



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

MARIA RITA ALANIZ PORTO

**ESTABILIDADE DE SUCO MISTO DE BETERRABA E
LARANJA CONTENDO OU NÃO *Lactobacillus acidophilus***

MARIA RITA ALANIZ PORTO

**ESTABILIDADE DE SUCO MISTO DE BETERRABA E
LARANJA CONTENDO OU NÃO *Lactobacillus acidophilus***

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Prudencio

Londrina
2015

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

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

P853e Porto, Maria Rita Alaniz.
Estabilidade de suco misto de beterraba e laranja contendo ou não *Lactobacillus acidophilus* / Maria Rita Alaniz Porto. – Londrina, 2015.
127 f. : il.

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, 2015.

Inclui bibliografia.

1. Suco de frutas – Teses. 2. Bebidas – Avaliação sensorial – Teses. 3. Probiótico – Teses. 4. Alimentos funcionais – 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.

CDU 663.8/9

MARIA RITA ALANIZ PORTO

**ESTABILIDADE DE SUCO MISTO DE BETERRABA E LARANJA
CONTENDO OU NÃO *Lactobacillus acidophilus***

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.

BANCA EXAMINADORA

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Helena
Prudencio
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Lyssa Setsuko Sakanaka
Universidade Tecnológica Federal do Paraná –
UTFPR

Prof^a. Dr^a. Josiane Alessandra Vignoli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Wilma Aparecida Spinosa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 25 de setembro de 2015.

Dedico este trabalho a minha mãe
Clara Eli, meu pai Nelson Porto (*in
memorian*), meu esposo Pedro
Henrique e minha filha Clara Akemi
que são os amores da minha vida.
A minha prima Josiane (*in memorian*)
pela inspiração a lutar pelos meus
sonhos.

AGRADECIMENTOS

A Deus pela fé, força e por colocar pessoas tão especiais em minha vida, que foram essenciais para eu suportar os momentos difíceis e por não me deixar desistir dos meus sonhos.

Agradeço à minha orientadora Prof^a. Dr^a. Sandra Helena Prudencio, não só pela constante orientação neste trabalho, mas sobretudo pela sua compreensão e paciência diante das minhas dificuldades. Sua ajuda foi essencial para a conclusão do doutorado.

À Prof^a. Dr^a. Sandra Garcia, pela colaboração e auxílio, sempre me atendendo prontamente em sua sala para esclarecer dúvidas, ao Prof. Dr. Raúl J. E. Castro Gómez, pela ajuda com as análises microbiológicas, à Prof^a. Dr^a. Marta de Toledo Benassi pela colaboração, principalmente com relação ao ácido ascórbico, enfim a todos os professores do departamento que de alguma forma contribuíram para minha formação, através de seus ensinamentos.

Ao programa de Pós graduação em Ciência de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de crescimento profissional e realização do doutorado.

Aos funcionários do departamento pela ajuda, em especial à Técnica Alessandra e Técnica e Prof^a. Dr^a. Elza Youssef.

Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de IC, mestrado e doutorado.

À empresa Chr Hansen®, pela doação da cultura probiótica *L. acidophilus La-5*.

Aos colegas e amigos, que cito por ordem cronológica, pois por ordem de importância seria impossível, já que TODOS foram como anjos na minha vida, me fizeram sorrir e seguir em frente mesmo nos momentos mais difíceis, Douglas Xavier e Érika Saeki (almoçamos juntos no meu 1 dia de aula e até hoje são amigos queridos que tenho contato, ainda que a distância), Marcela Kobayashi, minha amiga irmã para sempre, Denise Lebedenco, Angélica Ishikawa, Marines Corso e Marianne Shirai, amigas queridas, quando nos encontramos é uma alegria,

Raissa Castilho, grande amiga e que seria de mim no laboratório de microbiologia sem você? Kkkk, Karla Guergoletto, sempre me ajudou e ensinou a decifrar as “manias” dos probióticos, Marsílvio, impossível não rir e falar bobagem quando nos encontramos, mas as vezes também falamos sério kkk, Danizinha, Cintia Handa, Natalia Bom, Sabrina e Marcela Guelfi, queridas e sempre tão presentes, me ajudaram muito e sou grata demais por tudo, principalmente pela amizade de vocês, Vivian Okina, estagiária e amiga para a vida toda, super inteligente, foi meu braço direito e esquerdo em muitos momentos, e ao irmão de coração que encontrei, Fernando Sanches, irmão que pega no pé, irrita, incomoda, mas que você admira, respeita e sabe que pode contar sempre para o que der e vier. Queridos amigos, vocês são todos sem exceção especiais, me sinto honrada de tê-los conhecido, MUITO, MUITO OBRIGADA POR TUDO!

À minha mãezinha Clara Eli que sempre me apoiou, esteve presente na minha educação e aguentou firme e forte comigo nessa jornada.

Ao meu marido Pedro Henrique Matsubara, pelo amor, amizade e apoio nos momentos mais difíceis da minha vida, principalmente por me ajudar a cuidar da minha mãe e continuar o doutorado, você é e sempre será o amor da minha vida, Te amo!

À minha Tia Enira e Tia Iraci que me ajudam a enfrentar o problema de saúde da minha mãe, obrigada, sem vocês, também seria impossível ter concluído esse sonho.

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

“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito. Não sou o que deveria ser, mas Graças a Deus, não sou o que era antes”. (Marthin Luther King)

PORTO, Maria Rita Alaniz. **Estabilidade de Suco Misto de Beterraba e Laranja contendo ou não *Lactobacillus acidophilus***. 2015. 127 f. Tese (Doutorado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2015.

RESUMO

Suco misto de beterraba e laranja é uma bebida funcional alternativa que pode contribuir para o aumento do consumo de beterraba e laranja, sendo uma adição positiva à dieta. O objetivo do presente trabalho foi desenvolver um suco misto de beterraba e laranja puro e adicionado do probiótico *Lactobacillus acidophilus*, que seja apreciado, apresente estabilidade físico-química, atividade antioxidante e viabilidade da cultura probiótica durante armazenamento refrigerado. Inicialmente foram preparados, suco de beterraba puro e pasteurizado, suco de laranja pasteurizado e duas formulações de suco misto de beterraba e laranja, nas proporções 1:1 e 1:2 (v/v). Em um segundo momento do estudo, as duas formulações de suco misto de beterraba e laranja, nas proporções 1:1 e 1:2 (v/v) foram adicionadas do probiótico *L. acidophilus*. Avaliaram-se as alterações do pH, acidez total titulável, °Brix, conteúdo de betalaínas, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante em DPPH e ABTS, parâmetros de cor, viabilidade do microrganismo (apenas para os sucos mistos probióticos) durante o armazenamento refrigerado (4 °C/28 dias) dos sucos, além de sua aceitação sensorial e intenção de compra. A acidez (% de ácido cítrico), pH, e conteúdo de ácido ascórbico presentes no suco de laranja, contribuíram para a estabilidade das betacianinas, dos parâmetros de cor, teores elevados de compostos fenólicos totais e atividade antioxidante nos sucos mistos de beterraba e laranja, além disso, melhor aceitação sensorial quando comparados ao suco de beterraba puro e pasteurizado. Nos sucos mistos probióticos, em ambas as proporções estudadas, as características físico-químicas e atividade antioxidante não sofreram alterações indesejáveis durante armazenamento e o número de probióticos viáveis nos sucos manteve-se dentro do estabelecido pelo regulamento brasileiro de alimentos funcionais. A estabilidade dos compostos antioxidantes (betalaínas, ácido ascórbico e compostos fenólicos) e a viabilidade probiótica, possivelmente ocorreram pela sinergia entre esses fitoquímicos e o *L. acidophilus* (microaerófilo) na redução do oxigênio presente em ambos os sucos mistos de beterraba e laranja envasados, que evitaram conseqüentemente uma deterioração do produto. Os sucos apresentaram boa aceitação sensorial e intenção de compra, com destaque à cor do produto. Os resultados deste estudo indicaram que suco misto de beterraba e laranja é um meio adequado para manter a viabilidade de *L. acidophilus* durante armazenamento refrigerado com tempo de vida útil de 28 dias.

Palavras-chave: Betalaínas. Ácido ascórbico. Compostos fenólicos. Aceitação funcional.

PORTO, Maria Rita Alaniz. **Stability of a blend of Beet Juice and Orange with and without *Lactobacillus acidophilus***. 2015. 127 p. Thesis (Doctor's degree in Food Science) – University of Londrina, Londrina, 2015.

ABSTRACT

Beet juice blended with orange juice is an alternative functional beverage which can contribute to increase the consumption of beet and orange, and it is a positive addition to the diet. Initially, pure and pasteurized beet juice, and pasteurized orange juice, and two blended beet juice and orange formulations in ratios 1:1 and 1:2 (v/v). The objective of this study was to develop a blended juice with beet and orange juice with the additional the probiotic *Lactobacillus acidophilus*, that will be appreciated, towards physical and chemical stability, antioxidant activity and viability of probiotic culture during cold storage. In the second phase of the study, the formulations of blended beet juice and orange formulations in ratios 1:1 and 1:2 (v/v) were added with the probiotic *L. acidophilus*. Analises consisted on evaluate changes in pH, titratable acidity, °Brix, betalains content, ascorbic acid content, total phenolic compounds, antioxidant activity in DPPH and ABTS, color parameters, the microrganism viability (only for probiotics mixed juices) during cold storage (4°C / 28 days) of juices, beyond the addition to its sensory acceptance and purchase intent. The acidity (% citric acid), pH and content of ascorbic acid present in orange juice, contributed to the stability of betacyanins, color parameters, high levels of phenolic compounds and antioxidant activity in the blended juices of beet and orange besides, more acceptable when compared to the pure beet and pasteurized juice. In probiotics mixed juices, in both proportions studied the physicochemical characteristics and antioxidant activity did not suffer undesirable changes during storage and the number of viable probiotics in the juices remained within the established by Brazilian regulation of functional foods. The stability of antioxidants (betalains, ascorbic acid and phenolic compounds) and the probiotic viability, possibly occurred by synergy between these phytochemicals and *L. acidophilus* (microaerophilic) in the reduced presence of oxygen in both mixed and packaged beetroot juice orange consequently prevented the deterioration of the product. The juices showed good sensory acceptance and purchase intent, positively highlighting the color of the product. The results of this study indicate that mixed beet juice and orange is a suitable means to maintain the viability of *L. acidophilus* during refrigerated storage with shelflife of 28 days.

