmo em condições de baixo teor de açúcares, como no caldo nutriente. Em condições aeróbicas e caldo MRS, outras cepas também passaram a ser inibidas (*P. aerogenosa*, *B. cereus* e *B. stearothermophilus*), principalmente devido à presença de açúcares neste meio de cultura, os quais foram utilizados pela cultura probiótica para a produção de substâncias inibitórias. Em condições anaeróbicas e caldo MRS houve inibição de *E. coli*, *S. typhimurium*, *S. aureus* e *B. cereus*. A utilização de agentes antimicrobianos que não possuam efeitos adversos à saúde humana, como os probióticos, poderia inibir a proliferação de micro-organismos patogênicos em alimentos; ou auxiliar em infecções gastrointestinais.

Kim et al. (2005) investigaram a atividade antioxidante in vitro de diversas culturas comerciais utilizadas na fabricação de leites fermentados. A cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* apresentou alta inibição da peroxidação lipídica (68,17%); atividade sequestrante de radicais hidroxila (71,3%); e atividade quelante de íons ferro (72,06%). A peroxidação lipídica é precursora em patologias como dano ao DNA, carcinogênese, mutagênese e envelhecimento. Os radicais hidroxila são radicais livres extremamente reativos, podendo reagir com diversos tipos de moléculas, como ácidos graxos poli-insaturados, proteínas e ácidos orgânicos. O controle da presença de íon ferro é importante porque o mesmo pode causar indiretamente danos ao tecido humano, visto que participa na formação de radicais hidroxila e estimula a peroxidação lipídica. Os resultados indicaram que as culturas probióticas poderiam ser utilizadas como antioxidantes naturais, sendo capazes de reduzir os danos oxidativos. No entanto, testes in vivo devem ser realizados para consubstanciar os efeitos em humanos.

Liu et al. (2011) estudaram o efeito de frações celulares (células tratadas pelo calor, paredes celulares brutas, extratos intracelulares e exopolissacarídeos- EPS) de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* na proliferação de células epiteliais intestinais humanas e de células de câncer de cólon. Os resultados revelaram que o EPS exibiu a maior atividade anti-proliferativa de células cancerígenas, enquanto a viabilidade das células

epiteliais intestinais não foi afetada a uma concentração de 550 Mg/ mL de EPS. Também foi observado que todas as frações celulares e EPS de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* reduziram a citotoxicidade de 4-nitroquinolina-1-óxido (4-NQO) contra as células intestinais, com o EPS mostrando a maior atividade anticitotóxica. Além disso, verificou-se que o EPS pode exercer efeitos de bloqueio e bioanticitotoxicidade tanto pelo ajuste da função de intestino quanto pela reparação das células danificadas, reduzindo assim a citotoxicidade de 4-NQO. Portanto, as diferentes frações celulares de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* poderiam ter efeito anticarcinogênico.

Mirzaei et al. (2008) avaliaram o efeito da administração oral durante 45 dias de diferentes doses de leites fermentados com *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nos parâmetros hematológicos, proteína sérica e albumina de ratos albinos. Os ratos receberam, além da dieta normal, leite (controle) ou 32, 64 e 96 mL de leites fermentados com  $10^7$  UFC do probiótico /mL do produto por dia. A avaliação dos parâmetros hematológicos demonstrou que os ratos que ingeriram o leite fermentado probiótico eram mais saudáveis. Nas menores doses, houve aumento na proteína total e albumina; e no número de células brancas; enquanto nas maiores doses o número de hematócitos, células vermelhas, hemoglobina, granulócitos e leucócitos foi aumentado, indicando que os ratos não estavam anêmicos e eram mais resistentes a infecções. Os resultados indicaram que a cultura probiótica estudada era segura para consumo e apresentava efeito imunoestimulante. O efeito nos parâmetros hematológicos foi dependente da dose de leite fermentado probiótico ministrada.

Os possíveis mecanismos de ação dos probióticos para os benefícios à saúde relatados seriam (MANNING; GIBSON, 2004; MUSSATO; MANCILHA, 2007; SHAH, 2007; VENTER, 2007):

- Modificação significativa da microbiota colônica. A ingestão de culturas probióticas teria capacidade de aumentar a quantidade de bactérias benéficas no intestino e inibir o crescimento de bactérias putrefativas ou patogênicas. Isso decorre do fato de que os produtos finais do metabolismo das bactérias benéficas, como os ácidos, diminuiriam o pH do cólon a valores abaixo dos quais os patógenos teriam capacidade de competir efetivamente. Além disso, algumas espécies de lactobacilos e bifidobactérias teriam a capacidade de excretar antimicrobianos naturais, com amplo espectro de atividade;

- Propriedades anticarcinogênicas. As culturas probióticas teriam a capacidade de inibir a formação de focos de criptas aberrantes, um biomarcador do câncer de cólon, reduzindo a incidência de tumores. Os mecanismos de ação propostos seriam: produção de metabólitos benéficos, como o butirato, capaz de estimular a apoptose de células cancerígenas e fonte energética preferida pelos colonócitos; alteração do metabolismo colônico para fermentações sacarolíticas em detrimento das proteolíticas, resultando em produtos finais mais benignos; melhoria no balanço da microbiota intestinal; normalização da permeabilidade intestinal (resultando em prevenção ou retardamento da absorção de toxinas); fortalecimento dos mecanismos de barreira intestinais; e ativação de fatores celulares não específicos (como macrófagos);
- Efeito protetor contra infecções gastrointestinais. Estaria relacionado à capacidade das culturas probióticas de inibir a adesão de patógenos às células epiteliais;
- Efeitos imunológicos. As culturas probióticas são capazes de estimular tanto mecanismos de defesa não-específicos como também certos tipos de células envolvidas na resposta imune específica. O resultado é, frequentemente, o aumento na atividade fagocitária e na quantidade de moléculas imunológicas, como a imunoglobulina A, o que pode inibir patógenos como salmonela e rotavírus.

### 2.3 PRODUTOS NÃO LÁCTEOS PROBIÓTICOS

Os produtos lácteos fermentados compreendem a maior parte dos alimentos contendo culturas probióticas (CÉSPEDES et al., 2013), sendo adequados para a incorporação de probióticos por já apresentarem imagem positiva diante dos consumidores; não necessitarem de mudanças na tecnologia envolvida e no processo de fabricação; e pela capacidade de proteger os probióticos através do trânsito gastrointestinal (AWAISHE, 2012). Além disso, o processo fermentativo age na manutenção e otimização da viabilidade microbiana; e os consumidores estão familiarizados com o fato de que esses produtos contêm micro-organismos vivos. o armazenamento refrigerado ajuda a estabilizar as culturas probióticas (BoZA-MÉNDEZ; LÓPEZ-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012).

No entanto, outros alimentos têm sido investigados como potenciais veículos carreadores dessas culturas, como: chocolate (POSSEMIERS et al., 2010); chucrute (YU et al., 2012); picles (ÇETIN, 2011); bebidas preparadas a partir de cereais (CHARALAMPOPOULOS; PANDIELLA, 2010); barras de cereais (CHEN; MUSTAPHA, 2012) e produtos de soja (SINGH et al., 2011). Produtos feitos com frutas e legumes, tais como vegetais fermentados (LEE et al., 2011), azeitonas de mesa (HURTADO et al., 2012) e frutas minimamente processadas (ALEGRE et al., 2011; ROBLE et al., 2010) também têm sido avaliados.

O desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos permitiria o consumo destas culturas benéficas por pessoas intolerantes à lactose, alérgicas às proteínas do leite, hipercolesterolêmicas, vegetarianas estritas ou residentes em locais onde os produtos lácteos não estão acessíveis (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Em bebidas não lácteas, os probióticos têm sido geralmente empregados em sucos fermentados (ELLENDERSEN et al., 2012; GODERSKA; CZARNECKA; CZARNECKI, 2007; MARHAMATIZADEH et al., 2012; NAZZARO et al., 2008; YOON; WOODAMS; HANG, 2005), devido à maior adaptação e aumento de viabilidade do micro-organismo probiótico no meio ácido durante o processo fermentativo. No entanto, a fermentação altera a consistência, aroma, e sabor dos produtos, sendo que sucos fermentados nem sempre são aceitos sensorialmente pelos consumidores (GRANATO et al., 2010).

### 2.3.1 Suco de Fruta Probiótico

Estudos que indicam os sucos de fruta como uma opção de matriz não láctea para a incorporação de probióticos são recentes e justificados pelas seguintes características e vantagens:

- são ricos em nutrientes (vitaminas, antioxidantes e polifenóis) (NAZZARO et al., 2008);
- apresentam perfis de sabor considerados agradáveis por pessoas de todas as idades (GRANATO et al., 2010);
- são consumidos regularmente, o que é essencial para se obter os efeitos benéficos associados aos probióticos (SHEEHAN; ROOS; FITZGERALD, 2007);

- são considerados produtos saudáveis pela população em geral, principalmente devido à presença no mercado de sucos de fruta fortificados com vitaminas ou cálcio (SHEEHAN; ROOS; FITZGERALD, 2007);
- não contém culturas iniciadoras que competem por nutrientes com os probióticos (COSTA et al., 2013);
- são geralmente suplementados com ingredientes antioxidantes, como o ácido ascórbico, que promovem condições anaeróbicas no meio (DING; SHAH, 2008);
- contêm quantidades significativas de açúcares, os quais podem ser metabolizados pelas culturas probióticas (DING; SHAH, 2008);
- não possuem alergênicos, como a lactose e a caseína, que impedem o consumo de produtos lácteos por segmentos da população (NAZARRO et al., 2007);
- são naturalmente isentos de colesterol (BEVILACQUA et al., 2013); e
- o seu trânsito no trato gastrointestinal é relativamente rápido, o que reduz o tempo de exposição dos probióticos a ambientes hostis, como o meio ácido do estômago (MOUSSAVI, 2012).

No entanto, sucos de fruta têm apresentado limitações à adição de culturas probióticas, tais como:

- acidez acentuada (ANTUNES et al., 2013);
- presença de oxigênio (DING; SHAH, 2008);
- quantidades insuficientes de peptídeos e aminoácidos livres necessários para os probióticos (ANTUNES et al., 2013);
- presença de conservantes, aromatizantes e saborizantes, os quais podem diminuir a viabilidade das culturas probióticas (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005);
- alterações nas características sensoriais dos produtos com a adição dos probióticos, incluindo desenvolvimento de aromas (perfumado, lácteo) e sabores (amargo, ácido) desagradáveis (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004b; GRANATO et al., 2010);

- as culturas probióticas são adicionadas como ingredientes, não tendo a capacidade de se multiplicar no alimento, o que demanda micro-organismos com boa estabilidade (GRANATO et al., 2010); e
- devido à maior utilização de embalagens cartonadas pela indústria de alimentos, o armazenamento de sucos geralmente é realizado à temperatura ambiente. No entanto, sucos pasteurizados e conservados mediante refrigeração também estão disponíveis no mercado.

Segundo Schimdt e Pereira (2011), o primeiro desafio na formulação de sucos adicionados de probióticos é o de fazer com que essa bebida não se descaracterize em demasia, tornando-se uma bebida fermentada. Para isso, é preciso que a metabolização dos componentes do suco por parte dos micro-organismos probióticos seja minimizada. Além disso, é preciso avaliar diferentes culturas probióticas, a fim de verificar a sua capacidade de alterar o perfil de sabor dos produtos (LUCKOW et al., 2005).

O segundo desafio no desenvolvimento de bebidas probióticas é fazer com que o micro-organismo mantenha a sua viabilidade e funcionalidade durante a vida útil do produto e, principalmente, no organismo humano. Provavelmente, este seja o fator que mais limite o desenvolvimento de bebidas de fruta com características probióticas (SCHIMDT; PEREIRA, 2011). A viabilidade das culturas probióticas em sucos de fruta é dependente, principalmente, do tipo de fruta utilizado na sua formulação, do pH e do teor de oxigênio dissolvido no meio, e da cepa empregada (ANTUNES et al., 2013).

Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007) avaliaram a tolerância à acidez e a processos tecnológicos (pasteurização e tratamento a alta pressão) de diferentes cepas probióticas (*L. salivarius* UCC118, *L. salivarius* UCC500, *B. lactis* BB-12, *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* GG e *L. paracasei* NFBC43338) durante armazenamento em suco de laranja, abacaxi e oxicoco. Os resultados indicaram diferenças significativas entre as culturas com relação à tolerância à acidez, com *L. casei* DN-114 001, *L. rhamnosus* GG e *L. paracasei* NFBC43338 apresentando maiores taxas de sobrevivência. Nenhuma cepa manteve concentrações adequadas ( $>10^6$  UFC/mL) nos produtos após os tratamentos térmico ou a alta pressão, indicando que as culturas probióticas devem ser adicionadas após esses processos. Os autores concluíram que as cepas probióticas do grupo *L. casei* apresentaram maior potencial para serem adicionadas a sucos de fruta, devido à sua tolerância a ambientes ácidos. Cepas de *L. casei* também foram recomendadas por Céspedes et al. (2013) para inclusão em sucos de laranja, maçã, multifrutas e limão.

### 2.3.1.1 Suco de maçã probiótico

Na década de 50, foram instalados os primeiros pomares comerciais de maçã no interior de São Paulo (Região Sudeste), os quais tecnicamente não foram bem-sucedidos devido às características edafoclimáticas, que não eram adequadas às variedades selecionadas para o cultivo. Na década de 70, foram instalados com sucesso os pomares comerciais nas regiões elevadas dos estados sulinos, compreendendo o Sul do Paraná, a Região Serrana de Santa Catarina e a Serra Gaúcha do Norte do Estado do Rio Grande do Sul (WOSIACKI; NOGUEIRA; SILVA, 2000).

Em relação às cultivares, mais de 95% dos pomares brasileiros são formados principalmente pelas cultivares Gala - e suas mutações Royal Gala, Imperial Gala, e Mondial Gala - e Fuji - dentre elas, Fuji Suprema e Kiko -, vindo em seguida a Golden Delicious (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

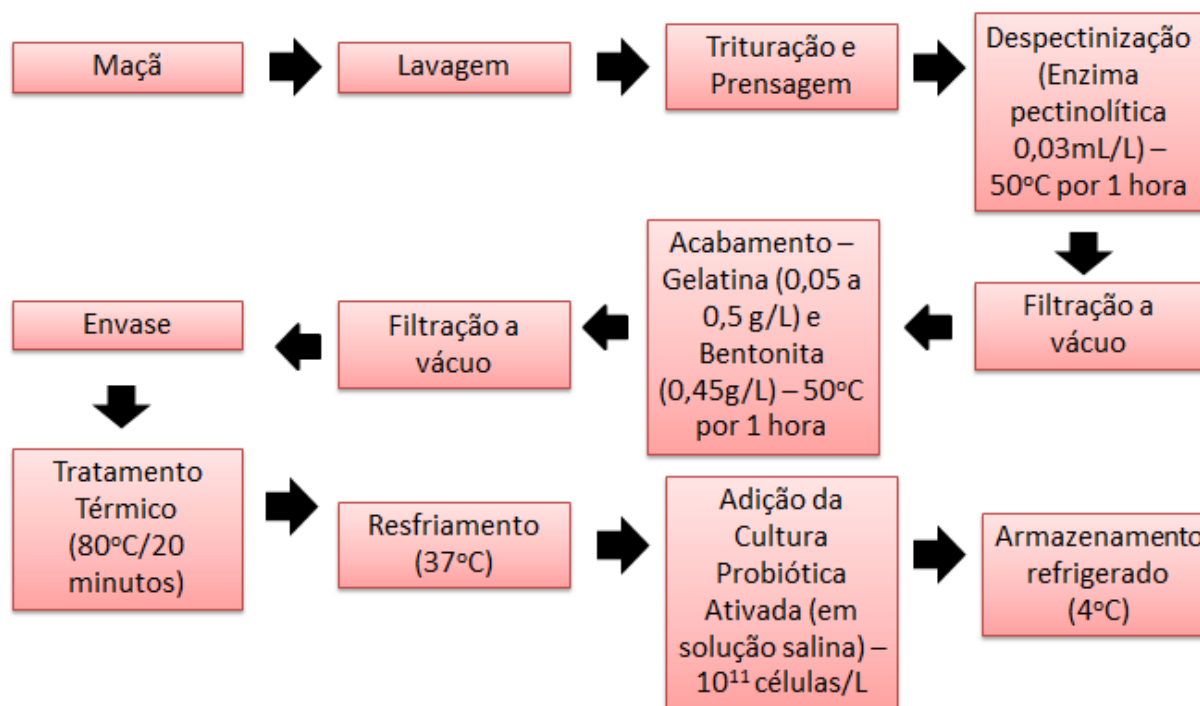
A maçã tem valor reconhecido para a saúde humana devido ao seu conteúdo de compostos bioativos, os quais são promotores de saúde. Dentre os compostos bioativos da maçã encontram-se os polifenóis, com ação antioxidante, e as pectinas, promotoras do equilíbrio do trânsito gastrointestinal (NOGUEIRA et al., 2003). Os polifenóis da maçã fazem parte do grupo dos fitoquímicos, podendo reduzir o risco de algumas doenças crônicas como câncer e doenças cardiovasculares, agindo por meio da retirada do meio de radicais livres, oxigênio livre e de radicais peróxidos (NEVES, 2005).

Na comercialização das maçãs, a etapa de classificação gera um descarte de 15 a 30% de frutas que não alcançaram o padrão exigido para o consumo. As frutas que apresentam algum defeito de ordem física ou fisiológica são destinadas ao setor industrial para a elaboração de sucos, vinhos, destilados e vinagres; enquanto que as com sintomas de doenças são sumariamente eliminadas como resíduo agroindustrial (NOGUEIRA et al., 2007).

Aproximadamente 15% da produção nacional (descarte) de maçã são transformados em suco, sendo que a maior parte destina-se à exportação. Entre a fruta in natura e o suco, a maçã já agrega mais de US\$ 30 milhões anuais à receita cambial brasileira. Porém, a produção e a comercialização do suco de maçã no Brasil ainda são baixas, enquanto na Europa e nos Estados Unidos o suco de maçã é um dos mais populares, chegando a ser apontado como o segundo mais consumido no mundo (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

Na Figura 1 está apresentado o fluxograma de fabricação de sucos clarificados de maçã probióticos.

**Figura 1** – Processamento de suco clarificado de maçã probiótico



**Fonte:** Próprios autores

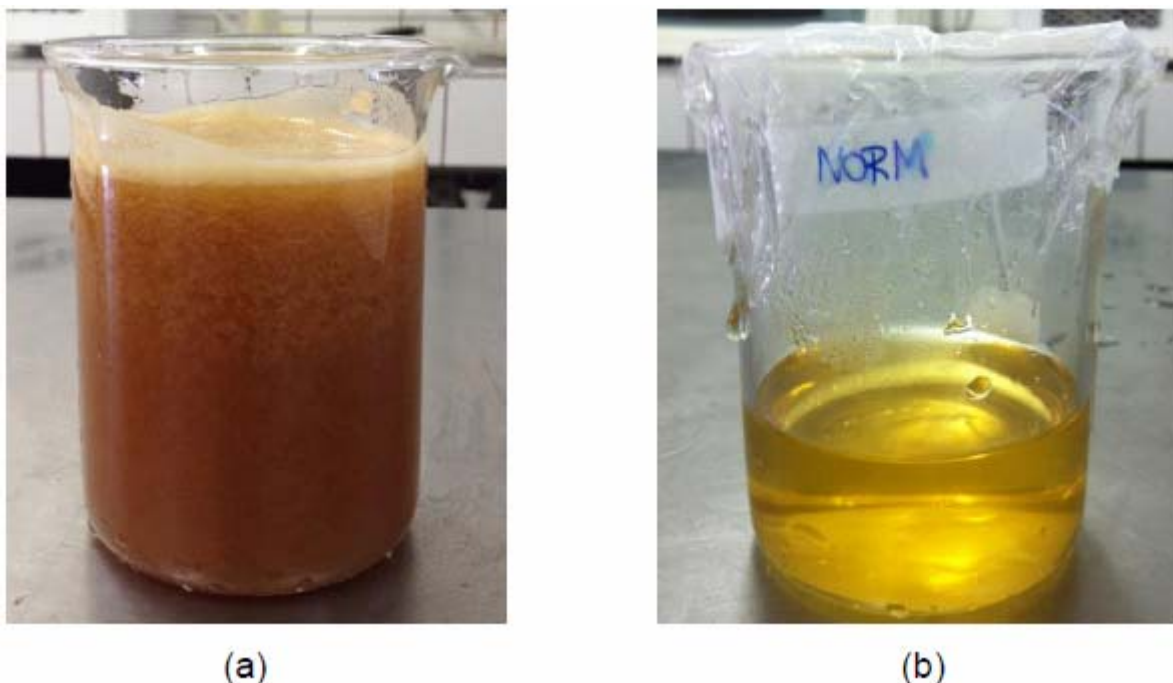
O processo de fabricação do suco de maçã se inicia com a lavagem das frutas frescas. Após a lavagem, as frutas são trituradas e prensadas, a fim de aumentar o rendimento em suco. O suco bruto é turvo, viscoso, com cor escura e contém quantidades significativas de componentes coloidais em suspensão (Figura 2a), estabilizados por polissacarídeos, como a pectina e o amido (ALVAREZ et al., 2000).

Embora haja mercado para a comercialização de suco de maçã em sua forma bruta, a grande maioria dos sucos é comercializada em sua forma clarificada (VELEIRINHO; LOPES-DA-SILVA, 2009). Isso porque, durante o processo de clarificação as partículas em suspensão são removidas por filtração, melhorando a estabilidade e a aparência do suco e, conseqüentemente, aumentando a aceitação pelo consumidor (GOKMEN et al., 2001).

A clarificação dos sucos de maçã envolve a retirada de componentes, como a pectina, responsáveis pela turbidez dos mesmos, e, portanto, se inicia com a despectinização, por meio da utilização de enzimas pectinolíticas. As enzimas hidrolisam a pectina e ocasionam a floculação dos complexos pectina-pectina, diminuindo a viscosidade

do sistema e facilitando o processo de filtração. A despectinização é geralmente realizada a 50°C por 1 a 2 horas (ALVAREZ et al., 2000).

**Figura 2** – Suco de maçã bruto (a) e clarificado (b)



Fonte: Próprios autores

Após o tratamento enzimático, os sólidos sedimentados são removidos por filtração convencional ou à vácuo; assim como, por ultrafiltração (ALVAREZ et al., 2000). Então, agentes de refino são utilizados para promover o acabamento do processo de clarificação. O tratamento com gelatina (0,05 a 0,5 g/L) é um método muito comum de acabamento, e, na maioria dos casos, esta proteína apresenta cargas positivas no pH intrínseco do suco (3,4 a 4,2), sendo particularmente útil na remoção de substâncias pécticas. O seu uso isolado pode levar a uma situação de hiper-refino, quando a turvação ocorre pelo excesso de agente de clarificação. Por isso, a utilização conjunta da gelatina com outros coadjuvantes é recomendável (EISELE; DRAKE, 2005; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

A bentonita é um material argiloso, cujo componente principal é a montmorillonita, argila composta de silicato contendo metais, como ferro, alumínio e manganês, atuando como trocador de íons com proteínas carregadas positivamente, e, portanto, sendo capaz de retirá-las do meio (ONSEKIZOGLU; BAHCECI; ACAR, 2010; WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010). O suco de maçã clarificado (Figura 2b) apresenta boa aparência, sendo límpido e claro, sem turvação aparente; consequência de um processo enzimático bem sucedido (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

Para sucos pasteurizados, após a clarificação, os mesmos são envasados e submetidos a tratamento térmico. O tratamento térmico para a estabilização de suco de maçã, dada as condições intrínsecas da matéria-prima, pode ser relativamente brando (80°C por 20 minutos), inibindo a atividade de escurecimento enzimático e o crescimento de microorganismos (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010).

O processo de fabricação de sucos clarificados de maçã probióticos é semelhante ao processo tradicional, exceto pela adição da cultura probiótica. Após a pasteurização dos sucos, os mesmos são resfriados a temperaturas inferiores a 37°C e as culturas probióticas são adicionadas. Os sucos são, então, armazenados em temperatura de refrigeração (4°C) (MOUSSAVI, 2012).

Em produtos lácteos fermentados, as culturas probióticas geralmente são incorporadas diretamente ao leite, mediante a introdução de quantidades adequadas das mesmas, em pó ou congeladas. Como a cultura probiótica participa do processo fermentativo, com diminuição gradativa do pH, a mesma se torna mais adaptada ao meio (SHAH, 2000). No caso de sucos de fruta, essa prática resultaria na exposição direta das culturas probióticas às condições ácidas dos produtos; ocasionando perda substancial de viabilidade. Desta forma, os probióticos são, geralmente, propagados em meios de cultura e condições ótimas de tempo e temperatura, a biomassa separada por centrifugação e re-suspensa em solução salina; sendo então, adicionados aos sucos (AWAISHEH, 2012). Assim, se obtém inóculos com maior concentração da cultura probiótica e mais estáveis às condições adversas do meio.

O suco de maçã apresenta vantagens para ser um veículo carreador de culturas probióticas, a saber: contém quantidades significativas de açúcares (sacarose, frutose e glicose), promotores do crescimento de probióticos (EISELE; DRAKE, 2005); sua acidez (pH 3,4 a 4,2) é menos acentuada do que a de outros sucos, como os provenientes de frutas cítricas (pH 2,8 a 3,5) (DING; SHAH, 2008; EISELE; DRAKE, 2005); não apresenta naturalmente inibidores de crescimento de culturas probióticas, especialmente do grupo *L. casei* (VINDEROLA et al., 2002); e é o segundo suco mais consumido no mundo (WOSIACKI; NOGUEIRA, 2010; GEISLER, 2013).

## 2.4 PREBIÓTICOS

Prebióticos são componentes alimentares não viáveis que conferem benefícios à saúde do hospedeiro associados à modulação de sua microbiota (FAO/ AGNS, 2007). Para ser classificado como prebiótico, o componente não pode ser hidrolisado ou absorvido no trato gastrointestinal superior; deve ser substrato seletivo para um ou um número limitado de bactérias colônicas; alterar a composição da microbiota para uma composição mais saudável; e, preferencialmente, induzir efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (MANNING; GIBSON, 2004). Quanto às propriedades tecnológicas requeridas, deve ser estável durante a estocagem, não requerer refrigeração e ser de incorporação fácil e eficiente em alimentos processados (TUNGLAND, 2000).

Como os prebióticos são componentes alimentares não-viáveis, a gama de produtos aos quais podem ser adicionados é muito maior do que para as culturas probióticas, visto que para estas a manutenção da viabilidade é imprescindível. Além disso, os prebióticos têm a vantagem de serem estáveis a processos térmicos e à exposição ao oxigênio (VENTER, 2007). No entanto, geralmente, em pHs inferiores a 4, tratamentos térmicos a temperaturas muito elevadas ou estocagem prolongada à temperatura ambiente, os prebióticos podem ser hidrolisados, resultando em perda das propriedades funcionais e de saúde (FRANCK, 2002; VORAGEN, 1998). Contudo, sua hidrólise é limitada a menos de 10% se os produtos apresentarem mais do que 70% de umidade, forem estocados a temperaturas inferiores a 10°C ou tiverem tempo de vida útil curto (FRANCK, 2002; ROBERFROID, 2005).

Entre os prebióticos estudados incluem-se: frutanos tipo inulina (fruto-oligossacarídeos (FOS), oligofrutose e inulina), isomalto-oligossacarídeos (IMO), galato-oligossacarídeos (GOS), polidextrose, lactulose e amido resistente (SIRÓ et al., 2008). No entanto, apenas frutanos tipo inulina, lactulose e galato-oligossacarídeos têm sua ação prebiótica devidamente documentada e reconhecida (AL-SHERAJI et al., 2013; ANADÓN et al., 2010; ROBERFROID, 2005); e apenas os frutanos tipo inulina apresentam alegação de efeito sobre a composição da microbiota intestinal permitida pela legislação brasileira. A utilização da alegação de propriedade funcional de FOS e da inulina é permitida desde que o produto contenha no mínimo 3 g para alimentos sólidos e 1,5 g para alimentos líquidos (ANVISA, 2008a).

Frutanos tipo inulina estão amplamente distribuídos na natureza em uma variedade de plantas (Quadro 2).

No entanto, os níveis encontrados nos alimentos são baixos para serem capazes de exercer efeito benéfico à saúde; sendo preconizada a ingestão de pelo menos 4 gramas ao dia destes componentes para que se possa obter os efeitos funcionais e de saúde associados aos prebióticos (AL-SHERAJI et al., 2013; MANNING; GIBSON, 2004).

**Quadro 2** – Ocorrência natural de frutanos tipo inulina em alimentos

Fonte	Conteúdo de frutanos (%)
Abobrinha	2,4
Alcachofra	1,2
Alcachofra de Jerusalém	12,2
Alho	17,4
Arroz	0,5
Banana	0,5
Cebola	6,3
Centeio	0,75
Cevada	1,0
Chicória	20
Dente de Leão	13,5
Melancia	0,32
Melão	0,21
Nectarina	0,21
Pêssego	0,4
Toranja	0,23
Trigo	2,5
Yacon	11

**Fonte:** Van Loo (1995); Muir et al. (2007)

A produção comercial de inulina é realizada a partir de sua extração de raízes de chicória (*Cichorium intybus*) (Figura 3), preferida por possuir alta concentração deste componente (mais de 70% em peso seco) e teores constantes durante o ano todo (FRANCK, 2002). A inulina é composta de uma mistura de oligômeros e polímeros de frutose, na qual o número de unidades de monossacarídeos varia de 2 até mais de 65, com um grau de polimerização (DP) médio na inulina nativa de 12 (ROBERFROID, 2005).

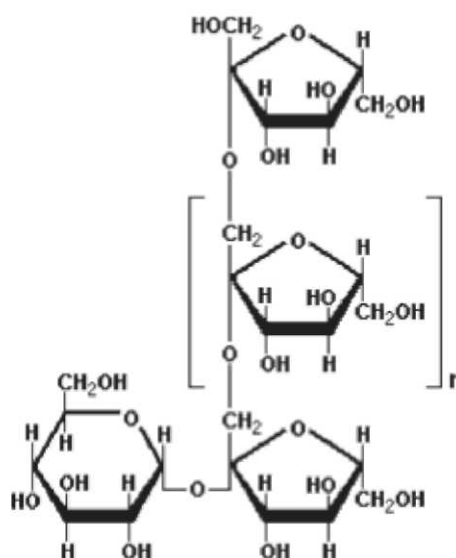
**Figura 3** – Chicória (*Cichorium intybus*)



**Fonte:** Kelly (2008)

Quanto às oligofrutoses e os fruto-oligossacarídeos (FOS), alguns pesquisadores os consideram como sendo termos sinônimos, designando misturas de frutanos tipo inulina com DP máximo de 10 (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; FRANCK, 2002; ROBERFROID, 2005). No entanto, outros definem fruto-oligossacarídeos como sendo os frutanos tipo inulina sintetizados a partir da sacarose, e oligofrutoses aqueles produzidos por hidrólise parcial da inulina (CARABIN; FLAMM, 1999; COUSSEMENT, 1999; VAN DE WIELE et al., 2007). A divisão torna possível discriminar se o ingrediente utilizado foi sintetizado quimicamente a partir da sacarose ou extraído de raízes de chicória e hidrolisado parcialmente (PIMENTEL; GARCIA; PRUDENCIO, 2012c). A estrutura química de frutanos tipo inulina está apresentada na Figura 4.

**Figura 4** – Estrutura química de frutanos tipo inulina (n=número de monossacarídeos)



**Fonte:** Gibson; Delzenne (2008).

As oligofrutoses podem ser encontradas comercialmente na forma de pó ou xaropes incolores (75% matéria seca). Esse ingrediente tem propriedades tecnológicas comparáveis às do açúcar e xaropes de glicose, por possuir açúcares livres (FRANCK, 2002).

Alguns benefícios à saúde associados aos prebióticos, particularmente inulina e oligofrutoses, são o aumento na absorção de minerais provenientes da dieta; alívio da constipação; redução dos lipídios sanguíneos; manutenção dos açúcares sanguíneos; inibição de patógenos; e redução do risco de câncer de cólon (AL-SHERAJI et al., 2013; MANNING; GIBSON, 2004). A extensão e o tipo de benefício à saúde proporcionados pelos prebióticos estariam relacionados ao seu grau de polimerização. Prebióticos com maior grau de polimerização, como a inulina, seriam fermentados de forma mais lenta, permitindo penetração mais efetiva através do cólon e tendo efeito mais pronunciado nas regiões distais. Já as oligofrutoses, de baixo grau de polimerização, seriam rapidamente fermentadas, e teriam efeito nas regiões proximais do intestino (GIBSON; DELZENNE, 2008).

Um possível efeito adverso do consumo destes componentes seria o desconforto intestinal. Isso se deve ao fato de que as oligofrutoses podem ser hidrolisadas e completamente fermentadas pela microbiota colônica, resultando na produção de gases, como dióxido de carbono e hidrogênio (ROBERFROID, 2005). Contudo, as bifidobactérias e os lactobacilos não produzem gás como parte do seu metabolismo e, portanto, se a produção de gás estiver ocorrendo, é porque a dosagem de prebiótico está muito elevada e o efeito prebiótico está comprometido, ou seja, bactérias diferentes das culturas probióticas

estariam envolvidas na fermentação (KOLIDA; GIBSON, 2007). Estudos indicam que doses de até 20 g/dia de oligofrutoses são toleradas; e somente teores superiores a 30 g/dia poderiam desencadear diarreia em humanos, devido ao efeito osmótico (AL-SHERAJI et al., 2013).

Os prebióticos são adicionados a leites fermentados durante a padronização dos sólidos totais e, no caso de sucos de fruta, como ingredientes antes do tratamento térmico, a fim de eliminar micro-organismos patogênicos ou deteriorantes que possam estar presentes nos mesmos. A fim de obter os benefícios à saúde associados ao seu consumo, a sua estabilidade nos produtos adicionados deve ser garantida (COURTIN et al., 2009).

## 2.5 SIMBIÓTICOS

Produtos que contém tanto prebióticos quanto probióticos são denominados simbióticos (SHAH, 2007). Os simbióticos promovem o crescimento de micro-organismos benéficos já existentes no cólon, assim como, aumentam a sobrevivência, implantação e crescimento daqueles que estão sendo adicionados com o produto (LIONG; SHAH, 2005).

Os alimentos simbióticos, portanto, são mais do que apenas uma mistura de probióticos e prebióticos, sendo necessário que haja sinergia entre os dois componentes. O desenvolvimento desses alimentos requer um longo processo de avaliação, onde prebióticos selecionados e cepas probióticas são testados, tanto in vitro como in vivo, com a finalidade de encontrar os pares com maior atividade e sinergia (HUEBNER; WEHLING; HUTKINS, 2007). Esse tipo de produto teria maior valor agregado se o prebiótico pudesse proteger as células probióticas durante o processamento, formulação e/ou armazenamento dos produtos e, assim, melhorar a sua viabilidade e estabilidade (SAARELA et al., 2006).

Saarela et al. (2006) relatam que as pesquisas acerca de compostos funcionais como probióticos e prebióticos têm sido direcionadas ao aspecto de promoção da saúde, sendo que o desempenho tecnológico de prebióticos como protetores de culturas probióticas não tem sido avaliado.

Shin et al. (2000) demonstraram que a adição de 5% de galato-oligosacarídeos e, especialmente, de fruto-oligosacarídeos (FOS) a leite desnatado aumentou a sobrevivência de duas cepas de *Bifidobacterium* durante o armazenamento refrigerado (4°C).

Estudos acerca de sucos de fruta simbióticos ainda são escassos (SANTOS et al., 2008; LUCKOW; DELAHUNTY, 2004b; PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011) sendo que nenhum deles utilizou a maçã como matéria-prima.

## 2.6 SUBSTITUTOS DE AÇÚCAR

Problemas de saúde como obesidade, diabetes, e hipertensão; ou preocupações com a estética corporal têm estimulado a pesquisa e o desenvolvimento de produtos sem adição de açúcar ou com baixos teores desse componente (JAIN et al., 2013; MARCELLINI; CHAINHO; BOLINI, 2005). Além disso, a Organização Mundial de Saúde propôs a redução no consumo de açúcares para níveis inferiores a 5% da energia total diária, valor equivalente a 25 gramas diários (WHO, 2014).

O açúcar apresenta uma variedade de funções em alimentos, tais como a de adoçar; promover o aroma e o gosto; dar corpo; melhorar a textura; estender a vida útil; e melhorar a cor. Em produtos sem adição de açúcar, a doçura é promovida pela adição de substitutos de açúcar, tais como edulcorantes, adoçantes, dentre outros. No entanto, embora a doçura seja conseguida com a adição de substitutos de açúcar, produtos sem açúcar podem apresentar problemas de aparência, textura e sensação tátil oral (AUERBACH; DEDMAN, 2012; RONDA et al., 2005).

Algumas características importantes para a seleção de substitutos de açúcar são: possuir o gosto e as propriedades funcionais do açúcar; ter baixa densidade calórica em uma base equivalente de doçura; ser fisiologicamente inerte e sensorialmente aceitável; auxiliar na manutenção ou redução de peso e na melhoria da diabetes; auxiliar na redução do risco de cáries dentárias; e ser comercialmente viável (MALIK; JEYARANI; RAGHAVAN, 2002). Além disso, os fatores individuais destes compostos, tais como a intensidade e persistência do gosto doce e a presença ou não do gosto residual, são fundamentais para a aceitação, preferência e escolha por parte dos consumidores (CADENA; BOLINI, 2012; MARCELLINI; CHAINHO; BOLINI, 2005).