Keywords: Betalains. Ascorbic acid. Phenolic compounds. Acceptance. Functional.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAIS E MÉTODOS

Figura 1 – Beterraba (<i>Beta vulgaris L. cv Early wonder</i>)	20
Figura 2 – Fórmula Geral da Betalaínas. (A) porção de ácido betalâmico presente em todas as moléculas de betalaínas. (B) dependendo dos resíduos R1 e R2, a estrutura irá representar um betacianina ou uma betaxantina	22
Figura 3 – Estrutura das principais betalaínas de beterraba. (A) betacianinas também conhecidas como betaninas (com unidade de açúcar) e betanidina sem açúcar e (B) betaxantinas.....	23
Figura 4 – Partes da Laranja.....	25
Figura 5 – Estrutura do ácido ascórbico e seus isômeros.....	26
Figura 6 – Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico.....	27
Figura 7 – Benefícios à saúde com o consumo de probióticos	31
Figura 8 – Fluxograma de análises, Parte 1 da tese	42
Figura 9 – Fluxograma de análises, Parte 2 da tese	43
Figura 10 – Envase das amostras para armazenamento refrigerado (4°C)	45
Figura 11 – Apresentação das amostras no Teste de Aceitação Sensorial	51

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Figura 1 – Conteúdo de Ácido Ascórbico (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias.....	76
Figura 2 – Diferença Total na Cor (ΔE^*ab) de sucos armazenados a 4°C durante 30 dias	83

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Figura 1 – Conteúdo de Ácido Ascórbico (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 28 dias.....	101
Figura 2 – Diferença Total na Cor (ΔE^*ab) de sucos armazenados a 4 °C por 28 Dias.....	107

LISTA DE TABELAS

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA E MATERIAIS E MÉTODOS

Tabela 1 – Principais constituintes da beterraba crua em 100 g de porção comestível	21
Tabela 2 – Composição química do suco de laranja, concentrado congelado, sem adoçante, não diluído	25
Tabela 3 – Bactérias lácticas mais utilizadas em preparações probióticas.....	33
Tabela 4 – Alguns estudos de culturas probióticas em sucos e bebidas à base de frutas e/ou hortaliças	37
Tabela 5 – Codificação das amostras analisadas	46

ARTIGO CIENTÍFICO 1

Tabela 1 – Acidez e pH de sucos armazenados a 4 °C durante 30 dias	74
Tabela 2 – Conteúdo de Betacianinas (vermelho-violeta) (mg/100mL) em sucos armazenados a 4 °C durante 30 dias	78
Tabela 3 – Conteúdo de Betaxantinas (amarelo) (mg/100mL) em sucos armazenados a 4 °C durante 30 dias	78
Tabela 4 – Compostos Fenólicos Totais (µg EAG/mL) em sucos armazenados a 4 °C/30 dias	79
Tabela 5 – Atividade Antioxidante de DPPH Trolox (µg/mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias	81
Tabela 6 – Atividade Antioxidante de ABTS Trolox (µg/mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias	81
Tabela 7 – Parâmetros de cor de sucos armazenados a 4°C durante 30 dias.....	82
Tabela 8 – Aceitação de atributos de sucos	85

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Tabela 1 – Acidez, pH e sólidos solúveis (°Brix) de sucos mistos de beterraba e laranja probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias.....	99
Tabela 2 – Conteúdo de Betacianinas (mg/100mL) e Betaxantinas (mg/100mL) em sucos mistos probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias	103
Tabela 3 – Teor de Compostos Fenólicos Totais (µg EAG/mL), Atividade Antioxidante de DPPH Trolox (µg/mL) e ABTS Trolox (µg/mL) em sucos mistos probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias.....	105
Tabela 4 – Parâmetros de cor de sucos mistos probióticos armazenados a 4 °C durante 28 dias.....	106
Tabela 5 – Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (log UFC/200 mL) de sucos mistos probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias	108
Tabela 6 – Aceitação de atributos e intenção de compra de sucos mistos de beterraba e laranja com <i>Lactobacillus acidophilus</i>	111

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura
WHO	World Health Organization
EUA	Estados Unidos da América
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
MAPA	Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento
ABECITRUS	Associação Brasileira Exportadores de Cítricos
CLAE	Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
pH	Potencial Hidrogeniônico
NaOH	Hidróxido de sódio
SST	Sólidos Solúveis Totais
EAG	Equivalentes de Ácido Gálico
DPPH	2,2-difenil-1-picrilhidrazil
ABTS	2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolina-6-ácido sulfônico)
UFC	Unidades Formadoras de Colônia
MRS	ágar deMan, Rogosa e Sharpe
UV-VIS	Ultravioleta-Visível
PVDF	Fluoreto Polivinidileno
PUFA	Ácidos Graxos Polinsaturados

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO GERAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DA LITERATURA	20
3.1	BETERRABA	20
3.1.1	Betalainas	21
3.2	SUCO DE LARANJA	24
3.2.1	Ácido Ascórbico	26
3.3	ALIMENTOS FUNCIONAIS	29
3.4	PROBIÓTICOS.....	30
3.4.1	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	34
3.5	PRODUTOS VEGETAIS COM PROBIÓTICOS	35
3.6	ANÁLISE SENSORIAL DE BEBIDAS DE ORIGEM VEGETAL PROBIÓTICAS	39
4	MATERIAL E MÉTODOS	42
4.1	MATERIAL	43
4.2	MÉTODOS.....	44
4.3	DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA	51
5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
6	RESULTADOS E DISCUSSÃO	65
6.1	ARTIGO CIENTÍFICO 1	65
6.2	ARTIGO CIENTÍFICO 2	90
7	CONCLUSÕES	119
	APÊNDICES	120

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NA FORMA DE CONVITE PARA PARTICIPANTES DA SESSÃO DE TESTE DE ACEITAÇÃO	121
APÊNDICE B - FICHA DE RECRUTAMENTO	123
APÊNDICE C - FICHA DE TESTE DE ACEITAÇÃO E FICHA DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA.....	124
APÊNDICE D - FICHA DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA	125
ANEXOS	126
ANEXO A - APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA	127

1 INTRODUÇÃO

A preocupação com a saúde se evidencia a cada dia no comportamento do ser humano. A busca pela qualidade de vida se estende aos cuidados com a alimentação, caracterizada por uma crescente demanda por produtos saudáveis e com características nutricionais e sensoriais próximas dos alimentos *in natura* (WANSINK, 2004; CARMO et al., 2014).

O mercado brasileiro de sucos prontos para beber está em franca expansão, acompanhando a tendência mundial de ingestão de bebidas saudáveis, saborosas e de fácil consumo. Sucos de frutas e/ou hortaliças prontos para o consumo são considerados bebidas refrescantes, capazes de saciar a sede, contêm quantidades significativas de vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes que contribuem para uma dieta saudável e ao mesmo tempo respondem ao apelo por produtos naturais, o que contribui para sua grande aceitação (FERRAREZI, 2008; FERREIRA; ALCÂNTARA, 2013).

Na indústria brasileira destaca-se a produção do suco de laranja, devido ao seu sabor conhecido e ampla aceitabilidade, e de algumas frutas tropicais. Por outro lado, há alguns sucos de vegetais amplamente conhecidos, como é o caso da beterraba, que apesar de possuir grande quantidade de compostos de interesse alimentar como fibras, vitaminas, betalaínas e sais minerais, possuem uma preferência limitada devido ao sabor relativamente fraco, porém com grande potencial, devido à sua grande disponibilidade e custo baixo.

O suco de laranja é uma fonte muito importante de ácido ascórbico, um nutriente que além da ação vitamínica, é valioso pelo seu efeito antioxidante e estimulante do sistema imunológico além de outros benefícios à saúde (CORTÉS et al., 2005).

A beterraba é uma fonte de matéria-prima para coquetéis de frutas e hortaliças devido à sua cor vermelha intensa, seus nutrientes e fibras. As betalaínas, bem como os flavonoides, são pigmentos encontrados exclusivamente em plantas, e se assemelham na aparência das cores e comportamento, às antocianinas. Estes pigmentos, além de fornecerem cor à beterraba, são importantes substâncias antioxidantes na alimentação humana (KANEER; HAREL; GRANIT, 2001).

Sucos de frutas e vegetais são ingredientes promissores para serem utilizados na produção de alimentos funcionais, pois contêm vitaminas, proteínas,

carboidratos e frequentemente fibras alimentares. Sua vantagem adicional é a ocorrência de pigmentos naturais vegetais, tais como carotenóides, clorofilas, antocianinas e betalaínas que neutralizam os radicais livres responsáveis pelos processos de degradação de estruturas celulares e alterações das moléculas de DNA dos organismos dos consumidores (STINTZING; CARLE, 2004).

Alimentos funcionais são definidos como alimentos que em adição à função nutricional básica, suprem o organismo com componentes que contribuem para redução do risco de desenvolver doenças (GERMAN et al., 1999, PRADO et al., 2008, SHAH, 2007, URALA; LAATEENMAKI, 2007). Os alimentos funcionais, além de compreenderem àqueles que contêm naturalmente compostos bioativos, também são representados pelos alimentos denominados probióticos, prebióticos e simbióticos (LEROY; DE VUYST, 2004; KNORR, 1998).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001). O reconhecimento dos alimentos contendo probióticos como alimentos funcionais que provêem benefícios, além da nutrição básica inerente e as emergentes evidências para seu potencial na prevenção de doenças têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos (PATRIGNANI et al., 2006; PHILLIPS; KAILASAPATHY; TRAN, 2006).

De acordo com Rivera-Espinoza; Gallardo-Navarro (2010) os probióticos são tradicionalmente adicionados em iogurtes e outros produtos lácteos fermentados. No entanto, há um aumento da procura de produtos probióticos não lácteos pelos consumidores vegetarianos, intolerantes à lactose ou alérgicos à proteína do leite, além de outros fatores (RAY; SIVAKUMAR, 2009). Este fato levou ao desenvolvimento de produtos probióticos a partir de matrizes de alimentos diversos, incluindo frutas (PRADO et al., 2008) e produtos hortícolas (YOON; WOODAMS; HANG, 2006).

A utilização de microrganismos com propriedades funcionais nos alimentos pode contribuir com a segurança alimentar, pela produção de metabólitos como as bacteriocinas e produção de ácidos como o lático, que reduz o pH do trato intestinal desfavorecendo o crescimento de patógenos (LEROY; DE VUYST, 2004).

As bactérias probióticas mais pesquisadas são as do grupo das bactérias lácticas e seus gêneros incluem o *Lactobacillus*, o *Lactococcus*, o *Streptococcus*, alguns *Enterococcus* e também são representadas pelo gênero

Bifidobacterium (SALMINEN; VON WRIGHT, 1993; FERNÁNDEZ; BORIS; BARBÉS, 2003).

Os *Lactobacillus* têm sido consumidos desde o início do uso dos leites fermentados como alimentos. As espécies probióticas, como os *Lactobacillus acidophilus* são utilizadas seguramente há muitas décadas (SALMINEN; WRIGHT; MORELLI, 1998). Esta espécie tem sido considerada predominante no trato intestinal de seres humanos saudáveis e, portanto, o microrganismo mais comumente utilizado em produtos probióticos (ARIHARA; OTA; ITOH, 1998).

Atualmente os produtos lácteos dominam o mercado brasileiro de alimentos funcionais probióticos, ainda que pesquisas científicas tenham enfatizado o potencial de bebidas não lácteas como veículo para alimentos probióticos. Pesquisadores buscam o desenvolvimento de sucos de frutas/hortaliças probióticos por serem importantes componentes de uma alimentação saudável, pela facilidade de consumo e conservação. Porém, poucas pesquisas são encontradas cujo tema são bebidas mistas de frutas e hortalças, sendo a maioria em sucos de frutas, bebidas à base de soja ou chás.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver suco misto de beterraba e laranja com e sem probiótico pela adição de *Lactobacillus acidophilus*, sensorialmente apreciado, com estabilidade físico-química, capacidade antioxidante e viabilidade da cultura probiótica durante armazenamento refrigerado.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Elaborar um suco misto de beterraba e laranja, tendo como principais respostas a aceitação e a atividade antioxidante do suco misto;
- Determinar a estabilidade físico-química do suco misto desenvolvido em armazenamento refrigerado (4°C) ao longo de 30 dias.
- Desenvolver suco misto de beterraba e laranja probiótico, por meio da adição do microrganismo *Lactobacillus acidophilus*, em duas formulações.
- Determinar a estabilidade físico-química, potencial antioxidante e viabilidade do microrganismo nos sucos mistos probióticos desenvolvido em armazenamento refrigerado (4°C) ao longo de 28 dias.
- Medir a aceitação e a intenção de compra dos sucos mistos com e sem a adição do probiótico.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 BETERRABA

A beterraba (*Beta vulgaris* L.) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, com diversos biótipos, sendo três deles de significativa importância econômica. Estes biótipos são: a beterraba açucareira, forrageira e hortícola. Na beterraba açucareira, as raízes possuem altos teores de sacarose, sendo utilizadas para a extração do açúcar. Na beterraba forrageira, as raízes e folhas são empregadas na alimentação animal. E por sua vez, a beterraba hortícola, também conhecida como beterraba vermelha ou beterraba de mesa, é o biótipo cultivado no Brasil. Tanto as raízes como as folhas são utilizadas na alimentação humana (TIVELLI et al., 2011).

A beterraba é uma hortaliça da família Chenopodiceae, na qual a principal parte comestível é sua raiz tuberosa. Existem poucas cultivares plantadas no Brasil, sendo a cultivar *Early Wonder* (beterraba vermelha ou “de mesa”) a principal, como ilustrado na Figura 1 (VITTI et al., 2003; HERNANDES et al., 2007).

Figura 1 - Beterraba (*Beta vulgaris* L. cv *Early wonder*)



Fonte: Google imagens

A raiz tuberosa da beterraba de cor vermelho-arroxeadada, devido à presença de betalaínas, é fonte de vitaminas do complexo B e de minerais como sódio, potássio, e magnésio, como apresentado na Tabela 1 (HERNANDES et al., 2007).

Tabela 1 – Principais constituintes da beterraba crua em 100 g de porção comestível

Composição química	Valor por 100 g
Água (%)	88
Calorias (Kcal)	49
Proteínas (g)	1,9
Lipídios (g)	0,1
Carboidratos (g)	11,1
Fibra Alimentar (g)	3,4
Cinzas (g)	0,9
Cálcio, Ca (mg)	18
Magnésio, Mg (mg)	24
Manganês, Mn (mg)	1,23
Fósforo, P (mg)	19
Ferro, Fe (mg)	0,3
Sódio, Na (mg)	10
Potássio, K (mg)	375
Cobre, Cu (mg)	0,08
Zinco, Zn (mg)	0,5
Tiamina (mg)	0,04

Fonte: Tabela Brasileira de Composição de Alimentos – TACO, 2011.

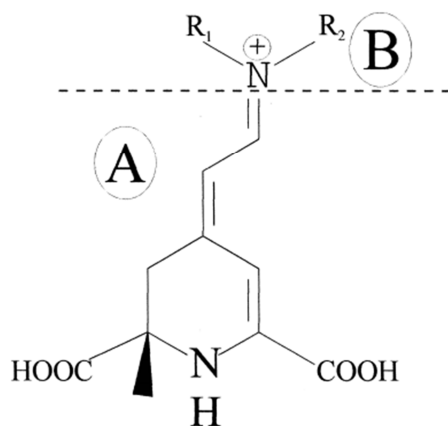
Segundo VINSON et al. (1998) e ZITNANOVA et al. (2006) a beterraba é uma das hortaliças com maior potencial antioxidante. A atividade antioxidante da beterraba está associada aos seus compostos fenólicos e suas betalaínas, com participação na eliminação de radicais livres e, conseqüentemente, na prevenção de doenças como câncer e doenças cardiovasculares (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

3.1.1 Betalaínas

A coloração da beterraba é devida à presença das betalaínas, pigmentos hidrossolúveis contendo nitrogênio, que incluem as betacianinas, responsáveis pela coloração vermelho-violeta e as betaxantinas, de coloração amarela.

As betalaínas são compostos N-heterocíclicos solúveis em água, localizados nos vacúolos das células e seu precursor comum é o ácido betalâmico, ou seja, quimicamente, as betalaínas são definidas por uma estrutura que engloba todos os componentes que apresentam uma fórmula geral demonstrada na Figura 2 (CAI; SUN; CORKE, 2005; SCHOEFS, 2004; DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000). A estrutura geral das betalaínas contém o ácido betalâmico acompanhado de um radical R_1 ou R_2 . Estes radicais são uma representação geral para os possíveis substituintes desse ponto da estrutura, que podem ser de um simples hidrogênio a um complexo substituinte (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; STINTZING; CARLE, 2004).

Figura 2 - Fórmula Geral da Betalaínas. (A) porção de ácido betalâmico presente em todas as moléculas de betalaínas. (B) dependendo dos resíduos R_1 e R_2 , a estrutura irá representar um betacianina ou uma betaxantina.



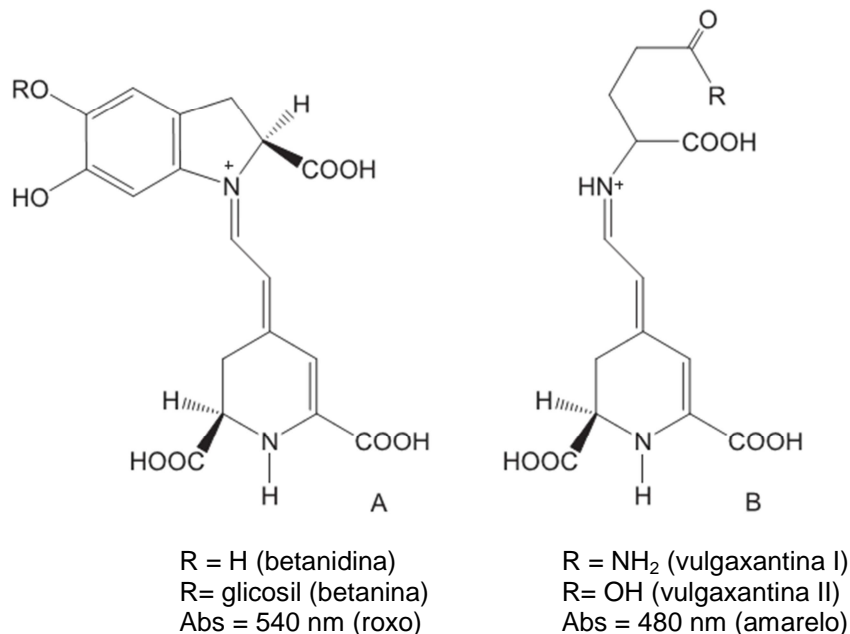
Fonte: Adaptado de DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000.