Uma variedade de edulcorantes/adoçantes de alta intensidade está disponível no mercado para utilização pelas indústrias de alimentos, incluindo a sacarina, acessulfame-K, aspartame, estévia e sucralose. Além disso, outros compostos têm sido avaliados como substitutos de açúcar, como as oligofrutoses (JAIN et al., 2013). A utilização de substitutos de açúcar só será bem sucedida se os mesmos demonstrarem ser capazes

de manter a qualidade sensorial dos produtos quando comparados aos adoçados com sacarose (PORTMAN; KILCAST, 1996).

O desenvolvimento de bebidas de frutas com baixo teor de calorias e níveis reduzidos de sacarose, sem alterar as características sensoriais, pode auxiliar no aumento do consumo de sucos e néctares de fruta (CADENA et al., 2013).

Assim, a utilização da oligofrutose ou a sucralose como substitutos de açúcar é uma opção em função das características e vantagens descritas a seguir.

### 2.6.1 Oligofrutose

As oligofrutoses teriam algumas vantagens quando comparadas com a sacarose (CRITTENDEN; PLAYNE, 1996; MUSSATO; MANCILHA, 2007; ROBERFROID, 1999):

- não são metabolizadas pelos micro-organismos da biota bucal, conseqüentemente, não ocorre produção de ácidos e poliglucanos, os quais são compostos cariogênicos;
- não são digeridas pelos humanos, devido à ausência de enzimas necessárias para hidrolisar as ligações 3 existentes entre os monossacarídeos. Portanto, não teriam a capacidade de alterar os níveis glicêmicos e insulínicos no sangue, podendo ser utilizadas em alimentos para consumo de diabéticos;
- apresentam baixo valor calórico ( $1,5 \text{ kcal g}^{-1}$ ); e
- seu maior peso molecular pode promover um aumento na viscosidade dos produtos nos quais foram adicionadas, podendo atuar como agente de corpo.

No entanto, a doçura das oligofrutoses na forma pura é de 30 a 60% quando comparada à da sacarose, portanto, pode ser necessário combiná-las com edulcorantes para se obter níveis de doçura desejáveis, sendo capazes de mascarar possíveis gostos residuais ocasionados pelos mesmos (APOLINÁRIO et al., 2014; FRANCK, 2002; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

O potencial de substituição de açúcar das oligofrutoses já foi avaliado em diversos produtos, tais como: biscoitos (GALLAGHER et al., 2003); bolos (RONDA et al., 2005); bebidas lácteas achocolatadas (PENHA et al., 2009); chocolate (AIDOO et al., 2013); geleias; sorvetes (MURPHY, 2001) e sucos de abacaxi, manga e laranja (RENUKA et al.,

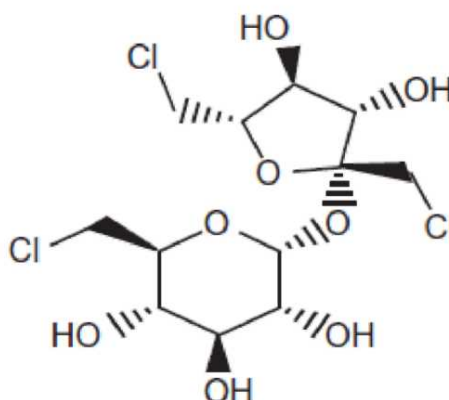
2009). No geral, as oligofrutoses foram caracterizadas como um substituto parcial do açúcar, por possuírem baixo poder adoçante quando comparado ao da sacarose (APOLINÁRIO et al., 2014); influenciarem negativamente as características sensoriais dos produtos quando adicionadas em quantidades elevadas (RONDA et al., 2005); e pela recomendação máxima de ingestão, devido à produção de gases, o que limita a concentração que pode ser adicionada aos produtos (ROBERFROID, 2005).

### 2.6.2 Sucralose

A sucralose (SPLENDA®) foi descoberta por meio de um programa de pesquisa realizado pela Universidade de Londres durante os anos 70, onde se observou que a cloração seletiva da molécula de sacarose poderia resultar em um composto intensamente doce (GOLDSMITH; MERKEL, 2001). A cloração é realizada por meio de um processo de múltiplos passos, o qual substitui, seletivamente, três grupos hidroxila por três átomos de cloro na molécula de sacarose (SHIBAO et al., 2009). A substituição é realizada nas posições 1 e 6 da molécula de frutose e na posição 4 da molécula de glicose (GOLDSMITH; MERKEL, 2001). Na Figura 5 está apresentada a estrutura química da sucralose.

A cloração produz mudanças notáveis na intensidade de doçura e na estabilidade da sacarose, sem comprometer o gosto proporcionado por ela (BASU; SHIVHARE; SINGH, 2013). A ligação glicosídica resultante na sucralose é muito mais resistente à hidrólise ácida e enzimática do que a do composto de origem, e, portanto, é responsável pela incapacidade de mamíferos de digerir-la e metabolizá-la como uma fonte de energia. Consequentemente, a sucralose é não calórica (GOLDSMITH; MERKEL, 2001).

**Figura 5** – Estrutura química da sucralose



**Fonte:** Basu; Shivhare; Singh (2013)

O poder adoçante da sucralose é, aproximadamente, seiscentas vezes maior do que o da sacarose (BARRY, 2011; PSZCZOLA, 1999). No entanto, a composição físico-química do meio, a temperatura em que o produto é consumido, o pH, e outros ingredientes presentes têm influência sobre a percepção de doçura do edulcorante (GOLDSMITH; MERKEL, 2001).

A sucralose é comercializada na forma de pó branco, cristalino, e não higroscópico, sendo solúvel em água, etanol, e metanol; e tendo efeito negligenciável no pH dos produtos. A viscosidade de suas soluções é semelhante às de sacarose (GOLDSMITH; MERKEL, 2001). Apresenta boa estabilidade em alimentos secos e de alta umidade e em condições variadas de processamento e estocagem. No entanto, em temperaturas elevadas, uma ligeira decomposição pode ocorrer, ocasionando alteração de cor do branco para o castanho (O'DONNEL, 2007).

Cavallini e Bolini (2005), em estudo com suco de manga reconstituído, observaram que sucos com sucralose apresentaram leve gosto residual amargo e de curta duração, diferentemente de sucos com outros edulcorantes (ciclato/sacarina e estévia), os quais proporcionaram gosto residual amargo intenso e de média a longa duração aos produtos. O gosto residual amargo observado para a sucralose foi semelhante ao da sacarose. Marcellini, Chainho e Bolini (2005) avaliaram a aceitação de suco de abacaxi concentrado reconstituído e adoçado com diferentes edulcorantes (ciclato/sacarina, sucralose, aspartame puro, estévia) ou sacarose. Os autores relataram que o suco adoçado com sucralose foi mais aceito do que os adicionados de outros edulcorantes e do que o suco com sacarose. Portanto, a sucralose tem sido considerada o edulcorante que melhor substitui a sacarose, já que ocasiona poucas alterações sensoriais nos produtos quando comparada a outros edulcorantes (CADENA et al., 2013).

Estudos acerca do possível efeito deletério da sucralose mostraram que esse edulcorante é seguro para consumo humano. Seu uso é permitido com limites máximos no Brasil e na União Européia e quantum satis nos Estados Unidos (SHIBAO et al., 2009). No Brasil, a permissão é de 0,02 a 0,04%, dependendo do tipo de produto, sendo de 0,02% para bebidas com informação nutricional complementar com substituição parcial de açúcares e 0,025% para substituição total (ANVISA, 2008b).

Uma desvantagem da utilização de sucralose seria o seu custo elevado. No entanto, os consumidores estão dispostos a pagar um maior preço por produtos sem ou com teor reduzido de açúcar. Além disso, Barry (2011) formulou um suco de romã com substituição de 6,5% da sacarose por 1,5% de frutose e uma pequena quantidade de

sucralose e obteve uma redução de 40% no custo do produto final. Al-Dabbas, Maher e Al-Qudsi (2012) avaliaram o efeito da substituição parcial da sacarose por sucralose em néctares de laranja. Os resultados indicaram que ao substituir 25% da sacarose por sucralose houve uma redução no custo dos produtos de US\$ 187,5 por tonelada de sacarose utilizada. Para uma produção anual e considerando a utilização de 2 toneladas de sacarose diárias, a redução nos custos dos néctares seria de US\$ 11.250,00 por ano. Portanto, é possível formular sucos com sucralose como substituto de açúcar e com custos menores de produção.

## 2.7 Análise Sensorial de Sucos de Fruta Funcionais

A análise sensorial de sucos de fruta adicionados de componentes funcionais, como probióticos e prebióticos e de sucralose, tem fundamental importância, pois se faz necessário entender o impacto sensorial desses componentes em sistemas não lácteos; e determinar como a adição influencia a aceitação e a preferência dos consumidores. Além disso, é importante entender as características dos sucos que mais são afetadas por estes componentes (aparência, aroma, sabor ou textura), com a finalidade de direcionar o desenvolvimento e formulação desses produtos (GRANATO et al., 2010; LUCKOW; DELAHUNTY, 2004a).

O impacto sensorial da adição de probióticos e prebióticos a alimentos ainda não foi extensivamente estudado, contudo, é possível assumir que produtos adicionados destes ingredientes funcionais provavelmente terão perfis de sabor diferenciados em relação aos produtos sem adição (GRANATO et al., 2010). A adição de prebióticos a alimentos tem maior influência na textura e aroma dos produtos, enquanto a adição de probióticos tem maior efeito no sabor e aroma. No primeiro caso, o ingrediente prebiótico é adicionado à matriz do produto, conferindo e reforçando interações já existentes entre diferentes componentes do alimento. No segundo caso, o metabolismo da cultura probiótica pode resultar na produção de componentes que contribuem negativamente ao aroma e sabor dos produtos (CRUZ et al., 2010).

Em estudo com suco de laranja, Luckow e Delahunty (2004b) observaram que julgadores treinados foram capazes de distinguir sensorialmente sucos funcionais contendo probióticos e prebióticos daqueles sem adição. Os sucos funcionais foram descritos como tendo aroma "lácteo" e sabor "arenoso", "artificial", "pungente" e "medicinal". Além disso, na avaliação com consumidores, os sucos funcionais tiveram menor aceitabilidade do

que os sucos tradicionais. Devido às características negativas observadas, os consumidores indicaram que não estão dispostos a consumir os sucos na quantidade ou frequência requerida para obter os benefícios à saúde associados aos componentes funcionais.

Bevilacqua et al. (2013) avaliaram a aceitação de sucos de maçã e de frutas vermelhas com extrato de citros como conservante natural e adicionados de culturas probióticas (*L. plantarum* c19 e *B. animalis* ssp. *lactis* DSMZ 10140). As culturas probióticas não afetaram a aceitação dos sucos, pois os produtos probióticos foram igualmente aceitos aos convencionais.

Portanto, não está claro se todas as culturas probióticas proporcionam ao produto o mesmo sabor e nos mesmos níveis de intensidade (LUCKOW et al., 2005).

Dentre os métodos sensoriais, os testes afetivos e descritivos são de suma importância quando se desenvolvem novos produtos.

### 2.7.1 Testes Afetivos

Os testes afetivos têm por objetivo conhecer a opinião de um determinado grupo de consumidores que consome o produto de interesse, ou seja, da população alvo do produto. Essa opinião pode ser dada com relação ao produto de uma forma global ou a características específicas, tais como aparência, aroma, sabor e textura (CHAVES; SPROSSER, 2001).

Nos testes afetivos a seleção da equipe não está vinculada à capacidade do julgador de discriminar amostras ou descrever atributos de um produto, mas sim à busca de consumidores que se incluam como público-alvo ou consumidores em potencial do produto. Alguns critérios nessa escolha podem ser considerados, dentre eles, frequência de consumo, idade, sexo e estado civil (DELLA LUCIA; MINIM; CARDELLO, 2006).

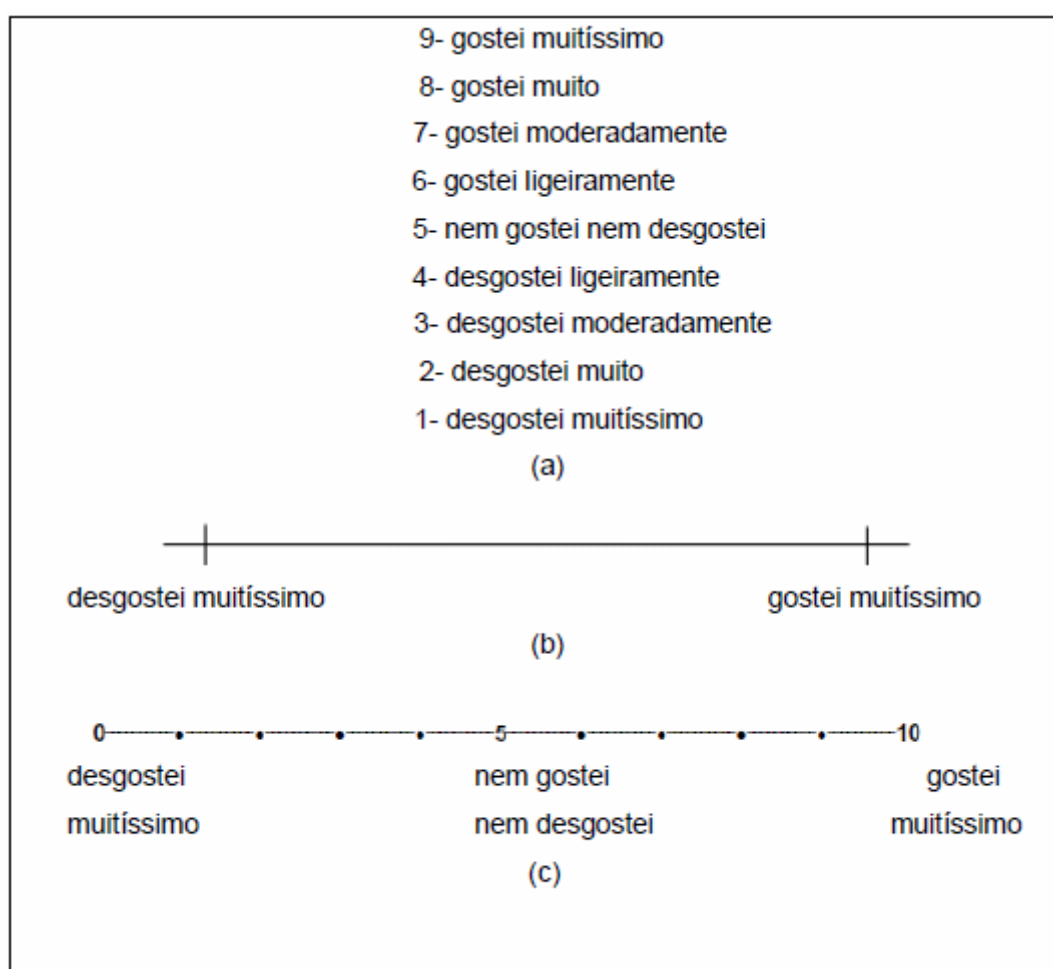
Os testes afetivos podem ser de preferência ou aceitação. Os testes de preferência avaliam somente se os julgadores preferiram certa amostra em relação à outra (teste de comparação pareada); ou ordenar o grau de preferência entre três ou mais amostras (teste de ordenação-preferência) (STONE; SIDEL, 2004).

No teste de aceitação, os produtos são apresentados aos consumidores e os mesmos são solicitados a indicar o quanto gostaram ou desgostaram, por meio de uma escala. A escala mais comumente utilizada é a escala hedônica de 9 pontos, sendo que pelo menos 50 consumidores são necessários para determinar a aceitação de um produto com

grau de confiabilidade adequado, uma vez que há uma grande subjetividade na avaliação sensorial (DRAKE, 2007).

A escala hedônica de 9 pontos (Figura 6a), desenvolvida por Jones et al. (1955) e Peryan e Pilgrim (1957), é uma escala bipolar balanceada ao redor da categoria neutra (5 = nem gostei, nem desgostei) com quatro categorias positivas (6, 7, 8 e 9 = gostei ligeiramente, moderadamente, muito e muitíssimo, respectivamente) e quatro negativas (1, 2, 3, e 4 = desgostei muitíssimo, muito, moderadamente e ligeiramente, respectivamente). Portanto, as categorias são rotuladas com frases representando os vários graus de afetividade, e arranjadas sucessivamente, sugerindo uma continuidade do desgostar e gostar dos produtos (LIM, 2011). Lim (2011) relata que a principal razão da escala hedônica de 9 pontos ser a escala mais utilizada em testes de aceitação é que, comparada a outras escalas, apresenta um número limitado de categorias, o que torna fácil a sua utilização por diversos segmentos da população; sem ser necessário um treinamento prévio.

**Figura 6** – Tipos de escalas para teste de aceitação: (a) escala hedônica de 9 pontos, (b) escala hedônica linear; (c) escala hedônica híbrida



Outras escalas também têm sido propostas para estudos com consumidores, tais como: escala hedônica não estruturada ou linear (Figura 6b) e escala hedônica híbrida (Figura 6c). A utilização de escala hedônica não estruturada ou linear apresenta a vantagem de dar mais liberdade aos consumidores de expressarem suas percepções sensoriais; reduzir os efeitos contextuais; e apresentar os dados com menores desvios da normalidade do que a escala hedônica de 9 pontos. No entanto, o seu uso é limitado, pois é mais difícil de ser compreendida e, conseqüentemente, torna a avaliação sensorial mais lenta (VILLANUEVA; PETENATE; SILVA, 2005).

A escala hedônica híbrida é uma escala linear (0 a 10) resultante da combinação de escala estruturada e não estruturada. Para ser de mais fácil utilização pelo consumidor do que a escala não estruturada, a escala hedônica híbrida é ancorada com rótulos verbais nas regiões média (5 = nem gostei, nem desgostei) e extremas da escala (0 = desgostei muitíssimo; 10 = gostei muitíssimo). As porções restantes são marcadas com pontos equidistantes, de modo a melhor definir o grau e a orientação da continuidade hedônica (VILLANUEVA; PETENATE; SILVA, 2005).

No entanto, as escalas apresentadas se configuram como alternativas à escala hedônica de 9 pontos, sendo que os estudos ainda se concentram em comparar suas eficiências em avaliar a aceitação de amostras com o método considerado padrão (escala hedônica de 9 pontos) (LAWLESS; POPPER; KROLL, 2010; LIM; FUJIMARO, 2010).

Os testes de aceitação são incluídos no controle de qualidade de alimentos por serem a única maneira de saber se os consumidores gostam ou não dos produtos; e em que extensão isso ocorre. Estes testes são indispensáveis quando se deseja desenvolver produtos adicionados de probióticos e prebióticos ou com substitutos de açúcar, levando em consideração que estes teriam grande potencial de comercialização (CRUZ et al., 2010). Satisfazer as necessidades dos consumidores é uma prioridade do mercado, e neste sentido, a aceitabilidade de um produto pelo consumidor é considerada essencial para compras posteriores e, conseqüentemente, fator de contribuição para o sucesso da empresa em longo prazo (RESANO et al., 2010).

### 2.7.2 Testes Descritivos

Os testes descritivos são ferramentas mais sofisticadas em análise sensorial. Por meio dos resultados de uma análise descritiva é possível obter descrições completas dos produtos, determinar as semelhanças e diferenças entre eles, e ter uma base

para se determinar os atributos sensoriais mais importantes para sua aceitação e comercialização (CRUZ et al., 2010). Os testes descritivos são utilizados pela indústria com a finalidade de direcionar o desenvolvimento e reformulação de produtos (REINBACH et al., 2014).

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) é um método descritivo que tem sido amplamente utilizado em estudos que procuram determinar o perfil sensorial de produtos. A aplicação da ADQ demanda tempo, já que envolve sessões de levantamento dos atributos; treinamento extensivo da equipe sensorial com amostras de referência, para identificação e quantificação dos atributos; e seleção estatística dos julgadores; a fim de formar uma equipe sensorial capaz de avaliar o produto (STONE; SIDEL, 2004).

Muitos estudos têm avaliado métodos alternativos à ADQ com consumidores, como CATA (Check All Apply - "Marque tudo o que se aplica"), CATA com intensidade, Mapeamento projetivo (Napping® ou Mapa Projetivo), Sorting ("Classificação") e Escala de Intensidade, com resultados satisfatórios (ARES et al., 2011a; CRUZ et al., 2013; REINBACH et al., 2014; VARELA; ARES, 2012). No entanto, ainda é cedo para afirmar que esses métodos geram dados com o mesmo grau de confiabilidade, e, portanto, a ADQ ainda é o método mais utilizado para caracterização sensorial e estudos envolvendo formulação e reformulação de alimentos (CADENA et al., 2013).

### 2.7.3 Metodologias de Tratamento de Dados em Análise Sensorial

As técnicas estatísticas não paramétricas (binomiais e qui-quadrado) e paramétricas (análise de variância e testes de comparação de médias) são comumente empregadas na análise de dados sensoriais. Contudo, quando o objetivo do estudo vai além da simples estimação e discriminação de amostras, outros métodos mais sofisticados podem se aplicados.

A Análise de Componentes Principais (ACP) é uma técnica multivariada que permite uma análise global dos resultados da Análise Sensorial, mostrando as relações existentes entre as amostras e evidenciando os atributos que melhor caracterizam cada uma delas. A ACP descreve as relações entre múltiplas variáveis por meio da redução do espaço das variáveis por combinações lineares das variáveis originais (JAWORSKA et al., 2005).

O Mapa de Preferência é uma metodologia que aplica técnicas estatísticas multivariadas tais como ACP, método de escala multidimensional, análise de variáveis canônicas, mínimos quadrados parciais, objetivando a modelagem, análise e entendimento

das preferências do consumidor e sua relação com as características do produto (BONANY et al., 2014; ENDRIZZI et al., 2014). Devido às suas propriedades atrativas, o Mapa de Preferência tem sido utilizado para uma série de finalidades, como por exemplo, para identificar os atributos importantes para a aceitação de alimentos (SINESIO et al., 2010), encontrar a melhor composição do produto (FELBERG et al., 2010) e otimizar formulações (ARES et al., 2011 b).

Existem dois tipos de Mapa de Preferência: o Interno e o Externo. O Mapa de Preferência Interno se baseia em respostas hedônicas de consumidores (aceitação) para determinar a representação multidimensional dos produtos e dos consumidores em um espaço comum. O Mapa de Preferência Externo faz uso de caracterização sensorial (teste descritivo) e / ou instrumental para fornecer uma representação multidimensional das características sensoriais/instrumentais, produtos e, finalmente, consumidores em um espaço comum (LOVELY; MEULLENET, 2009).

Em outras palavras, o Mapa de Preferência Externo tem a finalidade de explicar as preferências dos consumidores baseando-se em atributos sensoriais e/ou instrumentais, enquanto o Mapa de Preferência Interno apenas indica quais produtos são preferidos pelos consumidores (RESANO et al., 2010). Segundo Van Kleef, van Trijp e Luning (2006), o Mapa de Preferência Externo é mais indicado no desenvolvimento tecnológico de alimentos (por exemplo, perfis de produtos), enquanto o Mapa de Preferência Interno seria mais adequado para fins de marketing, ou seja, de comunicação, posicionamento do produto, e segmentação dos consumidores.

A Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) é uma técnica estatística utilizada para agrupar unidades experimentais baseada em respostas semelhantes.

Essa análise é comumente incorporada quando o Mapa de Preferência Externo é utilizado, pois, facilita a interpretação dos resultados, sendo muito útil em testes com consumidores, já que os mesmos têm variada aceitação e preferência pelos produtos (SCHILLING; COGGINS, 2007). Neste método, os valores hedônicos do teste de aceitação com consumidores são utilizados. Os consumidores são, então, agrupados baseados em sua preferência e impressão geral dos produtos (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). A segmentação dos consumidores com base na impressão geral (aceitação) que tiveram dos produtos é útil na identificação de nichos de mercado, o que auxilia as indústrias a direcionar a formulação de seus produtos a públicos-alvo desejados.

Os fabricantes de alimentos não desejam apenas conhecer a aceitação geral de seus produtos, mas também o que os consumidores gostam ou desgostam deles e

como os atributos podem aumentar a aceitação. A Regressão por Mínimos Quadrados Parciais (PLS) é uma metodologia que pode ser utilizada na Análise Sensorial de alimentos quando se deseja determinar os atributos importantes na aceitação dos produtos, tanto de forma positiva quanto de forma negativa (BAYARRI et al., 2011; CADENA et al., 2013). Para isso, os valores hedônicos do teste de aceitação são considerados como variável dependente e as médias de intensidade dos atributos sensoriais (ADQ) são as variáveis independentes (CADENA et al., 2013).

Assim, verificam-se os atributos que contribuem positivamente na aceitação dos produtos; os que contribuem negativamente e, portanto, precisam ser eliminados e/ou melhorados; e aqueles que não têm contribuição significativa. É possível observar ainda a magnitude do efeito do atributo na aceitação. Rossini et al. (2012) relatam que a PLS pode ser útil em análises sensoriais de rotina em indústrias de alimentos, visto que auxilia na seleção de um número pequeno de atributos relevantes para o produto. A exclusão de atributos que não contribuem de forma significativa à aceitação economiza tempo nas avaliações e evita fadiga dos julgadores.

## 2.8 EMBALAGEM DE PRODUTOS FUNCIONAIS

A embalagem tem um papel fundamental na manutenção da qualidade e estabilidade de alimentos durante sua vida útil, sendo parte integrante do sistema de conservação, e funcionando como uma barreira entre o alimento e o ambiente externo. Deve ser concebida e desenvolvida não só para armazenar o produto, mas também para protegê-lo e agregá-lo valor, já que a embalagem pode afetar diretamente a decisão de compra do consumidor (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

A proteção oferecida pela embalagem é o fator de maior importância, uma vez que está diretamente relacionada com a segurança do consumidor. Portanto, a embalagem deve ser adequada para cada alimento, a fim de minimizar as alterações indesejáveis que podem afetar o produto durante o seu tempo de vida útil (AZEREDO; FARIA; BRITO, 2004).

Com relação aos custos das embalagens, os aspectos econômicos são fundamentais, particularmente em setores da indústria de alimentos cuja competitividade tende a aumentar e as margens de lucro diminuir. Além disso, o fator ambiental representa uma variável significativa dessa equação complexa; dependendo das exigências legais de cada país, da política ambiental das empresas e da atitude dos consumidores. Assim, o ideal

é obter uma embalagem que apresente os menores custos, baixo impacto ambiental e adequado desempenho à conservação e consumo dos produtos (FARIA; WALTER; CRUZ, 2011).

O vidro é inodoro e quimicamente inerte, tendo várias vantagens para aplicação em embalagens de alimentos: é impermeável a gases e vapores, por isso, mantém o frescor do produto durante um longo período de tempo, sem prejudicar o seu sabor ou aroma; e a resistência a altas temperaturas de processamento é útil na esterilização de produtos, tanto de baixa quanto de alta acidez. É rígido, fornece um bom isolamento, e pode ser produzido em vários formatos diferentes. A sua transparência permite ao consumidor ver o produto, no entanto, variações de cor no vidro podem proteger conteúdos sensíveis à luz (MARSH; BUGUSU, 2007).

Como qualquer material, o vidro tem algumas desvantagens. Apesar dos esforços para a utilização de espessuras mais finas, embalagens de vidro são pesadas, o que aumentam os custos com o transporte dos produtos. Outra preocupação é a sua fragilidade e susceptibilidade à quebra devido à pressão interna, impacto ou choque térmico (MARSH; BUGUSU, 2007). Por essas razões, as indústrias de alimentos preferem comercializar os seus produtos em embalagens plásticas (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Os plásticos são fluidos e moldáveis, sendo possível a confecção de embalagens em diferentes formatos e com considerável flexibilidade. São quimicamente resistentes; baratos e leves, com uma ampla gama de propriedades físicas e ópticas. Muitos plásticos são seláveis termicamente; e podem ser integrados em processos de produção onde a embalagem é confeccionada, preenchida com o produto e lacrada, na mesma linha de processo (MARSH; BUGUSU, 2007).

O material plástico Polietileno Tereftalato (PET) é formado quando o ácido tereftálico reage com etilenoglicol, sendo capaz de fornecer uma boa barreira a gases (oxigênio e dióxido de carbono) e à umidade. Também tem boa resistência ao calor, aos óleos minerais, solventes e ácidos, mas não às bases. Conseqüentemente, o PET está se tornando o material de embalagem escolhido para muitos produtos alimentícios, particularmente bebidas e águas minerais (MARSH; BUGUSU, 2007).

Em termos de reciclagem, tanto o vidro quanto o PET são vantajosos, por serem 100% recicláveis. Se considerarmos somente o índice de reciclagem, segundo dados de 2009 do relatório de Indicadores de Desenvolvimento Sustentável (IDS) do IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística) (IBGE, 2012), o campeão absoluto da reciclagem no

Brasil é o alumínio com 98,2%. Em seguida, vêm as embalagens PET com 58,9%, e as de vidro (47%).

A principal função dos sistemas de embalagens para alimentos probióticos é manter um número adequado de micro-organismos vivos ao longo da vida útil do produto, de modo que os probióticos possam exercer a atividade biológica no organismo do hospedeiro. Adicionalmente, a embalagem deve manter as características dos probióticos de resistirem à passagem pelo sistema digestivo, e a habilidade de desenvolvimento no organismo do hospedeiro, quando o mecanismo de ação dos probióticos estiver associado a essas condições (FARIA; WALTER; CRUZ, 2011). No caso de produtos prebióticos, um teor mínimo do componente funcional (3 g para alimentos sólidos e 1,5 g para alimentos líquidos na porção diária) ao longo da vida útil do produto deve ser mantido (ANVISA, 2008a).

As cepas probióticas utilizadas em alimentos são geralmente aeróbicas ou microaerófilas e, portanto, o nível de oxigênio no produto ou o que permeia a embalagem durante a estocagem deve ser o menor possível, a fim de evitar a toxicidade e morte do micro-organismo, com conseqüente perda de sua funcionalidade (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007). Isso decorre do fato de que os probióticos são desprovidos da cadeia transportadora de elétrons e/ou da enzima catalase, portanto, são incapazes de transformar o oxigênio a peróxido de hidrogênio e/ou promover a quebra do último. Conseqüentemente, ocorre acúmulo de derivados metabólicos tóxicos, tais como o ânion superóxido ( $O_2^-$ ), radical hidróxido ( $OH^-$ ), e peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) na célula, causando a sua morte (BOZAMENDÉZ; LÓPEZ-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004). No geral, micro-organismos pertencentes a gêneros estritamente anaeróbicos, como *Bifidobacterium*, são mais sensíveis ao oxigênio do que os do gênero *Lactobacillus*, contudo, a sensibilidade é dependente exclusivamente da cepa selecionada (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004).

No requisito de barreira ao oxigênio, as embalagens tradicionais de vidro e metálicas, bem como as estruturas laminadas com alumínio, oferecem o melhor desempenho protetor. Essas embalagens, quando especificadas e produzidas de forma adequada, apresentam permeação gasosa restrita à região de fechamento. Já os materiais plásticos, apresentam permeabilidades características e relativas, dependendo da composição polimérica e do processo de fabricação da embalagem (FARIA; WALTER; CRUZ, 2011) (Quadro 3).

Estudos que avaliam embalagens para produtos probióticos são geralmente com embalagens ativas e filmes plásticos com alta permeabilidade ao oxigênio

(MILLER et al., 2002; MILLER et al., 2003; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; WANG; YU; CHOU, 2004) e restritos a produtos lácteos fermentados (JANSON et al., 2002; JAYAMANNE; ADAMS, 2004; KUDELKA, 2005). Até onde se conhece, nenhum estudo foi realizado para avaliar embalagens adequadas para o armazenamento de produtos não lácteos probióticos.

**Quadro 3** – Permeabilidade de alguns materiais poliméricos\*

Polímero	TPO <sub>2</sub> (cm <sup>2</sup> mm/m <sup>2</sup> .dia.atm) <sup>a</sup>	TPCO <sub>2</sub> (cm <sup>3</sup> /m <sup>2</sup> .dia.at m) <sup>b</sup>	TPVA (g mm/m <sup>2</sup> .dia) <sup>a</sup>
Etileno vinil álcool (EVOH)	0,8	3,9	1,5
Policloreto de vinilideno (PVDC)	0,1	4,9	0,09
Náilon 6	0,4	114	2,3
Polietileno tereftalato amorfo (PET)	3	472	3
Polietileno (garrafa) (PET)	1,8	ND	1,5
Policloreto de vinila (PVC)	3,5	394	0,8
Polipropileno (PP)	48	10800	0,09
Polietileno de Alta Densidade (PEAD)	42	11400	0,08
Policarbonato	295	21100	10,8
Poliestireno (PS)	172	17700	4,2
Polietileno de Baixa Densidade (PEBD)	184	49200	0,2

\*TPO<sub>2</sub> – taxa de permeabilidade ao oxigênio; TPCO<sub>2</sub> – taxa de permeabilidade ao dióxido de carbono; e TPVA – taxa de permeabilidade ao vapor de água; ND- dado não disponível  
a Hannay (2002) (23°C e 75% UR para oxigênio; 38°C e 95% UR para vapor de água)  
b Brown (1992) (24°C e 75% UR para gás carbônica; 20mm de espessura)

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

- Desenvolver e avaliar um suco clarificado de maçã potencialmente simbiótico por meio da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como cultura probiótica e oligofrutose como prebiótico e substituto de açúcar. Avaliar o efeito sensorial de substituição de açúcar da sucralose.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a influência da adição de cultura probiótica e/ou oligofrutose como prebiótico e substituto de açúcar nas características físicas, químicas e microbiológicas e na aceitação de sucos clarificados de maçã durante armazenamento refrigerado (4°C) por 28 dias;
- Avaliar o impacto da embalagem (vidro ou plástico) nas características físicas, químicas e microbiológicas e na aceitação de sucos clarificados de maçã durante armazenamento refrigerado (4°C) por 28 dias;
- Descrever as propriedades sensoriais dos sucos por meio de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ), avaliando o efeito da adição de cultura probiótica e/ou da oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar;
- Medir por teste afetivo a aceitação e intenção de compra dos sucos formulados;
- Avaliar a influência dos atributos sensoriais na aceitação de sucos clarificados de maçã.

#### 4 MATERIAL E MÉTODOS

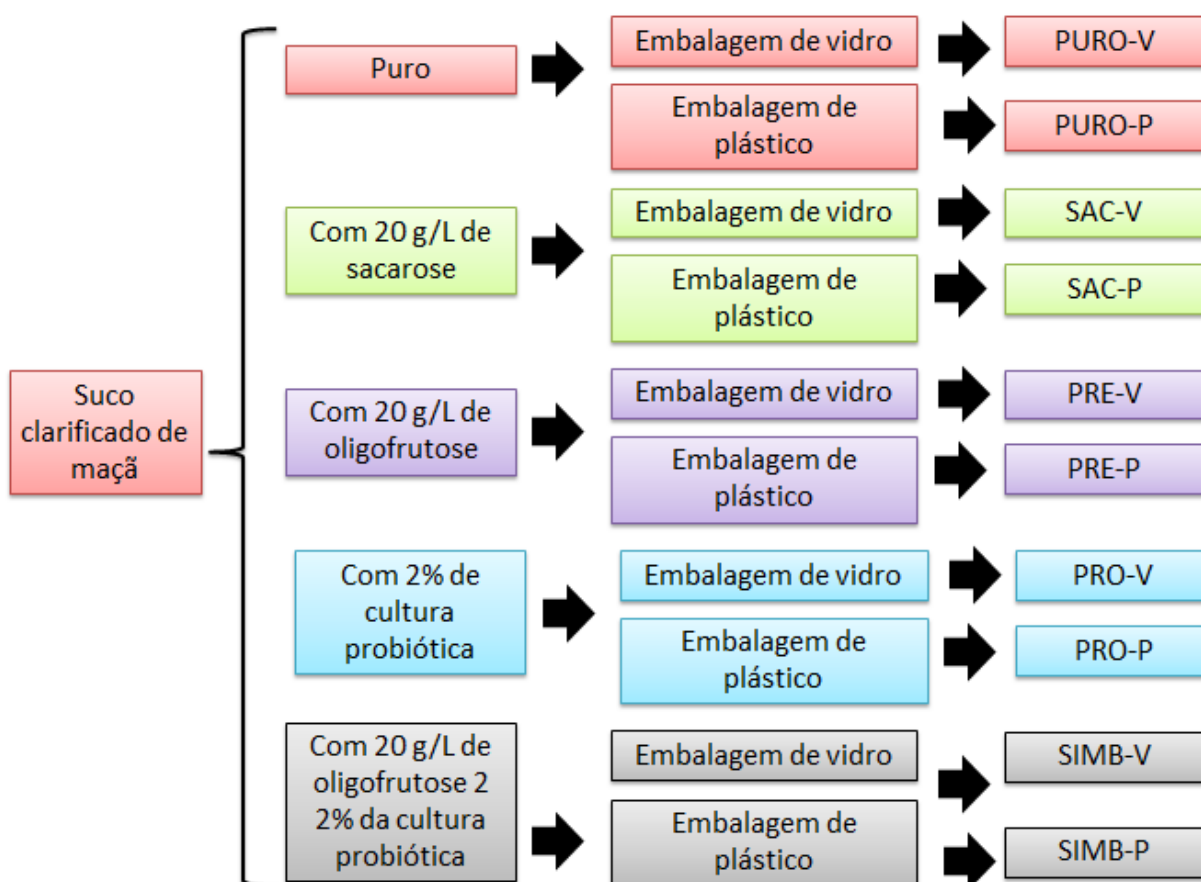
Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina, do Departamento de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, e do Instituto Federal do Paraná - Câmpus Ivaiporã.