A variação desses grupos ocorre em função das diferentes fontes desses pigmentos e determinam sua tonalidade cromática e estabilidade. Desta forma, como mostra a Figura 3, as betalaínas podem ser divididas em dois grupos estruturais: as betacianinas (vermelho ao vermelho violeta) e as betaxantinas (amarelo).

As betacianinas podem ser classificadas por sua estrutura química em quatro tipos: betanina, amarantina, gonferina e bougainvilina. São descritos aproximadamente 50 tipos de betacianinas (pigmentos vermelhos) e 20 tipos de betaxantinas (pigmentos amarelos). As beterrabas contêm ambos os pigmentos,

cerca de 75-95% de betacianina (betanina) e aproximadamente 95% de betaxantina (vulgaxantina I) (CAI; SUN; CORKE, 2005).

Figura 3 - Estrutura das principais betalainas de beterraba. (A) betacianinas também conhecidas como betaninas (com unidade de açúcar) e betanidina sem açúcar e (B) betaxantinas



Fonte: Adaptado BONACIN et al., 2009.

Dentre suas propriedades funcionais, as betalainas são identificadas como um antioxidante natural (NETZEL et al., 2005; STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003; TESORIERE et al., 2004).

Em estudo investigando a relação estrutura-atividade de várias betaxantinas e betacianinas com sua atividade sobre radicais livres, observou-se uma relação com a estrutura das betalainas. Desta forma, estudos mostraram a beterraba como um dos dez mais potentes antioxidantes. Este potencial antioxidante foi atribuído a características estruturais das betalainas. Stintzing; Carle (2004) observaram que nas betaxantinas, o aumento no número de resíduos hidroxí e imino promoveu a eliminação de radicais livres e nas betacianinas, a glicosilação reduziu a atividade, enquanto a acilação aumentou o potencial antioxidante.

Ainda, as betaninas (em forma de extratos da beterraba) demonstram atuar também na prevenção de alguns tipos de câncer, dentre eles os cânceres de pele e fígado, devido suas propriedades antioxidantes (LILA, 2004).

Assim como muitos outros pigmentos naturais, betalaínas são muito sensíveis ao calor, à luz e à oxidação, especialmente a que é causada por atividade da peroxidase (POX), que é uma das principais causas de descoloração do pigmento. POX envolve um grupo de enzimas que desempenham um papel crucial na eliminação de radicais livres dentro de sistemas de plantas, estando também envolvido no desenvolvimento de vários processos metabólicos (REGALADO; GARCIA-ALMENDÁREZ; DUARTE-VÁZQUEZ, 2004).

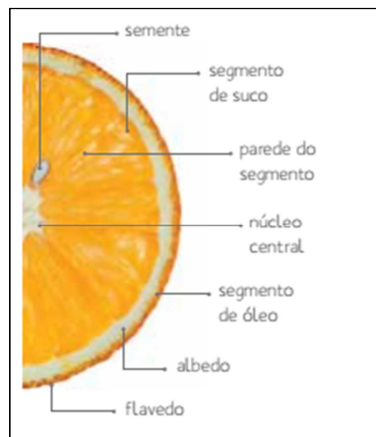
Salgado (1997) observou que a adição de antioxidante, como o ácido ascórbico, melhora a estabilidade dos pigmentos de betalaínas em beterrabas, sendo que a concentração de 400 mg.L^{-1} foi a melhor para preservar a cor do produto. O ácido cítrico teve semelhante efeito protetor quando comparado com o ácido ascórbico adicionado à beterraba. A combinação dos ácidos não resultou em efeito maior do que quando utilizados isoladamente (ATTOE; ELBE, 1985).

3.2 SUCO DE LARANJA

A laranja é um dos dez produtos agropecuários mais produzidos no país, sendo o Brasil o maior produtor mundial desde a década de 1990. Somente no ano de 2010 a produção superou 19 milhões de toneladas, sendo que cerca de 80% desta produção se destina para a obtenção de sucos industrializados. Somente as exportações de suco de laranja do mesmo ano somaram US\$ 1,775 bilhão, aumento próximo de 50% comparado com as exportações do ano de 2003, evidenciando que o mercado continua em crescimento (FAO, 2012; MAPA 2013, VALOR ECONÔMICO, 2011).

Dados da ABECITRUS (2009) mostram que o Brasil detém 30% da produção mundial de laranja e 59% da produção de suco, sendo o Estado de São Paulo e a Flórida nos EUA os maiores detentores da oferta mundial, um caso raríssimo tratando-se de commodities agrícolas.

As partes que compõem a laranja são: o flavedo, parte externa e colorida da casca; o albedo, porção interna esbranquiçada e esponjosa da laranja; gomos revestidos por uma membrana e preenchidos por pequenas vesículas de suco e sementes (TRIBESS, 2003), como ilustrado na Figura 4.

Figura 4 – Partes da Laranja

Fonte: CITRUS BR, 2014.

A laranja possui um baixo teor calórico, cerca de 60 calorias por 100 gramas de produto, é fonte de β -caroteno, folato, tiamina e potássio além de uma excelente fonte de vitamina C (TRIBESS, 2003). A composição química do suco de laranja concentrado congelado está apresentada na Tabela 2.

Tabela 2 – Composição química do suco de laranja, concentrado congelado, sem adoçante, não diluído

Composição química	Valor por 100 g
Água (g)	57,85
Calorias (Kcal)	159
Proteínas (g)	2,39
Lipídios (g)	0,21
Carboidratos, por diferença (g)	38,17
Fibra alimentar (g)	0,8
Cálcio, Ca (mg)	32
Magnésio, Mg (mg)	34
Fósforo, P (mg)	57
Potássio, K (mg)	674
Vitamina C (ácido ascórbico total) (mg)	137,9
Tiamina (mg)	0,28
β -caroteno (μ g)	62
Folato (total) (μ g)	155

Fonte: Tabela de Composição Química dos Alimentos – TABNUT, 2014.

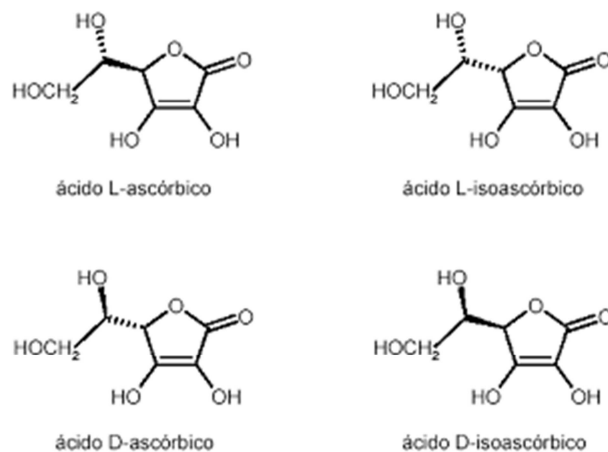
3.2.1 Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico é um composto hidrossolúvel que corresponde a uma forma oxidada da glicose, $C_6 H_8 O_6$ (176,13 g/mol), sendo uma alfacetolactona de seis átomos de carbono, formando um anel lactona com cinco membros e um grupo enadiol bifuncional com um grupo carbonilo adjacente. (VANNUCCHI; ROCHA, 2012).

Vitamina C é o nome dado ao conjunto de compostos (isômeros, formas sintéticas e produtos de oxidação) que apresentam atividade biológica semelhante à do ácido L-ascórbico (2,3-enediol-L-ácido glicônico-γlactona) (SPINOLA et al., 2013).

Na Figura 5 está ilustrada a estrutura do ácido ascórbico (ácido L-ascórbico - LAA) e de seus isômeros. Entre estes, apenas o ácido D-isoascórbico (DIAA) apresenta atividade semelhante ao L-ascórbico em relação à ação antioxidante e 5% como atividade de vitamina C (CORDENUNSI et al., 2002; HERRERO; IBANEZ; CIFUENTES, 2005).

Figura 5 - Estrutura do ácido ascórbico e seus isômeros



Fonte: Adaptado de BOYCE, 1999

A importância nutricional dessa vitamina hidrossolúvel está estabelecida há muito tempo: devido ao papel do ácido ascórbico como cofator na hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno, sabe-se que sua deficiência causa escorbuto, enfermidade caracterizada por sangramento da gengiva,

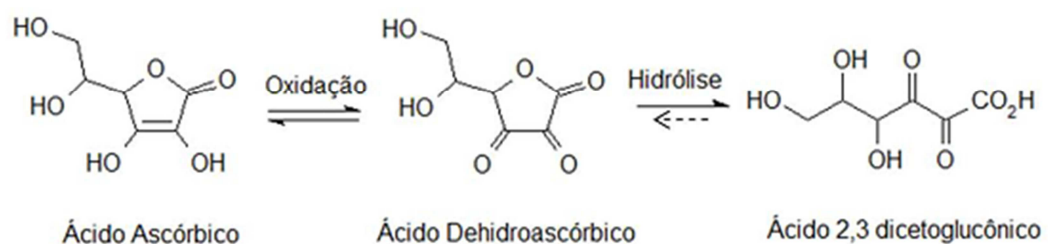
dificuldade na cicatrização de feridas, fadiga e anemia, e que pode ser fatal (PHILLIPS et al., 2010). O ácido ascórbico é um cofator em diversos processos fisiológicos, incluindo a síntese de norepinefrina e de hormônios adrenais, a ativação de hormônios peptídicos e a síntese de carnitina.

O ácido ascórbico age ainda como antioxidante, além de facilitar a absorção intestinal de ferro e a manutenção do íon ferroso no plasma sanguíneo (TARRAGO-TRANI; PHILLIPS; COTTY, 2012).

Sua ação antioxidante está relacionada com o aprisionamento de peróxidos tóxicos e com a estabilização de radicais livres, protegendo lipídios, proteínas e outros biocomponentes do dano oxidativo (ZINELLU et al., 2004). Quando o ferro está presente em grande quantidade, o ácido ascórbico pode atuar como um pró-oxidante (ALMARES-ABARCA et al., 2007). O mecanismo de oxidação do ácido ascórbico está demonstrado na Figura 6.