A tese constou de duas partes, conforme segue:

**Parte 1 – Efeito do tipo de embalagem e da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e oligofrutose nas características físico-químicas e microbiológicas e na aceitabilidade de suco clarificado de maçã**

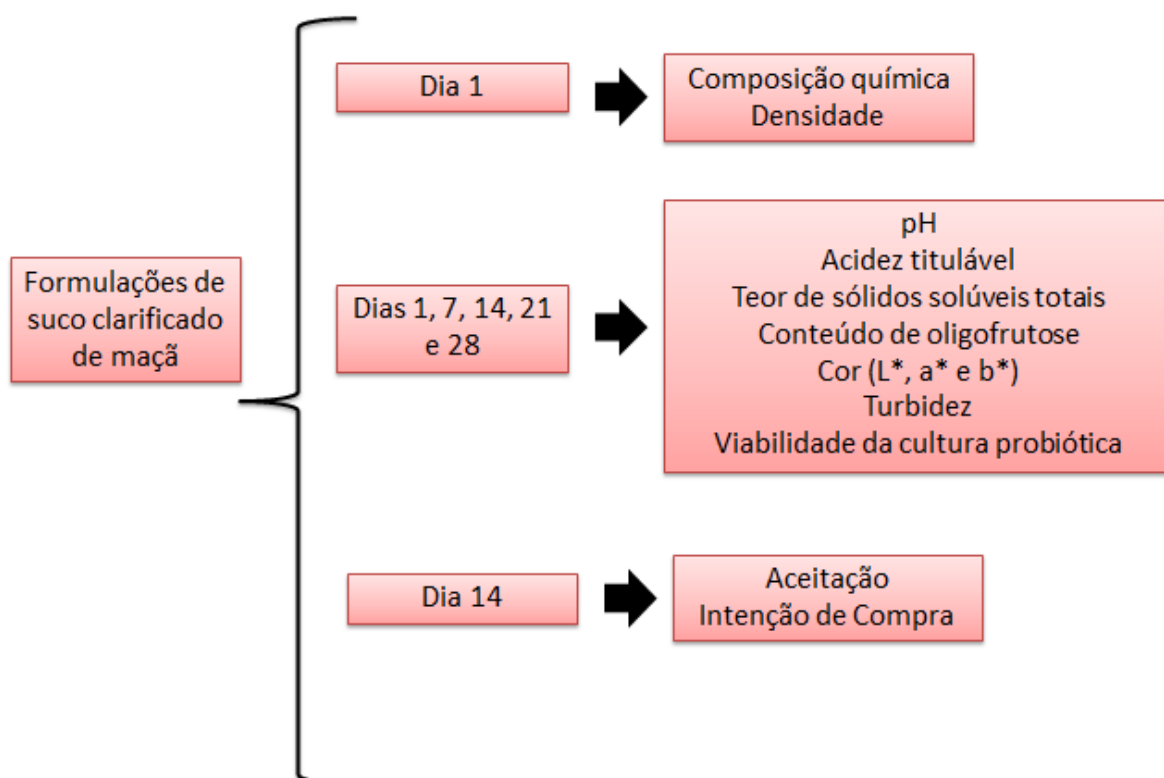
Para este estudo, dez formulações de sucos clarificados de maçã foram preparadas conforme Figura 7.

**Figura 7 – Formulações de suco clarificado de maçã**



Os sucos clarificados de maçã foram avaliados quanto as suas características físico-químicas e microbiológicas e aceitabilidade durante armazenamento refrigerado (4°C por 28 dias) conforme Figura 8. O efeito do tipo de embalagem (vidro ou plástico) e da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e oligofrutose foi avaliado.

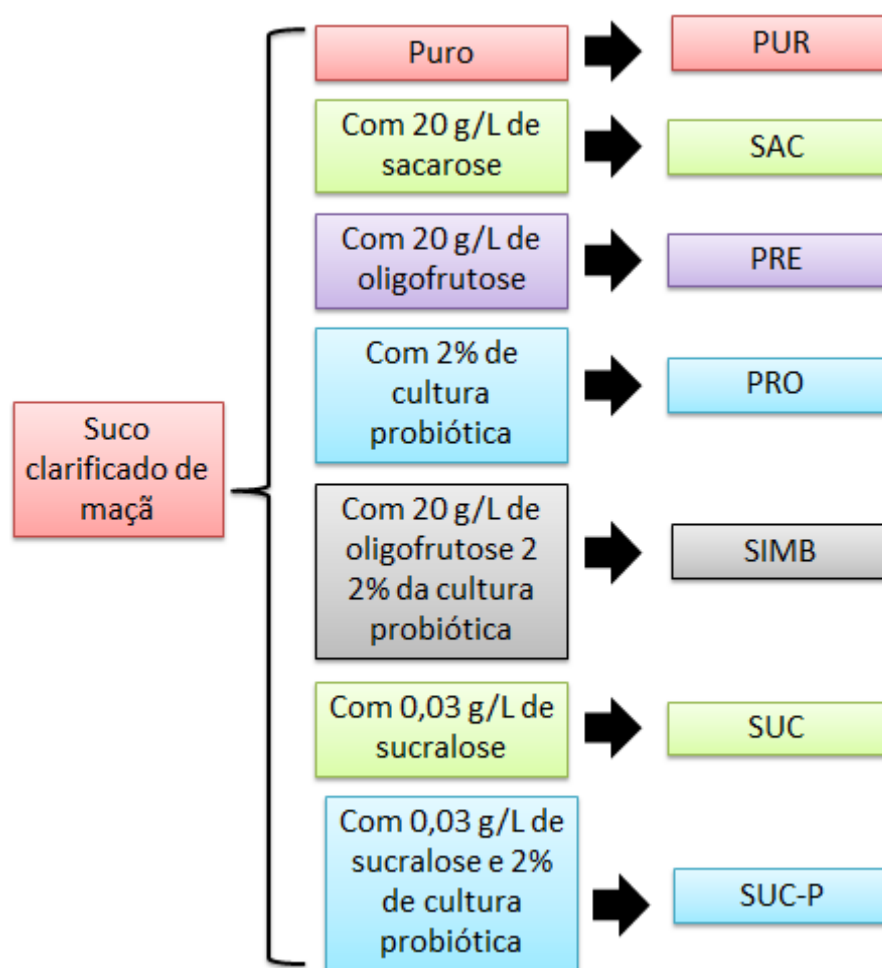
**Figura 8** – Esquema de avaliação dos sucos clarificados de maçã



## Parte 2 – Suco clarificado de maçã probiótico com oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar: perfil sensorial e aceitabilidade

Para este estudo, sete formulações de sucos clarificados de maçã foram preparadas conforme Figura 9.

**Figura 9** – Formulações de suco clarificado de maçã



Os sucos clarificados de maçã foram caracterizados sensorialmente (perfil sensorial e aceitação de atributos) após 1 a 2 dias de armazenamento refrigerado em embalagem de vidro. O efeito da adição de oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar e da cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nas características sensoriais dos produtos foi avaliado, assim como foi determinada a influência dos atributos sensoriais na aceitação dos produtos.

#### 4.1 MATERIAL

Maçã Royal Gala (*Malus domestica* Borkh) (Castel Frutas®); enzima pectinolítica (Pectinex Ultra Clear, Novozymes®); bentonita sódica natural (Na-35; Schumacher®); gelatina incolor (Dr. Oetker®); sacarose (União®), oligofrutose (P95, Orafiti®), sucralose (Splenda®) e cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (LC-01, Christian Hansen®) foram utilizados no experimento. Foram utilizadas embalagens de vidro

(Farma®) ou plástico (Polietileno Tereftalato - PET; Drex®) com capacidade para 50mL. A embalagem de plástico apresentava 0,5 mm de espessura, permeabilidade ao vapor de água de 1,5g de água mm/m<sup>2</sup>.dia (a 38°C e 90% de umidade relativa) e permeabilidade ao oxigênio de 1,8 cm<sup>2</sup>mm/m<sup>2</sup>.dia.atm (a 24°C e 75% de umidade relativa) (HANNAY, 2002).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Obtenção da Cultura Probiótica Ativada

Para a ativação da cultura probiótica liofilizada utilizou-se o método descrito por Ding e Shah (2008), com modificações. Uma alçada da cultura foi inoculada em 5mL de caldo MRS (Himedia®) e incubada a 37°C por 15h. Decorrido este tempo, 1% (v/v) foi novamente inoculado em 10mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 15h (pré-inóculo). Para a obtenção da biomassa, 1% (v/v) do pré-inóculo foi transferido para 300mL de caldo MRS e re-incubado nas mesmas condições. A biomassa foi separada por centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf®, modelo 5804R) a 14000g (10.000 rpm) por 10 min a 4°C e lavada três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril (NaCl Dinamica®) para a remoção do MRS residual. Após, se ressuspendeu a biomassa em 50mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril, obtendo-se assim a cultura probiótica ativada.

### 4.2.2 Preparação dos Sucos de Maçã

Maçãs Gala foram lavadas em água corrente, sanitizadas (6mL/L de desinfetante para hortifrutícolas Pury Vitta®, 0,96% p/p cloro ativo) e trituradas em processador de frutas (Walita®). Os sucos brutos foram submetidos a tratamento enzimático (Pectinex Ultra Clear 0,03 mL/L), sendo mantidos em banho maria por 1 hora a 50°C e posteriormente filtrados a vácuo em funil de Buchner (papel de filtro Qualy®, 80g/m<sup>2</sup>; 205um; 25cm de diâmetro). A clarificação dos sucos foi completada por meio de tratamento com bentonita ativada com 24 horas de antecedência (0,45 g/L) e gelatina (0,05 g/L) a 50°C por 1 hora seguido de filtração a vácuo em funil de Buchner (BURDURLU; KARADENIZ, 2003).

Os sucos clarificados foram, então, adicionados de sacarose (20 g/L), oligofrutose (20 g/L), ou sucralose (0,03 g/L). A concentração de oligofrutose adicionada se baseou na regulamentação brasileira a fim de utilizar a alegação de propriedade funcional da oligofrutose (prebiótico) (ANVISA, 2008a); e na ingestão mínima diária sugerida para frutanos

a fim de obter efeitos benéficos à saúde (KEENAN et al., 2011; RÖ3LE et al., 2010). A sacarose foi adicionada nos teores sugeridos para suco de maçã por Bleibaum et al. (2002) e Ellendersen et al. (2012). A quantidade de sucralose foi determinada por meio da recomendação do fabricante para o produto (poder adoçante: 600 vezes maior do que o da sacarose), em estudos disponíveis na literatura (MARCELLINI, CHAINHO; BOLINI, 2005; CADENA; BOLINI, 2012; MARCHI et al., 2012) e por testes sensoriais (Testes Triangulares) preliminares (resultados não apresentados), respeitando os limites máximos estabelecidos por legislação (ANVISA, 2008b) e objetivando intensidade de doçura semelhante à do produto adoçado com sacarose.

Todas as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro ou plástico com capacidade para 50mL (Parte 1), ou apenas em frascos de vidro (Parte 2); pasteurizadas a 80°C por 20 minutos em banho maria e resfriadas em banho de gelo até 37°C. As formulações com culturas probióticas foram adicionadas de 2% (v/v) da cultura probiótica ativada, o que correspondia a  $10^{11}$  células viáveis por litro de suco. Os sucos de maçã foram, então, armazenados a 4°C por 28 dias (Parte 1) ou 2 dias (Parte 2).

#### 4.2.3 Avaliações Físico-Químicas

As determinações de umidade, proteína, lipídios e cinzas foram realizadas de acordo com a AOAC (2004) e o teor de carboidratos totais foi obtido por diferença. A densidade dos sucos clarificados de maçã foi medida utilizando um picnômetro (25mL, Prolab®).

A concentração de oligofrutose foi determinada utilizando o kit enzimático Fructan HK (Megazyme International Irlanda®). Inicialmente, a sacarose e os maltooligosacarídeos, quando presentes na amostra, são hidrolisados a frutose e glicose usando uma enzima específica sucrase/maltase. Após o ajuste de pH, as amostras são analisadas quanto à glicose + frutose (A) ou tratadas com frutanase purificada (a qual hidrolisa frutanos a frutose e glicose) e então analisadas quanto à frutose + glicose (B). O conteúdo de frutanos corresponde à diferença entre B e A (MEGAZYME, 2014).

Determinou-se o pH dos sucos em potenciômetro digital (Tecnal®) previamente calibrado com tampões fosfato (Synth®) pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido málico, foi medida segundo a AOAC (2004). O teor de SST foi obtido utilizando-se refratômetro do tipo ABBE e os resultados foram expressos em °Brix.

Para avaliação da cor utilizou-se colorímetro (Minolta®, modelo CR400) com adaptador para líquidos, o qual forneceu diretamente os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul). A turbidez foi medida utilizando espectrofotômetro UVA/IS a 600nm (SHAH et al., 2010).

#### 4.2.4 Avaliações Microbiológicas

Um mililitro de cada formulação de suco clarificado de maçã foi diluído em 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid®) esterilizada e agitado uniformemente com um agitador. As diluições seriadas foram realizadas e o número de microorganismos viáveis da cultura probiótica enumerado usando a técnica de pour plate. A contagem de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* foi feita em ágar MRS (Difco®) e incubação anaeróbica (Anaerobac, Probac®) a 37°C por 72 horas (THARMARAJ; SHAH, 2003). Aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras foram enumerados de acordo com Brasil (2003).

#### 4.2.5 Avaliação Sensorial

A Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) e o teste de aceitação foram conduzidos após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina (Parecer CEP/UEL nº 063/2011; CAAE nº 0044.0.268.000-11, anexo 1). O questionário de recrutamento dos julgadores e o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) para os testes da ADQ e de aceitação estão apresentados nos anexos 2, 3, 4 e 5.

##### 4.2.5.1 Condições de teste

Os testes sensoriais foram realizados em Laboratório de Análise Sensorial, cujas instalações incluem cabines individuais, controle de iluminação, e temperatura ambiente. Para avaliação foi utilizada luz branca e 30 mL das formulações foram servidos em copos de plástico (50mL), codificados com números de três dígitos aleatórios, aproximadamente à temperatura de 4°C. Água potável à temperatura ambiente e biscoitos cream cracker sem sal foram disponibilizados para a limpeza da boca antes e entre as avaliações das formulações.

#### 4.2.5.2 Análise descritiva quantitativa (ADQ) dos sucos clarificados de maçã

##### 4.2.5.2.1 *Pré-seleção dos julgadores*

Foram selecionados vinte e seis indivíduos dentre estudantes e funcionários do Instituto Federal do Paraná - Câmpus Ivaiporã (Ivaiporã, Paraná, Brasil). No recrutamento foi solicitado o preenchimento de um questionário para a obtenção de informações sobre os julgadores quanto ao interesse, disponibilidade de tempo para a realização dos testes, afinidade com o produto a ser avaliado e facilidade de expressão (Anexo 2).

Inicialmente, os julgadores foram submetidos a testes de reconhecimento de odores e gostos básicos (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). A capacidade dos voluntários em reconhecer os gostos básicos foi avaliada por meio do teste proposto por Caul (1957) apud Penna (1980) onde cada indivíduo avaliou o gosto de uma série de soluções aquosas contendo sacarose (0,4 e 0,8%), ácido cítrico (0,03 e 0,04%), cloreto de sódio (0,08 e 0,15%) e cafeína (0,02 e 0,03%). As amostras de cada solução foram apresentadas em ordem aleatória aos candidatos em copos plásticos codificados com três dígitos aleatórios. Indivíduos que não conseguiram identificar pelo menos uma das soluções referentes a cada gosto básico foram eliminados da equipe sensorial a ser formada. A ficha utilizada se encontra na Figura 10.

**Figura 10** – Ficha para teste de reconhecimento de gostos básicos

<b>TESTE DE RECONHECIMENTO DE GOSTOS BÁSICOS</b>				
Nome:		Data:		
Por favor, prove cada solução duas vezes e descreva a qualidade do gosto (doce, ácido, salgado ou amargo)				
Enxague a boca entre uma amostra e outra				
Nº da amostra	Doce	Ácido	Salgado	Amargo

A capacidade dos indivíduos em reconhecer os odores foi avaliada em teste sensorial onde foi solicitado a cada voluntário que descrevesse a qualidade do odor de uma série de 20 substâncias aromáticas diferentes encontradas no cotidiano: café, chocolate, vinagre de maçã, limão, extrato de tomate, erva doce, canela, cravo da Índia, orégano, alho, queijo muçarela, leite, gengibre, cebola, mostarda, salsa, vinho tinto, suco de laranja, pimenta do reino e maçã. As amostras foram colocadas sobre algodão; contido no fundo de frascos de Erlenmeyer; recobertos com papel alumínio, codificados e tampados com papel alumínio perfurado.

A porcentagem de acerto para cada aroma específico foi calculada por meio de contagem de pontos (3 pontos: termo correto; 2 pontos: termo descritivo ou associativo; 1 ponto: termo errado; 0 : sem resposta). Indivíduos que não atingiram o mínimo de 70% de acerto foram excluídos da equipe sensorial a ser formada (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 1999). A ficha utilizada se encontra na Figura 11.

**Figura 11** – Ficha para teste de reconhecimento de odores básicos

<b>TESTE DE RECONHECIMENTO DE ODORES BÁSICOS</b>	
Nome:	Data:
<p>Os frascos cobertos contêm substâncias odoríferas que se encontram normalmente em casa ou no local de trabalho. Aproxime o frasco de seu nariz, tire a tampa, aspire brevemente 3 vezes e tente identificar o odor. Se não lhe vier à memória o nome exato da substância, tente descobrir alguma coisa com o qual você associe esse odor.</p>	
Nº da amostra	Odor

A partir dos resultados dos testes de reconhecimento dos odores e gostos básicos, foram selecionados 23 candidatos.

#### 4.2.5.2.2 *Desenvolvimento da terminologia descritiva*

O desenvolvimento da terminologia descritiva pelos julgadores selecionados foi realizado utilizando-se o Método de Rede (MOSKOWITZ, 1983; ELLENDERSEN et al., 2012), onde oito sucos foram apresentados aos pares aos julgadores (PUR x PRE; PUR x SIMB; PUR x SAC; e PUR x SUC) e os mesmos foram solicitados a descrever as semelhanças e diferenças entre as formulações de cada par em relação à aparência, aroma, sabor e textura. Apenas um par de formulações foi analisado por sessão. A ficha utilizada se encontra na Figura 12.

**Figura 12** – Ficha para levantamento de terminologia descritiva

<b>FICHA PARA LEVANTAMENTO DE TERMINOLOGIA DESCRITIVA (MÉTODO DE REDE)</b>	
Nome:.....	Data:.....
Por favor, prove as duas amostras quanto à aparência, aroma, sabor e textura e indique em que elas são semelhantes e em que são diferentes.	
Amostras: _____ e _____	
Aparência:	
Aroma:	
Sabor:	
Textura:	

Após o término das sessões, uma discussão em grupo foi conduzida sob a supervisão de um líder, com o objetivo de identificar os termos ou atributos mais citados; agrupar termos descritivos semelhantes e gerar amostras de referência. Foram gerados os seguintes termos descritores: cor, turbidez, presença de partículas e corpo para aparência; aroma de maçã e aroma doce para o aroma; sabor de maçã, gosto doce, gosto ácido e gosto residual para o sabor; e corpo para a textura.

As definições para cada descritor (atributo) e as referências para os pontos extremos da escala, para cada atributo, foram consensualmente estabelecidas pelos julgadores e encontram-se na Tabela 1.

**Tabela 1** – Atributos, definições e amostras de referência desenvolvidos pela equipe sensorial para formulações de suco clarificado de maçã

Atributo	Definição	Amostra de referência
<b>Aparência</b>		
Cor	Intensidade da cor amarela com tendência ao laranja	<u>Fraca</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 2% de leite em pó desnatado (Molico®) <u>Forte</u> : Suco de maçã comercial (Welch®)
Turbidez	Falta de transparência do produto	<u>Ausente</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intensa</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 20% de cloreto de sódio
Presença de partículas	Ausência de partículas de maçã triturada visualmente identificáveis	<u>Ausente</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) sem partículas visíveis <u>Muita</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) com cinco partículas (0,5mm) de maçã triturada depositadas

Corpo	Facilidade de manipular o suco no copo	<u>Pouco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Muito</u> : Néctar de goiaba Del Valle®
<b>Aroma</b>		
Maçã	Aroma característico da fruta maçã	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%)
Doce	Aroma característico de suco adoçado e pasteurizado	<u>Fraco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 10% açúcar refinado União® (antes da pasteurização)
<b>Sabor</b>		
Maçã	Sabor característico de maçã	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%)
Gosto Doce	Gosto doce característico da presença de açúcares	<u>Fraco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 4% de açúcar refinado União®

Gosto Ácido	Percepção do gosto ácido na língua	<u>Fraço</u> : Suco clarificado de maçã Gala (90%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de ácido málico (pH 3,5)
Gosto Residual	Gosto residual amargo	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 3% de adoçante Magro (Lightsweet®)
<b>Textura</b>		
Corpo	Sensação de cobertura na boca	<u>Pouco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Muito</u> : Néctar de goiaba Del Valle®

Sessões suplementares de avaliação das formulações, das referências sugeridas e de discussão em grupo foram realizadas a fim de alcançar um consenso de termos descritivos (atributos) entre os julgadores da equipe sensorial, homogeneizar a técnica de avaliação, e definir a ficha de avaliação das formulações.

A ficha de avaliação foi preparada em consenso e era composta de escalas não estruturadas de 9 cm, com termos de intensidade ancorados a 0 ou 0,5 cm do extremo esquerdo e 0,5 cm do extremo direito, onde o extremo esquerdo representava a ausência ou a menor intensidade, e o extremo direito a maior intensidade do atributo. A ficha descritiva consensualmente desenvolvida encontra-se na Figura 13.

**Figura 13** – Ficha utilizada para avaliação dos atributos levantados na Análise Descritiva Quantitativa de formulações de suco clarificado de maçã

---

**ANÁLISE DESCRITIVA QUANTITATIVA DE SUCO DE MAÇÃ**

Nome: \_\_\_\_\_ Amostra: \_\_\_\_\_

**APARÊNCIA**

Cor | |  
fraca forte

Turbidez | |  
ausente intensa

Presença de partículas | |  
ausente muita

Corpo | |  
pouco muito

**AROMA**

Maçã | |  
ausente intenso

Doce | |  
fraco intenso

**SABOR**

Maçã | |  
ausente intenso

Gosto Doce | |  
fraco intenso

Gosto Ácido | |  
fraco intenso

Gosto Residual | |  
ausente intenso

**TEXTURA**

Corpo | |  
pouco muito

---

#### 4.2.5.2.3 *Treinamento dos julgadores*

Os julgadores foram treinados para identificar e quantificar os atributos usando as amostras de referência (Tabela 1). Os materiais de referência e a definição de cada termo descritivo foram colocados à disposição dos julgadores em cada sessão. O treinamento foi encerrado quando os julgadores demonstraram não terem dificuldade em avaliar as formulações utilizando a ficha de avaliação.

#### 4.2.5.2.4 *Seleção final dos julgadores*

Após 10 sessões de treinamento com duração de 40 minutos, o desempenho de cada julgador foi avaliado. Quatro formulações (PUR, SAC, SIMB e SUC-P) foram testadas usando delineamento de blocos completos casualizados contendo três repetições (sessões), onde as quatro formulações foram apresentadas simultaneamente em cada sessão. A intensidade dos atributos foi determinada usando a ficha de avaliação desenvolvida.

Foi executada análise de variância para os resultados de cada julgador, para cada atributo, tendo como fonte de variação: formulações e repetições. Foram computados para cada julgador os níveis de significância ( $p$ ) dos valores de  $F_{\text{formulações}}$  e  $F_{\text{repetições}}$ . Os julgadores que apresentaram poder discriminativo ( $p$  de  $F_{\text{formulações}} < 0,5$ ); reprodutibilidade nos julgamentos ( $p$  de  $F_{\text{repetições}} \geq 0,05$ ) e consenso com os demais membros do grupo foram selecionados (ELLENDERSEN et al., 2012; PIMENTEL; CRUZ; PRUDENCIO, 2013). A concordância dos julgadores com a equipe foi verificada através da comparação das médias individuais com a média da equipe sensorial.

Dezoito julgadores treinados (9 mulheres e 9 homens) participaram da equipe final. Todos tinham entre 15 e 25 anos de idade, estavam cursando o ensino médio e gostavam de suco de maçã, com consumo de ocasional a frequente, ou seja, de algumas vezes ao mês a algumas vezes ao dia. A maioria (>75%) costumava consumir produtos probióticos (leites fermentados e iogurtes); com fibras; e de baixo teor de açúcar.

#### 4.2.5.2.5 *Avaliação das formulações*

A análise descritiva das 7 formulações pelos julgadores treinados foi realizada em triplicata utilizando um delineamento de blocos incompletos casualizados

(descrito no item 5.4), onde cada julgador avaliou, de forma monádica, três formulações em cada sessão, perfazendo 7 sessões de avaliação. As sessões foram realizadas em dois dias consecutivos (4 sessões no primeiro dia e 3 sessões no segundo dia de armazenamento dos sucos), com intervalo de pelo menos 1 hora entre as mesmas.

#### 4.2.5.3 Teste de aceitação

Os consumidores foram recrutados por contato pessoal a partir de sua disponibilidade de participar do teste e por serem consumidores de sucos de fruta, preferencialmente de maçã.

Na Parte 1, o teste de aceitação de atributos (cor, aroma, sabor e global), utilizando escala hedônica de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo); e o teste de intenção de compra, utilizando escala de 5 pontos (1 = certamente não compraria; 5 = certamente compraria) (STONE; SIDEL, 2004) foram realizados por uma equipe de 80 julgadores não treinados no 14<sup>o</sup> dia de armazenamento dos produtos. Os julgadores avaliaram as dez formulações em duas sessões de avaliação, onde, em cada sessão, cinco formulações selecionadas aleatoriamente foram apresentadas de forma monádica e em ordem aleatorizada.

Na Parte 2, a aceitação (aparência, aroma, sabor, textura e impressão geral) das formulações de sucos clarificados de maçã foi avaliada por 86 consumidores potenciais dos produtos, por meio de escala hedônica de 9 pontos (9 = gostei muitíssimo; 1 = desgostei muitíssimo) (AGUIAR et al., 2012; SYMONEAUX; GALMARINI; MEHINAGIC, 2012); e a intenção de compra foi avaliada por meio de escala de 5 pontos (5 = certamente compraria; 1 = certamente não compraria). A avaliação foi realizada em duas sessões, com quatro formulações na primeira sessão e três formulações na segunda, no primeiro e segundo dias de armazenamento dos sucos. A seleção das formulações para cada sessão foi realizada de forma aleatória e as formulações avaliadas uma de cada vez.

Na tabela 2 está apresentado o perfil dos consumidores recrutados nos dois experimentos de aceitação (Partes 1 e 2 da Tese).

**Tabela 2** – Perfil dos consumidores

Perfil	Experimento 1	Experimento 2
Sexo	68% do sexo feminino e 32% do sexo masculino	51% do sexo feminino e 49% do sexo masculino
Idade	57% com 15-25 anos; 26% com 25-35 anos; 11% com 35-50 anos; 6% com mais de 50 anos	66% com 15-25 anos; 22% com 25-35 anos; 9% com 35-50 anos; 3% com mais de 50 anos
Escolaridade	1% ensino básico completo; 54% ensino médio completo; 45% pelo menos graduação	42% ensino básico completo (cursando ensino médio); 35% ensino médio completo; 23% pelo menos graduação
Frequência de suco de maçã	4% frequentemente; 27% moderadamente; 59% ocasionalmente; 10% nunca	5% frequentemente; 34% moderadamente; 44% ocasionalmente; 17% nunca
Frequência de consumo de produtos com fibras	42% frequentemente; 29% moderadamente; 21% ocasionalmente; 8% nunca	34% frequentemente; 31% moderadamente; 29% ocasionalmente; 6% nunca
Frequência de consumo de produtos probióticos	25% frequentemente; 39% moderadamente; 25% ocasionalmente; 11% nunca	32% frequentemente; 43% moderadamente; 23% ocasionalmente; 2% nunca
Frequência de consumo de produtos com baixo teor de açúcar	17% frequentemente; 19% moderadamente; 35% ocasionalmente; 29% nunca	13% frequentemente; 29% moderadamente; 36% ocasionalmente; 22% nunca

A ficha de avaliação se encontra na Figura 14.



completos casualizados, onde os tratamentos foram as formulações e os blocos os julgadores.

Os dados de cada experimento foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ).

Na Parte 2, o experimento da ADQ seguiu delineamento de blocos incompletos, onde  $t$  (nº de tratamentos) = 7;  $k$  (nº de tratamento por sessão) = 3;  $r$  (nº de repetições) = 3;  $b$  (nº de sessões) = 7;  $A$  (nº de vezes que 2 tratamentos aparecem juntos em um mesmo bloco) = 1;  $E = 0,78$ , Tipo V. Os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores (formulações e julgadores) com interação. Quando a interação formulação x julgadores foi significativa, o valor de  $F_{\text{formulação}}$  foi recalculado, considerando o quadrado médio da interação como denominador (BAYARRI et al., 2011). As diferenças entre as formulações foram determinadas pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a aceitação, o delineamento foi blocos completos casualizados, onde os tratamentos foram as formulações e os blocos os julgadores. Os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores (formulações e julgadores), teste F e teste de Tukey de comparação das médias ( $p < 0,05$ ).

A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada sobre os dados médios de cada atributo levantado no teste descritivo (ADQ). A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada para correlacionar os dados da equipe treinada com os dados de aceitação. Os valores de impressão geral da aceitação foram considerados como variável dependente (matriz-Y) enquanto as intensidades médias dos atributos da ADQ foram consideradas as variáveis independentes (matriz-X) (CADENA et al., 2013). Um Mapa de Preferência Externo (PREFMAP) foi conduzido realizando a ACP dos dados da ADQ e então, relacionando cada um dos consumidores ao espaço da ACP por análise de regressão (BONANY et al., 2014). Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) foi realizada a fim de determinar grupos de consumidores com preferências semelhantes, considerando as distâncias Euclidianas (dissimilaridade) e o método de aglomeração de Ward (BONANY et al., 2014).

As análises estatísticas foram conduzidas nos softwares SAS (versão 9.1.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) e XLSTAT para Windows (versão 2012; Addinsoft, Nova Iorque, NY).

## REFERÊNCIAS

AGUIAR, I.B.; MIRANDA, N.G.M.; GOMES, F.S.; SANTOS, .M.C.S.; FREITAS, D.G.C.; TONON, R.V.; CABRAL, L.M.C. Physicochemical and sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.16, p.137-142, 2012.

AIDOO, R.P.; DEPYPERE, F.; AFOAKWA, E.O.; DEWETTINCK, K. Industrial manufacture of sugar free chocolates- applicability of alternative sweeteners and carbohydrate polymers as raw materials in product development. **Trends in Food Science and Technology**, v.32, n.2, p.84-96, 2013.

AKESOWAN, A.; CHOONHAHIRUN, A. Quality assessment of reduced-calorie Thai mung bean marzipan made with erythritol-sucralose blend and soy milk. **Life Science Journal**, v.10, n.2, p.2129-2134, 2013.

AL-DABBAS, M.M.; MAHER, M.; AL-QUDSI, J.M. Effect of partial replacement of sucrose with the artificial sweetener sucralose on the physico-chemical, sensory, microbial characteristics, and final cost saving of orange nectar. **International Food Research Journal**, v.19, n.2, p.679-683, 2012.

ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, v.28, n.1, p.59–66, 2011.

AL-SHERAJI, S.H.; ISMAIL, A.; MANAP, M.Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R.M.; HASSAN, F.A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v.5, n.4, p.1542-1553, 2013.

ÁLVAREZ, S.; RIERA, F.A.; ÁLVAREZ, R.; COCA, J.; CUPERUS, F.P.; BOWER, S.T.; BOSWINKEL, G.; GEMERT, R.W.; VELDSINK, J.W.; GIORNO, L.; DONATO, L.; TODISCO, S.; DRIOLI, E.; OLSSON, J.; TRAGARDH, G.; GAETA, S.N.; PANYOR, L. A new integrated membrane process for producing clarified apple juice and apple juice aroma concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.46, n.2, p.109-125, 2000.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M.R.; CABALLERO, V.; CASTELLANO, V. Assesment of prebiotics and probiotics: na overview. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Eds). **Bioactive foods in promoting health. Probiotics and Prebiotics**. Londres: Academic Press, 2010. Cap. 2, p. 19-41.

ANTUNES, A.E.C.; LISERRE, A.M.; COELHO, A.L.A.; MENEZES, C.R.; MORENO, I.; YOTSUNAYAGI, K.; AZAMBUJA, N.C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v.54, n.1, p.125-131, 2013.

ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Atualizado em julho, 2008**. 2008a.

ANVISA. Resolução RDC nº 18, de 24 de março de 2008 - Dispõe sobre o "Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos". **Diário Oficial da União 25/03/2008**, 2008b.

APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: a review of different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.368-378, 2014.

ARES, G.; DELIZA, R.; BARREIRO, C.; GIMENEZ, A.; GAMBARO, A. Comparison of two sensory profiling techniques based on consumer perception. **Food Quality and Preference**, v.21, n.4, p.417–426, 2011a.

ARES, G.; VARELA, P., RADO, G.; GIMÉNEZ, A. Identifying ideal products using three different consumer profiling methodologies. Comparison with external preference mapping. **Food Quality and Preference**, v.22, n.6, p.581 -591, 2011b.

**ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). Official methods of analysis of AOAC International.** 16 ed; Arlington, v.2, 2004.

AUERBACH, M.; DEDMAN, A-K. **Bulking agents- Multi-functional ingredients.** In: O'DONNELL, K.; KEARSLEY, M. (Eds.). Sweeteners and sugar alternatives in food technology. 2nd Ed., Wiley Blackwell, p.435-466, 2012

AWAISHEH, S.S. **Probiotic food product classes, types, and processing.** Probiotics, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0776-7, InTech, DOI: 10.5772/51267. Available from: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotic-food-products-classes-types-and-processing>. 2012.

AZEREDO, H. M. C.; FARIA, J.A.F.; BRITO, E.S. **Embalagens e Estabilidade de Alimentos.** In: Azeredo, H.M.C. Embalagem e Estabilidade de Alimentos. (pp. 151–164). Embrapa Agroindústria Tropical: Fortaleza, Ceará. 2004.

AZIZPOUR, K.; BAHRAMBEYGI, S.; MAHMOODPOUR, S.; AZIZPOUR, A. History and basic of probiotics. **Research Journal of Biological Sciences**, v.4, n.4, p.409-426, 2009.

BARRY, A. Meeting today's consumer demands. **Technology + Marketing**, p.8-10, 2011.

BASU, S.; SHIVHARE, U.S.; SINGH, T.V. Effect of substitution of stevioside and sucralose on rheological, spectral, color and microstructural characteristics of mango jam. **Journal of Food Engineering**, v.114, n.4, p.465–476, 2013.

BAYARRI, S.; CARBONELL, I.; BARRIOS, E.; COSTELL, E. Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurts and yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v.21, n.2, p.111-118, 2011.

BLEIBAUM, R.N.; STONE, H.; TAN, T.; LEBRECHE, S.; SAINT-MARTIN, E.; ISZ, S. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. **Food Quality and Preference**, v.13, n.6, p.409–422, 2002.

BONANY, J.; BRUGGER, C.; BUEHLER, A.; CARBÓ, J.; CODARIN, S.; DONATI, F.; ECHEVERRIA, G.; EGGER, S.; GUERRA, W.; HILAIRE, C.; HÖLLER, I.; IGLESIAS, I.; JESIONKOWSKA, K.; KONOPACKA, D.; KRUCZNSKA, D.; MARTINELLI, A.; PETIOT, C.; SANSAVINI, S.; STEHR, R.; SCHOORL, F. Preference mapping of apple varieties in Europe. **Food Quality and Preference**, v.32, p.317-329, 2014.

BOZA-MÉNDEZ, E.; LÓPEZ-CALVO, R.; CORTÉS-MUÑOZ, M. **Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations**, Probiotics, Everlon Cid Rigobelo (Ed.), InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/innovative-dairy-products-development-using-probiotics-challenges-and-limitations>. 2012.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Reforma Agrária, Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Anexo I- **Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e água**.

BROWN, W.E. **Plastic in food packaging**. New York: Marcel Dekker, Inc, 1992. 539p.

BRUNSER, O.; GOTTELAND, M. Probiotics and prebiotics in human health: an overview. In: WATSON, R.R.; PREEDY, V.R. (Eds). **Bioactive foods in promoting health. Probiotics and Prebiotics**. Londres: Academic Press, 2010. Cap. 6, p. 73-93.

BURDURLU, H.S.; KARADENIZ, F. Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. **Food Chemistry**, v.80, n.1, p.91-97, 2003.

CADENA, R. S.; BOLINI, H. M.A. Ideal and relative sweetness of high intensity sweeteners in mango nectar. **International Journal of Food Science & Technology**, v.47, n.5, p.991–996, 2012.

CADENA, R.S.; CRUZ, A.G.; NETTO, R.R.; CASTRO, W.F.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango nectar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. **Food Research International**, v.54, n.2, p.1670-1679, 2013.

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, n.3, p.268-282, 1999.

CAVALLINI, D. C. U.; BOLINI, H. M.A. Comparação da percepção temporal de doçura, amargor e sabor de fruta em suco de manga reconstituído e adoçado com sacarose, mistura ciclamato/sacarina 2:1, aspartame, sucralose e estévia. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.361–382, 2005.

CÉSPEDES, M., CÁRDENAS, P.; STAFFOLANI, M.; CIAPPINI, M.C.; VINDEROLA, G. Performance in nondairy drinks of probiotic *L. casei* strains usually employed in dairy products. **Journal of Food Science**, v.78, n.5, p.M756-M762. 2013.

ÇETIN, B. Production of probiotic mixed pickles (Turşu) and microbiological properties. **African Journal of Biotechnology**, v.10, n.66, p.14926–14931, 2011.

CHAMPAGNE, C.O.; GARDNER, N.J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.1, p. 61-84, 2005.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S.S. Survival of human derived *Lactobacillus plantarum* in fermented cereal extracts during refrigerated storage. **LWT- Food Science and Technology**, v.43, n.3, p.431–435, 2010.

CHAVES, J. B. P.; SPROSSER, R. L. **Práticas de laboratório de análise sensorial de alimentos e bebidas**. Viçosa: UFV, 2001. 81 p.

CHEN, A.; MUSTAPHA, A. Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. **Food Microbiology**, v.30, n.1, p.68–73, 2012.

COSTA, M.G.N.; FONTELES, T.V.; JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimization and product stability. **Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p.261-266, 2013.

COURTIN, C.M.; SWENNEN, K.; VERJANS, P.; DELCOUR, J.A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.831-837, 2009.

COUSSEMENT, P.A.A. Inulin and oligofructose: safe intakes and legal status. **Journal of Nutrition**, v.129, n.7, p.1412-1417, 1999.

CRITTENDEN, R.G; PLAYNE, M.J. Production, properties and applications of food-grade oligosaccharides. **Trends in Food Science and Technology**, v.7, n.11, p.353-361, 1996.

CRITTENDEN, R.G; MORRIS, L.F; HARVEY, M.L; TRAN, L.T; MITCHELL, H.L; PLAYNE, M.J. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, v. 90, n.2, p.268-278, 2001.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v.40, n.8, p.951-956, 2007.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; WALTER, E.H.M.; MORTAZAVIAN, A.M.; GRANATO, D.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory analysis: relevance for prebiotic, probiotic, and synbiotic product development. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.4, p. 358-373, 2010.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; CASTRO, W.F.; ESMERINO, E.A.; RODRIGUES, J.B.; GAZE, L.; FARIA, J.A.F.; FREITAS, M.Q.; DELIZA, R.; BOLINI, H.M.A. Consumer perception of probiotic yogurt: Performance of check all that apply (CATA), projective mapping, sorting and intensity scale. **Food Research International**, v.54, n.1, p.601–610, 2013.

DELLA LUCIA, S. M., MINIM, V. P. R., CARNEIRO, J. D. S. Análise sensorial de alimentos. In. **Análise sensorial: Estudo com consumidores/ Valéria Paula Rodrigues Minim – Viçosa: Ed. UFV, Cap. 1, p. 13-50, 225p., 2006.**

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v.15, n.2, p.219-232, 2008.

DONKOR, O.N; NILMINI, S.L.I; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, n.6, p.657-665, 2007.

DRAKE, M. A. Invited review: Sensory analysis of dairy foods. **Journal of Dairy Science**. v.90, n.11, p.4925–4937, 2007.

EISELE, T.A.; DRAKE, S.R. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. **Journal of Food Composition Analysis**, v.18, n.2-3, p.213-221, 2005.

ELLENDERSEN, L.S.N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTO, K.B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, v.12, n.4, p.475-485, 2012.

ENDRIZZI, I.; GASPERI, F.; RODBOTTEN, M.; NAES, T. Interpretation, validation and segmentation of preference mapping models. **Food Quality and Preference**, v.32, Parte C, p.198-209, 2014.

FAO/ WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group of Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in food, Ontario, Canadá. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. 2002.

FAO / AGNS. **FAO Technical Meeting Report on Prebiotics**. 2007. Disponível em: [http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics\\_Tech\\_Meeting\\_Report.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf).

FARIA, J.A.F.; WALTER, E.H.N.; CRUZ, A.G. Sistemas de embalagem para alimentos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F (Eds), **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Ed. 1, Varela, 2011. p.163-222.

FELBERG, I.; DELIZA, R.; FARAH, A.; CALADO, E.; DONANFELO, C. M. Formulation of a soy-coffee beverage by response surface methodology and internal preference mapping. **Journal of Sensory Studies**, v.25, Suplemento 1, p.226–242, 2010.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.287-291, 2002.

GALLAGHER, E.; O'BRIEN, C.M.; SCANNELL, A.G.M.; ARENDT, E.K. Evaluation of sugar replacers in short dough biscuit production. **Journal of Food Engineering**, v.56, n.1-2, p.261-263, 2003.

GEISLER, M. **Commodity apple profile**. Disponível em: [http://www.agmrc.org/commodities\\_\\_products/fruits/apples/commodity-apple-profile/](http://www.agmrc.org/commodities__products/fruits/apples/commodity-apple-profile/). Acesso em: 09/04/2014. 2013.

GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. Inulin and oligofructose. **Nutrient Today**, v.43, n.2, p.54-59, 2008.

GLOBAL INDUSTRY ANALYSTS. **Global functional foods and drink industry**. 818p. 2012.

GODERSKA, K.; CZARNECKA, M.; CZARNECKI, Z. Effect of prebiotic additives to carrot juice on the survivability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bacteria. **Polish Journal of Food Nutrition and Sciences**, v.57, n.4, p.427-432, 2007.

GOKMEN, V.; ARTIK, N., ACAR, J., KAHRAMAN N., POYRAZOGLU, E. Effects of various clarification treatments on patulin, phenolic compound and organic acid compositions of apple juice. **European Food Research and Technology**, v.213, n.3, p.194–199, 2001.

GOLDSMITH, L. A.; MERKEL, C. M. **Sucralose**. In: Nabors, L. O'B.; Gelardi, R. C. Edit. Alternative sweeteners. 3.ed. New York, Marcel Dekker, 2001. pp.185-207.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.3, p.292-302, 2010.

HANNAY, F. **Rigid plastic packaging – materials, processes and applications**. Rapra Technology: United Kingdom. 2002. p.18.

HUEBNER, J.; WEHLING, R.L.; HUTKINS, R.W. Functional activity of commercial prebiotics. **International Dairy Journal**, v.17, n.7, p.770-775, 2007.

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

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Indicadores de desenvolvimento sustentável. 2012. Disponível em: [ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos\\_naturais/indicadores\\_desenvolvimento\\_sustentavel/2012/ids2012.pdf](ftp://geofp.ibge.gov.br/documentos/recursos_naturais/indicadores_desenvolvimento_sustentavel/2012/ids2012.pdf). Acesso em: 27/01/2014.

JAIN, P.; KUMAR, A.; JHA, A.; KUMAR, R.; PANDEY, S.K. Textural and sensory properties of Lal peda manufactured with artificial sweeteners and bulking agents. **International Journal of Dairy Technology**, v.66, n.1, p.119-126, 2013.

JANSON, S. E. A.; GALLET, G.; HEFT, T.; KARLSSON, S.; GEDDE, U. W.; HENDENQVIST, M. Packaging materials for fermented milk, part 2: solute-induced changes and effects of material polarity and thickness on food quality. **Packaging Technology and Science**, v.15, n.6, p.287–300, 2002.

JAWORSKA, D.; WASZKIEWICZ-ROBAK, B.; KOLANOWSKI, W.; & SWIDERSKI, F. Relative importance of texture properties in the sensory quality and acceptance of natural yoghurts. **International Journal of Dairy Technology**, v.58, n.1, p.39-46, 2005.

JAYAMANNE, V. S.; ADAMS, M. R. Survival of probiotic bifidobacteria in buffalo curd and their effect on sensory properties. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, n.7, p.719–725, 2004.

JONES, L.V.; PERYAM, D.R.; THURSTONE, L.L. Development of a scale for measuring soldier's food preferences. **Food Research**, v.20, n. 5, p. 512-520, 1955.

KEENAN, D.; BRUNTON, N.; BUTLER, F.; WOUTERS, R.; GORMLEY, R. Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple pures enriched with prebiotic inclusions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, n.3, p.261-268, 2011.

KELLY, G. Inulin-type prebiotics – A Review. Part 1. **Alternative Medicine Review**, v.13, n.4, p.315-329, 2008.

KIM, H.S.; CHAE, H.S.; JEONG, S.G.; HAM, J.S.; IM, S.K.; AHN, C.N.; LEE, J.M. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.18, n.2, p.255-258, 2005.

KOLIDA, S.; GIBSON, G.R. Prebiotic capacity of inulin-type fructans. **Journal of Nutrition**, v.137, n.11, p.2503S-2506S, 2007.

KOS, B.; SUSKOVIC, J.; VUKOVIC, S.; SIMPRAGA, M.; FRECE, J.; MATOSIC, S. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v.94, n.6, p.981–987, 2003.

KUDELKA, W. Changes in the acidity of fermented milk products during their storage as exemplified by natural bio-yoghurts. **Milchwissenschaft**, v.60, n.3, p.294–296, 2005.

LAWLESS, H.T.; POPPER, R.; KROLL, B.J. A comparison of the labeled magnitude (LAM) scale, an 11-point category scale and the traditional 9-point hedonic scale. **Food Quality and Preference**, v.21, n.1, p.4-12, 2010.

LEE, J.A.B.; SETO, D.B.A.; BIELORY, L.M.D. Meta-analysis of clinical trials of probiotics for prevention and treatment of pediatric atopic dermatitis. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v.121, n.1, p.116-121, 2008.

LEE, S. Y.; GANESAN, P.; AHN, J.; KWAK, H. S. *Lactobacillus acidophilus* fermented yam (*Dioscorea opposita* Thunb.) and its preventive effects on gastric lesion. **Food Science and Biotechnology**, v.20, n.4, p.927–932, 2011.

LIM, J.; FUJIMARU, T. Evaluation of the Labeled Hedonic Scale under different experimental conditions. **Food Quality and Preference**, v.21, n.5, p.521—530, 2010.

LIM, J. Hedonic scaling: A review of methods and theory. **Food Quality and Preference**, v.22, n.8, p.733-747, 2011.

LIONG, M.T.; SHAH, N.P. Optimization of growth of *Lactobacillus casei* ASCC 292 and production of organic acids in the presence of fructooligosaccharide and maltodextrin. **Journal of Food Science**, v. 70, n.2, p.113-120, 2005.

LIU, C-T.; CHU, F-J.; CHOU, C-C.; YU, R-C. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. **Mutation research**, v.721, n.2, p.157-162, 2011.

LOVELY, C.; MEULLENET, J-F. Comparison of preference mapping techniques for the optimization of strawberry yogurt. **Journal of Sensory Studies**, v.24, n.4, p.457–478, 2009.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Which juice is —healthier? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, n.7-8, p.751-759, 2004a.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. **Food Research International**, v. 37, n.8, p.805-814, 2004b.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; DELAHUNTY, C; FITZGERALD, G. Determining the odor and flavor characteristics of probiotic, health-promoting ingredients and the effects of repeated exposure on consumer acceptance. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.S53–S59, 2005.

MALIK, A.; JEYARANI, T.; RAGHAVAN, B. A comparison of artificial sweeteners' stability in a lime-lemon flavored carbonated beverage. **Journal of Food Quality**, v.25, n.1, p.75–82, 2002.

MANNING, T.S; GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v.18, n.2, p.287-298, 2004.

MARCELLINI, P.S.; CHAINHO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Doçura ideal e análise de aceitação de suco de abacaxi concentrado reconstituído adoçado com diferentes edulcorantes e sacarose. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.2, p.177-182, 2005.

MARCHI, R.; MONTES-VILLANUEVA, N.D.; McDANIEL, M.R.; BOLINI, H.M.A. Sensory profile and stability of a new ready-to-drink passion fruit juice beverage with different sweetener systems. **CENTRUM Católica's Working Paper Series**, n. 2012-09-0016, p.1-34, 2012.

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**, v.11, n.3, p.287-295, 2012.

MARSH, K.; BUGUSU, B. Food Packaging – roles, materials, and environmental issues. **Journal of Food Science**, v.72, n.3, p.R39-R55, 2007.

MEGAZYME. Disponível em: [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com). Acesso em: 08/04/2014.

MEILGAARD, M; CIVILLE, G.V; CARR, B.T. **Sensory Evaluation Techniques**. 3ed. London: CRC Press, 1999. 281p.

MILLER, C. W.; NGUYEN, M. H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The influence of packaging materials on the dissolved oxygen content of probiotic yogurt. **Packaging Technology and Science**, v.15, n.3, p.133–138, 2002.

- MILLER, C. W.; NGUYEN, M. H.; ROONEY, M.; KAILASAPATHY, K. The control of dissolved oxygen content in probiotic yogurts by alternative packing materials. **Packaging Technology and Science**, v.16, n.2, p.61–67, 2003.
- MIRZAEI, H.; TABRIZI, B.A.; HASANPOUR, A.; BABPOUR, A.; KARIM, G. Study on the effect of consuming different amount of fermented milk with *Lactobacillus casei* 01 on haematological parameters in rats. **Research Journal of Biological Sciences**, v.3, n.12, p.1376-1380, 2008.
- MOSKOWITZ, H.R. **Product Testing and Sensory Evaluation of food-marketing and R&D Approaches**. Westport: Food and Nutrition Press, 1983. 605p.
- MOUSSAVI, M. **Comparative analysis of the viability and functional performance of mono- and multi-species probiotic cultures in a non-Dairy food matrix**. Thesis (Doctor in Philosophy), The University of Newcastle, 2012. 344p.
- MUIR, J.G.; SHEPERD, S.J.; ROSELLA, O.; ROSE, R.; BARRET, J.S.; GIBSON, P.R. Fructan and free fructose content of common Australian vegetables and fruit. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.55, n.16, p.6619-6627, 2007.
- MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **British Journal of Nutrition**, v.85, Suplemento 1, p.S47-S53, 2001.
- MUSSATTO, S.I; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n.3, p.587-597, 2007.
- NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; SADA, A.; ORLANDO, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2271-2276, 2008.
- NEVES, L. De S. **Fermentado probiótico de suco de maçã**. Tese (Doutorado em Processos Biotecnológicos Industriais), Universidade Federal do Paraná. 2005. 106p.
- NOGUEIRA, A; SANTOS, L.D.; WIECHETECK, F.V.B.; GUYOT, S.; WOSIACKI, G. Efeito do processamento no teor de compostos fenólicos em suco de maçã. **Publicativo UEPG, ciências exatas terra, ciências agrárias e engenharias**, v.9, n.3, p.7-14, 2003.
- NOGUEIRA, A.; TEIXEIRA, S.H.; DEMIATE, I.M.; WOSIACKI, G. Influência do processamento no teor de minerais em sucos de maçãs. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.27, n.2, p.259-264, 2007.
- O'DONNELL, K. **Carbohydrate and intense sweeteners**. In: Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. 2nd Edition (ed. ASHURST, P.R), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p.68-87, 2007.
- ONSEKIZOGLU, P.; BAHCECI, K.S.; ACAR, M.J. Clarification and the concentration of apple juice using membrane processes: A comparative quality assessment. **Journal of Membrane Science**, v.352, n.1-2, p.160–165, 2010.

PALACIOS, T.; COULSON, S.; BUTT, H.; VITETTA, L. The gastrointestinal microbiota and multi-strain probiotic therapy: In children and adolescent obesity. **Advances in Integrative Medicine**, v.1, n.1, p. 2-8, 2014.

PENHA, C.B.; MADRONA, G.S.; TERRA, C.O. Efeito da substituição do açúcar por oligofrutose em bebida láctea achocolatada. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.3, n.2, p.29-37, 2009.

PENNA, E.W. **Evaluacion sensorial: una metodologia actual para tecnologia de alimentos**. Santiago: Universidade do Chile, 1980, 134p.

PERYAM, D.R.; PILGRIM, F.J. Hedonic scale method of measuring food preference. **Food Technology**, v.11, Suplemento, p.9-14, 1957.

PIMENTEL, T.C.; PRUDENCIO, S.H.; RODRIGUES, R.S. Néctar de pêsego potencialmente simbiótico. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.3, p.455-464, 2011.

PIMENTEL, T.C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S;H. Effect of long-chain inulin on the texture profile and survival of *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* in set yoghurts during refrigerated storage. *International Journal of Dairy Technology*, v.65, n.1, p.104-110, 2012a.

PIMENTEL, T.C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S;H. Iogurte probiótico com frutanos tipo inulina de diferentes graus de polimerização: características físico-químicas e microbiológicas e estabilidade ao armazenamento. *Semina: Ciências Agrárias*, v. 33, n.3, p.1059-1070, 2012b.

PIMENTEL, T. C., GARCIA, S., PRUDENCIO, S.H. Aspectos funcionais, de saúde e tecnológicos de frutanos tipo inulina. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.30, n.1, p.103–118, 2012c.

PIMENTEL, T.C.; CRUZ, A.G.; PRUDENCIO, S.H. *Short communication*: Influence of long-chain inulin and *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* on the sensory profile and acceptance of a traditional yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p.6233-6241, 2013.

PORTMANN, M.O.; KILCAST, D. Psychophysical characterization of new sweeteners of commercial importance for the EC food industry. **Food Chemistry**, v.56, n.3, p.291–302, 1996.

POSSEMIERS, S.; MARZORATI, M.; VERSTRAETE, W.; WIELE, T. V. Bacteria and chocolate: A successful combination for probiotic delivery. **International Journal of Food Microbiology**, v.141, n.1-2, p.97–103, 2010.

PRADO, F.C.; PARADA, J.L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C.R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n.2, p.111-123, 2008.

PSZCZOLA, D. Sweet beginnings to a New Year. **Food Technology**, n.53, n.2, p.70-76, 1999.

QIANG, X.; YONGLIE, C.; QIANBING, W. Health benefit application of functional oligosaccharides. **Carbohydrate polymers**, v.77, p.435-441, 2009.

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

REINBACH, H.C.; GIACALONE, D.; RIBEIRO, L.M.; BREDIE, W.L.P.; FROST, M.B. Comparison of three sensory profiling methods based on consumer perception: CATA, CATA with intensity and Napping®. **Food Quality and Preference**, v.32, Parte B, p.160–166, 2014.

RENUKA, B.; KULKARNI, S.G.; VIJAYANAND, P.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.42, n.5, p.1031-1033, 2009.

RESANO, H.; SANJUÁN, A.I.; CILLA, I.; RONCALÉS, P.; ALBISU, L.M. Sensory attributes that drive consumer acceptability of dry-cured ham and convergence with trained sensory data. **Meat Science**, v.84, n.3, p.344–351, 2010.

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

RIZZON, L.A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, Golden delicious e fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.750-756, 2005.

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

ROBERFROID, M. B. Caloric value of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, n.7, p.1436-1437, 1999.

ROBERFROID, M.B. **Inulin-type fructans: functional food ingredients**. London: CRC Press, Boca Raton, 2005. p. 39-60.

RONDA, F.; GÓMEZ, M.; BLANCO, C.A.; CABALLERO, P.A. Effect of polyols and nondigestible oligosaccharides on the quality of sugar-free sponge cakes. **Food Chemistry**, v.90, n.4, p.549-555, 2005.

ROSA, C.O.B.; COSTA, N.M.B. **Alimentos funcionais: histórico, conceitos e atributos**. In: Alimentos funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2010. p.7.

ROSS, R.P.; DESMOND, C.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, T. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p.1410-1417, 2005.

ROSSINI, K.; VERDUM, S.; CARIOU, V.; QANNARIM E.M.; FOGLIATTO, F.S. PLS discriminant analysis applied to conventional sensory profiling data. **Food Quality and Preference**, v.23, n.1, p.18–24, 2012.

SAAD, S.M.I.; KOMATSU, T.R.; GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; BURITI, F.C.A. Probióticos e prebióticos em alimentos: aspectos tecnológicos, legislação e

segurança no uso. In: SAAD, S.M.I; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F (Eds), **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Ed. 1, Varela, 2011. p.23-50.

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

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MÄTTÖ, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, n.2, p.171–178, 2006.

SAEED, M.; ZAHID, S.; SATTAR, M.U. Isolation, characterization and utilization of *Saccharomyces boulardii* as probiotic supplement in apple juice. **Advances in Food and Biosciences**, v.1, n.1, p. 8-13, 2013.

SANTOS, J.S.; XAVIER, A.A.O.; BONEVENTI, P.; SOUZA, R.B.; GARCIA, S. Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.839-844, 2008.

SCHILLING, M.W.; COGGINS, P.C. Utilization of agglomerative hierarchical clustering in the analysis of hedonic scaled consumer acceptability data. **Journal of Sensory Studies**, v.22, n.4, p.477–491, 2007.

SCHIMDT, F.L.; PEREIRA, K.S. O potencial de probióticos e prebióticos em bebidas de origem vegetal. In: SAAD, S.M.I; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F (Eds), **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. Ed. 1, Varela, 2011. p.565-584.

SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.

SHAH, N.P. Functional foods from probiotics and prebiotics. **Food Technology**, v.55, n.11, p.46-53, 2001.

SHAH, N.P.; DING, W.K.; FALLOURD, M.J.; LEYER, G. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. **Journal of Food Science**, v.75, n.5, p.M278-M282, 2010.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, n.11, p.1262-1277, 2007.

SHEEHAN, V.M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G.F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.8, n.2, p.279-284, 2007.

SHIBAO, J.; SANTOS, G.F.A; GONÇALVES, N.F.; GOLLÜCKE, A.P.B. **Edulcorantes em alimentos: aspectos químicos, tecnológicos e toxicológicos**. São Paulo: Phorte, p.65-69, 2009.

SHIN, H.-S.; LEE, J.-H; PETSKA, J.J; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercial *Bifidobacterium* spp in skim milk containing oligosaccharides and inulin. **Journal of Food Science**, v.65, n.5, p. 884-887, 2000.

SINESIO, F.; CAMMARERI, M.; MONETA, E.; NAVEZ, B.; PEPARAI, M.; CAUSSE, M.; GRANDILLO, S. Sensory quality of fresh French and Dutch market tomatoes: A preference mapping study with Italian consumers. **Journal of Food Science**, v.75, n.1, p.S55–S67, 2010.

SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v.1, p.S287–S290, 2011.

SIRÓ, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food: product development, marketing and consumer acceptance- a review. **Appetite**, v.51, n.3, p.456-467, 2008.

STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3 ed. New York: Academic Press., 2004.

SYMONEAUX, R.; GALMARINI, M.V.; MEHINAGIC, E. Comment analysis of consumer's likes and dislikes as an alternative tool to preference mapping. A case study on apples. **Food Quality and Preference**, v.24, n.1, p.59–66, 2012.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.5, n.1, p.1-8, 2004.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.7, p.2288-2296, 2003.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, v.16, n.3, p.261-276, 2009.

TUNGLAND, C. **Inulin – a comprehensive scientific review**. 2000. Disponível em: < [http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin\\_review.html](http://members.shaw.ca/duncancrow/inulin_review.html)>. Acesso em: 14/02/2014.

VAN DE WIELE, T.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERSTRAETE, W. Inulin-type fructans of longer degree of polymerization exert more pronounced in vitro prebiotic effects. **Journal of Applied Microbiology**, v.102, n.2, p.452- 460, 2007.

VAN KLEEF, E.; VAN TRIJP, H.C.M.; LUNING, P. Internal versus external preference analysis: An exploratory study of end-user evaluation. **Food Quality and Preference**, v.17, n.5, p.387–399, 2006.

VAN LOO, J.; COUSSEMENT, P.; DE LEENHEER, L.; HOEBREGS, H & SMITS, G. On the presence of inulin and oligofructose as natural ingredients in the Western Diet. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.35, n.6, p.525-552, 1995.

VARELA, P.; ARES, G. Sensory profiling, the blurred line between sensory and consumer science. A review of novel methods for product characterization. **Food Research International**, v.48, n.2, p.893–908, 2012.

VASUDHA, S.; MISHRA, H.N. Non dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, v.20, n.1, p.7-15, 2013.

VELEIRINHO, B.; LOPES-DA-SILVA, J.A. Short communication: Application of electrospun poly(ethylene terephthalate) nanofiber mat to apple juice clarification. **Process Biochemistry**, v.44, p.353-356, 2009.

VENTER, C.S. Prebiotics: an update. **Journal of Family Ecology and Consumer Sciences**, v.35, p.17.25, 2007.

VILLANUEVA, N.D.M.; PETENATE, A.J.; SILVA, M.A.A.P. Performance of the hybrid hedonic scale as compared to the traditional hedonic, self-adjusting and ranking scales. **Food Quality and Preference**, v.16, n.8, p.691-703, 2005.

VINDEROLA, C.G.; COSTA, G.A.; REGENHARDT, S.; REINHEIMER, J.A. Influence of compounds associated with fermented dairy products on the growth of lactic acid starter and probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.12, n.7, p.579-589, 2002.

VORAGEN, A.G.J. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. **Trends in Food Science & Technology**, v.9, n. 8/9, p.328-335, 1998.

WANG, Y.-C.; YU, R.-C.; CHOU, C.-C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v.93, n.2, p.209–217, 2004.

WHO. **World Health Organization**. Disponível em: [www.who.int](http://www.who.int). Acesso em: 09/04/2014.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A.; SILVA, N. C. Brazilian apple production: a few years later. **Fruit Processing**, v.10, n.12, p.472-475, 2000.

WOSIACKI, G.; NOGUEIRA, A. Suco de maçã. In: **Bebidas não alcoólicas – Ciência e Tecnologia**. São Paulo: Editora Blucher, 2010, volume 2, p.269-302.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.38, n.1, p.73-75, 2005.

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

## 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados foram redigidos na forma de dois artigos científicos, conforme segue:

**ARTIGO CIENTÍFICO 1:** Efeito do tipo de embalagem e da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e oligofrutose nas características físico-químicas e microbiológicas e na aceitabilidade de suco clarificado de maçã

**ARTIGO CIENTÍFICO 2:** Suco clarificado de maçã probiótico com oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar: perfil sensorial e aceitabilidade

### 5.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

**Efeito do tipo de embalagem e da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e oligofrutose nas características físico-químicas e microbiológicas e na aceitabilidade de suco clarificado de maçã**

Resumo: Este estudo objetivou avaliar o efeito do tipo de embalagem (vidro ou plástico) e da adição de cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* e/ou oligofrutose (prebiótico e substituto de açúcar) nas características físico-químicas e microbiológicas e na aceitabilidade de suco clarificado de maçã durante armazenamento refrigerado (4°C por 28 dias). Sucos adicionados de cultura probiótica apresentaram composição química, densidade, aceitabilidade e intenção de compra semelhantes aos produtos sem adição; mas maior acidez, turbidez e cor vermelha. A adição de oligofrutose não alterou as características físico-químicas, aceitabilidade, intenção de compra e estabilidade ao armazenamento dos produtos; e exerceu efeito protetor às culturas probióticas, aumentando sua sobrevivência durante a estocagem. A oligofrutose foi estável ao armazenamento em suco de maçã e poderia ser utilizada como substituto de açúcar, sendo que sua adição resulta em produtos com características físico-químicas e de aceitabilidade semelhantes aos produtos adicionados de sacarose. Sucos de maçã armazenados em embalagem de vidro apresentaram maior viabilidade da cultura probiótica do que os armazenados em embalagem de plástico (PET), não havendo efeito da embalagem nas características físico-químicas e na aceitabilidade dos produtos. É possível desenvolver sucos de maçã simbióticos adicionados de oligofrutose, um prebiótico, e culturas probióticas, onde a oligofrutose ajude na manutenção da viabilidade e estabilidade dos probióticos nos produtos.

**Palavras-chave:** suco de fruta. Prebiótico. Probiótico. *Malus domestica* Borkh. Embalagem

## 1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que conferem efeito benéfico ao indivíduo quando administrados em quantidades adequadas (FAO/WHO, 2002). A cultura *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (L. casei-01) tem apresentado benefícios à saúde, tais como: atividade antimicrobiana em infecções gastrointestinais (THARMARAJ; SHAH, 2009); propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e antioxidantes (KIM et al., 2005; LIU et al., 2011); e estimulação do sistema imune (MIRZAEI et al., 2008).

As culturas probióticas geralmente são adicionadas a produtos lácteos, visto que não há necessidade de grandes mudanças nos processos de fabricação ou na tecnologia envolvida; e os consumidores estão acostumados com a presença de micro-organismos neste tipo de produto (BOZA-MENDÉZ; LÓPEZ-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012). No entanto, outras matrizes alimentares precisam ser avaliadas como carreadoras de bioculturas, a fim de propiciar ao mercado outras opções, especialmente aos consumidores que não apreciam ou não podem consumir derivados do leite, como os intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite, hipercolesterolêmicos ou vegetarianos estritos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Sucos de fruta podem representar um meio alternativo de veicular culturas probióticas e ingredientes prebióticos aos consumidores, uma vez que são considerados produtos saudáveis (MARHAMATIZADEH et al., 2012) e são consumidos regularmente, sendo este um fator essencial para que os probióticos exerçam suas funções (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007). Além disso, são ricos em açúcares, minerais e vitaminas, que poderiam ser utilizados pelos probióticos (DING; SHAH, 2008); e não contém culturas iniciadoras, as quais competiriam com as culturas probióticas por nutrientes (SOHAIL et al., 2012).

No entanto, a adição de probióticos em sucos é mais complexa do que em produtos lácteos, uma vez que os sucos apresentam quantidades insuficientes de peptídeos e aminoácidos livres, necessários no metabolismo das culturas; e as cepas são geralmente sensíveis às condições mais ácidas (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007) e à presença de corantes, saborizantes e conservantes (SHAH et al., 2010) nestes produtos; além de poderem alterar suas características sensoriais (GRANATO et al., 2010).

Prebióticos, como as oligofrutoses, são componentes alimentares não viáveis que conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro associados à modulação de sua microbiota (FAO/AGNS, 2007). Nos alimentos, as oligofrutoses teriam capacidade de

aumentar a viabilidade de culturas probióticas durante o processamento e armazenamento dos produtos, possivelmente por serem substratos disponíveis para o metabolismo desses micro-organismos (DONKOR et al., 2007) e, portanto, poderiam aumentar a estabilidade dos probióticos em sucos de fruta durante a estocagem. Além disso, apresentam gosto doce similar ao da sacarose, podendo ser utilizadas como substitutos de açúcar (RENUKA et al., 2009; YOUSAF et al., 2010). No entanto, a doçura na forma pura é de 30 a 60% quando comparada à da sacarose (APOLINÁRIO et al., 2014; FRANCK, 2002; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

A embalagem dos alimentos tem grande influência sobre a viabilidade de culturas probióticas, visto que esses micro-organismos são geralmente anaeróbios ou microaerófilos e, portanto, a exposição ao oxigênio pode ser letal (TALWALKAR; KAILASAPAHY, 2004). A utilização de embalagens de vidro favorece a sobrevivência das culturas probióticas devido a sua baixa permeabilidade ao oxigênio, no entanto, os altos custos do vidro e os perigos inerentes à sua utilização tornam o seu uso bastante restrito, sendo as embalagens de plástico preferidas pelos fabricantes de alimentos (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Em bebidas não lácteas, probióticos e prebióticos têm sido geralmente empregados em sucos fermentados (ELLENDERSEN et al., 2012; GODERSKA; CZARNECKA; CZARNECKI, 2007; MARHAMATIZADEH et al., 2012; NAZZARO et al., 2008; YOON; WOODAMS; HANG, 2005), devido à maior adaptação e aumento de viabilidade do micro-organismo probiótico no meio ácido durante o processo fermentativo. No entanto, a fermentação altera a textura, aroma, e sabor dos produtos, sendo que sucos fermentados nem sempre são aceitos sensorialmente pelos consumidores (GRANATO et al., 2010).

Poucos estudos avaliaram o efeito da adição de probióticos (CHAMPAGNE; RAYMOND; GAGNON, 2008; DING; SHAH, 2008; RODRIGUES et al., 2012; SAARELA et al., 2006; SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007; SOHAIL et al., 2012) ou prebióticos (RENUKA et al., 2009; SANTOS et al., 2008; YOUSAF et al., 2010) a sucos não fermentados, sendo que nenhum deles estudou o efeito do tipo de embalagem e a influência da adição de oligofrutose como substituto de açúcar e protetor de culturas probióticas. Portanto, o objetivo do presente estudo foi avaliar o efeito do tipo de embalagem (plástico ou vidro) e da adição de cultura probiótica (*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*) e/ou oligofrutose (prebiótico e substituto de açúcar) nas características físico-

químicas e microbiológicas e na aceitabilidade de sucos clarificados de maçã durante armazenamento refrigerado (4°C por 28 dias).

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Maçã Royal Gala (*Malus domestica* Borkh) (Castel Frutas®); enzima pectinolítica (Pectinex Ultra Clear, Novozymes®); bentonita sódica natural (Na-35; Schumacher®); gelatina incolor (Dr. Oetker®); sacarose (União®), oligofrutose (P95, Orafiti®, DP médio 5) e cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (LC-01, Christian Hansen®) foram utilizados no experimento. Foram utilizadas embalagens de vidro (Farma®) ou plástico (Polietileno Tereftalato - PET; Drex®) com capacidade para 50mL. A embalagem de plástico apresentava 0,5 mm de espessura, permeabilidade ao vapor de água de 1,5g de água mm/m<sup>2</sup>.dia (a 38°C e 90% de umidade relativa) e permeabilidade ao oxigênio de 1,8 cm<sup>2</sup>mm/m<sup>2</sup>.dia.atm (a 24°C e 75% de umidade relativa) (HANNAY, 2002).

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Obtenção da Cultura Probiótica Ativada

Para a ativação da cultura probiótica liofilizada utilizou-se o método descrito por Ding e Shah (2008), com modificações propostas por Pimentel, Prudencio e Rodrigues (2011). Uma alçada da cultura foi inoculada em 5mL de caldo MRS (Himedia®) e incubada a 37°C por 15h. Decorrido este tempo, 1% (v/v) foi novamente inoculado em 10mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 15h (préinóculo). Para a obtenção da biomassa, 1% (v/v) do pré-inóculo foi transferido para 300mL de caldo MRS e incubado nas mesmas condições. A biomassa foi separada por centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf®, modelo 5804R) a 14000g (10.000 rpm) por 10 min a 4°C e lavada três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril (NaCl Dinamica®) para a remoção do MRS residual. Após, se ressuspendeu a biomassa em 50mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril, obtendo-se assim a cultura probiótica ativada.

## 2.2.2 Formulações

Dez formulações de sucos clarificados de maçã foram preparadas: PURO-V (suco puro em embalagem de vidro); SAC-V (com sacarose em embalagem de vidro); PRE-V (prebiótica - com oligofrutose em embalagem de vidro); PRO-V (probiótica - com cultura probiótica em embalagem de vidro); SIMB-V (simbiótica - com oligofrutose e cultura probiótica em embalagem de vidro); PURO-P (suco puro em embalagem de plástico); SAC-P (com sacarose em embalagem de plástico); PRE-P (prebiótica - com oligofrutose em embalagem de plástico); PRO-P (probiótica - com cultura probiótica em embalagem de plástico); e SIMB-P (simbiótica - com oligofrutose e cultura probiótica em embalagem de plástico).

## 2.2.3 Preparação dos Sucos de Maçã

Maçãs Gala de um mesmo fornecedor (Castel Frutas®) foram lavadas em água corrente, sanitizadas (6mL/L de desinfetante para hortifrutícolas Pury Vitta®, 0,96% p/p cloro ativo) e trituradas em processador de frutas (Walita®). Os sucos brutos foram submetidos a tratamento enzimático (Pectinex Ultra Clear 0,03 mL/L), sendo mantidos em banho maria por 1 hora a 50°C e posteriormente filtrados a vácuo em funil de Buchner (papel de filtro Qualy®, 80g/m<sup>2</sup>; 205um; 25cm de diâmetro). A clarificação dos sucos foi completada por meio de tratamento com bentonita ativada com 24 horas de antecedência (0,45 g/L) e gelatina (0,05 g/L) a 50°C por 1 hora seguido de filtração a vácuo em funil de Buchner (BURDURLU; KARADENIZ, 2003).

Os sucos clarificados foram, então, adicionados de sacarose (20 g/L) (Formulações SAC-V e SAC-P) e oligofrutose (20 g/L) (Formulações PRE-V; PRE-P; SIMB-V e SIMB-P). A concentração de oligofrutose adicionada se baseou na regulamentação brasileira a fim de utilizar a alegação de propriedade funcional da oligofrutose (prebiótico) (ANVISA, 2008); e na ingestão mínima diária sugerida para frutanos a fim de obter efeitos benéficos à saúde (KEENAN et al., 2011; RÓ(3LE et al., 2010). A sacarose foi adicionada nos teores sugeridos para suco de maçã (BLEIBAUM et al., 2002; ELLENDERSEN et al., 2012).