A primeira degradação produz o ácido dehidroascórbico (DHAA), que possui 80% da bioatividade do LAA (LIAO et al., 2001). Essa reação pode ser revertida apenas por compostos de elevado potencial redutor, como o ditioneitol (DTT). O DHAA pode ainda ser hidrolisado ou oxidado para o ácido 2,3-dicetoglucônico, que não tem qualquer atividade vitamínica C (GIBBONS et al., 2001).

Figura 6 - Mecanismo de oxidação do ácido ascórbico



Fonte: Adaptado de OLIVEIRA, 2010.

Em virtude da sua incapacidade de sintetizar ácido ascórbico, o ser humano depende inteiramente da ingestão deste micronutriente. No Brasil, de acordo com a legislação pertinente, a ingestão diária recomendada (IDR) é de 60 mg para adultos (BRASIL, 1998).

As principais fontes de ácido ascórbico são as frutas e hortaliças, particularmente as frutas cítricas e os vegetais folhosos (PHILLIPS et al., 2010). Entretanto, o ácido ascórbico é considerado a vitamina mais sujeita à degradação por exposição ao calor, além de sofrer alterações aceleradas pela presença de oxigênio e pelo pH do meio, entre outras condições. Assim, o ácido ascórbico está sujeito a perdas significativas ao longo do armazenamento ou do processamento, sendo oxidado (química ou enzimaticamente) a ácido deidroascórbico, que apresenta atividade vitamínica, mas que é ainda menos estável e sofre oxidação a ácido dicetogulônico, que se degrada em diferentes produtos, como: ácido oxálico, ácido xilônico e xilose (OLIVEIRA, 2010).

Sabe-se que diversos fatores afetam a estabilidade do ácido ascórbico durante o armazenamento, incluindo o pH do meio, a presença de oxigênio e de íons metálicos, e a temperatura (TARRAGO-TRANI; PHILLIPS; COTTY, 2012; SPINOLA et al., 2013).

A metodologia padrão da AOAC (Association of Official Analytical Chemists) para determinação de ácido ascórbico em sucos consiste no método titulométrico envolvendo o 2,6-diclorofenol-indofenol (DCFI), conhecido como Reagente de Tillmans (AOAC Official Method 967.26) (HORWITZ, 2005). Esse método, no entanto, apresenta ponto de viragem de difícil visualização em amostras coloridas e várias substâncias presentes em alimentos, como por exemplo, íons de ferro e cobre, pigmentos, taninos e outros dificultam sua aplicação para diversos sucos de frutas e produtos de hortaliças (ARYA; MAHAJAN; JAIN, 2000).

Nesse sentido, o método padrão para quantificar a vitamina C é a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE), pois se trata de uma técnica mais sensível e específica que os métodos espectrofotométricos e não necessita de derivatização (NOVÁKOVÁ; SOLICH; SOLICHOVÁ, 2008). Os principais detectores utilizados para quantificação desta vitamina são os detectores ultravioleta (UV) e eletroquímico (EC). A dosagem de vitamina C também pode ser realizada utilizando detectores de fluorescência ou, ainda, por espectrometria de massa, porém estes métodos não são muito difundidos devido ao alto custo da análise (BAIERLE et al., 2012).

3.3 ALIMENTOS FUNCIONAIS

É cada vez maior a preocupação da população humana em evitar ou diminuir o consumo de alimentos que possam ser prejudiciais à saúde, da mesma forma que tem procurado aumentar o consumo de alimentos que contribuam para a melhoria da qualidade de vida. Esse comportamento é resultante do conhecimento da importância da relação dieta com a saúde, despertando o interesse por informações sobre alimentos, substâncias e suplementos alimentares que possam trazer consequências benéficas à saúde (PACHECO; SGARBIERI, 1999; PRATES; MATEUS, 2002; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005; FRANCO, 2006).

Paralelamente às novas filosofias alimentares, o estudo de substâncias de origem alimentar (sejam elas fitoquímicos, zooquímicos ou micro-organismos vivos) com propriedades bioativas, faz com que essas substâncias possam estar naturalmente presentes em alguns alimentos ou serem intencionalmente adicionadas. Alimentos funcionais são aqueles que contêm tais substâncias (SAAD et al., 2011).

A alegação de propriedade funcional é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 2008).

Os alimentos funcionais, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produzem efeitos metabólicos benéficos à saúde, devendo ser seguros para o consumo sem supervisão médica. Esses alimentos possuem potencial para promover a saúde por meio de mecanismos não previstos pela nutrição convencional, devendo ser salientado que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura de doenças (SANDERS, 1998). Alimento funcional é um alimento e não um fármaco, e, portanto não atua no tratamento de patologias (ROBERFROID, 2002).

A legislação brasileira, diferentemente da legislação de outros países, proíbe que referência à prevenção ou tratamento de doenças pelo consumo de alimentos com propriedades funcionais sejam alegadas nos rótulos de alimentos, visto que muitos fatores estão envolvidos nestes processos (HOLANDA et al., 2008).

O interesse pelos alimentos funcionais é crescente e tem atraído a atenção dos consumidores, da indústria de alimentos e pesquisadores. O mercado

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

Os principais ingredientes ou substâncias bioativas responsáveis pela funcionalidade dos alimentos podem ser classificados quanto à natureza química e molecular em: isoprenóides (carotenóides, saponinas, tocoferóis, tocotrienos e terpenos simples); compostos fenólicos (cumarinas, taninos, lignina, antocianinas, isoflavonas, flavonóides); proteínas, aminoácidos e afins (isotiocianatos, folato, 6 colina, compostos alil sulfurados); carboidratos e derivados (ácido ascórbico, polissacarídeos não amiláceos); prebióticos (inulina, frutooligossacarídeos, ácidos graxos e lipídeos (PUFA, ômega-3, esfingolipídeos, lecitina); minerais (Ca, Se, K, Cu, Zn) e microbiológicos (probióticos) (PRATES; MATEUS, 2002; PADILHA; PINHEIRO, 2004; PIMENTEL; FRANCKI; GOLLUCKE, 2005; FRANCO, 2006).

Dentre os alimentos mais pesquisados contendo ingredientes ou substâncias bioativas destacam-se a aveia (β -glucanas, psyllium), o alho (alicina), o tomate (licopeno), a soja (isoflavonas, proteína), a linhaça (ômega-3, ligninas), as frutas cítricas (flavonóides, linonóides), o vinho tinto e uva (flavonóides, fenóis, resveratrol), o peixe e óleo de peixe (ômega-3), os prebióticos (inulina, frutooligossacarídeos) e os probióticos (*Bifidobactérias*, *Lactobacillus*) (PACHECO; SGARBIERI, 1999; JONES, 2002; RODRÍGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003; FRANCO, 2006).

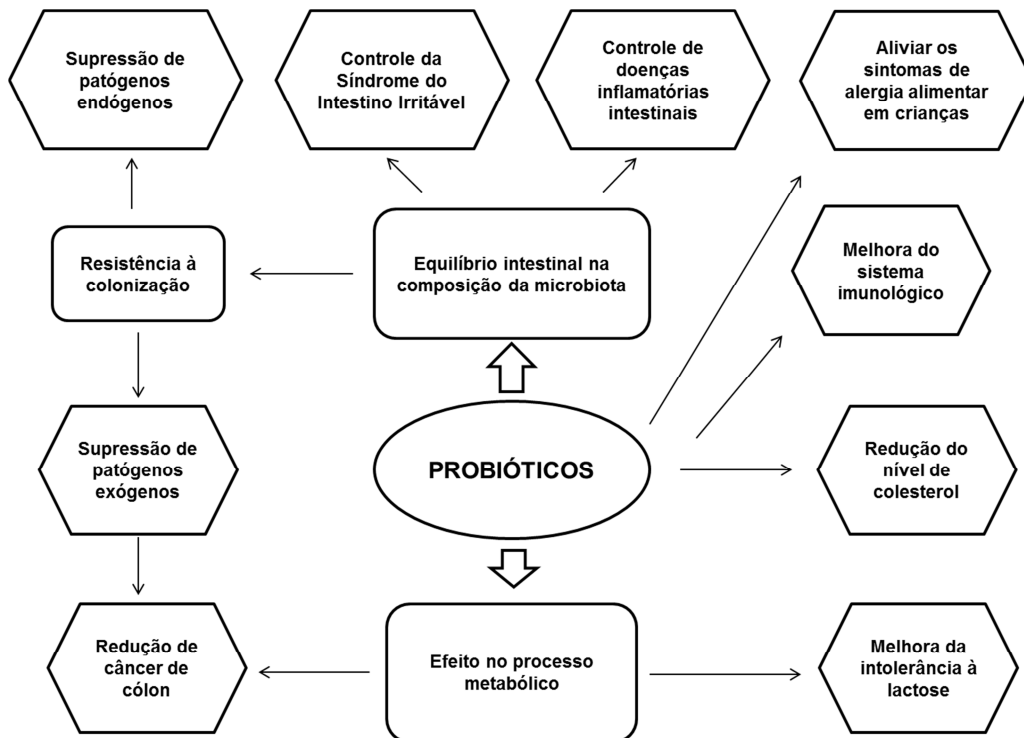
3.4 PROBIÓTICOS

Diversas definições de probióticos já foram publicadas, no entanto, a aceita internacionalmente, segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, é que eles são microrganismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003).