Todas as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro ou plástico, pasteurizadas a 80°C por 20 minutos em banho maria e resfriadas em banho de gelo até 37°C. As formulações com culturas probióticas (PRO-V; PRO-P; SIMB-V e SIMB-P)

foram adicionadas de 2% (v/v) da cultura probiótica ativada, o que correspondia a  $10^{11}$  células viáveis por litro de suco. Os sucos de maçã foram, então, armazenados a 4°C por 28 dias.

#### 2.2.4 Avaliações Físico-Químicas

As determinações de umidade, proteína, lipídios e cinzas foram realizadas de acordo com a AOAC (2004) e o teor de carboidratos totais foi obtido por diferença. A concentração de oligofrutose foi determinada utilizando o kit enzimático Fructan HK (Megazyme International Irlanda®) (MEGAZYME, 2014). A densidade dos sucos clarificados de maçã foi medida utilizando um picnômetro (25mL, Prolab®).

Determinou-se o pH dos sucos em potenciômetro digital (Tecnal®) previamente calibrado com tampões fosfato (Synth®) pH 4,0 e 7,0. A acidez titulável, expressa em porcentagem de ácido málico, foi medida segundo a AOAC (2004). O teor de SST foi obtido utilizando-se refratômetro do tipo ABBE e os resultados foram expressos em °Brix.

Para avaliação da cor utilizou-se colorímetro (Minolta®, modelo CR400) com adaptador para líquidos, o qual forneceu diretamente os parâmetros L\* (luminosidade), a\* (componente vermelho-verde) e b\* (componente amarelo-azul). A turbidez foi medida utilizando espectrofotômetro UV/VIS a 600nm (SHAH et al., 2010).

#### 2.2.5 Avaliações Microbiológicas

Um mililitro de cada formulação de suco clarificado de maçã foi diluído em 9 mL de água peptonada 0,1% (p/v) (Oxoid®) esterilizada e agitado uniformemente com um agitador. As diluições seriadas foram realizadas e o número de microorganismos viáveis da cultura probiótica enumerado usando a técnica de pour plate. A contagem de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* foi feita em ágar MRS (Difco®) e incubação anaeróbica (Anaerobac, Probac®) a 37°C por 72 horas (THARMARAJ; SHAH, 2003). Aeróbios mesófilos, coliformes totais e termotolerantes, *Salmonella* sp. e bolores e leveduras foram enumerados de acordo com Brasil (2003).

### 2.2.6 Avaliação Sensorial

O teste de aceitação de atributos (cor, aroma, sabor e global), utilizando escala hedônica de 9 pontos (1 = desgostei muitíssimo; 9 = gostei muitíssimo); e o teste de intenção de compra, utilizando escala de 5 pontos (1=certamente não compraria; 5=certamente compraria) (STONE; SIDEL, 2004) foram realizados por uma equipe de 80 julgadores não treinados no 14<sup>o</sup> dia de armazenamento dos produtos. Os julgadores avaliaram as dez formulações em duas sessões de avaliação, onde, em cada sessão, cinco formulações selecionadas de forma aleatória e codificadas, foram avaliadas à temperatura de 4°C, uma de cada vez, em ordem aleatorizada. Os testes foram conduzidos em cabines individuais com lâmpadas fluorescentes. Água potável à temperatura ambiente e biscoitos cream cracker foram disponibilizados para a limpeza da boca antes e entre as avaliações das formulações.

### 2.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

O experimento físico-químico e microbiológico seguiu o delineamento inteiramente casualizado e foi repetido duas vezes. A composição química e a densidade dos sucos foram determinadas em triplicata em cada repetição do experimento no primeiro dia de armazenamento. O pH, acidez titulável, teor de sólidos solúveis totais (SST), conteúdo de oligofrutose, cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ), turbidez e viabilidade da cultura probiótica foram avaliados em triplicata em cada repetição do experimento, a cada sete dias, por um período de 28 dias; por meio de esquema de tratamentos de parcelas subdivididas, onde o tratamento principal foi a formulação e o secundário o tempo de armazenamento. Para a aceitabilidade e intenção de compra o delineamento experimental foi blocos completos casualizados, onde os tratamentos foram as formulações e os blocos os julgadores.

Os dados foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e teste de comparação de médias de Tukey ( $p < 0,05$ ). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Statistical Analysis System (SAS) 9.1.3.

### 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.1 COMPOSIÇÃO QUÍMICA E DENSIDADE

Na Tabela 1 estão apresentadas a composição química e a densidade das formulações de suco clarificado de maçã. A composição química (g/100mL) se encontrou nas seguintes faixas: umidade (85,53-87,60); proteínas (0,038-0,042); cinzas (0,206-0,212), lipídios (0,128-0,149) e carboidratos (12,03-14,02); sendo consistente com as apresentadas por Alvarez et al. (2000) e USDA (2008). As densidades situaram-se entre 1,054 e 1,060 g/mL e estão de acordo com as relatadas por Rizzon, Bernardi e Miele (2005) e Markowski et. (2009) para sucos de maçã.

A adição do probiótico *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (Formulações PRO-V e PRO-P) não alterou ( $p > 0,05$ ) a composição química e a densidade dos sucos clarificados de maçã (PURO-V e PURO-P). Krasaekoopt, Pianjareolap e Kittisuriyanot (2007) também não observaram efeito da adição de *Lactobacillus casei* 01 e *Lactobacillus acidophilus* TISTR 450 na composição química de sucos de uva, abacaxi, maçã, tangerina e laranja vermelha. Efeito não significativo ( $p > 0,05$ ) na composição química e densidade também foi observado para o tipo de embalagem (vidro ou plástico), corroborando estudo anterior com iogurtes (DAVE; SHAH, 1997).

**Tabela 1** – Composição química e densidade dos sucos clarificados de maçã\*

Parâmetros	Formulações**									
	PURO-V	SAC-V	PRE-V	PRO-V	SIMB-V	PURO-P	SAC-P	PRE-P	PRO-P	SIMB-P
Umidade (g/100mL)	87,49±0,77 <sup>a</sup>	85,53±1,09 <sup>b</sup>	85,58±0,86 <sup>b</sup>	87,57±0,87 <sup>a</sup>	85,57±0,94 <sup>b</sup>	87,46±0,90 <sup>a</sup>	85,57±1,05 <sup>b</sup>	85,61±1,22 <sup>b</sup>	87,60±1,00 <sup>a</sup>	85,59±0,88 <sup>b</sup>
Proteínas (g/100mL)	0,039±0,008 <sup>a</sup>	0,039±0,004 <sup>a</sup>	0,038±0,002 <sup>a</sup>	0,042±0,004 <sup>a</sup>	0,041±0,003 <sup>a</sup>	0,038±0,003 <sup>a</sup>	0,038±0,002 <sup>a</sup>	0,038±0,002 <sup>a</sup>	0,041±0,002 <sup>a</sup>	0,042±0,002 <sup>a</sup>
Lipídios (g/100mL)	0,149±0,03 <sup>a</sup>	0,129±0,01 <sup>a</sup>	0,133±0,02 <sup>a</sup>	0,129±0,02 <sup>a</sup>	0,143±0,02 <sup>a</sup>	0,138±0,02 <sup>a</sup>	0,134±0,01 <sup>a</sup>	0,128±0,01 <sup>a</sup>	0,128±0,02 <sup>a</sup>	0,133±0,01 <sup>a</sup>
Cinzas (g/100mL)	0,212±0,07 <sup>a</sup>	0,207±0,05 <sup>a</sup>	0,210±0,06 <sup>a</sup>	0,206±0,06 <sup>a</sup>	0,208±0,08 <sup>a</sup>	0,209±0,03 <sup>a</sup>	0,210±0,08 <sup>a</sup>	0,208±0,05 <sup>a</sup>	0,207±0,06 <sup>a</sup>	0,210±0,05 <sup>a</sup>
Carboidratos (g/100mL)	12,11±0,71 <sup>b</sup>	14,09±1,06 <sup>a</sup>	14,04±0,85 <sup>a</sup>	12,04±0,84 <sup>b</sup>	14,04±0,98 <sup>a</sup>	12,17±0,91 <sup>b</sup>	14,05±1,08 <sup>a</sup>	14,02±1,20 <sup>a</sup>	12,03±0,98 <sup>b</sup>	14,03±0,86 <sup>a</sup>
Densidade (g/mL)	1,054±0,003 <sup>b</sup>	1,060±0,001 <sup>a</sup>	1,060±0,001 <sup>a</sup>	1,054±0,002 <sup>b</sup>	1,060±0,001 <sup>a</sup>	1,054±0,002 <sup>b</sup>	1,059±0,002 <sup>a</sup>	1,060±0,003 <sup>a</sup>	1,054±0,001 <sup>b</sup>	1,060±0,002 <sup>a</sup>

\*Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras distintas indicam diferenças a  $p \leq 0,05$  (n=6).

\*\*Formulações: PURO-V (puro+vidro); SAC-V (sacarose+vidro); PRE-V (oligofrutose+vidro); PRO-V (probiótico+vidro); SIMB-V (oligofrutose+probiótico+vidro); PURO-P (normal+plástico); SAC-P (sacarose+plástico); PRE-P (oligofrutose+plástico); PRO-P (probiótico+plástico); SIMB-P (oligofrutose+probiótico+plástico)

Sucos clarificados de maçã adicionados de sacarose (Formulações SAC-V e SAC-P) ou de oligofrutose (Formulações PRE-V, SIMB-V, PRE-P e SIMB-P) apresentaram menores valores de umidade e maiores valores de carboidratos e densidade ( $p < 0,05$ ) (PURO-V e PURO-P). As oligofrutoses são oligossacarídeos solúveis e a sacarose é um dissacarídeo, sendo que a adição a alimentos ocasiona aumento no teor final de sólidos totais e nos carboidratos (ABREU et al., 2011), os quais estão diretamente relacionados com a densidade (RIZZON; BERNARDI; MIELE, 2005).

### 3.2 Avaliações Físico-Químicas

O pH, acidez titulável e SST dos sucos clarificados de maçã estão apresentados na Tabela 2. O pH e a acidez titulável dos produtos durante o período de estocagem não foram alterados pela adição de oligofrutose ( $p > 0,05$ ), pois os resultados desses parâmetros foram similares nas formulações com oligofrutose (PRE-V e PRE-P) e sem adição desse ingrediente (PURO-V e PURO-P); mas ocorreu aumento do teor de SST ( $p < 0,05$ ); de forma semelhante às formulações adicionadas de sacarose (SAC-V e SAC-P). O aumento no teor de SST estaria relacionado à presença de mono e dissacarídeos na composição da oligofrutose e pela sacarose ser um dissacarídeo. Efeito não significativo ( $p > 0,05$ ) no pH, acidez titulável e SST também foi observado para o tipo de embalagem (vidro ou plástico), corroborando estudo anterior com iogurtes (DAVE; SHAH, 1997).

Sucos clarificados de maçã puros (PURO-V e PURO-P); com oligofrutose (PRE-V e PRE-P) ou com sacarose (SAC-V e SAC-P) não apresentaram alterações ( $p > 0,05$ ) nas características físico-químicas (pH, acidez titulável e SST) durante os 28 dias de armazenamento. A estabilidade dos parâmetros físico-químicos poderia estar relacionada ao tratamento de pasteurização aos quais os sucos foram submetidos (RENUKA et al., 2009), destruindo os micro-organismos que poderiam consumir os nutrientes do suco, principalmente açúcares redutores simples, resultando em diminuições nos teores de sólidos solúveis e aumento da acidez dos produtos (YOUSAF et al., 2010). Estabilidade quanto as características físico-químicas de sucos durante o armazenamento é desejável, pois confirma que os produtos continuam semelhantes àqueles recém-fabricados, mesmo após algumas semanas de armazenamento (PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011).

**Tabela 2** – Parâmetros físico-químicos (pH, acidez titulável e SST) dos sucos clarificados de maçã\*

Parâmetros	Tempo de Estocagem (dias)	Formulações**										
		PURO-V	SAC-V	PRE-V	PRO-V	SIMB-V	PURO-P	SAC-P	PURO-P	PRE-P	PRO-P	SIMB-P
pH	1	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,83± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,83± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,82± 0,03 <sup>Ab</sup>	3,83± 0,02 <sup>Ab</sup>
	7	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,03 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>
	14	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,03 <sup>Aa</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,81± 0,02 <sup>Bcb</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,03 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,82± 0,02 <sup>Ab</sup>	3,81± 0,01 <sup>Bcb</sup>
	21	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,80± 0,02 <sup>Bb</sup>	3,80± 0,02 <sup>Ccb</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,80± 0,02 <sup>Bb</sup>	3,80± 0,02 <sup>Cb</sup>
	28	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,03 <sup>Aa</sup>	3,79± 0,02 <sup>Cb</sup>	3,79± 0,02 <sup>Db</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,84± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,85± 0,02 <sup>Aa</sup>	3,79± 0,02 <sup>Cb</sup>	3,79± 0,02 <sup>Db</sup>
Acidez titulável (%ácido málico)	1	0,237± 0,003 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Db</sup>	0,237± 0,002 <sup>Db</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,239± 0,002 <sup>Da</sup>	0,239± 0,002 <sup>Da</sup>
	7	0,237± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,238± 0,002 <sup>Cb</sup>	0,240± 0,002 <sup>Ca</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ac</sup>	0,241± 0,002 <sup>Ca</sup>	0,241± 0,002 <sup>Ca</sup>
	14	0,238± 0,004 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,241± 0,002 <sup>Ba</sup>	0,243± 0,002 <sup>Ba</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,238± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,243± 0,002 <sup>Bca</sup>	0,243± 0,002 <sup>Bca</sup>
	21	0,237± 0,003 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,003 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,245± 0,002 <sup>Aa</sup>	0,244± 0,002 <sup>Aba</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,235± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,244± 0,002 <sup>Aba</sup>	0,244± 0,002 <sup>Aba</sup>
	28	0,238± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,247± 0,002 <sup>Aa</sup>	0,246± 0,002 <sup>Aa</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,236± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,237± 0,002 <sup>Ab</sup>	0,246± 0,002 <sup>Aa</sup>	0,246± 0,002 <sup>Aa</sup>
Sólidos solúveis totais (°Brix)	1	12,79± 0,87 <sup>Ab</sup>	14,33± 0,91 <sup>Aa</sup>	14,33± 0,92 <sup>Aa</sup>	12,58± 0,92 <sup>Ab</sup>	14,17± 1,01 <sup>Aa</sup>	12,83± 0,92 <sup>Ab</sup>	14,33± 0,92 <sup>Aa</sup>	12,83± 0,92 <sup>Ab</sup>	14,33± 0,92 <sup>Aa</sup>	12,58± 0,92 <sup>Ab</sup>	14,17± 1,00 <sup>Aa</sup>
	7	12,80± 0,87 <sup>Ac</sup>	14,38± 0,88 <sup>Aa</sup>	14,33± 0,83 <sup>Aab</sup>	12,46± 0,87 <sup>Aa</sup>	13,96± 0,87 <sup>Abc</sup>	12,79± 0,78 <sup>Ad</sup>	14,38± 0,79 <sup>Aa</sup>	12,79± 0,78 <sup>Ad</sup>	14,33± 0,83 <sup>Aab</sup>	12,46± 0,87 <sup>Aa</sup>	14,04± 0,78 <sup>Abbc</sup>
	14	12,80± 0,87 <sup>Ac</sup>	14,33± 0,91 <sup>Aa</sup>	14,38± 0,88 <sup>Aa</sup>	12,33± 0,92 <sup>Abd</sup>	13,83± 0,92 <sup>Bcb</sup>	12,79± 0,87 <sup>Ac</sup>	14,33± 0,92 <sup>Aa</sup>	12,79± 0,87 <sup>Ac</sup>	14,29± 0,87 <sup>Aa</sup>	12,33± 0,92 <sup>Abd</sup>	13,83± 0,92 <sup>Bcb</sup>
	21	12,54± 0,87 <sup>Ac</sup>	14,17± 1,00 <sup>Aa</sup>	14,17± 1,01 <sup>Aa</sup>	12,13± 0,96 <sup>Bd</sup>	13,67± 0,92 <sup>Bcb</sup>	12,58± 0,92 <sup>Ac</sup>	14,21± 1,05 <sup>Aa</sup>	12,58± 0,92 <sup>Ac</sup>	14,21± 1,05 <sup>Aa</sup>	12,08± 0,92 <sup>Bd</sup>	13,63± 0,88 <sup>Cb</sup>
	28	12,71± 0,97 <sup>Ac</sup>	14,25± 1,01 <sup>Aa</sup>	14,21± 0,97 <sup>Aa</sup>	12,04± 0,87 <sup>Bd</sup>	13,54± 0,87 <sup>Cb</sup>	12,71± 1,05 <sup>Ac</sup>	14,25± 1,01 <sup>Aa</sup>	12,71± 1,05 <sup>Ac</sup>	14,13± 0,96 <sup>Aa</sup>	12,04± 0,87 <sup>Bd</sup>	13,54± 0,87 <sup>Cb</sup>

\*Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras minúsculas distintas indicam diferenças a  $p \leq 0,05$  entre as formulações de suco clarificado de maçã para o mesmo dia de estocagem. Médias ± desvio padrão na mesma coluna acompanhadas de letras maiúsculas distintas indicam diferenças a  $p \leq 0,05$  para cada formulação afetada pelo tempo de armazenamento (n=6).

\*\*Formulações: PURO-V (puro+vidro); SAC-V (sacarose+vidro); PRE-V (oligofrutose+vidro); PRO-V (probiótico+vidro); SIMB-V (oligofrutose+probiótico+vidro); PURO-P (puro+plástico); SAC-P (sacarose+plástico); PRE-P (oligofrutose+plástico); PRO-P (probiótico+plástico); SIMB-P (oligofrutose+probiótico+plástico)

A adição da cultura probiótica (Formulações PRO-V, SIMB-V, PRO-P e SIMB-P) ocasionou ligeiro aumento da acidez titulável e reduções do pH e do teor de SST no sucos clarificados de maçã (PURO-V e PURO-P) ( $p < 0,05$ ) durante o armazenamento refrigerado. Os micro-organismos probióticos podem ter metabolizado os açúcares simples presentes no suco e/ou a oligofrutose e, como consequência, houve produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (RODRIGUES et al., 2012; SHAH et al., 2010; SOHAIL et al., 2012). A acidificação dos sucos também poderia estar relacionada à liberação de enzimas a partir de bactérias mortas e à hidrólise de açúcares dos sucos (DING; SHAH, 2008). De fato, o *Lactobacillus paracasei* é conhecido por sua capacidade de produzir ácido láctico a partir de fontes de carbono (RODRIGUES et al., 2012).

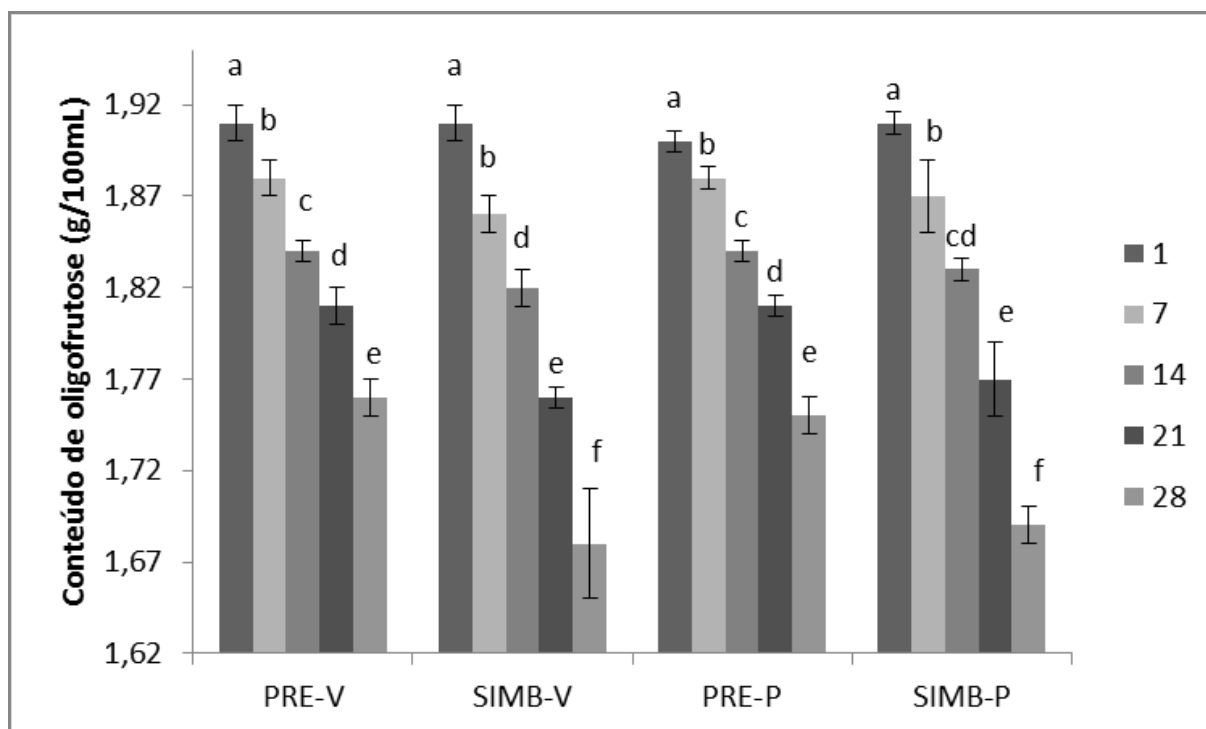
Os ácidos orgânicos contribuem para o sabor e palatabilidade de sucos de fruta, sendo que a maior acidez dos produtos probióticos poderia protegê-los do desenvolvimento de micro-organismos, aumentando sua vida útil; desde que não influenciem as características sensoriais ou tecnológicas dos produtos. Os valores de pH (3,79-3,85); acidez titulável (0,236-0,246 % ácido málico) e SST (12,58-14,38°Brix) são típicos para sucos de maçã e similares aos reportados por outros autores (EISELE; DRAKE, 2005; ELLENDERSEN et al., 2012).

O conteúdo de oligofrutose nas formulações de suco de maçã está apresentado na Figura 1. A concentração após 1 dia de armazenamento foi 1,901,91 g/100mL para todas as formulações adicionadas de oligofrutose (PRE-V, SIMB-V, PRE-P e SIMB-P), menor do que o nível adicionado originalmente (2 g/100mL). Isto pode estar relacionado com o fato de que a oligofrutose já tem 5 a 6 % de açúcares livres (frutose, glicose e sacarose) em sua formulação (BLECKER et al., 2002; RÕ(3LE et al., 2010) .

Durante o período de armazenamento, o teor de oligofrutose foi reduzido em 8% nas formulações prebióticas (PRE-V e PRE-P) e 11% nas formulações simbióticas (SIMB-V e SIMB-P), indicando que o prebiótico sofreu decomposição no baixo pH (Tabela 2), e provavelmente foi utilizado pela cultura probiótica no seu metabolismo. De fato, em ambientes ácidos, a oligofrutose pode ser hidrolisada, o que resulta na perda de propriedades nutricionais, físico-químicas e funcionais (COURTIN et al., 2009). No entanto, a hidrólise é limitada a menos de 10% se os produtos apresentarem mais do que 70% de umidade, forem estocados a temperaturas inferiores a 10°C ou tiverem tempo de vida útil, como os sucos clarificados de maçã (FRANCK, 2002). Algumas culturas probióticas, como *Lactobacillus paracasei* ssp . *paracasei*, têm a capacidade de utilizar frutanos tipo inulina

como substratos para o metabolismo, aumentando a sua sobrevivência durante o armazenamento dos produtos (DONKOR et al. , 2007) .

**Figura 1** – Conteúdo de oligofrutose (g/100mL) nas formulações de suco clarificado de maçã (PRE-V, SIMB-V, PRE-P e SIMB-P) durante armazenamento refrigerado (4°C)\*



\*As barras de erro representam o desvio padrão (n = 6). Formulações: PRE-V (prebiótica + vidro); SIMB-V (probiótico + prebiótico + vidro); PRE-P (prebiótico + plástico); e SIMB-P (probiótico + prebiótico + plástico). 1, 7, 14, 21 e 28 = tempo de armazenamento (dias)

No 28º dia de armazenamento, as formulações apresentaram 1,68-1,76 g de oligofrutose /100mL ou 3,36-3,52 g/ 200mL (porção diária). A ingestão mínima diária sugerida para frutanos a fim de obter efeitos benéficos à saúde é de 3 a 8 g de oligofrutose / porção do produto (KEENAN et al., 2011; RÕ(3LE et al., 2010). Com base nessa diretriz e na regulamentação brasileira (1,5 g / porção diária) (ANVISA, 2008), todos os sucos de maçã adicionados de oligofrutose e armazenados sob refrigeração por 28 dias do presente estudo podem ser considerados prebióticos, para uma porção de 200 mL.

Na Tabela 3 estão apresentados os resultados para os parâmetros de cor ( $L^*$ ,  $a^*$  e  $b^*$ ) e turbidez das formulações de suco.

Não houve influência ( $p > 0,05$ ) da adição de oligofrutose (PRE-V e PRE-P) na luminosidade ( $L^*$ ), cor amarela ( $b^*$ ) e turbidez dos sucos de maçã (PURO-V e PURO-P), enquanto um aumento na cor vermelha ( $a^*$ ) foi notado apenas nas embalagens de plástico, considerando os produtos ao final do período de armazenamento (28 dias). Comportamento

semelhante ( $p > 0,05$ ) foi observado para as formulações adicionadas de sacarose (SAC-V e SAC-P). Sabe-se que a estabilidade da cor e da turbidez é uma característica importante para a aceitação dos produtos pelos consumidores, já que a cor é um dos atributos primários de qualidade (RENUKA et al., 2009) e a turbidez é um problema em sucos clarificados (YOUSAF et al., 2010).

Sucos adicionados de culturas probióticas (PRO-V; SIMB-V; PRO-P e SIMB-P) apresentaram coloração mais vermelha e escura; e maior turbidez do que os produtos sem adição (PURO-V e PURO-P) ( $p < 0,05$ ), pois menores valores de  $L^*$  e  $b^*$  e maiores valores de  $a^*$  e turbidez foram encontrados. As alterações de cor e a turbidez foram ocasionadas pela adição do inóculo na forma de solução salina ao suco clarificado. O probiótico possivelmente estava suspenso na solução, na forma de partículas, as quais eram muito pequenas para sedimentarem, mas grandes o suficiente para refratarem a luz.

Durante o armazenamento, as alterações de cor e a turbidez proporcionadas pela adição da cultura probiótica foram intensificadas, mas com os produtos probióticos (PRO-V e PROV-P) apresentando maior turbidez ( $p < 0,05$ ) do que os simbióticos (SIMB-V e SIMB-P). O aumento da turbidez e a intensificação da cor vermelha provavelmente se devem ao acúmulo de células bacterianas lisadas ou mortas (SHAH et al., 2010). A diferença de turbidez entre as formulações probióticas e simbióticas é um indicativo de que as primeiras apresentavam menor sobrevivência da cultura probiótica, e, portanto, maior quantidade de células lisadas/mortas e maior turbidez.

**Tabela 3** – Parâmetros de cor (L\*, a\* e b\*) e turbidez dos sucos clarificados de maçã\*

Parâmetros	Tempo de Estocagem (dias)	Formulações**									
		PURO-V	SAC-V	PRE-V	PRO-V	SIMB-V	PURO-P	SAC-P	PRE-P	PRO-P	SIMB-P
L*	1	48,11±1,29 <sup>Abc</sup>	49,06±0,71 <sup>Aa</sup>	48,56±0,59 <sup>Aab</sup>	45,36±1,87 <sup>Aa</sup>	46,70±0,33 <sup>Ad</sup>	48,56±0,95 <sup>Aab</sup>	49,42±0,44 <sup>Aa</sup>	49,25±0,59 <sup>Aa</sup>	47,00±0,60 <sup>Ad</sup>	47,55±0,43 <sup>Ad</sup>
	7	48,11±1,17 <sup>Ab</sup>	49,24±1,02 <sup>Aa</sup>	49,15±1,39 <sup>Aa</sup>	44,70±1,19 <sup>Ad</sup>	46,20±0,60 <sup>ABc</sup>	49,16±0,61 <sup>Aa</sup>	49,63±0,81 <sup>Aa</sup>	49,74±1,15 <sup>Aa</sup>	45,19±0,37 <sup>Bd</sup>	45,95±0,93 <sup>Bc</sup>
	14	47,91±1,63 <sup>Ab</sup>	48,97±0,61 <sup>Aa</sup>	47,97±1,54 <sup>Ab</sup>	43,72±1,94 <sup>Ba</sup>	45,06±0,98 <sup>Bd</sup>	48,17±1,41 <sup>Aab</sup>	48,60±1,02 <sup>Aab</sup>	48,52±1,15 <sup>Aab</sup>	45,54±0,65 <sup>Bcd</sup>	46,29±0,39 <sup>Bc</sup>
	21	47,98±1,56 <sup>Ab</sup>	49,16±0,35 <sup>Aa</sup>	49,02±0,43 <sup>Aa</sup>	43,94±1,76 <sup>Bd</sup>	45,56±0,57 <sup>Bc</sup>	48,40±1,36 <sup>Aab</sup>	48,98±0,61 <sup>Aa</sup>	49,03±0,59 <sup>Aa</sup>	45,99±0,70 <sup>Bc</sup>	46,32±0,22 <sup>Bc</sup>
	28	48,59±1,00 <sup>Aab</sup>	49,23±0,65 <sup>Aa</sup>	48,57±1,65 <sup>Aab</sup>	43,88±1,70 <sup>Bd</sup>	45,13±0,84 <sup>Bc</sup>	48,16±1,89 <sup>Aab</sup>	48,63±1,09 <sup>Aab</sup>	48,61±1,16 <sup>Aa</sup>	45,41±0,44 <sup>Bc</sup>	45,24±0,70 <sup>Cc</sup>
a*	1	3,45±0,14 <sup>Aa</sup>	3,65±0,45 <sup>Aa</sup>	3,55±0,20 <sup>Aa</sup>	3,59±0,33 <sup>Ca</sup>	3,19±0,12 <sup>Cb</sup>	3,42±0,10 <sup>Aa</sup>	3,62±0,45 <sup>Aa</sup>	3,50±0,13 <sup>Aa</sup>	3,47±0,10 <sup>Ba</sup>	3,18±0,12 <sup>Cb</sup>
	7	3,53±0,22 <sup>Aabc</sup>	3,69±0,14 <sup>Aa</sup>	3,40±0,49 <sup>Bbc</sup>	3,68±0,07 <sup>Bca</sup>	3,58±0,21 <sup>Bab</sup>	3,33±0,31 <sup>Ac</sup>	3,73±0,16 <sup>Aa</sup>	3,30±0,47 <sup>Ac</sup>	3,76±0,39 <sup>Aab</sup>	3,59±0,34 <sup>Bab</sup>
	14	3,49±0,26 <sup>Ac</sup>	3,56±0,25 <sup>Abcd</sup>	3,49±0,16 <sup>Ac</sup>	3,89±0,17 <sup>ABa</sup>	3,71±0,16 <sup>Babc</sup>	3,34±0,33 <sup>Ad</sup>	3,61±0,10 <sup>Abc</sup>	3,50±0,34 <sup>Ac</sup>	3,74±0,34 <sup>Aab</sup>	3,62±0,35 <sup>Bbc</sup>
	21	3,50±0,24 <sup>Ac</sup>	3,51±0,19 <sup>Ac</sup>	3,51±0,17 <sup>Ac</sup>	3,95±0,10 <sup>Aa</sup>	3,76±0,13 <sup>ABab</sup>	3,33±0,34 <sup>Ad</sup>	3,65±0,29 <sup>Abc</sup>	3,50±0,34 <sup>Ac</sup>	3,75±0,35 <sup>Aab</sup>	3,63±0,36 <sup>Bbc</sup>
	28	3,66±0,14 <sup>Ac</sup>	3,83±0,20 <sup>Abcd</sup>	3,69±0,14 <sup>Ac</sup>	4,09±0,12 <sup>Aa</sup>	3,95±0,22 <sup>Aab</sup>	3,37±0,11 <sup>Aa</sup>	3,79±0,28 <sup>ABcd</sup>	3,64±0,32 <sup>Ad</sup>	3,91±0,43 <sup>Aab</sup>	3,87±0,19 <sup>Aabc</sup>
b*	1	13,92±1,05 <sup>Cbc</sup>	14,25±1,11 <sup>Cab</sup>	13,59±1,11 <sup>Ccd</sup>	12,95±0,80 <sup>Ba</sup>	13,20±0,92 <sup>Cde</sup>	13,98±0,81 <sup>Cbc</sup>	14,67±1,04 <sup>Ba</sup>	14,09±0,98 <sup>BCbc</sup>	13,27±0,70 <sup>Cde</sup>	14,02±0,98 <sup>Cbc</sup>
	7	14,22±0,61 <sup>BCbc</sup>	14,64±1,10 <sup>ABab</sup>	14,03±1,07 <sup>Bcd</sup>	12,97±0,84 <sup>Ba</sup>	13,57±1,07 <sup>BCde</sup>	14,42±0,24 <sup>ABabc</sup>	14,83±0,77 <sup>ABa</sup>	14,13±0,93 <sup>ABc</sup>	13,61±0,63 <sup>Bd</sup>	14,48±1,29 <sup>ABabc</sup>
	14	14,11±0,43 <sup>Cbc</sup>	14,50±0,65 <sup>BCab</sup>	14,23±0,42 <sup>BCab</sup>	13,28±0,62 <sup>Bd</sup>	13,56±0,92 <sup>CDcd</sup>	14,35±0,77 <sup>BCab</sup>	14,52±1,36 <sup>Ba</sup>	13,96±0,93 <sup>Cc</sup>	13,83±0,50 <sup>BCc</sup>	14,36±1,10 <sup>BCab</sup>
	21	14,73±1,17 <sup>ABb</sup>	15,23±1,54 <sup>Aab</sup>	14,51±0,99 <sup>ABbc</sup>	13,68±1,22 <sup>Aa</sup>	14,20±1,68 <sup>ABc</sup>	14,59±1,17 <sup>ABbcd</sup>	14,65±1,60 <sup>ABbc</sup>	14,39±1,54 <sup>ABbcd</sup>	14,13±1,01 <sup>ABde</sup>	14,62±1,53 <sup>ABbcd</sup>
	28	14,89±0,67 <sup>Aab</sup>	15,03±1,33 <sup>Aa</sup>	14,80±0,63 <sup>Aab</sup>	14,10±0,54 <sup>Ac</sup>	14,43±0,78 <sup>Abc</sup>	14,79±0,55 <sup>Aab</sup>	15,08±1,23 <sup>Aa</sup>	14,77±0,89 <sup>Aab</sup>	14,51±0,47 <sup>Abc</sup>	15,01±0,94 <sup>Aa</sup>
Turbidez a 600nm	1	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,32±0,03 <sup>Cb</sup>	0,31±0,03 <sup>Cb</sup>	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,34±0,04 <sup>Ca</sup>	0,31±0,04 <sup>Cb</sup>
	7	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,40±0,09 <sup>Ca</sup>	0,38±0,08 <sup>Bb</sup>	0,13±0,01 <sup>Ac</sup>	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,41±0,05 <sup>Ba</sup>	0,39±0,04 <sup>ABa</sup>
	14	0,11±0,02 <sup>Ad</sup>	0,10±0,01 <sup>Ad</sup>	0,10±0,01 <sup>Ad</sup>	0,42±0,06 <sup>Ba</sup>	0,39±0,06 <sup>Bbc</sup>	0,11±0,01 <sup>Ad</sup>	0,11±0,01 <sup>Ad</sup>	0,11±0,01 <sup>Ad</sup>	0,40±0,05 <sup>Bb</sup>	0,38±0,05 <sup>Bc</sup>
	21	0,12±0,00 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,10±0,01 <sup>Ac</sup>	0,42±0,07 <sup>Ba</sup>	0,39±0,06 <sup>Bb</sup>	0,11±0,00 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,10±0,00 <sup>Ac</sup>	0,41±0,06 <sup>Ba</sup>	0,39±0,06 <sup>ABb</sup>
	28	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,10±0,00 <sup>Ac</sup>	0,44±0,07 <sup>Aa</sup>	0,41±0,06 <sup>Ab</sup>	0,12±0,01 <sup>Ac</sup>	0,11±0,00 <sup>Ac</sup>	0,11±0,01 <sup>Ac</sup>	0,43±0,07 <sup>Aa</sup>	0,40±0,05 <sup>Ab</sup>

\*Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras minúsculas distintas indicam diferenças a  $p \leq 0,05$  entre as formulações de suco clarificado de maçã para o mesmo dia de estocagem. Médias ± desvio padrão na mesma coluna acompanhadas de letras maiúsculas distintas indicam diferenças a  $p \leq 0,05$  para cada formulação afetada pelo tempo de armazenamento (n=6).

\*\*Formulações: PURO-V (puro+vidro); SAC-V (sacarose+vidro); PRE-V (oligofrutose+vidro); PRO-V (probiótico+vidro); SIMB-V (oligofrutose+probiótico+vidro); PURO-P (puro+plástico); SAC-P (sacarose+plástico); PRE-P (oligofrutose+plástico); PRO-P (probiótico+plástico); SIMB-P (oligofrutose+probiótico+plástico).

L\* variando de 0 (preto) a 100 (branco); a\* variando do vermelho (+a\*) ao verde (-a\*) e b\* variando do amarelo (+b\*) ao azul (-b\*)

Todas as formulações de sucos clarificados de maçã apresentaram aumento ( $p < 0,05$ ) do parâmetro  $b^*$  de cor durante o período de armazenamento; indicando que os produtos se tornaram mais amarelados. A intensificação da cor pode ter sido ocasionada por reações oxidativas e não oxidativas de polifenóis, resultando em produtos de condensação coloridos; e em menor extensão, pela Reação de Maillard ou de formação de melanoidinas, que envolve açúcares e aminoácidos ou outros compostos aminados (TAJCHAKAVIT et al., 2001). Instabilidade da cor é considerada um problema de qualidade em sucos de maçã, no entanto, só se torna importante se influenciar a aceitabilidade dos produtos pelos consumidores.

### 3.3 AVALIAÇÕES MICROBIOLÓGICAS

As contagens microbianas durante o armazenamento dos sucos clarificados de maçã foram inferiores a 10 UFC/mL para mesófilos aeróbicos; 10 UFC/mL para bolores e leveduras e 3 NMP/mL para coliformes totais e termotolerantes; além de ausência de *Salmonella* sp. em 25mL de produto. Esses resultados atestam a adequação das operações de pré-processamento, a eficácia do tratamento térmico e a sanidade e estabilidade dos sucos clarificados de maçã durante o armazenamento refrigerado, sem a necessidade de utilização de conservantes.

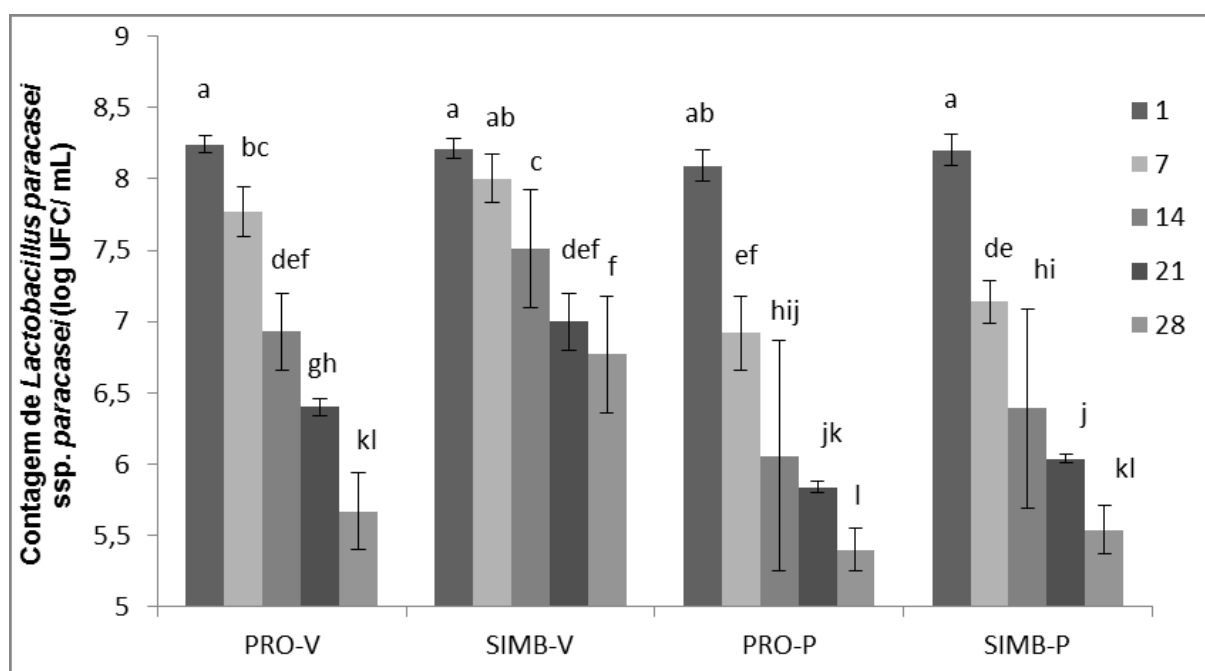
A sobrevivência da cultura probiótica nas formulações de suco de maçã está apresentada na Figura 2. No primeiro dia de armazenamento, as formulações PRO-V; SIMB-V; PRO-P e SIMB-P apresentaram contagens semelhantes ( $p > 0,05$ ) de *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*, indicando que a cultura probiótica estava presente na mesma quantidade em todas as formulações.

Houve uma rápida perda de viabilidade do probiótico ( $p < 0,05$ ) durante o armazenamento dos sucos clarificados de maçã (PRO-V; SIMB-V; PRO-P e SIMB-P), o que poderia estar relacionado à acidez; à presença de oxigênio no meio; ou ao baixo teor de compostos nitrogenados. As culturas probióticas são neutrófilas, com pH ótimo entre 5 e 9, e inibição de crescimento em pHs inferiores a 4,5. Quando as células estão presentes em ambientes com baixo pH, há um aumento da energia requerida para a manutenção do pH intracelular, e, como resultado, falta ATP para outras funções cruciais, ocasionando a morte celular (NUALKAEKUL; SALMERON; CHARAMPOPOULOS, 2011).

Probióticos são geralmente anaeróbicos ou microaerófilos e, portanto, por serem desprovidos da cadeia transportadora de elétrons e/ou da enzima catalase, a

presença de oxigênio pode ocasionar formação e acúmulo de metabólitos tóxicos na célula e resultar na morte celular por dano oxidativo (BOZA-MENDÉZ; LÓPEZ-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012; TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004). A contínua exposição ao oxigênio sob condições ácidas durante a estocagem dos produtos é a maior responsável pela redução nas contagens dos probióticos (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007).

**Figura 2** – Viabilidade (log UFC/mL) de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* nas formulações de sucos clarificados de maçã (PRO-V, SIMB-V, PRO-P e SIMB-P) durante armazenamento refrigerado (4°C)\*



\*As barras de erro representam o desvio padrão (n=6). Formulações: PRO-V (probiótico+vidro); SIMB-V (probiótico+prebiótico+vidro); PRO-P (probiótico+plástico); SIMB-P (probiótico+prebiótico+plástico). 1, 7, 14, 21 e 28 = tempo de armazenamento (dias)

A quantidade de proteína contida nos alimentos é um fator que influencia a sobrevivência de culturas probióticas, sendo sugeridas concentrações mínimas de 0,3% (NUALKAEKUL; SALMERON; CHARALAMPOPOULOS, 2011). De fato, o *Lactobacillus paracasei* tem necessidade específica por compostos nitrogenados (RODRIGUES et al., 2012). Agentes clarificantes são comumente utilizados na estabilização de sucos clarificados de maçã, como a bentonita, por efetiva e indiscriminadamente remover a proteína presente, a qual influencia a turbidez dos produtos (YOUSAF et al., 2010). Os sucos clarificados apresentaram quantidades ínfimas de proteínas (« 0,04%) (Tabela 1), o que pode ter relação com a perda de viabilidade dos probióticos.

É imperativo do ponto de vista de benefícios à saúde do consumidor que as culturas probióticas selecionadas mantenham sua viabilidade e funcionalidade durante o

período de armazenamento dos produtos (SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007). Consideram-se como valores potencialmente funcionais para probióticos contagens acima de  $10^6$  UFC/mL (DONKOR et al., 2007) ou  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção diária do produto (200mL) (ANVISA, 2008), portanto, os sucos poderiam ser considerados probióticos por 14 dias (PRO-P), 21 dias (SIMB-P e PRO-V) e 28 dias (SIMB-V).

As embalagens de vidro foram mais eficientes do que as embalagens de plástico na manutenção da viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento refrigerado, visto que as formulações em embalagens de vidro (PRO-V e SIMB-V) apresentaram maiores contagens ( $p < 0,05$ ) do que as formulações em embalagens de plástico (PRO-P e SIMB-P). Como não houve influência do tipo de embalagem no pH e na acidez titulável dos produtos durante o armazenamento refrigerado (Tabela 2), as variações nas contagens do probiótico entre as formulações podem ser relacionadas ao conteúdo de oxigênio dissolvido nos produtos. A permeabilidade ao oxigênio da embalagem é considerada o fator chave para os altos níveis de oxigênio presentes, sendo que materiais como polietileno, poliestireno ou PVC são permeáveis a gases e permitem a difusão do oxigênio nos produtos durante o armazenamento (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; VILLAS BOAS et al., 2012), enquanto o vidro apresenta permeabilidade extremamente baixa (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007).

Portanto, a fim de produzir sucos clarificados de maçã com *Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei* como cultura probiótica, a recomendação seria a utilização de embalagens de vidro, que, embora não sejam convenientes e práticas devido ao alto custo e aos perigos no manuseio (TALWALKAR; KAILAPATHY, 2004), foram mais efetivas na preservação das culturas. As embalagens de plástico, por sua vez, possivelmente não apresentaram suficientes propriedades de barreira ao oxigênio e, portanto, foram menos adequadas. Assim, caso haja opção por embalagens de plástico, alternativas poderiam ser estudadas, incluindo a adição de compostos que promovam condições anaeróbicas no suco, como o ácido ascórbico; ou utilização de embalagens ativas contendo absorvedores de oxigênio; com propriedades de permeabilidade seletiva ou fabricadas com espessura aumentada (CRUZ; FARIA; VAN DENDER, 2007; SHAH, 2000). Contudo, as recomendações genéricas sobre o melhor tipo de embalagem para probióticos não devem ser simplesmente extrapoladas, perante a diversidade de culturas existentes e das características intrínsecas de cada fruta utilizada na obtenção do suco.

A adição de oligofrutose (SIMB-V e SIMB-P) auxiliou na sobrevivência das culturas probióticas ( $p < 0,05$ ) nos sucos clarificados de maçã (PRO-V e PRO-P). As

oligofrutoses podem exercer efeito protetor sobre culturas probióticas, aumentando sua sobrevivência e atividade durante a estocagem de alimentos (DONKOR et al., 2007; SAARELA et al., 2006). Este efeito poderia ser atribuído ao fato das oligofrutoses serem substratos disponíveis para o metabolismo das culturas probióticas; servindo como fonte de carbono para a manutenção da célula e prevenindo injúrias causadas pela acidez (Figura 1). Além disso, a oligofrutose pode ter protegido fisicamente os probióticos de danos causados pelo ambiente por meio da adesão das células bacterianas ao oligossacarídeo (NUALKAEKUL; DEEPIKA; CHARAKANPOPOULOS, 2012).

### 3.4 AVALIAÇÃO SENSORIAL

Os sucos clarificados de maçã foram avaliados sensorialmente no 14<sup>o</sup> dia de armazenamento, pois todas as formulações adicionadas de probióticos (PRO-V; SIMB-V; PRO-P e SIMB-P) apresentavam contagens suficientes da cultura para serem consideradas alimentos probióticos ( $> 10^6$  UFC/mL) (Figura 2).

Na Tabela 4 estão apresentadas a aceitabilidade e a intenção de compra das formulações de suco de maçã. Os julgadores indicaram que gostaram moderadamente dos sucos clarificados de maçã (valores hedônicos próximos de 7 em escala de 9 pontos) e que provavelmente comprariam os produtos (valores próximos de 4 em escala de 5 pontos).

**Tabela 4** – Aceitabilidade e intenção de compra dos sucos clarificados de maçã\*

Parâmetros	Formulações**									
	PURO-V	SAC-V	PRE-V	PRO-V	SIMB-V	PURO-P	SAC-P	PRE-P	PRO-P	SIMB-P
Cor	7,0±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,5 <sup>a</sup>	6,8±1,5 <sup>a</sup>	6,9±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,4 <sup>a</sup>	6,7±1,3 <sup>a</sup>	6,9±1,5 <sup>a</sup>	6,9±1,5 <sup>a</sup>	6,9±1,3 <sup>a</sup>	6,7±1,5 <sup>a</sup>
Aroma	6,8±1,4 <sup>a</sup>	6,6±1,7 <sup>a</sup>	6,7±1,4 <sup>a</sup>	6,7±1,5 <sup>a</sup>	6,6±1,4 <sup>a</sup>	6,5±1,5 <sup>a</sup>	6,4±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,3 <sup>a</sup>	6,9±1,3 <sup>a</sup>	6,6±1,4 <sup>a</sup>
Sabor	7,0±1,5 <sup>a</sup>	6,9±1,6 <sup>a</sup>	7,0±1,4 <sup>a</sup>	7,0±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,5 <sup>a</sup>	6,3±1,6 <sup>a</sup>	6,6±1,8 <sup>a</sup>	6,9±1,4 <sup>a</sup>	7,0±1,3 <sup>a</sup>	6,8±1,4 <sup>a</sup>
Global	6,9±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,5 <sup>a</sup>	6,9±1,4 <sup>a</sup>	6,9±1,3 <sup>a</sup>	6,8±1,4 <sup>a</sup>	6,5±1,4 <sup>a</sup>	6,7±1,5 <sup>a</sup>	7,0±1,3 <sup>a</sup>	6,9±1,2 <sup>a</sup>	6,8±1,7 <sup>a</sup>
Intenção de compra	3,6±1,0 <sup>a</sup>	3,6±1,0 <sup>a</sup>	3,7±0,9 <sup>a</sup>	3,7±0,9 <sup>a</sup>	3,6±0,9 <sup>a</sup>	3,3±1,0 <sup>a</sup>	3,5±1,1 <sup>a</sup>	3,6±1,0 <sup>a</sup>	3,6±0,9 <sup>a</sup>	3,5±0,9 <sup>a</sup>

\*Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras iguais não diferem a  $p \leq 0,05$ .

\*\*Formulações: PURO-V (puro+vidro); SAC-V (sacarose+vidro); PRE-V (oligofrutose+vidro); PRO-V (probiótico+vidro); SIMB-V (oligofrutose+probiótico+vidro); PURO-P (puro+plástico); SAC-P (sacarose+plástico); PRE-P (oligofrutose+plástico); PRO-P (probiótico+plástico); SIMB-P (oligofrutose+probiótico+plástico).

Valores hedônicos (cor, aroma, sabor e global): 1 – desgostei muitíssimo; 9- gostei muitíssimo

Intenção de compra: 1 – certamente não compraria; 5- certamente compraria

A presença de sacarose (SAC-V e SAC-P), oligofrutose (PRE-V e PRE-P) ou cultura probiótica (PRO-V e PRO-P) não interferiu ( $p > 0,05$ ) na aceitabilidade (cor, aroma, sabor e global) e na intenção de compra dos sucos clarificados de maçã (PURO-V e PURO-P), assim como o tipo de embalagem; indicando que, embora essas adições tenham alterado algumas características físico-químicas dos produtos; não afetaram o quanto os consumidores gostaram dos sucos e o desejo dos mesmos em consumi-los ou comprá-los. Renuka et al. (2009) também não detectaram mudanças na aceitabilidade de sucos de fruta (abacaxi, manga e laranja) adicionados de fruto-oligossacarídeos quando comparados aos produtos controle. Pimentel, Prudencio e Rodrigues (2011) relataram que a adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* não influenciou a aceitabilidade (aparência, aroma, sabor, textura e global) e a intenção de compra de néctares de pêsego.

O metabolismo de culturas probióticas pode resultar na produção de componentes que contribuem negativamente no aroma e sabor dos produtos (BOZAMENDÉZ; LÓPEZ-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012). Conseqüentemente, produtos adicionados de probióticos podem apresentar menor aceitabilidade quando comparados aos produtos não adicionados, devido ao sabor diferenciado, sendo caracterizados como "ácidos", "amargos" ou "adstringentes" (GRANATO et al., 2010). A adição de prebióticos, como as oligofrutoses, tem maior influência sobre a textura e o aroma dos produtos, já que o ingrediente prebiótico é incorporado na matriz do alimento, conferindo e reforçando ligações existentes entre os componentes (CRUZ et al., 2010). A não alteração da aceitabilidade dos produtos com a adição de probióticos e/ou prebióticos é importante, pois os consumidores não estão interessados em consumir bebidas funcionais se os ingredientes adicionados ocasionarem aromas e sabores estranhos ou desagradáveis nos produtos, mesmo levando em consideração os benefícios à saúde (TUORILA; CARDELLO, 2002).

Portanto, é possível formular sucos de maçã probióticos utilizando oligofrutose como protetor das culturas probióticas e sem alteração da aceitabilidade dos produtos. As formulações contendo oligofrutoses (PRE-V; SIMB-V; PRE-P; SIMB-P) poderiam ainda exercer efeitos benéficos à saúde associados com a ingestão de prebióticos, como a inibição do crescimento de patógenos no intestino; aumento na absorção de cálcio proveniente da dieta e alívio da constipação (CRUZ et al., 2010).

No presente estudo, as formulações adicionadas de oligofrutose (PRE-V; PRE-P); de sacarose (SAC-V e SAC-P) e puras (PURO-V e PURO-P) apresentaram características físico-químicas (pH, acidez titulável, cor e turbidez) e sensoriais (aceitabilidade e intenção de compra) semelhantes ( $p > 0,05$ ). Dessa forma, a oligofrutose poderia ser

utilizada como substituto de açúcar, sendo que sua adição resulta em produtos com características físico-químicas e de aceitabilidade semelhantes aos produtos adicionados de sacarose. A semelhança físico-química e sensorial dos produtos puros (PURO-V e PURO-P) e dos adicionados de oligofrutose (PRE-V; PRE-P) possivelmente esteja relacionada ao fato dos sucos de maçã serem naturalmente doces. O principal açúcar é a frutose (EISELE; DRAKE, 2005), que é caracterizada por ser única dentre os açúcares conhecidos, apresentando maior doçura do que a sacarose (O'DONNELL, 2007).

#### 4 CONCLUSÕES

O suco de maçã é um meio adequado para a incorporação de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como probiótico, sendo obtidos produtos com aceitabilidade semelhante aos produtos puros, porém, mais ácidos, vermelhos e turvos. O tempo de vida dos sucos com cultura probiótica, baseado na quantidade mínima recomendada de probióticos, seria de 14 a 28 dias em refrigeração (4°C), dependendo do tipo de embalagem e da presença de oligofrutose. A oligofrutose pode ser utilizada como prebiótico e protetora de culturas probióticas (*Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*) em sucos de maçã, não tendo influência sobre as características físico-químicas (pH, acidez titulável, cor e turbidez), aceitabilidade, intenção de compra e estabilidade ao armazenamento dos produtos. Além disso, pode ser considerada um substituto de açúcar, resultando em produtos com características físico-químicas e de aceitabilidade semelhantes aos produtos adicionados de sacarose. A embalagem de vidro foi mais apropriada do que a de plástico na manutenção da viabilidade da cultura probiótica, não havendo efeito da embalagem (vidro ou plástico) nas características físico-químicas e na aceitabilidade dos sucos. É possível desenvolver sucos de maçã simbióticos adicionados de oligofrutose, um prebiótico; e culturas probióticas; onde a oligofrutose ajude na manutenção da viabilidade e estabilidade do probiótico nos produtos.

#### REFERÊNCIAS

ABREU, D.A.; SILVA, L.M.R.; LIMA, A.S.; MAIA, G.A.; FIGUEIREDO, R.W.; SOUSA, P.H.M. Desenvolvimento de bebidas mistas à base de manga, maracujá e caju adicionadas de prebióticos. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.2, p.197-203, 2011.

ÁLVAREZ, S.; RIERA, F.A.; ÁLVAREZ, R.; COCA, J.; CUPERUS, F.P.; BOWER, S.T.; BOSWINKEL, G.; GEMERT, R.W.; VELDSINK, J.W.; GIORNO, L.; DONATO, L.; TODISCO, S.; DRIOLI, E.; OLSSON, J.; TRAGARDH, G.; GAETA, S.N.; PANYOR, L. A new integrated membrane process for producing clarified apple juice and apple juice aroma concentrate. **Journal of Food Engineering**, v.46, n.2, p.109-125, 2000.

ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Atualizado em julho, 2008**. Disponível em: [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm).

APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: a review of different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.368-378, 2014.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTRY (AOAC). **Official Methods of Analysis**. 15 Ed., Association of Official Analytical Chemists, Washington, DC., USA., 2004.

BLECKER, C.; FOUGNIES, C.; VAN-HERK, J-C.; CHEVALIER, J-P.; PAQUOT, M. Kinetic study of the acid hydrolysis of various oligofructose samples. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.6, p.1602-1607, 2002.

BLEIBAUM, R.N.; STONE, H.; TAN, T.; LEBRECHE, S.; SAINT-MARTIN, E.; ISZ, S. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. **Food Quality and Preference**, v.13, n.6, p.409–422, 2002.

BOZA-MÉNDEZ, E.; LÓPEZ-CALVO, R.; CORTÉS-MUÑOZ, M. **Innovative dairy products development using probiotics: challenges and limitations**, Probiotics, Everlon Cid Rigobelo (Ed.), InTech. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/innovative-dairy-products-development-using-probiotics-challenges-and-limitations>.

BRASIL, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento e da Reforma Agrária, Instrução Normativa nº 62 de 26 de agosto de 2003. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Anexo I- **Métodos Analíticos Oficiais para análises microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e água**.

BURDURLU, H.S.; KARADENIZ, F. Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. **Food Chemistry**, v.80, n.1, p.91-97, 2003.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Journal of Food Science**, v.73, n.5, p.M221-M226, 2008.

COURTIN, C.M.; SWENNEN, K.; VERJANS, P.; DELCOUR, J.A. Heat and pH stability of prebiotic arabinoxylooligosaccharides, xylooligosaccharides and fructooligosaccharides. **Food Chemistry**, v.112, n.4, p.831-837, 2009.

CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F.; VAN DENDER, A.G.F. Packaging system and probiotic dairy foods. **Food Research International**, v.40, n.8, p.951-956, 2007.

CRUZ, A.G.; CADENA, R.S.; WALTER, E.H.M.; MORTAZAVIAN, A.M.; GRANATO, D.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory analysis: relevance for prebiotic, probiotic and symbiotic product development. **Comprehensive Review in Food Science and Food Safety**, v.9, n.4, p.358-373, 2010.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from comercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v.7, n.1, p.31-41, 1997.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v.15, n.2, p.219-232, 2008.

DONKOR, O.N; NILMINI, S.L.I; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, n.6, p.657-665, 2007.

EISELE, T.A.; DRAKE, S.R. The partial compositional characteristics of apple juice from 175 apple varieties. **Journal of Food Composition Analysis**, v.18, n.2-3, p.213-221, 2005.

ELLENDERSEN, L.S.N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTO, K.B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, v.12, n.4, p.475-485, 2012.

FAO/ WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group of Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in food, Ontario, Canadá, 2002. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. Acesso: 06/02/2014.

FAO / AGNS. **FAO Technical Meeting Report on Prebiotics**. 2007. Disponível em: [http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics\\_Tech\\_Meeting\\_Report.pdf](http://www.fao.org/ag/agn/agns/files/Prebiotics_Tech_Meeting_Report.pdf). Acesso: 06/02/2014.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.287-291, 2002.

GODERSKA, K.; CZARNECKA, M.; CZARNECKI, Z. Effect of prebiotic additives to carrot juice on the survivability of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* bacteria. **Polish Journal of Food Nutrition and Sciences**, v.57, n.4, p.427-432, 2007.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.3, p.292-302, 2010.

HANNAY, F. **Rigid plastic packaging – materials, processes and applications**. Rapra Technology: United Kingdom. 2002. p.18.

KEENAN, D.F.; BRUNTON, N.; BUTLER, F.; WOUTERS, R.; GORMLEY, R. Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple purees enriched with prebiotic inclusions. **Innovative in Food Science and Emerging Technologies**, v.12, n.3, p.261-268, 2011.

KIM, H.S.; CHAE, H.S.; JEONG, S.G.; HAM, J.S.; IM, S.K.; AHN, C.N.; LEE, J.M. Antioxidant activity of some yogurt starter cultures. **Asian-Australian Journal of Animal Sciences**, v.18, n.2, p.255-258, 2005.

KRASAEEKOOPT, W.; PIANJAREONLAP, R.; KITTISURIYAVONT, K. Probiotic juices. **2nd International Conference on "Fermentation Technology for value added agricultural products"**, p.4-10, 2007.

LIU, C-T.; CHU, F-J.; CHOU, C-C.; YU, R-C. Antiproliferative and anticytotoxic effects of cell fractions and exopolysaccharides from *Lactobacillus casei* 01. **Mutation research**, v.721, n.2, p.157-162, 2011.

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**, v.11, n.3, p.287-295, 2012.

MARKOWSKI, J.; BARON, A.; MIECZCZAKOWSKA, M.; PLOCHARSKI, W. Chemical composition of French and Polish cloudy apple juices. **Journal of Horticultural Science and Biotechnology**, ISAFRUIT Special Issue: 68-74, 2009.

MEGAZYME. Disponível em: [www.megazyme.com](http://www.megazyme.com). Acesso em: 08/04/2014.

MIRZAEI, H.; TABRIZI, B.A.; HASANPOUR, A.; BABPOUR, A.; KARIM, G. Study on the effect of consuming different amount of fermented milk with *Lactobacillus casei* 01 on haematological parameters in rats. **Research Journal of Biological Sciences**, v.3, n.12, p.1376-1380, 2008.

MUSSATTO, S.I.; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n.3, p.587-597, 2007.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; SADA, A.; ORLANDO, P. Synbiotic potential of carrot juice supplemented with *Lactobacillus* spp. and inulin or fructooligosaccharides. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.88, n.13, p.2271-2276, 2008.

NUALKAEKUL, S.; SALMERON, I.; CHARALAMMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, v.129, n.3, p.1037-1044, 2011.

NUALKAEKUL, S.; DEEPIKA, G.; CHARALAMMPOPOULOS, D. Survival of freeze dried *Lactobacillus plantarum* in instant fruit powders and reconstituted fruit juices. **Food Research International**, v.48, n.2, p.627-633, 2012.

O'DONNELL, K. **Carbohydrate and intense sweeteners**. In: Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. 2nd Edition (ed. ASHURST, P.R), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. 2007. p.68-87.

- PIMENTEL, T.C.; PRUDENCIO, S.H.; RODRIGUES, R.S. Néctar de pêsego potencialmente simbiótico. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.3, p.455-464, 2011.
- RENUKA, B.; KULKARNI, S.G.; VIJAYANAND, P.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.42, n.5, p.1031-1033, 2009.
- RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v.27, n.1, p.1-11, 2010.
- RIZZON, L.A.; BERNARDI, J.; MIELE, A. Características analíticas dos sucos de maçã gala, Golden delicious e fuji. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.25, n.4, p.750-756, 2005.
- RÖßLE, C.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R.T.; ROSS, P.R.; BUTLER, F. Development of potentially symbiotic fresh-cut apple slices. **Journal of Functional Foods**, v.2, p.245-254, 2010.
- RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; SANTOS, T.R.; FREITAS, A.C. Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. **Food Bioprocess and Biotechnology**, v.5, n.7, p.2748-2757, 2012.
- SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MATTO, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v.112, n.2, p.171-178, 2006.
- SANTOS, J.S.; XAVIER, A.A.O.; BONEVENTI, P.; SOUZA, R.B.; GARCIA, S. Suco de uva suplementado com *Lactobacillus acidophilus* e oligofrutose. **Semina: Ciências Agrárias**, v.29, n.4, p.839-844, 2008.
- SHAH, N.P. Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v.83, n.4, p.894-907, 2000.
- SHAH, N.P.; DING, W.K.; FALLOURD, M.J.; LEYER, G. Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. **Journal of Food Science**, v.75, n.5, p.M278-M282, 2010.
- 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, n.2, p.279-284, 2007.
- SOHAIL, A.; TURNER, M.S.; PRABAWATI, E.K.; COOMBES, A.G.A.; BHANDARI, B. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.2, p.162-166, 2012.
- STONE, H.; SIDEL, J. **Sensory evaluation practices**. 3 ed. New York: Academic Press., 2004.

TAJCHAKAVIT, S.; BOYE, J.I.; BÉLANGER, D.; COUTURE, R. Kinetics of haze formation and factors influencing the development of haze in clarified apple juice. **Food Research International**, v.34, n.5, p.431-440, 2001.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v.5, n.1, p.1-8, 2004.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, Bifidobacteria, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and Propionibacteria. **Journal of Dairy Science**, v.86, n.7, p.2288-2296, 2003.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Antimicrobial effects of probiotics against selected pathogenic and spoilage bacteria in cheese-based dips. **International Food Research Journal**, v.16, n.3, p.261-276, 2009.

TUORILA, H.; CARDELLO, A.V. Consumer responses to an off-flavor juice in the presence of specific health claims. **Food Quality and Preference**, v.13, n.7-8, p.561-569, 2002.

UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE, AGRICULTURAL RESEARCH SERVICE. **Nutrient database for standard reference**. Release 13. Washington, DC, 2008. Disponível em: <<http://www.nal.usda.gov/fnic/foodcomp/search/>>.

VILLAS BOAS, B.M.; SIQUEIRA, H.H.; LEME, S.C.; LIMA, L.C.O.; ALVES, T.C. Conservação de pimentão verde minimamente processado acondicionado em diferentes embalagens plásticas. **Pesquisa Agropecuária Tropical**, v.42, n.1, p.34-39, 2012.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.38, n.1, p.73-75, 2005.

YOUSAF, M.S.; YUSOF, S.; MANAP, M.Y.B.A.; ABD-AZIZ, S. Storage stability of clarified banana juice fortified with inulin and oligofructose. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.34, n.2, p.599-610, 2010.

## 5.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

### **Suco clarificado de maçã probiótico com oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar: perfil sensorial e aceitabilidade**

Resumo: Os objetivos do trabalho foram avaliar o efeito da adição de oligofrutose ou sucralose como substitutos de açúcar e da cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* no perfil sensorial e na aceitação de sucos clarificados de maçã; e determinar a influência dos atributos sensoriais na aceitação dos produtos. Sucos de maçã adicionados de oligofrutose apresentaram gosto doce menos intenso do que o suco com sacarose; enquanto os sucos com sucralose tinham cor mais clara. A adição de oligofrutose ou de sucralose contribuiu no aumento da aceitação (sabor e impressão geral) dos sucos puros, tornando-a semelhante à do produto com sacarose. Não houve diferença de aceitação quanto à aparência, aroma e textura dos sucos. A adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* ocasionou um aumento na turbidez dos sucos clarificados de maçã, contudo, não alterou a aceitação (aparência, aroma, sabor, textura e impressão geral) dos produtos. Usando a regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi possível verificar que a aceitação é dirigida de forma positiva pelo gosto doce, aroma doce e gosto residual; e negativamente pelo sabor de maçã, aroma de maçã, cor mais escura e gosto ácido. Foi possível desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico que apresentou perfil sensorial (exceto turbidez e presença de partículas) e aceitação semelhantes ao suco com sacarose, por meio da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como cultura probiótica e oligofrutose como substituto de açúcar e prebiótico.

**Palavras-chave:** L. casei 01. Prebiótico. ADQ. Edulcorante. Suco de fruta

## **1 INTRODUÇÃO**

Micro-organismos vivos que conferem efeitos benéficos aos indivíduos quando administrados em quantidades adequadas são denominados probióticos (FAO/WHO, 2002). As culturas probióticas são geralmente adicionadas a leites fermentados e iogurtes, no entanto, com o aumento do número de consumidores vegetarianos, a demanda de produtos não lácteos probióticos aumentou (VASUDHA; MISHRA, 2013). Além disso, a crescente quantidade de pessoas com intolerância à lactose e alergia à proteína do leite; e o teor de colesterol; são inconvenientes relacionados aos produtos lácteos fermentados (GRANATO et al., 2010; MARTINS et al., 2013).

Os sucos de fruta têm sido considerados meios adequados para a adição de culturas probióticas, porque já contém nutrientes benéficos em sua composição; apresentam perfis de sabor considerados agradáveis por pessoas de todas as idades; são considerados bebidas saudáveis e refrescantes; e são consumidos regularmente, fator

essencial para se obter os benefícios atribuídos aos probióticos (AWAISHEH, 2012; PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011). Além disso, não contém culturas iniciadoras para competir com os probióticos por substratos; podem ser suplementados com ingredientes que promovem condições anaeróbicas, como o ácido ascórbico; e possuem açúcares que podem ser metabolizados pelas culturas probióticas (DING; SHAH, 2008).

No entanto, a adição de culturas probióticas a sucos de fruta apresenta inúmeros desafios tecnológicos, como as condições ácidas, a presença de oxigênio, e as diferenças inerentes às frutas (VASUDHA; MISHRA, 2013; SAEED et al., 2013). Além disso, tem apresentado barreiras sensoriais, originando sucos de fruta com sabores e aromas descritos como "lácteos"; "medicinais", "ácidos", "salgados", "amargos", "adstringentes", "artificiais" e "de terra" (GRANATO et al., 2010; LUCKOW; DELAHUNTY, 2004a, 2004b; SAEED et al., 2013). Contudo, não está claro se todas as culturas probióticas proporcionam ao produto o mesmo sabor e nos mesmos níveis de intensidade (LUCKOW et al., 2005).

A sacarose, proveniente da cana de açúcar ou da beterraba, faz parte da dieta humana há séculos; e o gosto doce que ela proporciona aos produtos é naturalmente preferido pelos consumidores (AL-DABBAS et al., 2012). Devido à crescente preocupação com a saúde e às recomendações nutricionais para diminuição da ingestão de açúcar, muitas indústrias de alimentos estão interessadas em reduzir o conteúdo de sacarose dos produtos, incluindo as processadoras de sucos e néctares de frutas (RODBOTTEN et al., 2009). Um grande número de substitutos de açúcar tem sido utilizado, podendo fornecer diferentes características aos produtos, incluindo doçura, sensação tátil oral, estabilidade e, em alguns casos, melhoria da cor (OTDONNEL, 2007).

A sucralose é um adoçante não nutritivo produzido pela substituição de três grupos hidroxila por três átomos de cloro na molécula de sacarose, tendo como características a segurança para consumo; alto poder adoçante (600 vezes maior do que o da sacarose); leve gosto residual; e estabilidade a altas temperaturas e à acidez (AL-DABBAS et al., 2012). A sucralose tem sido considerada o edulcorante que melhor substitui o açúcar, já que ocasiona poucas alterações sensoriais nos produtos quando comparada a outros edulcorantes (CADENA et al., 2013).

As oligofrutoses têm atraído especial atenção dos pesquisadores e indústrias devido às suas propriedades prebióticas, de saúde, e tecnológicas (RENUKA et al., 2009). O consumo de oligofrutose estaria relacionado com a modulação da microbiota intestinal (efeito prebiótico); inibição do crescimento de patógenos no intestino; aumento na absorção de cálcio proveniente da dieta; e alívio da constipação (SAAD et al., 2013).

Tecnologicamente, oligofrutoses têm propriedades comparáveis às da sacarose e xaropes de glicose, por possuírem açúcares livres. No entanto, a doçura na forma pura é de 30 a 60% quando comparada à da sacarose (APOLINÁRIO et al., 2014; FRANCK, 2002; MUSSATO; MANCILHA, 2007).

Considerando o desenvolvimento de produtos funcionais, é necessário entender o impacto sensorial desses componentes e determinar como a adição nos produtos influencia a aceitabilidade e preferência dos consumidores em termos de aparência, aroma, sabor e textura, a fim de direcionar o desenvolvimento e formulação (GRANATO et al., 2010). Não há estudos que avaliem concomitantemente o efeito da adição de culturas probióticas e de substitutos de açúcar nas características sensoriais de sucos de maçã. Portanto, os objetivos do presente estudo foram: avaliar o efeito da adição de oligofrutose ou sucralose, como substitutos de açúcar, e da cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* no perfil sensorial e na aceitação de sucos clarificados de maçã; e determinar a influência dos atributos sensoriais na aceitação dos produtos.

## 2 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 MATERIAL

Maçã Royal Gala (*Malus domestica* Borkh) (Castel Frutas®); enzima pectinolítica (Pectinex Ultra Clear, Novozymes®); bentonita sódica natural (Na-35; Schumacher®); gelatina incolor (Dr. Oetker®); sacarose (União®), oligofrutose (P95, Orafiti®, DP médio 5), sucralose (Splenda®) e cultura probiótica *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* (LC-01, Christian Hansen®) foram utilizados no experimento.

### 2.2 MÉTODOS

#### 2.2.1 Obtenção da Cultura Probiótica Ativada

Para a ativação da cultura probiótica liofilizada utilizou-se o método descrito por Ding e Shah (2008), com modificações propostas por Pimentel, Prudencio e Rodrigues (2011). Uma alçada da cultura foi inoculada em 5mL de caldo MRS (Himedia®) e incubada a 37°C por 15h. Decorrido este tempo, 1% (v/v) foi novamente inoculado em 10mL de caldo MRS e incubado a 37°C por 15h (pré-inóculo). Para a obtenção da biomassa, 1% (v/v) do

pré-inóculo foi transferido para 300mL de caldo MRS e incubado nas mesmas condições. A biomassa foi separada por centrifugação em centrífuga refrigerada (Eppendorf®, modelo 5804R) a 14000g (10.000 rpm) por 10 min a 4°C e lavada três vezes com solução salina 0,85% (p/v) estéril (NaCl Dinamica®) para a remoção do MRS residual. Após, se ressuspendeu a biomassa em 50mL de solução salina 0,85% (p/v) estéril, obtendo-se assim a cultura probiótica ativada.