Consumo de células probióticas através de produtos alimentares é a abordagem mais popular no momento. A maioria dos produtos alimentares probióticos é categorizada como alimentos funcionais, e representam uma parte significativa do mesmo (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Probióticos proporcionam uma série de benefícios para a saúde, principalmente, por meio da manutenção da microbiota intestinal normal, proteção contra patógenos gastrointestinais (D'AIMMO; MODESTO; BIAVATI, 2007; LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001), a melhoria do sistema imunológico (GILLILAND, 1990), redução do nível de colesterol e pressão arterial (RASIC, 2003), a atividade anticancerígena (RASIC, 2003), melhor utilização de nutrientes e maior valor nutricional dos alimentos (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001) (Figura 7). Aplicações terapêuticas de probióticos incluem prevenção da diarreia infantil, doenças urinogenital, osteoporose, alergia alimentar e doenças atópicas; redução da diarreia induzida por anticorpos; alívio da constipação e hipercolesterolemia, o controle de doenças inflamatórias do intestino, e proteção contra câncer de cólon e bexiga (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; MATTILA-SANDHOLM et al, 2002; SALMINEN, 1996; VENTURI et al, 1999).

Figura 7 - Benefícios à saúde com o consumo de probióticos



Fonte: Adaptado de TRIPATHI; GIRI, 2014; PARVEZ et al., 2006.

Segundo Komatsu; Buriti; Saad (2008), quando se deseja garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente, entretanto não existe na literatura um consenso sobre a quantidade mínima de microrganismos probióticos a ser ingerida para garantir sua funcionalidade. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal, capazes de garantir a manutenção de concentrações ativas fisiologicamente (quantidade intestinal de 10^6 a 10^7 UFC/g) *in vivo*, foram observadas com porções de 100 g de produto alimentício contendo 10^8 a 10^9 unidades formadoras de colônias (UFC) de microrganismos probióticos (10^6 a 10^7 UFC/g de bioproduto) (SHAH, 2007).

Embora uma grande variedade de espécies e gêneros de microrganismos são considerados como probióticos potenciais (HOLZAPFEL et al., 1998; SHAH; RAVULA, 2004), predominantemente são utilizados comercialmente em alimentos probióticos bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (Tabela 3). Isso porque estes dois gêneros têm uma longa história de uso seguro e são considerados como GRAS (*Generally Recognized As Safe*) usado pelo FDA (*Food and Drug Administration*), órgão sanitário vigente dos Estados Unidos. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* também são habitantes dominantes no intestino humano (*Lactobacillus* no intestino delgado e *Bifidobacterium* no intestino grosso).

No entanto, as espécies pertencentes ao gênero *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium*, leveduras *Saccharomyces* (e.g. *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) e fungos filamentosos (e.g. *Aspergillus oryzae*) são também utilizados como probióticos devido aos seus efeitos de promoção da saúde (RIVERA-ESPINOSA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; VINDEROLA; REINHEIMER, 2003).

Tabela 3 - Bactérias lácticas mais utilizadas em preparações probióticas

Bactéria Probiótica	Espécie
<i>Lactobacillus</i> sp.	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> , <i>L. delbrueckii</i> ssp., <i>L. cellobiosus</i> , <i>L. curvatus</i> , <i>L. fermentum</i> , <i>L. lactis</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. reuteri</i> , <i>L. brevis</i>
<i>Bifidobacterium</i> sp.	<i>B. bifidum</i> , <i>B. adolescentis</i> , <i>B. animalis</i> , <i>B. infantis</i> , <i>B. thermophilum</i> , <i>B. longum</i>
<i>Enterococcus</i> sp.	<i>Ent. faecalis</i> , <i>Ent. faecium</i>
<i>Streptococcus</i> sp	<i>S. cremoris</i> , <i>S. salivarius</i> , <i>S. diacetylactis</i> , <i>S. intermedius</i>

Fonte: Adaptado de TRIPATHI; GIRI, 2014

A recomendação brasileira mais recente para alimentos probióticos da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) é com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos para efeitos funcionais, sendo o mínimo estipulado de 10^8 a 10^9 UFC/dia, e são reconhecidos como probióticos as seguintes bactérias *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

A seleção de cepas probióticas adequadas em dose adequada é o primeiro requisito para o desenvolvimento de um produto alimentício probiótico. A viabilidade do microrganismo durante processamento e armazenamento, sobrevivência durante o trânsito intestinal, e os benefícios em potencial à saúde do consumidor são os principais critérios para a seleção de cepas adequadas de espécies de bactérias probióticas (TALWALKAR; KAILASAPATHY, 2004; VENTURA; PEROZZI, 2011).

A sobrevivência das bactérias frente a diferentes fatores prejudiciais durante o processamento e desenvolvimento de produtos varia de acordo com a espécie e cepa específica (TAMIME et al., 2005). Em termos de robustez dos organismos probióticos, os lactobacilos são geralmente mais fortes do que bifidobactérias (MÄTTÖ et al., 2006; ROSS et al., 2005).

Encontrado naturalmente em alimentos tradicionais fermentados, lactobacilos são mais resistentes ao baixo pH e tem adaptação aos lácteos e outros substratos alimentares. Um grande número de espécies de *Lactobacillus* probióticos são tecnologicamente adequadas para aplicações em alimentos em comparação com Bifidobacterias (LEE; SALMINEN, 2009).

3.4.1 *Lactobacillus acidophilus*

O *Lactobacillus acidophilus* é um bastonete gram-positivo, caracterizado pela morfologia não esporulada, ocorre de forma isolada, aos pares ou em cadeias curtas, sem flagelos, homofermentativos (com o ácido láctico na configuração DL), são tolerantes ao sal e microaerófilos (tendo seu crescimento favorecido em anaerobiose ou em pressão reduzida de oxigênio) com temperatura ótima de crescimento de 35°C a 40°C, podendo desenvolver-se até 45°C (GOMES; MALCATA, 1999). O pH ótimo de crescimento é de 5,5 a 6,0 e tolera acidez na faixa de 0,3% a 1,9%. É resistente à acidez gástrica e aos sais biliares, com taxa de sobrevivência no trato gastrointestinal (TGI) estimada entre 2% e 5%. A capacidade de aderência ao intestino é variável (GUEDES NETO et al., 2002; TOMELIN; PEPLAU, 2005).

O emprego de *Lactobacillus acidophilus* em produtos fermentados comerciais está amplamente difundido, podendo ser utilizado isoladamente ou em associação com outros microrganismos. Esta utilização está associada às propriedades terapêuticas, dentre as quais se destacam a reposição de microbiota intestinal, desejável após uso prolongado de antibióticos. Habitantes naturais do intestino grosso secretam ácido láctico diminuindo o pH intestinal e inibindo o desenvolvimento de patógenos invasivos como *Salmonella spp.* e *Escherichia coli*. Agem pela competição por sítios de ligação no intestino e por nutrientes com as bactérias patogênicas, reduzindo assim o tempo de pós-infecção (SAAD, 2006; ITSARANUWAT; AL-HADDAD; ROBINSON, 2003).

Os benefícios para saúde e nutricionais dos *Lactobacillus acidophilus* e do *Lactobacillus casei* incluem a redução dos sintomas da intolerância à lactose (LEROY; DE VUYST, 2004; VINDEROLA et al., 2000; NIGHSWONGER; BRASHEARS; GILLILAND, 1996), inibição de microrganismos patogênicos e vírus,

produção de vitaminas, redução dos níveis de colesterol, efeitos inibitórios sobre tumores (NIGHSWONGER; BRASHEARS; GILLILAND, 1996), modulação da resposta imunológica, estabilização de uma barreira na mucosa intestinal e controle de desordens intestinais (VINDEROLA et al. 2000).

Os *Lactobacillus* têm sido consumidos desde o início do uso dos leites fermentados como alimentos. Os autores Salminen; Wright; Morelli (1998), no final da década de 90, já relatam que as espécies probióticas, como os *Lactobacillus acidophilus* eram utilizadas seguramente há muitos anos.

3.5 PRODUTOS VEGETAIS COM PROBIÓTICOS

Produtos lácteos fermentados geralmente oferecem boas matrizes portadoras de microrganismos probióticos. No entanto, outras matrizes alimentares, também têm sido estudadas como transportadores potenciais para estes microrganismos. O número crescente de indivíduos com intolerância à lactose, dislipidemia e vegetarianismo reforçam a importância do desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos.

As frutas e hortaliças são alimentos que apresentam em sua constituição quantidades significativas de vitaminas, minerais, fibras e compostos antioxidantes que contribuem para uma dieta saudável (PERES et al., 2012; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Entretanto, o volume de perdas desses produtos no Brasil provocados por danos mecânicos, manuseio inadequado, ferimentos, rachaduras e abrasões é significativo. Acredita-se que a redução de perdas e desperdícios de frutas e hortaliças seria possível mediante o estímulo ao processamento do alimento (MARTINS et al. 2013).

Uma alternativa para redução de desperdícios são bebidas à base de frutas e hortaliças, cuja facilidade de consumo e de conservação, além de permitir o consumo de frutas e hortaliças que normalmente não seriam consumidas *in natura*, agregam valor aos produtos e atendem ao perfil do consumidor moderno que tem exigido qualidade, praticidade e segurança (SAAD et al., 2011).

Sucos e bebidas a base de frutas e hortaliças podem ser um veículo alternativo para a incorporação de probióticos, porque eles são ricos em nutrientes, não contêm microrganismos fermentadores que competem por nutrientes com probióticos, são frequentemente suplementadas com ingredientes para remoção de

oxigênio, tais como ácido ascórbico, promovendo assim condições anaeróbicas e contêm quantidades elevadas de açúcares que podem incentivar o crescimento/viabilidade de probióticos. (DING; SHAH, 2008).

Atualmente pesquisas demonstram que produtos contendo bactérias probióticas ocupam grande espaço entre os alimentos funcionais, sendo utilizados não só em produtos lácteos como iogurtes, queijos, sorvetes, manteiga (SOCCOL et al., 2010), sobremesas, flans (ESPÍRITO-SANTO et al., 2011), mas também em produtos não lácteos à base de cereais, fórmulas para alimentação infantil, produtos derivados de soja (SINGH et al., 2011), produtos a base de frutas e hortaliças como bebidas, purês, hortaliças fermentadas, azeitonas de mesa (PERES, et al., 2012), produtos minimamente processados (ROßLE et al., 2010; MARTINS et al., 2013; OLIVEIRA et al., 2011), entre outros, que apresentam mercado em contínua expansão mundial, em virtude de sua demanda voltada aos benefícios potenciais à saúde (CHAMPAGNE et al., 2011).