## 2.2.2 Formulações

Sete formulações de sucos clarificados de maçã foram preparadas: PUR (suco puro); SAC (suco puro com sacarose); PRE (prebiótica - suco puro com oligofrutose); PRO (probiótica - suco puro com cultura probiótica); SIMB (simbiótica suco puro com oligofrutose e cultura probiótica); SUC (suco puro com sucralose); e SUC-P (suco puro com sucralose e cultura probiótica).

## 2.2.3 Preparação dos Sucos de Maçã

Maçãs Gala de um mesmo fornecedor (Castel Frutas®) foram lavadas em água corrente, sanitizadas (6mL/L de desinfetante para hortifrutícolas Pury Vitta®, 0,96% p/p cloro ativo) e trituradas em processador de frutas (Walita®). Os sucos brutos foram submetidos a tratamento enzimático (Pectinex Ultra Clear 0,03 mL/L), sendo mantidos em banho maria por 1 hora a 50°C e posteriormente filtrados a vácuo em funil de Buchner (papel de filtro Qualy®, 80g/m<sup>2</sup>; 205um; 25cm de diâmetro). A clarificação dos sucos foi completada por meio de tratamento com bentonita ativada com 24 horas de antecedência (0,45 g/L) e gelatina (0,05 g/L) a 50°C por 1 hora seguido de filtração a vácuo em funil de Buchner (BURDURLU; KARADENIZ, 2003).

Os sucos clarificados foram, então, adicionados de sacarose (20 g/L) (Formulação SAC), oligofrutose (20 g/L) (Formulações PRE e SIMB), ou sucralose (0,03 g/L) (Formulações SUC e SUC-P). A concentração de oligofrutose adicionada se baseou na regulamentação brasileira a fim de utilizar a alegação de propriedade funcional da oligofrutose (prebiótico) (ANVISA, 2008a); e na ingestão mínima diária sugerida para frutanos a fim de obter efeitos benéficos à saúde (KEENAN et al., 2011; RÓ(3LE et al., 2010). A sacarose foi adicionada nos teores sugeridos para suco de maçã (BLEIBAUM et al., 2002; ELLENDERSEN et al., 2012). A quantidade de sucralose foi determinada por meio da

recomendação do fabricante para o produto (poder adoçante: 600 vezes maior do que o da sacarose), em estudos disponíveis na literatura (MARCELLINI; CHAINHO; BOLINI, 2005; CADENA; BOLINI, 2012; MARCHI et al., 2012) e por testes sensoriais (Testes Triangulares) preliminares (resultados não apresentados), respeitando os limites máximos estabelecidos por legislação (ANVISA, 2008b) e objetivando intensidade de doçura semelhante à do produto adoçado com sacarose (SAC).

Todas as formulações foram acondicionadas em frascos de vidro (Farma®) com capacidade para 50mL, pasteurizadas a 80°C por 20 minutos em banho maria e resfriadas em banho de gelo até 37°C. As formulações com culturas probióticas (PRO; SIMB e SUC-P) foram adicionadas de 2% (v/v) da cultura probiótica ativada, o que correspondia a  $10^{11}$  células viáveis por litro de suco (nível que assegura o efeito probiótico) (DONKOR et al., 2007). Os sucos de maçã foram, então, armazenados a 4°C por até 2 dias.

#### 2.2.4 Perfil Sensorial

O perfil sensorial dos sucos clarificados de maçã foi desenvolvido por meio de Análise Descritiva Quantitativa (ADQ). Vinte e seis indivíduos foram selecionados dentre estudantes e funcionários do Instituto Federal do Paraná - Câmpus Ivaiporã (Ivaiporã, Paraná, Brasil). Inicialmente, os consumidores foram submetidos a testes de reconhecimento de odores e gostos básicos. Indivíduos que não conseguiram identificar pelo menos uma das soluções referentes a cada gosto básico ou não atingiram o mínimo de 70% de acerto nos odores básicos foram excluídos da equipe sensorial a ser formada (PIMENTEL; CRUZ; PRUDENCIO, 2013).

O desenvolvimento da terminologia descritiva pelos julgadores selecionados foi realizado utilizando-se o Método de Rede (MOSKOWITZ, 1983; ELLENDERSEN et al., 2012), onde oito sucos foram apresentados aos pares aos julgadores (PUR x PRE; PUR x SIMB; PUR x SAC; e PUR x SUC) e os mesmos foram solicitados a descrever as semelhanças e diferenças entre as formulações de cada par em relação à aparência, aroma, sabor e textura.

Após o julgador ter elencado seus próprios atributos (descritores), uma discussão com todos os participantes da equipe foi realizada, sob a supervisão de um líder, com o objetivo de selecionar os atributos mais citados e empregar o termo mais adequado, de acordo com a maioria dos julgadores. Assim, foi gerada uma lista consensual de atributos e suas definições.

Os atributos, definições e amostras de referência desenvolvidos pela equipe sensorial estão apresentados na Tabela 1. A ficha de avaliação foi preparada em consenso e era composta de escalas não estruturadas de 9 cm, com termos de intensidade ancorados a 0 ou 0,5 cm do extremo esquerdo e 0,5 cm do extremo direito, onde o extremo esquerdo representava a ausência ou a menor intensidade, e o extremo direito a maior intensidade do atributo.

**Tabela 1** – Atributos, definições e amostras de referência desenvolvidos pela equipe sensorial para formulações de suco clarificado de maçã

Atributo	Definição	Amostra de referência
<b>Aparência</b>		
Cor	Intensidade da cor amarela com tendência ao laranja	<u>Fraca</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 2% de leite em pó desnatado (Molico®) <u>Forte</u> : Suco de maçã comercial (Welch®)
Turbidez	Falta de transparência do produto	<u>Ausente</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intensa</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 20% de cloreto de sódio
Presença de partículas	Ausência de partículas de maçã triturada visualmente identificáveis	<u>Ausente</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) sem partículas visíveis <u>Muita</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) com cinco partículas (0,5mm) de maçã triturada depositadas

Corpo	Facilidade de manipular o suco no copo	<u>Pouco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Muito</u> : Néctar de goiaba Del Valle®
<b>Aroma</b>		
Maçã	Aroma característico da fruta maçã	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%)
Doce	Aroma característico de suco adoçado e pasteurizado	<u>Fraço</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 10% açúcar refinado União® (antes da pasteurização)
<b>Sabor</b>		
Maçã	Sabor característico de maçã	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%)
Gosto Doce	Gosto doce característico da presença de açúcares	<u>Fraço</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 4% de açúcar refinado União®

Gosto Ácido	Percepção do gosto ácido na língua	<u>Fraco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (90%) <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de ácido málico (pH 3,5)
Gosto Residual	Gosto residual amargo	<u>Ausente</u> : Água <u>Intenso</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) adicionado de 3% de adoçante Magro (Lightsweet®)
<b>Textura</b>		
Corpo	Sensação de cobertura na boca	<u>Pouco</u> : Suco clarificado de maçã Gala (100%) <u>Muito</u> : Néctar de goiaba Del Valle®

Os julgadores foram treinados para identificar e quantificar os atributos usando as amostras de referência (Tabela 1). Após 10 sessões de treinamento, o desempenho de cada julgador foi avaliado. Quatro formulações (SAC, PUR, SIMB e SUC-P) foram testadas usando delineamento de blocos completos casualizados contendo três repetições (sessões), onde as quatro formulações foram apresentadas simultaneamente em cada sessão. A intensidade dos atributos foi determinada usando a ficha de avaliação elaborada. Os dados de cada julgador para cada atributo foram submetidos à ANOVA. Os julgadores que apresentaram poder discriminativo ( $p$  de  $F_{\text{formulações}} < 0,5$ ); reprodutibilidade nos julgamentos ( $p$  de  $F_{\text{repetições}} < 0,05$ ) e consenso com os demais membros do grupo em relação aos atributos foram selecionados (ELLENDERSEN et al., 2012; PIMENTEL; CRUZ; PRUDENCIO, 2013).

Dezoito julgadores treinados (9 mulheres e 9 homens) participaram da equipe final. Todos tinham entre 15 e 25 anos de idade, estavam cursando o ensino médio e gostavam de suco de maçã, com consumo de ocasional a frequente, ou seja, de algumas vezes ao mês a algumas vezes ao dia. A maioria (>75%) costumava consumir produtos probióticos (leites fermentados e iogurtes); com fibras; e de baixo teor de açúcar.

A análise descritiva das formulações pelos julgadores treinados foi realizada utilizando um delineamento de blocos incompletos casualizados, onde  $t$  (nº de tratamentos) = 7;  $k$  (nº de tratamento por sessão) = 3;  $r$  (nº de repetições) = 3;  $b$  (nº de sessões) = 7;  $A$  (nº de vezes que 2 tratamentos aparecem juntos em um mesmo bloco) = 1 ;  $E = 0,78$ , Tipo V. Cada julgador avaliou, de forma monádica, três formulações em cada sessão. As sessões foram realizadas em dois dias consecutivos (4 sessões no primeiro dia e 3 sessões no segundo dia de armazenamento dos sucos), com intervalo de pelo menos 1 hora entre as mesmas. As formulações foram apresentadas a 4°C, em copos plásticos de 50mL codificados com 3 dígitos aleatórios, sob luz branca.

### 2.2.5 Aceitação

A aceitação (aparência, aroma, sabor, textura e impressão geral) das formulações de sucos clarificados de maçã foi avaliada por 86 consumidores potenciais dos produtos, por meio de escala hedônica de 9 pontos (9= gostei muitíssimo; 1= desgostei muitíssimo) (AGUIAR et al., 2012; SYMONEAUX et al., 2012). A intenção de compra foi avaliada por meio de escala de 5 pontos (5= certamente compraria; 1= certamente não compraria).

Trinta mililitros de cada formulação, em copos plásticos de 50mL, codificados com 3 dígitos aleatórios e a 4°C, foram avaliados de forma monádica e ordem aleatorizada, sob luz branca. A avaliação foi realizada em duas sessões, com quatro formulações na primeira sessão e três formulações na segunda, no primeiro e segundo dias de armazenamento dos sucos. A seleção das formulações para cada sessão foi realizada de forma aleatória.

Os consumidores foram recrutados por contato pessoal a partir de sua disponibilidade de participar do teste e por serem consumidores de sucos de fruta, preferencialmente de maçã. A equipe era composta por 66,3% de indivíduos de 15-25 anos de idade; 22,1% de 25-35 anos; 9,3% de 35-50 anos; e 2,3% com mais de 50 anos. Destes, 4,65% relataram consumir frequentemente (algumas vezes ao dia) sucos de maçã, 33,72% moderadamente (algumas vezes na semana), 44,19% ocasionalmente (algumas vezes no mês) e 17,44% nunca consumiam.

## 2.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados do experimento da ADQ foram submetidos à ANOVA de dois fatores (formulações e julgadores) com interação. Quando o valor de F da interação formulação x julgadores foi significativo, o valor de  $F_{\text{formulação}}$  foi recalculado, considerando o quadrado médio da interação como denominador (BAYARRI et al., 2011). As diferenças entre as formulações foram determinadas pelo Teste de Tukey ( $p < 0,05$ ). Para a aceitação, os dados foram submetidos à ANOVA de dois fatores (formulações e julgadores), teste F e teste de Tukey de comparação das médias ( $p < 0,05$ ). A Análise de Componentes Principais (ACP) foi realizada sobre os dados médios de cada atributo levantado no teste descritivo. A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) foi utilizada para correlacionar os dados descritivos com os dados de aceitação. Os valores de impressão geral da aceitação foram considerados como variável dependente (matriz-Y) enquanto as intensidades médias dos atributos da ADQ foram consideradas as variáveis independentes (matriz-X) (CADENA et al., 2013). Um Mapa de Preferência Externo (PREFMAP) foi conduzido realizando a ACP dos dados da ADQ e então, relacionando cada um dos consumidores ao espaço da ACP por análise de regressão (BONANY et al., 2014). Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) foi realizada a fim de determinar grupos de consumidores com preferências semelhantes, considerando as distâncias Euclidianas (dissimilaridade) e o método de aglomeração de Ward (BONANY et al., 2014). As análises estatísticas foram conduzidas nos softwares SAS (versão 9.1.3; SAS Institute Inc., Cary, NC) e XLSTAT para Windows (versão 2012; Addinsoft, Nova Iorque, NY).

## 3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

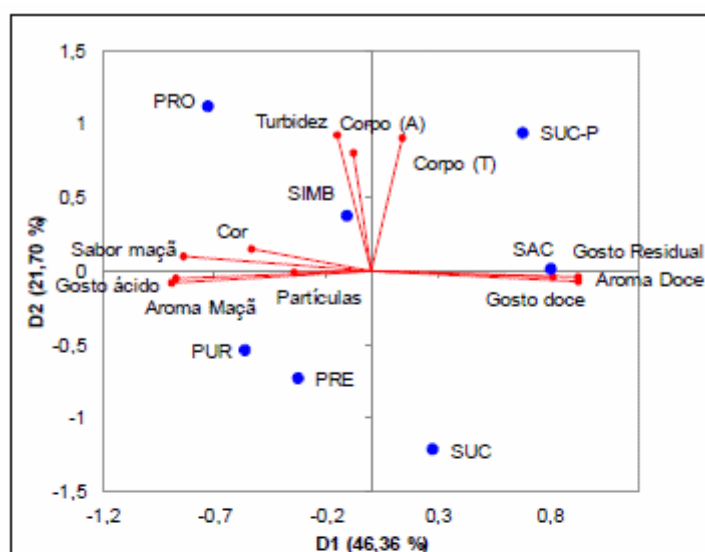
### 3.1 MAPA SENSORIAL

Os três primeiros componentes da ACP apresentaram autovalores superiores a 1, indicando que deveriam ser utilizados para a interpretação dos resultados (critério de Kaiser) (BAYARRI et al., 2011; SYMONEAUX et al., 2012). O primeiro componente principal (CP1) explicou 56,18% da variabilidade contida nas variáveis originais, enquanto os componentes 2 (CP2) e 3 (CP3) explicaram 21,59 e 10,75%, respectivamente, totalizando 88,52% de explicação.

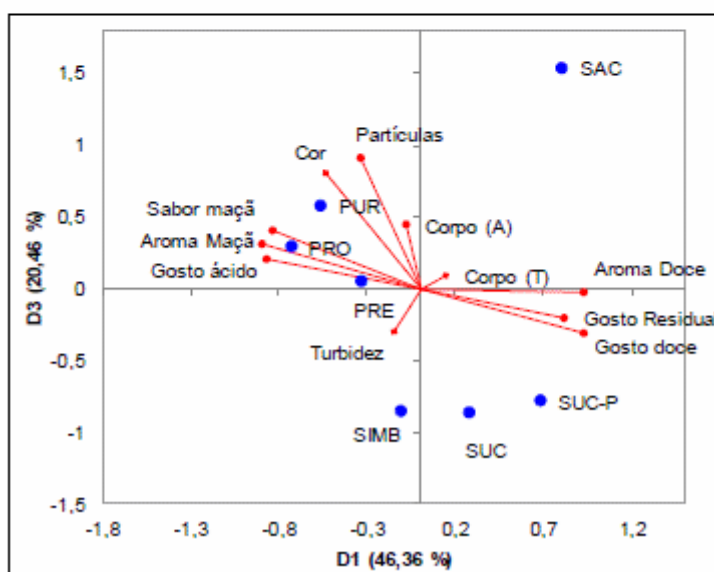
A fim de simplificar a interpretação das diferentes dimensões da ACP, os fatores foram ortogonalmente rotacionados, seguindo a transformação VARIMAX com o método de normalização de Kaiser (MARCHI et al., 2012) (Figuras 1A e 1B). Uma nova distribuição da variância total explicada por cada componente foi obtida (D1 = 46,36%; D2 = 21,7% e D3 = 20,46%), mantendo-se a variância acumulada para os primeiros três componentes (88,52%). Embora a variância acumulada continue igual, a sua distribuição entre os componentes é mais homogênea (BONANY et al., 2014).

Em cada eixo (D1, D2 ou D3), os atributos que apresentaram coeficiente de correlação com o componente superior a 0,7 (valores absolutos) foram considerados importantes (MARCHI et al., 2012). Em D1, aroma doce, gosto doce e gosto residual apresentaram correlação positiva, enquanto aroma de maçã, gosto ácido e sabor de maçã apresentaram correlação negativa. Turbidez e corpo (aparência e textura) foram positivamente correlacionados com D2, enquanto cor e presença de partículas foram positivamente correlacionados com D3 (Figuras 1A e 1B). Portanto, D1 representa os atributos de aroma e sabor; D2 representa a textura; e D3 os atributos de aparência dos sucos clarificados de maçã.

**Figura 1** – Mapa sensorial de componentes principais após transformação VARIMAX (D): atributos (vetores) e formulações (círculos) de suco clarificado de maçã. (A) D1 versus D2; (B) D1 versus D3\*



(A)



(B)

\*Formulações: SAC (sacarose); PUR (pura); PRE (prebiótica - oligofrutose); PRO (probiótica); SIMB (simbiótica – oligofrutose e probiótico); SUC (sucralose); e SUC-P (sucralose e probiótico). (A) corresponde a atributos avaliados na aparência e (T) a atributos avaliados na textura

O primeiro componente principal (D1) separou as formulações quanto à presença de açúcar e/ou substitutos de açúcar. À extrema esquerda se encontraram as formulações sem estes ingredientes: suco puro (PUR) e suco puro com probiótico (PRO); mais ao centro as adicionadas de oligofrutose (PRE e SIMB); e à direita as adicionadas de açúcar (SAC) ou sucralose (SUC e SUC-P). O segundo componente principal (D2) separou as formulações quanto à presença da cultura probiótica, sendo que as formulações

adicionadas de probióticos (PRO, SIMB e SUC-P) ficaram acima do eixo. O terceiro componente principal (D3) separou, principalmente, a formulação adicionada de açúcar (SAC; parte superior do eixo) das adicionadas de substitutos de açúcar (SIMB, SUC e SUC-P; parte inferior do eixo). Esses resultados indicam que a adição de sacarose, substitutos de açúcar (oligofrutose e sucralose) e cultura probiótica resultam em sucos clarificados de maçã com características sensoriais diferenciadas.

As formulações sem substitutos de açúcar (PUR e PRO) foram caracterizadas pela maior intensidade do aroma de maçã, sabor de maçã e do gosto ácido; e menor intensidade do aroma doce, e gostos doce e residual, sendo o contrário do que foi observado para as formulações adicionadas de açúcar (SAC) e sucralose (SUC e SUC-P). Já as formulações adicionadas de oligofrutose (PRE e SIMB), apresentaram intensidades intermediárias para os mesmos atributos. Sucos adicionados de probiótico (PRO; SIMB e SUC-P) foram caracterizados pela maior turbidez e corpo (aparência e textura). A utilização de substitutos de açúcar (SUC-P; SUC e SIMB) resultou em sucos de cor mais clara e menor quantidade de partículas visíveis.

Os valores de intensidade média dos atributos sensoriais dos sucos clarificados de maçã estão apresentados na Tabela 2.

A adição da cultura probiótica (Formulação PRO) promoveu um aumento ( $p < 0,05$ ) na turbidez dos sucos clarificados de maçã (Formulação PUR), mas não causou alteração ( $p > 0,05$ ) nos demais atributos sensoriais dos produtos. O aumento na turbidez foi ocasionado pela adição do inóculo na forma de solução salina ao suco clarificado. Este resultado também foi observado na análise física de turbidez dos sucos (Artigo 1). As análises físico-químicas indicaram, ainda, intensificação na cor vermelha e na acidez dos sucos com a adição de probióticos, o que não foi detectado na avaliação sensorial descritiva. Medidas químicas ou instrumentais são mais sensíveis do que a avaliação humana, mesmo quando os julgadores são treinados.

**Tabela 2** – Valores médios de intensidade dos atributos sensoriais da Análise Descritiva Quantitativa (ADQ) de formulações de suco clarificado de maçã\*

Atributo	Formulação**						
	PUR	SAC	PRE	PRO	SIMB	SUC	SUC-P
<b>Aparência</b>							
Cor	3,31 <sup>ab</sup>	3,28 <sup>ab</sup>	3,21 <sup>ab</sup>	3,45 <sup>a</sup>	2,77 <sup>bc</sup>	2,46 <sup>c</sup>	2,53 <sup>c</sup>
Turbidez	0,86 <sup>c</sup>	0,76 <sup>c</sup>	0,86 <sup>c</sup>	2,51 <sup>a</sup>	1,66 <sup>b</sup>	0,58 <sup>c</sup>	2,37 <sup>a</sup>
Presença de partículas	1,14 <sup>ab</sup>	1,24 <sup>a</sup>	1,01 <sup>ab</sup>	1,20 <sup>a</sup>	0,52 <sup>b</sup>	0,61 <sup>ab</sup>	0,53 <sup>b</sup>
Corpo	1,56 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>	1,39 <sup>a</sup>	1,67 <sup>a</sup>	1,48 <sup>a</sup>	1,38 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>
<b>Aroma</b>							
Maçã	5,61 <sup>a</sup>	5,34 <sup>a</sup>	5,51 <sup>a</sup>	5,73 <sup>a</sup>	5,45 <sup>a</sup>	5,38 <sup>a</sup>	5,08 <sup>a</sup>
Doce	3,80 <sup>ab</sup>	4,38 <sup>a</sup>	3,68 <sup>ab</sup>	3,40 <sup>b</sup>	4,10 <sup>ab</sup>	4,03 <sup>ab</sup>	4,27 <sup>a</sup>
<b>Sabor</b>							
Maçã	6,00 <sup>a</sup>	5,45 <sup>ab</sup>	5,81 <sup>ab</sup>	5,87 <sup>ab</sup>	5,65 <sup>ab</sup>	5,14 <sup>b</sup>	5,24 <sup>ab</sup>
Gosto Doce	2,02 <sup>e</sup>	4,39 <sup>ab</sup>	3,23 <sup>cd</sup>	2,36 <sup>de</sup>	3,65 <sup>bc</sup>	4,51 <sup>ab</sup>	4,64 <sup>a</sup>
Gosto Ácido	1,90 <sup>a</sup>	1,47 <sup>ab</sup>	1,60 <sup>ab</sup>	1,97 <sup>a</sup>	1,58 <sup>ab</sup>	1,66 <sup>ab</sup>	1,36 <sup>b</sup>
Gosto Residual	0,85 <sup>b</sup>	1,26 <sup>ab</sup>	0,84 <sup>b</sup>	0,96 <sup>ab</sup>	0,91 <sup>ab</sup>	1,42 <sup>a</sup>	1,35 <sup>ab</sup>
<b>Textura</b>							
Corpo	1,52 <sup>a</sup>	1,70 <sup>a</sup>	1,58 <sup>a</sup>	1,74 <sup>a</sup>	1,73 <sup>a</sup>	1,47 <sup>a</sup>	1,71 <sup>a</sup>

\*Médias na mesma linha acompanhadas de letras minúsculas distintas indicam diferenças a  $p < 0,05$  entre as formulações de suco clarificado de suco de maçã para o mesmo atributo sensorial (escala de 9 cm)

\*\*Formulações: PUR (suco puro); SAC (com sacarose); PRE (prebiótica - com oligofrutose); PRO (probiótica - com probiótico); SIMB (simbiótica - com oligofrutose e probiótico); SUC (com sucralose); e SUC-P (com sucralose e probiótico).

A adição de oligofrutose (Formulação PRE) ao suco puro (PUR) ocasionou um aumento na intensidade do gosto doce ( $p < 0,05$ ), não havendo diferença ( $p > 0,05$ ) entre as duas formulações com relação aos demais atributos avaliados.

Porém, quando comparada à formulação adicionada de açúcar (SAC), o suco prebiótico (PRE) apresentou intensidade de gosto doce menos acentuada, não diferindo na intensidade dos demais atributos avaliados ( $p > 0,05$ ), o que pode ser explicado pelo menor poder adoçante das oligofrutoses. De fato, as oligofrutoses na forma pura possuem doçura de 30 a 60% quando comparada à da sacarose (APOLINÁRIO et al., 2014; FRANCK, 2002; MUSSATO; MANCILHA, 2007). Desta forma, quando adicionadas em suco puro de maçã em concentração suficiente para o efeito prebiótico, atuam como substituto parcial da sacarose. Os resultados da avaliação sensorial corroboram os encontrados nas análises físico-químicas, onde a adição de oligofrutose não alterou as características físico-

químicas (pH, acidez titulável, cor e turbidez) dos sucos clarificados de maçã, mas aumentou o teor de sólidos solúveis totais (Artigo 1).

O suco clarificado de maçã adicionado de sucralose (SUC) apresentou cor menos intensa, sabor de maçã menos pronunciado e maior intensidade de gosto doce e residual do que o suco puro (PUR). Possivelmente a maior intensidade do gosto doce tenha influenciado na percepção do sabor de maçã do produto. O leve gosto residual amargo percebido pelos julgadores na presença de sucralose corrobora estudos anteriores (CAVALLINI; BOLINI, 2005; MARCHI et al., 2012). No entanto, quando comparada à formulação adicionada de açúcar (SAC), a formulação com sucralose (SUC) só diferia na cor, sendo ligeiramente mais clara ( $p < 0,05$ ). Produtos com sacarose geralmente apresentam coloração mais intensa devido às reações de caramelização, e em menor extensão, de Maillard, enquanto a sucralose não participa dessas reações (JAIN et al., 2013). Em relação ao residual amargo, a sacarose e a sucralose apresentam gosto amargo leve, de curta duração e semelhante (CADENA et al., 2013; CAVALLINI; BOLINI, 2005). A semelhança na intensidade do gosto doce das formulações com sacarose (SAC) e com sucralose (SUC) demonstra a adequação da sucralose como substituto de açúcar.

A utilização de sucralose ou oligofrutose em conjunto com a cultura probiótica (SUC-P e SIMB, respectivamente) resultou em sucos clarificados de maçã mais claros e turvos e com menor quantidade de partículas visíveis do que o suco com sacarose (SAC). A cor mais clara estaria associada à presença do substituto de açúcar e a turbidez à adição do probiótico, conforme relatado anteriormente. A semelhança na intensidade do gosto doce das formulações com sacarose (SAC) e com oligofrutose e cultura probiótica (SIMB) demonstra que, na presença da cultura probiótica, a oligofrutose se tornou um substituto total de sacarose. Possivelmente, a cultura probiótica, ao utilizar a oligofrutose como fonte de energia, tenha liberado açúcares livres no meio (frutose), os quais contribuíram no aumento da intensidade do gosto doce detectada pelos julgadores. Em estudo anterior (Artigo 1), observou-se significativa redução de oligofrutose (1,9 para 1,87 g/100mL) após 7 dias de armazenamento, podendo-se supor que com 1 a 2 dias a hidrólise das unidades já tenha ocorrido, em menor extensão, mas suficiente para contribuir com a doçura.

O perfil sensorial das formulações de suco clarificado de maçã, desenvolvido pelos julgadores treinados, indica que a adição de cultura probiótica, oligofrutose e sucralose não altera substancialmente a intensidade dos atributos intrínsecos dos sucos de maçã (aroma de maçã, sabor de maçã, gosto ácido e corpo). Esse fato é de

suma importância na reformulação de sucos, pois os consumidores desejam produtos funcionais e com teor reduzido de açúcar que apresentem características semelhantes a dos produtos convencionais disponíveis no mercado (BARRY, 2011).

### 3.2 ACEITAÇÃO

Na Tabela 3 são apresentados os resultados do teste com consumidores. A aceitabilidade em relação à aparência, aroma, sabor, textura e impressão geral dos sucos situou-se entre 7 e 8 da escala hedônica de 9 pontos, indicando que os consumidores gostaram de "moderadamente" a "muito" dos produtos. Quanto à intenção de compra, os resultados se encontraram próximos de 4 em uma escala de 5 pontos para todas as formulações avaliadas, indicando que os consumidores provavelmente comprariam os sucos. A alta aceitabilidade dos produtos pelos consumidores é um resultado interessante, considerando que os brasileiros não estão habituados a consumir sucos clarificados de maçã. De fato, Aguiar et al. (2012) avaliaram a aceitação (impressão geral) de sucos clarificados de maçã concentrados (por osmose reversa ou evaporação osmótica) e reconstituídos (12° Brix) por 80 consumidores brasileiros. As médias se encontraram próximas de 5 na escala hedônica de 9 pontos, indicando que os consumidores "nem gostaram, nem desgostaram" dos produtos.

**Tabela 3 – Aceitabilidade de formulações de sucos clarificados de maçã\***

Atributo	Formulações**						
	PUR	SAC	PRE	PRO	SIMB	SUC	SUC-P
Aparência	7,7± 1,2 <sup>a</sup>	7,8 ± 1,1 <sup>a</sup>	7,8± 1,1 <sup>a</sup>	7,6± 1,4 <sup>a</sup>	7,5± 1,4 <sup>a</sup>	7,6± 1,3 <sup>a</sup>	7,6± 1,3 <sup>a</sup>
Aroma	7,5± 1,3 <sup>a</sup>	7,6± 1,3 <sup>a</sup>	7,5± 1,2 <sup>a</sup>	7,4± 1,1 <sup>a</sup>	7,4± 1,4 <sup>a</sup>	7,4± 1,3 <sup>a</sup>	7,6± 1,2 <sup>a</sup>
Sabor	7,5± 1,1 <sup>b</sup>	8,1± 1,1 <sup>a</sup>	7,7± 1,2 <sup>ab</sup>	7,5± 1,4 <sup>b</sup>	7,6± 1,3 <sup>ab</sup>	8,0± 1,1 <sup>ab</sup>	7,9± 1,1 <sup>ab</sup>
Textura	7,5± 1,4 <sup>a</sup>	7,7± 1,2 <sup>a</sup>	7,6± 1,3 <sup>a</sup>	7,4± 1,4 <sup>a</sup>	7,5± 1,3 <sup>a</sup>	7,6± 1,4 <sup>a</sup>	7,7± 1,3 <sup>a</sup>
Geral	7,5± 1,3 <sup>b</sup>	8,0± 1,1 <sup>a</sup>	7,8± 1,2 <sup>ab</sup>	7,5± 1,3 <sup>b</sup>	7,8± 1,1 <sup>ab</sup>	8,0± 1,1 <sup>ab</sup>	7,9± 1,0 <sup>ab</sup>
Intenção de Compra	4,1± 0,9 <sup>a</sup>	4,2± 0,9 <sup>a</sup>	4,0± 0,9 <sup>a</sup>	3,9± 1,0 <sup>a</sup>	4,0± 1,1 <sup>a</sup>	4,1± 0,9 <sup>a</sup>	4,2± 0,9 <sup>a</sup>

\*Médias ± desvio padrão na mesma linha acompanhadas de letras minúsculas distintas indicam diferenças a  $p < 0,05$  entre a aceitação das formulações de suco clarificado de maçã

\*\*Formulações: PUR (suco puro); SAC (com sacarose); PRE (prebiótica - com oligofrutose); PRO (probiótica - com probiótico); SIMB (simbiótica - com oligofrutose e probiótico); SUC (com sucralose); e SUC-P (com sucralose e probiótico). Valores hedônicos (cor, aroma, sabor, textura e impressão geral): 1 - desgostei muitíssimo 9- gostei muitíssimo Intenção de compra: 1 - certamente não compraria 5- certamente compraria

Não houve diferença de aceitação ( $p > 0,05$ ) entre as formulações estudadas quando avaliadas quanto a aparência, aroma e textura; e a intenção de compra. Os resultados de aceitação corroboram os encontrados no perfil sensorial descritivo, onde as formulações testadas não apresentaram diferença de intensidade de aroma de maçã e do corpo (aparência e textura). Além disso, indicam que a coloração mais clara das formulações adicionadas de sucralose (SUC e SUC-P) e a turbidez das formulações probióticas (PRO; SIMB e SUC-P) não interferiram na aceitação dos sucos clarificados de maçã.

A formulação com sacarose (SAC) foi mais aceita (sabor e impressão geral) do que a formulação pura (PUR), comprovando o efeito do açúcar na melhoria da aceitação de sucos ( $p < 0,05$ ). Resultados semelhantes foram observados em outros estudos com sucos de maçã (ENDRIZZI et al., 2014; ROBBOTTEN et al., 2009).

A adição de oligofrutose e de sucralose contribuiu com o aumento da aceitação de sucos clarificados de maçã contendo ou não probióticos, isto é, a aceitabilidade quanto ao sabor e a impressão geral das formulações prebiótica (PRE), simbiótica (SIMB), com sucralose (SUC) e com sucralose e probiótico (SUC-P) foi semelhante ( $p > 0,05$ ) à da formulação adicionada de açúcar (SAC). Os resultados indicam que, embora a intensidade do gosto doce promovida com a adição da oligofrutose seja inferior a da sacarose, ela ainda pode ser considerada um substituto de açúcar, pois tornou um suco puro tão aceito quanto o produto adicionado de sacarose.

Além disso, comprovam o efeito de substituição de açúcar da sucralose, com efeitos positivos na aceitação dos produtos. Segundo Marcellini, Chainho e Bolini (2005), a intensidade e a persistência do gosto doce e a presença ou não de residuais são fundamentais para a aceitação, preferência e escolha de produtos com edulcorantes pelos consumidores. Portanto, a sucralose e a oligofrutose tornam-se boas alternativas para evitar o gosto amargo e metálico dos principais edulcorantes utilizados pela indústria.

A adição da cultura probiótica (Formulação PRO) não interferiu na aceitação ( $p > 0,05$ ) dos produtos (Formulação PUR), indicando que o suco de maçã é um meio adequado para a inoculação de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei*. Estudos acerca da incorporação de culturas probióticas em sucos e/ou néctares de frutas têm sido contrastantes, onde alguns indicam não alteração da aceitação dos produtos (BEVILACQUA et al., 2013; PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011) enquanto outros relatam perda de aceitação devido a presença de um sabor desagradável (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004a, 2004b; SAEED et al., 2013). As diferenças encontradas podem ser relacionadas ao tipo de suco de fruta e à cultura probiótica empregada.

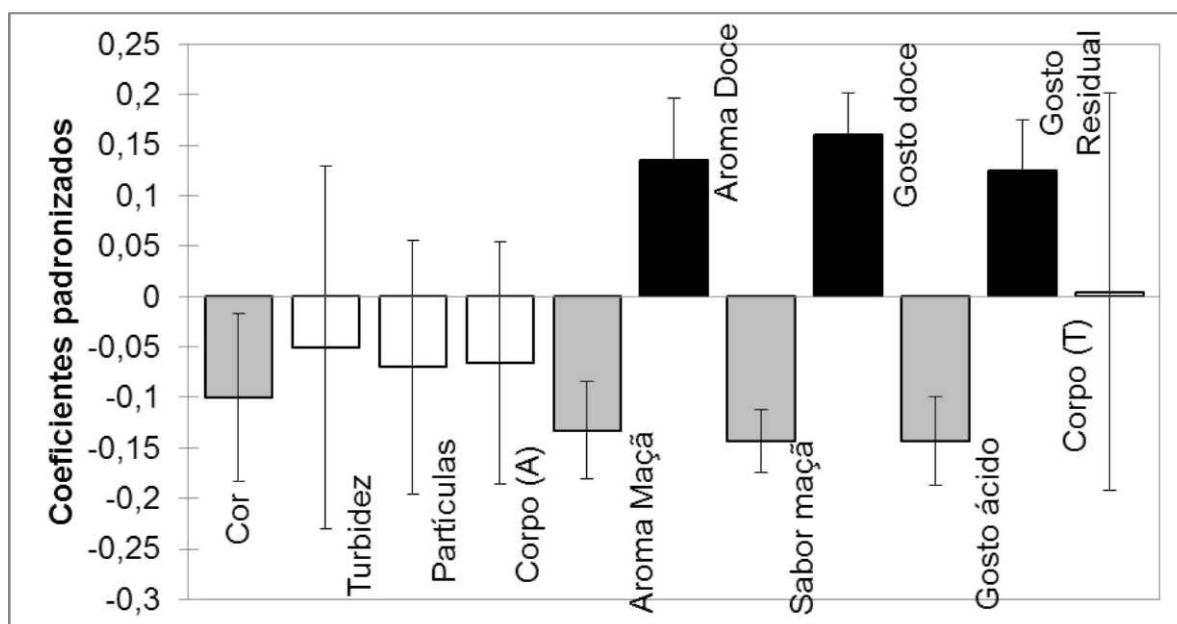
A manutenção da aceitação dos sucos clarificados de maçã com a adição de probióticos é de suma importância, pois os consumidores não estão dispostos a comprometer o sabor de seus produtos em busca de melhorias na saúde; além de só repetirem a compra dos mesmos quando estão convencidos da manutenção das características sensoriais do produto convencional (BARRY, 2011).

### 3.3 INFLUÊNCIA DOS ATRIBUTOS SENSORIAIS NA ACEITAÇÃO DE SUCOS CLARIFICADOS DE MAÇÃ

A regressão por mínimos quadrados parciais (PLS) (Figura 2) foi utilizada para determinar os atributos sensoriais importantes na aceitação geral de sucos de maçã por consumidores. Um modelo para um componente foi obtido, onde a regressão explicou 84% dos valores médios de aceitação (dados Y) e 55,9% dos valores médios dos atributos sensoriais (dados X), sendo reportada com um  $Q^2$  acumulado igual a 0,736, indicando uma qualidade satisfatória do modelo.

Os coeficientes padronizados para os atributos sensoriais (cor, aroma de maçã, aroma doce, sabor de maçã, gosto doce, gosto ácido e gosto residual) foram significativos, tendo em vista que a importância da variável na projeção (VIP) foi maior ou igual a 0,8 (BAYARRI et al., 2011). Assim, os atributos representados pelas colunas localizadas na parte positiva do eixo Y (colunas em preto) têm importância positiva na aceitação de sucos de maçã, enquanto as colunas na parte negativa do eixo Y (colunas em cinza) representam os atributos cuja presença é negativa na aceitação dos sucos. As colunas em branco representam os atributos sem contribuição na aceitação (VIP < 0,8).

**Figura 2** – Coeficientes de regressão da PLS de formulações de suco clarificado de maçã\*



\*preto = atributos que contribuem positivamente na aceitação pelos consumidores (VIP > 0,8); cinza = atributos que contribuem negativamente na aceitação pelos consumidores (VIP > 0,8); branco = atributos sem contribuição significativa na aceitação pelos consumidores (VIP < 0,8)

A aceitação (impressão geral) dos sucos clarificados de maçã foi dirigida de forma positiva pelos gostos doce e residual, e aroma doce. De fato, Endrizzi et al. (2014) afirmam que a doçura é o atributo mais importante para a aceitação de sucos de maçã. Segundo Cavallini e Bolini (2005), a sucralose apresenta leve gosto residual amargo e de curta duração, diferentemente da maioria dos edulcorantes utilizados pela indústria, sendo este residual semelhante ao da sacarose. Esta semelhança justificaria a contribuição positiva do gosto residual na aceitação dos sucos de maçã neste estudo.

Cor mais escura, aroma de maçã, sabor de maçã e gosto ácido foram considerados atributos que diminuem a aceitação dos produtos. Rodbotten et al. (2009) relatam que a acidez é um atributo que diminui a aceitação de sucos pelos consumidores, e que, a maior intensidade do gosto doce em produtos adoçados suprime a percepção de acidez. Sucos que apresentam sabor pronunciado da fruta a qual lhe deu origem, geralmente, são percebidos como menos doces e mais ácidos (ELLENDERSEN et al., 2012) e, conseqüentemente, preteridos pela maioria dos consumidores. A intensificação da cor em sucos de maçã tem sido relacionada com a perda de aceitação dos produtos pelos consumidores (BLEIBAUM et al., 2002).

Turbidez, presença de partículas e corpo (aparência e textura) não apresentaram contribuição significativa na aceitação de sucos clarificados de maçã (VIP < 0,8). A não contribuição da turbidez foi um resultado inesperado, visto que esta é considerada

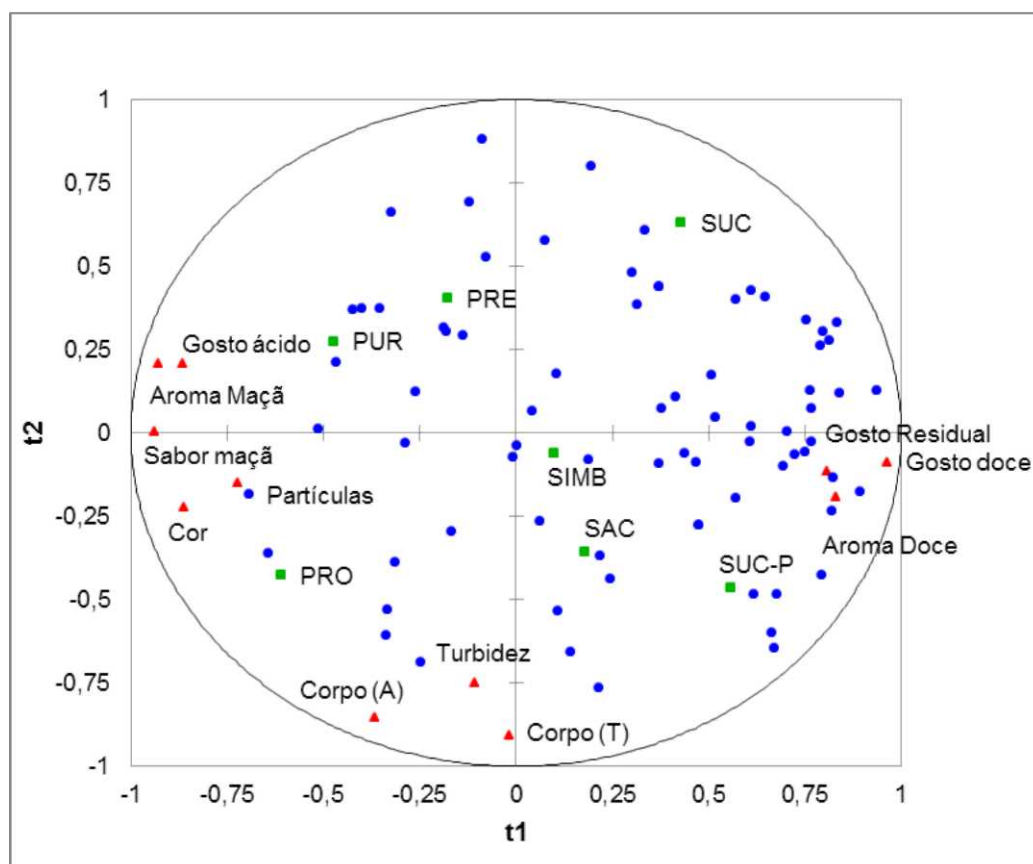
um crítico problema de qualidade em sucos clarificados de fruta (YOUSAFF et al., 2010). Este fato pode estar relacionado ao baixo consumo de suco clarificado de maçã pelos brasileiros (AGUIAR et al., 2012) ou a turbidez proporcionada pela adição da cultura probiótica foi baixa, não prejudicando a aceitação dos sucos.

#### 3.4 MAPA DE PREFERÊNCIA EXTERNO

Na Figura 3 são apresentados os resultados do Mapa de Preferência Externo (PREFMAP). Usando duas dimensões ( $t_1$  e  $t_2$ ), foi possível explicar 77,3% da variância dos atributos sensoriais obtidos na ADQ, e 41,5% da variância total da aceitação sensorial. Os consumidores (círculos) estão próximos das formulações (quadrados) mais aceitas por eles.

Visualmente (Figura 3) pode-se observar que as formulações adicionadas de açúcar (SAC) ou substitutos de açúcar (SUC, SUC-P e SIMB) apresentaram maior aceitação devido à maior percepção de doçura (aroma e gosto) e gosto residual, os quais são os atributos que contribuem positivamente para a aceitação dos produtos. Por outro lado, o suco puro (PUR) foi o menos preferido; provavelmente devido à maior intensidade no sabor de maçã, aroma de maçã; gosto ácido; e menor doçura. Segundo Costa et al. (2013) os consumidores costumam preferir sucos com adição de açúcar pelo gosto doce em si, mas também, porque o aumento nas concentrações de açúcar contribui na redução da percepção do gosto ácido.

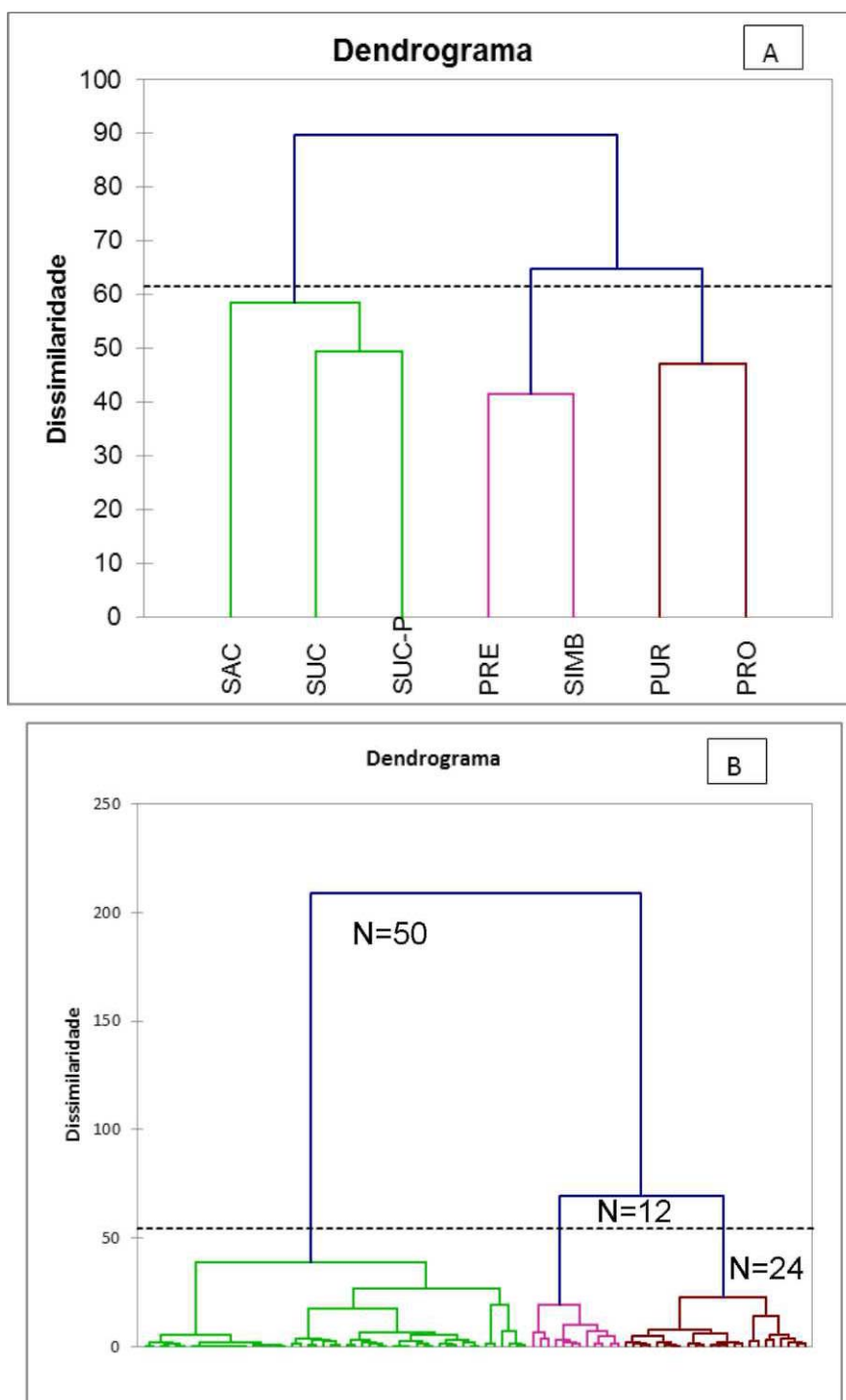
**Figura 3** – Mapa de Preferência Externo de formulações de suco clarificado de maçã\*



\*quadrados= formulações; círculos = consumidores; triângulos=atributos. Formulações: PUR (suco puro); SAC (com sacarose); PRE (prebiótica - com oligofrutose); PRO (probiótica -com probiótico); SIMB (simbiótica - com oligofrutose e probiótico); SUC (com sucralose); e SUC-P (com sucralose e probiótico)

A fim de determinar grupos de consumidores com diferentes preferências pelos sucos clarificados de maçã, a Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) foi realizada e os resultados são apresentados na Figura 4.

**Figura 4** – Análise Hierárquica de Agrupamento (AHA) para preferência de formulações de suco clarificado de maçã. (A) Formulações; (B) Consumidores\*



\*Formulações: SAC (com sacarose); PUR (suco puro); PRE (prebiótica - com oligofrutose); PRO (probiótica - com probiótico); SIMB (simbiótica - com oligofrutose e probiótico); SUC (com sucralose); e SUC-P (com sucralose e probiótico)

Foi observada a presença de três grupos de formulações: Grupo 1 (à esquerda) contendo as formulações SAC, SUC e SUC-P; Grupo 2 (ao meio) com as formulações PRE e SIMB; e Grupo 3 (à direita) com as formulações PUR e PRO (Figura 4A).

A maioria dos consumidores (58,14%) estava no Grupo 1 e, portanto, tinha preferência pelas formulações com maior intensidade no gosto e aroma doces (SAC; SUC; e SUC-P) (Figura 4B). Os consumidores do Grupo 3 (27,91%), no entanto, tinham preferência pelas formulações pura (PUR) e probiótica (PRO). Segundo Endrizzi et al. (2014) existem consumidores que comumente ingerem alimentos mais saudáveis, tendo preferência por sucos sem adição de açúcar, além daquele já presente na matéria-prima, e que estão mais acostumados ao gosto ácido desses produtos.

Há ainda consumidores (Grupo 2) (13,95%), com preferência pelas formulações adicionadas de oligofrutose como substituto de açúcar (PRE e SIMB), indicando que existem consumidores que preferem sucos com intensidades intermediárias na doçura.

Os resultados da AHA indicam que há um mercado consumidor amplo para o suco de maçã e que as indústrias podem direcionar a formulação dos seus produtos ao público alvo desejado.

#### **4 CONCLUSÕES**

O presente estudo traz contribuições importantes às indústrias produtoras de sucos de maçã e aos pesquisadores da área de alimentos funcionais. O suco de maçã mostrou ser um meio adequado para a incorporação de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como probiótico, sendo obtidos produtos com características sensoriais (exceto turbidez) e aceitação semelhantes aos produtos convencionais. A sucralose e a oligofrutose podem ser utilizadas como substitutos de açúcar, aumentando a aceitação de sucos puros e tomando-a semelhante à dos adicionados de sacarose. No caso das formulações com oligofrutose, somam-se ainda os benefícios à saúde associados ao consumo de prebióticos e a baixa quantidade de calorias.

Conclui-se que foi possível desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico que apresentou perfil sensorial (exceto turbidez e presença de partículas) e aceitação semelhantes ao suco com sacarose, por meio da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como cultura probiótica e oligofrutose como substituto de açúcar e prebiótico. A fim de melhorar a aceitação dos produtos, o gosto e o aroma doces poderiam ser intensificados. Para isso, a oligofrutose poderia ser adicionada em maior concentração (4 g/100mL) ou utilizada em conjunto com uma quantidade reduzida de açúcar (sacarose) ou um edulcorante, que poderia ser a sucralose.

## REFERÊNCIAS

- AGUIAR, I.B.; MIRANDA, N.G.M.; GOMES, F.S.; SANTOS, .M.C.S.; FREITAS, D.G.C.; TONON, R.V.; CABRAL, L.M.C. Physicochemical and sensory properties of apple juice concentrated by reverse osmosis and osmotic evaporation. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.16, p.137-142, 2012.
- AL-DABBAS, M.M.; AL-QUDSI, J.M. Effect of partial replacement of sucrose with the artificial sweetener sucralose on the physico-chemical, sensory, microbial characteristics, and final cost saving of orange nectar. **International Food Research Journal**, v.19, n.2, p.679-683, 2012.
- ANVISA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Atualizado em julho, 2008**. Available in: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. 2008a.
- ANVISA. **Regulamento Técnico que autoriza o uso de aditivos edulcorantes em alimentos, com seus respectivos limites máximos**. Resolução RDC n. 18, 24/03/2008. 2008b.
- APOLINÁRIO, A.C.; DAMASCENO, B.P.G.L.; BELTRÃO, N.E.M.; PESSOA, A.; CONVERTI, A.; SILVA, J.A. Inulin-type fructans: a review of different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. **Carbohydrate Polymers**, v.101, p.368-378, 2014.
- AWAISHEH, S.S. **Probiotic food product classes, types, and processing**. Probiotics, Prof. Everlon Rigobelo (Ed.), ISBN: 978-953-51-0776-7, InTech, DOI: 10.5772/51267. Disponível em: <http://www.intechopen.com/books/probiotics/probiotic-food-products-classes-types-and-processing>. 2012. Acesso: 06/02/2014.
- BARRY, A. Meeting today's consumer demands. **Technology + Marketing**, p.8-10, 2011.
- BAYARRI, S.; CARBONELL, I.; BARRIOS, E.; COSTELL, E. Impact of sensory differences on consumer acceptability of yoghurts and yoghurt-like products. **International Dairy Journal**, v.21, n.2, p.111-118, 2011.
- BEVILACQUA, A.; CAMPANIELLO, D.; CORBO, M.R.; MADDALENA, L.; SINIGAGLIA, M. Suitability of *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus plantarum* as probiotics intended for fruit juices containing citrus extracts. **Journal of Food Science**, v.78, n.11, p.M1764-1771, 2013.
- BLEIBAUM, R.N.; STONE, H.; TAN, T.; LABRECHE, S.; SAINT-MARTIN, E.; ISZ, S. Comparison of sensory and consumer results with electronic nose and tongue sensors for apple juices. **Food Quality and Preference**, v.13, n.6, p.409–422, 2002.
- BONANY, J.; BRUGGER, C.; BUEHLER, A.; CARBÓ, J.; CODARIN, S.; DONATI, F.; ECHEVERRIA, G.; EGGER, S.; GUERRA, W.; HILAIRE, C.; HÖLLER, I.; IGLESIAS, I.; JESIONKOWSKA, K.; KONOPACKA, D.; KRUCZNSKA, D.; MARTINELLI, A.;

PETIOT, C.; SANSAVINI, S.; STEHR, R.; SCHOORL, F. Preference mapping of apple varieties in Europe. **Food Quality and Preference**, v.32, Parte C, p.317-329, 2014.

BURDURLU, H.S.; KARADENIZ, F. Effect of storage on nonenzymatic browning of apple juice concentrates. **Food Chemistry**, v.80, n.1, p.91-97, 2003.

CADENA, R. S.; BOLINI, H. M.A. Ideal and relative sweetness of high intensity sweeteners in mango nectar. **International Journal of Food Science & Technology**, v.47, n.5, p.991-996, 2012.

CADENA, R.S.; CRUZ, A.G.; NETTO, R.R.; CASTRO, W.F.; FARIA, J.A.F.; BOLINI, H.M.A. Sensory profile and physicochemical characteristics of mango néctar sweetened with high intensity sweeteners throughout storage time. **Food Research International**, v.54, n.2, p.1670-1679, 2013.

CAVALLINI, D. C. U.; BOLINI, H. M.A. Comparação da percepção temporal de doçura, amargor e sabor de fruta em suco de manga reconstituído e adoçado com sacarose, mistura ciclamato/sacariona 2:1, aspartame, sucralose e estévia. **Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v.23, n.2, p.361-382, 2005.

COSTA, M.G.M.; FONTELES, T.V.; JESUS, A.L.T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v.139, n.1-4, p.261-266, 2013.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v.15, n.2, p.219-232, 2008.

DONKOR, O.N; NILMINI, S.L.I; STOLIC, P.; VASILJEVIC, T. & SHAH, N.P. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v.17, n.6, p.657-665, 2007.

ELLENDERSEN, L.S.N.; GRANATO, D.; GUERGOLETTA, K.B.; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**, v.12, n.4, p.475-485, 2012.

ENDRIZZI, I.; GASPERI, F.; ROBBOTTEN, M.; NAES, T. Interpretation, validation and segmentation of preference mapping models. **Food Quality and Preference**, v.32, Parte C, p.198-209, 2014.

FAO/ WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Working Group of Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotic in food, Ontario, Canadá. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>. 2002.

FRANCK, A. Technological functionality of inulin and oligofructose. **British Journal of Nutrition**, v.87, n.2, p.287-291, 2002.

GRANATO, D.; BRANCO, G.F.; NAZZARO, F.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. Functional foods and nondairy probiotic food development: trends, concepts and

products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.9, n.3, p.292-302, 2010.

JAIN, P.; KUMAR, A.; JHA, A.; KUMAR, R.; PANDEY, S.K. Textural and sensory properties of Lal peda manufactured with artificial sweeteners and bulking agents. **International Journal of Dairy Technology**, v.66, n.1, p.119-126, 2013.

KEENAN, D.; BRUNTON, N.; BUTLER, F.; WOUTERS, R.; GORMLEY, R. Evaluation of thermal and high hydrostatic pressure processed apple pures enriched with prebiotic inclusions. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.12, n.3, p.261-268, 2011.

LUCKOW, T., DELAHUNTY, C. Which juice is healthier? A consumer study of probiotic non-dairy juice drinks. **Food Quality and Preference**, v.15, n.7-8, p.751–759, 2004a.

LUCKOW, T.; DELAHUNTY, C. Consumer acceptance of orange juice containing functional ingredients. **Food Research International**, v.37, n.8, p.805-14, 2004b.

LUCKOW, T.; SHEEHAN, V.; DELAHUNTY, C; FITZGERALD, G. Determining the odor and flavor characteristics of probiotic, health-promoting ingredients and the effects of repeated exposure on consumer acceptance. **Journal of Food Science**, v.70, n.1, p.S53–S59, 2005.

MARCELLINI, P.S.; CHAINHO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Doçura ideal e análise de aceitação de suco de abacaxi concentrado reconstituído adoçado com diferentes edulcorantes e sacarose. **Alimentos & Nutrição**, v.16, n.2, p.177-182, 2005.

MARCHI, R.; MONTES-VILLANUEVA, N.D.; McDANIEL, M.R.; BOLINI, H.M.A. Sensory profile and stability of a new ready-to-drink passion fruit juice beverage with different sweetener systems. **CENTRUM Católica's Working Paper Series**, n. 2012-09-0016, p.1-34, 2012.

MARTINS, E.M.F.; RAMOS, A.M.; VANZELA, E.S.L.; STRINGHETA, P.C.; PINTO, C.L.O.; MARTINS, J.M. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v.51, n.2, p.764–770, 2013.

MOSKOWITZ, H.R. **Product Testing and Sensory Evaluation of food-marketing and R&D Approaches**. Westport: Food and Nutrition Press, 1983. 605p.

MUSSATTO, S.I; MANCILHA, I.M. Non-digestible oligosaccharides: a review. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, n.3, p.587-597, 2007.

O'DONNELL, K. **Carbohydrate and intense sweeteners**. In: Chemistry and technology of soft drinks and fruit juices. 2nd Edition (ed. ASHURST, P.R), Blackwell Publishing Ltd, Oxford, UK. p.68-87, 2007.

PIMENTEL, T.C., PRUDENCIO, S.H., & RODRIGUES, R.S. Néctar de pêssego potencialmente simbiótico. **Alimentos e Nutrição**, v.22, n.3, p.455-464, 2011.

PIMENTEL, T.C.; CRUZ, A.G.; PRUDENCIO, S.H. *Short communication*: Influence of long-chain inulin and *Lactobacillus paracasei* subspecies *paracasei* on the sensory profile and acceptance of a traditional yogurt. **Journal of Dairy Science**, v.96, n.10, p.6233-6241, 2013.

RENUKA, B.; KULKARNI, S.G.; VIJAYANAND, P.; PRAPULLA, S.G. Fructooligosaccharide fortification of selected fruit juice beverages: effect on the quality characteristics. **Lebensmittel Wissenschaft Technologie**, v.42, n.5, p.1031-1033, 2009.

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

RODBOTTEN, M.; MARTINSEN, B. K.; BERGE, G. I.; MORTVEDT, H. S.; KNUSTEN, S. H.; LEA, P; NAES, T. A cross-cultural study of preference for apple juice with different sugar and acid contents. **Food Quality and Preference**, v.20, n.3, p. 277-284, 2009.

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

SAEED, M.; ZAHID, S.; SATTAR, M.U. Isolation, characterization and utilization of *Saccharomyces boulardii* as probiotic supplement in apple juice. **Advances in Food and Biosciences**, v.1, n.1, p. 8-13, 2013

SYMONEAUX, R.; GALMARINI, M.V.; MEHINAGIC, E. Comment analysis of consumer's likes and dislikes as an alternative tool to preference mapping. A case study on apples. **Food Quality and Preference**, v.24, n.1, p.59–66, 2012.

VASUDHA, S.; MISHRA, H.N. Non dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, v.20, n.1, p.7-15, 2013.

YOUSAF, M.S.; YUSOF, S.; MANAP, M.Y.B.A.; ABD-AZIZ, S. Storage stability of clarified banana juice fortified with inulin and oligofructose. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.34, Suplemento s2, p.599-610, 2010.

## CONCLUSÕES

- O suco de maçã é um meio adequado para a incorporação de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como probiótico, sendo obtidos produtos com composição química e aceitabilidade semelhantes aos produtos puros, porém, mais ácidos (acidez titulável); vermelhos (avaliação instrumental) e turvos (avaliação física e sensorialmente);
- O tempo de vida dos sucos com cultura probiótica, baseado na quantidade mínima recomendada de probióticos, seria de 14 a 28 dias em refrigeração (4°C), dependendo do tipo de embalagem e da presença de oligofrutose;
- A oligofrutose pode ser utilizada como prebiótico e protetora de culturas probióticas (*Lactobacillus paracasei* ssp *paracasei*) em sucos de maçã, não tendo influência sobre as características físico-químicas (pH, acidez titulável, cor e turbidez) e estabilidade ao armazenamento dos produtos. Quando adicionada em concentração suficiente para o efeito prebiótico (2 g/100mL), atua como substituto parcial da sacarose, pois sucos com oligofrutose apresentam menor intensidade do gosto doce do que os com sacarose. Com relação à aceitabilidade, sucos adicionados de oligofrutose são igualmente aceitos aos adicionados de sacarose;
- Com base na ingestão mínima diária de frutanos e na regulamentação brasileira para utilização da alegação de propriedade funcional da oligofrutose, os sucos com oligofrutose e armazenados em refrigeração por 28 dias poderiam ser considerados prebióticos, para uma porção de 200mL;
- A sucralose pode ser utilizada como substituto de açúcar, resultando em produtos com intensidade de gosto doce e aceitação semelhantes aos com sacarose. No entanto, os produtos são mais claros (avaliação sensorial);
- A embalagem de vidro é mais apropriada do que a de plástico para manutenção mais prolongada (28 dias) da viabilidade de *Lactobacillus*

paracasei ssp. paracasei, não havendo efeito da embalagem nas características físico-químicas e na aceitabilidade dos sucos;


- É possível desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico que apresente composição química, perfil sensorial (exceto turbidez e presença de partículas) e aceitação semelhantes ao suco com sacarose. Portanto, em conjunto com a cultura probiótica, a oligofrutose atua como um substituto total do açúcar, pois sucos simbióticos apresentaram intensidade do gosto doce semelhante ao suco com sacarose. Contudo, os produtos são mais ácidos (acidez titulável) e turvos (avaliação física e sensorial);
- A aceitação de sucos clarificados de maçã é dirigida de forma positiva pelo gosto doce, aroma doce e gosto residual amargo; e negativamente pelo sabor de maçã, aroma de maçã, cor mais escura e gosto ácido.

## **ANEXOS**

**ANEXO A**  
**APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA**



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS**  
**Universidade Estadual de Londrina**  
**Registro CONEP 268**

Parecer CEP/UEL: 063/2011 CAAE: 0044.0.268.000-11 Processo: 8676/2011 Folha de Rosto: 414896	Londrina, 03 de maio de 2011.
Pesquisador(a): Sandra Helena Prudêncio Unidade/Órgão: CCA – Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos	
Prezado(a) Senhor(a):  <p style="text-align: center;">O “Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina” (Registro CONEP 268) – de acordo com as orientações da Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde/MS e Resoluções Complementares, avaliou o projeto:</p> <p style="text-align: center;"><b>“Suco de Fruta Simbiótico com Oligofrutose como Substituto de Açúcar”</b></p>	
Situação do Projeto: <b>APROVADO</b>  Informamos que deverá ser comunicada, por escrito, qualquer modificação que ocorra no desenvolvimento da pesquisa, bem como deverá apresentar ao CEP/UEL relatório final da pesquisa.	
Atenciosamente,    <b>Profa. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli</b> Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos Universidade Estadual de Londrina	

## ANEXO B

### FICHA DE RECRUTAMENTO DE JULGADORES PARA TESTE DESCRITIVO

#### QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO DE JULGADORES (Teste descritivo)

Você já deve ter ouvido falar de julgadores profissionais de vinhos que diferenciam vinhos de safras diferentes apenas pelo odor. O que torna esses julgadores capazes de tal façanha é, principalmente, o treinamento que eles recebem.

Neste momento, desejamos formar uma equipe treinada de julgadores, capacitada para medir a intensidade das características sensoriais (aparência, sabor, aroma e textura) de *suco de maçã*. Ser um julgador não tomará muito de seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A equipe de julgadores se reunirá semanalmente, por um período de 30 minutos, no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA. Esperamos que os julgadores tenham disponibilidade para participar da equipe por cerca de 6 (seis) meses.

**Se você deseja participar da equipe de julgadores, por favor, preencha este formulário.**

Se você tiver alguma dúvida, ou necessitar de informações adicionais, não hesite em entrar em contato com Tatiana (tel: 44 9101-9000, e-mail: tatipimentel@hotmail.com) ou Profa. Sandra Helena (tel: 3371-4080, e-mail: sandrah@uel.br).

Dados Pessoais:

Nome \_\_\_\_\_

Telefone trabalho \_\_\_\_\_ Telefone casa \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_

Horários e dias da semana disponíveis para participar do treinamento:

Indique o período em que você pretende tirar férias este ano:

1. Faixa etária:

( ) 15-25

( ) 25-35

( ) 35-50

( ) acima de 50 anos

2. Sexo:

( ) masculino

( ) feminino

3. Ocupação:

 aluno \_\_\_\_\_ funcionário professor outro \_\_\_\_\_

4. Escolaridade:

 1º grau 2º grau 3º grau outro \_\_\_\_\_5. Gosta de *suco de fruta*?  Sim Não

6. Indique o quanto você aprecia cada um desses produtos:

	Gosto	Nem gosto/ Nem desgosto	Não gosto	Nunca provei
Suco de maçã				
Produtos com fibras				
Produtos com probióticos				
Produtos com baixo teor de açúcar				

7. Frequência de consumo de *suco de fruta*:

Suco	Nunca	Ocasionalmente (algumas vezes ao ano)	Moderadamente (algumas vezes por mês)	Frequentemente (algumas vezes por semana)
Laranja				
Maçã				
Uva				
Pêssego				
Morango				
Outro _____				

8. Frequência de consumo de suco com baixo teor de açúcar (light):

- Nunca
- Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano
- Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês
- Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

9. Frequência de consumo de produtos com fibras:

- Nunca
- Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano
- Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês
- Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

10. Frequência de consumo de produtos com probióticos:

- Nunca
- Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano
- Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês
- Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

11. Já participou de algum teste sensorial?  Não  Sim De que tipo ?

Aceitação ( )

Discriminativo ( )

Descritivo ( )

---

**ANEXO C**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA TESTE**  
**DESCRIPTIVO**

---

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Teste Descritivo)**

**“SUCO DE FRUTA SIMBIÓTICO COM OLIGOFRUTOSE COMO SUBSTITUTO DE AÇÚCAR”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Suco de fruta simbiótico com oligofrutose como substituto de açúcar”, realizada no “Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos”. O objetivo da pesquisa é “desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico por meio da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como cultura probiótica e oligofrutose como prebiótico e substituto de açúcar”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: durante as sessões de avaliação, previamente agendadas, medir a intensidade das características sensoriais de cor, aroma, sabor e textura em amostras de suco. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são: desenvolver um suco de maçã pontencialmente funcional (com benefícios à saúde), sendo então, uma alternativa aos produtos lácteos funcionais já existentes no mercado e permitindo o consumo de culturas probióticas e prebióticos por intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite e vegetarianos estritos. A ingestão do suco de maçã não trará nenhum prejuízo ou risco à saúde.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar ( Sandra Helena Prudencio, Av. São Paulo, 672 - Apto 91 - Londrina – PR, (43) 3371-4080), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

**Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

---

## ANEXO D

## FICHA DE RECRUTAMENTO DE JULGADORES PARA TESTE DE ACEITAÇÃO

## QUESTIONÁRIO PARA RECRUTAMENTO DE JULGADORES (Teste de Aceitação)

Desejamos formar uma equipe de julgadores para avaliar a aceitação de *suco de maçã*. As amostras serão produzidas a partir de frutas ou polpas e adicionadas de oligofrutose e/ou cultura probiótica (*Lactobacillus paracasei ssp. paracasei*). Ser um julgador não tomará muito seu tempo e não envolverá nenhuma tarefa difícil. A prova será realizada no Laboratório de Análise Sensorial do DCTA, leva em torno de 15 minutos e você poderá fazê-la no horário em que tiver maior disponibilidade.

Se você deseja participar do teste, por favor, preencha este formulário.

Se você tiver alguma dúvida, ou necessitar de informações adicionais, não hesite em entrar em contato com Tatiana (tel: 44 9101-9000, e-mail: tatipimentel@hotmail.com) ou Profa. Sandra Helena (tel: 3371-4080, e-mail: sandrah@uel.br).

Dados Pessoais:

Nome \_\_\_\_\_

Telefone trabalho \_\_\_\_\_ Telefone casa \_\_\_\_\_

E-mail \_\_\_\_\_

1. Faixa etária:

( ) 15-25

( ) 25-35

( ) 35-50

( ) acima de 50 anos

2. Sexo:

( ) masculino

( ) feminino

3. Ocupação:

( ) aluno \_\_\_\_\_

( ) funcionário

( ) professor

( ) outro \_\_\_\_\_

4. Escolaridade:

( ) 1º grau

( ) 2º grau

( ) 3º grau

( ) outro \_\_\_\_\_

5. Gosta de *suco de fruta*? ( ) Sim

( ) Não

6. Indique o quanto você aprecia cada um desses produtos:

	Gosto	Nem gosto/ Nem desgosto	Não gosto	Nunca provei
Suco de maçã				
Produtos com fibras				
Produtos com probióticos				
Produtos com baixo teor de açúcar				

7. Frequência de consumo de *suco de fruta*

Suco	Nunca	Ocasionalmente (algumas vezes ao ano)	Moderadamente (algumas vezes por mês)	Frequentemente (algumas vezes por semana)
Laranja				
Maçã				
Uva				
Pêssego				
Morango				
Outro _____				

8. Frequência de consumo de suco com baixo teor de açúcar (light):

- ( ) Nunca  
 ( ) Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano  
 ( ) Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês  
 ( ) Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

9. Frequência de consumo de produtos com fibras:

- ( ) Nunca  
 ( ) Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano  
 ( ) Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês  
 ( ) Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana

10. Frequência de consumo de produtos com probióticos:

- ( ) Nunca  
 ( ) Ocasionalmente - \_\_\_\_\_ vezes por ano  
 ( ) Moderadamente - \_\_\_\_\_ vezes por mês  
 ( ) Frequentemente - \_\_\_\_\_ vezes por semana
-

**ANEXO E**  
**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA TESTE DE**  
**ACEITAÇÃO**

---

**Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Teste de Aceitação)**

**“SUCO DE FRUTA SIMBIÓTICO COM OLIGOFRUTOSE COMO SUBSTITUTO DE AÇÚCAR”**

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo a participar da pesquisa “Suco de fruta simbiótico com oligofrutose como substituto de açúcar”, realizada no “Laboratório de Análise Sensorial do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos”. O objetivo da pesquisa é “desenvolver um suco de maçã potencialmente simbiótico por meio da adição de *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* como cultura probiótica e oligofrutose como prebiótico e substituto de açúcar”. A sua participação é muito importante e ela se daria da seguinte forma: avaliar o quanto gostou ou desgostou das amostras de suco fornecidas durante a sessão de avaliação previamente agendada. Gostaríamos de esclarecer que sua participação é totalmente voluntária, podendo você: recusar-se a participar, ou mesmo desistir a qualquer momento sem que isto acarrete qualquer ônus ou prejuízo à sua pessoa. Informamos ainda que as informações serão utilizadas somente para os fins desta pesquisa e serão tratadas com o mais absoluto sigilo e confidencialidade, de modo a preservar a sua identidade.

Os benefícios esperados são: desenvolver um suco de maçã pontencialmente funcional (com benefícios à saúde), sendo então, uma alternativa aos produtos lácteos funcionais já existentes no mercado e permitindo o consumo de culturas probióticas e prebióticos por intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite e vegetarianos estritos. A ingestão do suco de maçã não trará nenhum prejuízo ou risco à saúde.

Informamos que o senhor não pagará nem será remunerado por sua participação. Garantimos, no entanto, que todas as despesas decorrentes da pesquisa serão ressarcidas, quando devidas e decorrentes especificamente de sua participação na pesquisa.

Caso você tenha dúvidas ou necessite de maiores esclarecimentos pode nos contactar ( Sandra Helena Prudencio, Av. São Paulo, 672 - Apto 91 - Londrina - PR, (43) 3371-4080), ou procurar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, na Avenida Robert Kock, nº 60, ou no telefone 3371 – 2490. Este termo deverá ser preenchido em duas vias de igual teor, sendo uma delas, devidamente preenchida e assinada entregue a você.

Londrina, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2011.

**Pesquisador Responsável**

RG: \_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_ (nome por extenso do sujeito de pesquisa), tendo sido devidamente esclarecido sobre os procedimentos da pesquisa, concordo em participar voluntariamente da pesquisa descrita acima.

Assinatura (ou impressão dactiloscópica): \_\_\_\_\_

Data: \_\_\_\_\_

Obs: Caso o participante da pesquisa seja menor de idade, deve ser incluído o campo para assinatura do menor e do responsável.

---