A sobrevivência de probióticos vem sendo estudada em diversos sucos e bebidas a base de frutas e hortaliças como apresentado na Tabela 4, sendo que a viabilidade desses microrganismos difere dependendo da matriz (fruta e/ou hortaliça), e é também dependente da estirpe. Mesmo que lácteos ainda seja a base preferida para adição de probióticos, há uma tendência de usar frutas e hortaliças, incluindo exóticas como ingrediente (SANTO et al., 2011).

Tabela 4 – Alguns estudos de culturas probióticas em sucos e bebidas à base de frutas e/ou hortaliças

Suco e/ou bebida	Microrganismo Probiótico	Referência
Cajú	<i>Lactobacillus johnsonii</i>	Vergara et al., 2010
Laranja, grapefruit, groselha preta, abacaxi, romã, cranberry e limão.	<i>Lactobacillus plantarum</i>	Nualkaekul; Charalampopoulos, 2011
Romã	<i>L. plantarum, Lactobacillus delbrueckii</i>	Mousavi et al., 2011
Pera	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Ankolekar et al., 2012
Ameixa	<i>Lactobacillus kefiranofaciens, Candida kefir e Saccharomyces boluradii</i>	Sheela; Suganya, 2012
Maçã	<i>Lactobacillus casei</i>	Ellendersen et al., 2012 Pimentel et al., 2015
	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Pimentel; Madrona; Prudencio, 2015.
Tomate	<i>Lactobacillus acidophilus LA39, Lactobacillus casei A4, Lactobacillus delbrueckii D7 e Lactobacillus plantarum C3</i>	Yoon; Woodams; Hang, 2004.
Beterraba	<i>L. acidophilus LA39, L. casei A4, L. delbrueckii D7 e L. plantarum C3</i>	Yoon; Woodams; Hang, 2005
Repolho	<i>L. casei A4, L. delbrueckii D7 e L. plantarum C3</i>	Yoon; Woodams; Hang, 2006
Laranja, Abacaxi e Cranberry	<i>L. casei DN 114 001, Lactobacillus rhamnosus GG, Lactobacillus paracasei NFBC 43338, e Bifidobacterium lactis Bb-12</i>	Sheehan; Ross; Fitzgerald, 2007
Melão	<i>L. casei NRRL B-442</i>	Fonteles et al., 2011
Melão	<i>L. casei NCIMB 4114</i>	Saw et al., 2011
Cajú	<i>L. casei NRRL B 442</i>	Pereira; Maciel; Rodrigues, 2011
Pêssego	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Pimentel; Prudencio; Rodrigues, 2011

Fonte: o próprio autor e MARTINS et al. (2013).

Yoon; Woodams; Hang (2005) avaliaram a viabilidade de produção de suco de beterraba esterilizado e fermentado, utilizando as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum*. Como resultado, foi verificado que *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram mais eficientes na redução do pH do suco (para valores inferiores a 4,5, a partir de valor inicial de 6,3) durante a

fermentação. Entretanto, *L. plantarum* revelou-se mais resistente à estocagem em temperatura de 4°C durante quatro semanas (10^6 - 10^8 UFC/mL de produto).

Para um suco ou bebida de fruta manter suas características peculiares que o definem como tal, o primeiro desafio é minimizar a metabolização de componentes da bebida, por parte dos microrganismos. Isso implica em minimizar ou, até mesmo impedir a multiplicação dos microrganismos no produto, sem entretanto, inviabilizá-lo (SAAD et al., 2011).

De acordo com Saad et al. (2011) o segundo desafio no desenvolvimento de bebidas vegetais probióticas é fazer com que o microrganismo mantenha a viabilidade e funcionalidade durante a vida de prateleira do produto e, principalmente, no organismo humano. Em parte, esta preocupação é porque a adição de probióticos em sucos de vegetais é mais complexa do que a formulação de produtos lácteos, devido ao baixo pH dos sucos e quantidades insuficientes de alguns dos pequenos peptídeos e aminoácidos livres necessários para probióticos (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008). Provavelmente, este seja o fator que mais limite o desenvolvimento de bebidas derivadas de frutas com características probióticas (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005). Assim, algumas características intrínsecas ao suco de frutas e/ou hortaliças, à sua formulação, ao seu processamento e à resposta dos microrganismos a essas características intrínsecas necessitam ser consideradas (SAAD et al., 2011). Ainda assim, Prado et al. (2008) relataram que as bebidas, como sucos de frutas e vegetais podem ser a próxima categoria de matrizes de alimentos para servir como portadores de bactérias probióticas desde que apoiado por estudos publicados.

Shah et al. (2010) estudaram a sobrevivência de bactérias probióticas num modelo de sistema de suco de fruta, com adição de cepas diferentes de bactérias probióticas: *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Bifidobacterium lactis* HN001 e *Lactobacillus paracasei* LPC 37 e concluíram que mesmo em sucos de frutas com vida útil relativamente curta, alguns ingredientes como extrato de chá verde, vitamina C, e extrato de semente de uva, que contêm altos níveis de antioxidantes pela propriedade de remoção de oxigênio, podem promover um ambiente mais favorável para as bactérias probióticas e pode ser útil no desenvolvimento de um alimento funcional a base de suco de frutas.

O efeito da suplementação com cultura probiótica (*L. paracasei* ssp. *paracasei*) e/ou oligofrutose (prebiótico substituto ao açúcar) em suco de maçã

clarificado foi analisado por Pimentel et al. (2015), com relação às características físico-químicas, à viabilidade do probiótico e aceitabilidade da bebida durante o armazenamento refrigerado (4°C/28 dias) em diferentes embalagens (plástico ou vidro). Os resultados demonstraram que a oligofrutose pode ser usada como um prebiótico protetor das culturas probióticas e que as embalagens de vidro foram mais eficientes na manutenção da viabilidade das culturas probióticas, visto que as formulações estudadas em embalagens de vidro apresentaram maiores contagens ($p < 0,05$) do que as formulações em embalagens de plástico.

3.6 ANÁLISE SENSORIAL DE BEBIDAS DE ORIGEM VEGETAL PROBIÓTICAS

A qualidade de um produto de consumo compreende três aspectos fundamentais: físico-químico (nutricional), sensorial e microbiológico. Com certeza o aspecto sensorial é o mais intimamente relacionado à qualidade percebida pelo consumidor e, conseqüentemente, à escolha do produto. Dessa maneira, as características de qualidade sensorial, tais como aparência, aroma, sabor e textura, precisam ser monitoradas em diversos momentos: na percepção e escolha dessa qualidade, por meio de estudos do consumidor; no desenvolvimento ou processamento do produto, por estudos da influência dos ingredientes e da tecnologia do processamento; na padronização e no controle de qualidade de rotina; na estabilidade da qualidade sensorial durante o armazenamento; e no momento da avaliação do nível de qualidade do produto por testes de mercado (DUTCOSKY, 2013).

Há um interesse genuíno no desenvolvimento de suco de frutas como base de bebidas funcionais com probióticos, porque eles têm perfis de sabor, que são atraentes para todas as faixas etárias e porque eles são percebidos como alimentos saudáveis e refrescantes (TUORILA; CARDELLO, 2002; YOON; WOODAMS; HANG, 2004; SHEEHAN; ROSS; FITZGERALD, 2007). No entanto, as bactérias lácticas contribuem para o aroma e sabor dos produtos fermentados, onde o processo de fermentação com estas bactérias, além de modificarem a composição do alimento, proporcionam novas características sensoriais como gosto ácido, modificações na textura, tanto pela biomassa celular, como pela produção de polissacarídeos e também produção de compostos aromáticos que alteram o perfil de sabor e aroma do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004).

Segundo Luckow; Delahunty (2004) o desenvolvimento de “off-flavour” em produtos não lácteos é mais pronunciado do que naqueles contendo leite e/ou seus derivados.

Ainda de acordo com Luckow et al. (2006), seriam basicamente três as maneiras de reduzir o impacto negativo do “off-flavour” na aceitação, por parte dos consumidores de sucos e bebidas probióticas:

1) mascarar o sabor indesejável, por exemplo, pela adição à bebida de sucos de frutas tropicais que possuam um sabor marcante;

2) fazer com que o consumidor passe a consumir o produto com frequência, pois haveria uma familiarização ao sabor, em um primeiro momento indesejável;

3) o consumidor fazer a associação da mudança no sabor da bebida probiótica, comparativamente à original, com os benefícios à saúde que o consumo de tal produto traria.

Porém, para alguns autores, como Tuorila; Cardello (2002), a não alteração na aceitabilidade dos produtos com a adição de probióticos e/ou prebióticos é extremamente 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 conta os benefícios para a saúde.

Estudos que avaliaram a incorporação de culturas probióticas em sucos de frutas e/ou néctares têm sido contraditórios, com alguns indicando que não houve mudança na aceitação dos produtos (BEVILACQUA et al., 2013; PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011, PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2015) e outros relatando uma perda de aceitação, devido à presença de um sabor desagradável (LUCKOW; DELAHUNTY, 2004; SAEED; ZAHID; SATTAR, 2013). As diferenças encontradas podem estar relacionadas com o tipo de suco de fruta, à cultura probiótica utilizada e o método de adição ou fermentação dos microrganismos nos sucos de frutas e ou/hortaliças.

O estudo de impacto sensorial por Luckow e Delahunty (2004) mostrou que os consumidores preferem as características sensoriais do suco de laranja convencional comparado aos seus homólogos funcionais (suco contendo probióticos), isso porque o desenvolvimento de “off-flavour” em produtos não lácteos é mais pronunciado do que naqueles contendo leite e/ou seus derivados.

Já no trabalho de Pimentel; Prudencio; Rodrigues (2011) a adição de *L. paracasei ssp. paracasei* não influenciou a aceitabilidade (aparência, aroma, sabor, textura e global) e a intenção de compra de néctares de pêsego, visto que os provadores indicaram que gostaram moderadamente dos néctares de pêsego preparados (valores entre 7 e 8 em escala hedônica de nove pontos) e que provavelmente comprariam os produtos (valores próximos de 4 de intenção de compra em escala de 5 pontos).

Em sucos clarificados de maçã também adicionados de *L. paracasei ssp. paracasei*, a presença de sacarose, oligofrutose ou cultura probiótica não interferiu na aceitabilidade (cor, aroma, sabor e global) e na intenção de compra, assim como o tipo de embalagem; indicando que, embora a adição da cultura probiótica tenha promovido um aumento na turbidez dos sucos de maçã e 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, conforme verificado por Pimentel et al. (2015).

4 MATERIAL E MÉTODOS

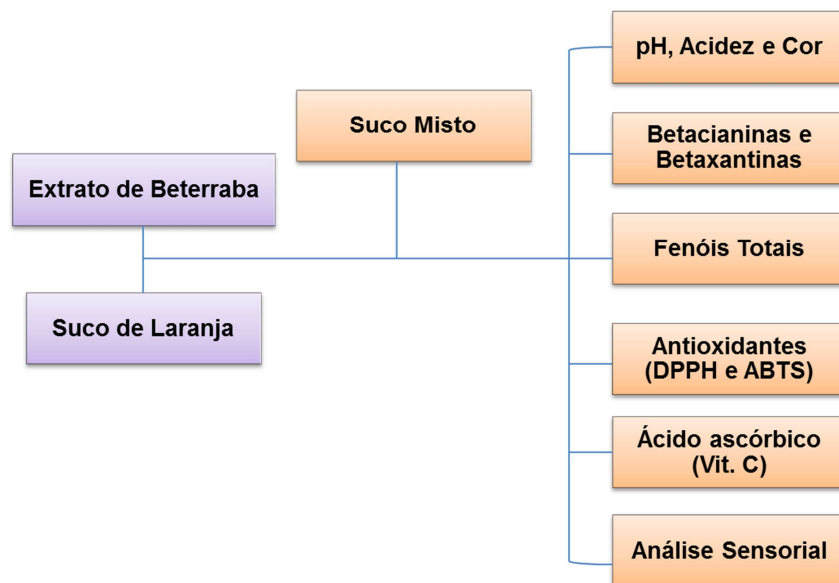
Os experimentos foram realizados nos Laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina.

A tese constou de duas partes, conforme segue:

Parte 1 – Suco misto de beterraba e laranja: Conteúdo de betalaínas, ácido ascórbico e atividade antioxidante durante o armazenamento refrigerado e aceitação

Para este estudo, o extrato de beterraba, o suco de laranja e as formulações de sucos mistos sob refrigeração (4°C) por 30 dias foram analisados conforme a Figura 8:

Figura 8 – Fluxograma de análises, Parte 1 da tese.

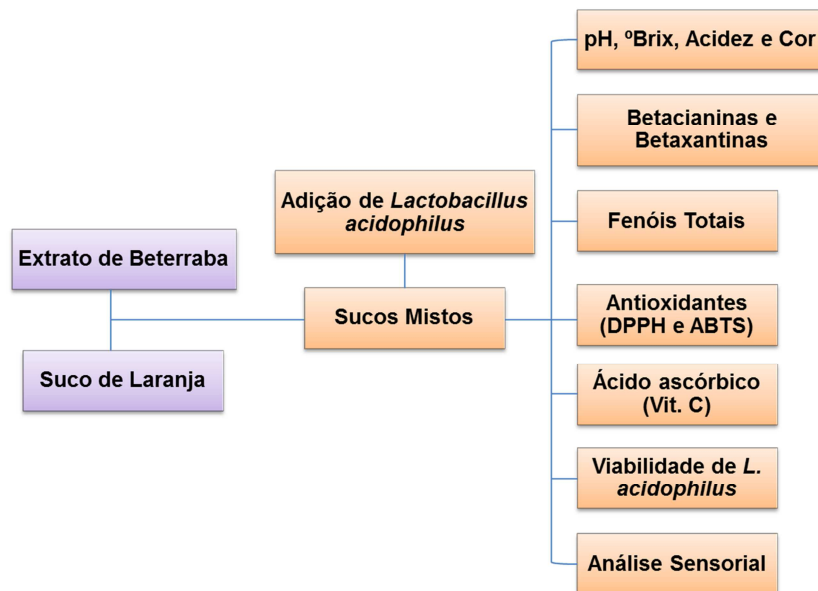


Fonte: o próprio autor.

Parte 2 – Suco Misto de beterraba e laranja adicionado de *Lactobacillus acidophilus*: Conteúdo de betalainas, atividade antioxidante e viabilidade do microrganismo durante o armazenamento refrigerado e aceitação sensorial

Para este estudo, as formulações selecionadas de suco misto em duas proporções diferentes beterraba:laranja, a partir do estudo da parte 1, foram adicionados do probiótico *Lactobacillus acidophilus* para estudo durante o armazenamento refrigerado (4°C) por 28 dias de armazenamento conforme a Figura 9.

Figura 9 – Fluxograma de análises, Parte 2 da tese.



Fonte: o próprio autor.

4.1 MATERIAL

4.1.1 Matérias-primas

Foram utilizadas no experimento beterrabas (*Beta vulgaris L.*) cv. Early Wonder frescas obtidas na CEASA (Central de Abastecimento do Paraná S.A.) na cidade de Londrina, suco de laranja concentrado congelado (Lanjal, Brasil) e cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (Christian Hansen, Dinamarca). Foram utilizadas embalagens de vidro com tampa de rosca (Farma, Brasil) de 50mL.

4.1.2 Reagentes e Padrões

O padrão de ácido ascórbico foi adquirido da Sigma (Alemanha). Acetonitrila (grau HPLC) foi adquirida da Fischer Scientific (EUA), ácido metafosfórico Vetel (Brasil), ácido sulfúrico Quimica Moderna, Brasil, ABTS (2,2'-azino-bis-(3-etilbenzotiazolína-6-ácido sulfônico) Sigma- Aldrich (EUA), Trolox (6-hidroxi-2,5,7,8-tetrametilchroman-2-ácido carboxílico) foram obtidos da Aldrich (Alemanha). Etanol foi obtido da Anidrol (Brasil). O reagente Folin Ciocalteau foi comprado da Merck (Alemanha) e o carbonato de sódio foi obtido da Nuclear (Brasil). A água empregada para o preparo das amostras e solventes foi obtida por sistema de purificação Milli-Q (Millipore, França).

4.2 MÉTODOS

4.2.1 Extração do Suco de Beterraba

As beterrabas frescas foram lavadas com água potável, sanitizadas por 30 minutos em água clorada (150 mg/L de hipoclorito de sódio Dinâmica, Brasil), enxaguadas com água potável e descascadas manualmente. Em seguida o suco puro foi obtido por meio de centrífuga doméstica (Mondial, Brasil).

4.2.2 Preparo do Suco de Laranja

O suco concentrado de laranja (66°Brix) foi diluído com água esterilizada na proporção de 1:6 (v/v), conforme recomendação do fabricante, até o valor de sólidos solúveis próximo de 12°Brix.

4.2.3 Preparo dos Sucos Mistos

A partir do extrato puro de beterraba e suco diluído de laranja foram preparados os sucos mistos em duas proporções, 1:1 e 1:2 (v/v), respectivamente.

4.2.4 Adição de Probiótico no Suco Misto

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* liofilizada e de uso direto, foi dissolvida assepticamente aos sucos mistos de beterraba e laranja na proporção de 0,2% (p/v) após a pasteurização realizada conforme item 4.2.5.

4.2.5 Pasteurização e Armazenamento dos Sucos

Através de avaliações microbiológicas (coliformes totais, coliformes termotolerantes e bolores e leveduras) a pasteurização das amostras em banho-maria MA 127 (Marconi, Brasil) foi estabelecida no binômio tempo-temperatura de 70 °C/30 minutos.

Após o tratamento térmico, efetuou-se o envase dos sucos em frascos de vidro transparentes estéreis de 50 mL, com exceção dos sucos mistos probióticos em que o envase foi realizado após a adição da cultura probiótica, conforme ilustrado na Figura 10.

Figura 10 – Envase das amostras para armazenamento refrigerado (4°C)



Fonte: o próprio autor.

O estudo do efeito do armazenamento refrigerado (4°C) foi realizado nas amostras, com a codificação conforme Tabela 5:

Tabela 5 – Codificação das amostras analisadas

	Amostra	Código
Parte 1	Suco de beterraba puro não pasteurizado	SB
	Suco de beterraba puro pasteurizado	SBP
	Suco de laranja diluído pasteurizado	SLP
	Suco Misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado	SMBL 1:1
	Suco Misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado	SMBL 1:2
Parte 2	Suco Misto probiótico de beterraba e laranja 1:1 (v/v)	SMPBL 1:1
	Suco Misto probiótico de beterraba e laranja 1:2 (v/v)	SMPBL 1:2

Fonte: o próprio autor.

As análises, em cada repetição do experimento, foram realizadas em triplicata nos tempos: 0, 5, 10, 15, e 30 dias de armazenamento para SB, SBP, SLP, SMBL 1:1 e SMBL 1:2 e nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias para SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2.

4.2.6 Avaliações Físico-químicas

A determinação de pH das amostras foi realizada em potenciômetro digital (Tecnal, Brasil) previamente calibrado com tampões fosfato (Synth, Brasil) pH 4,0 e 7,0. A acidez foi medida por meio de titulação com solução de NaOH (Anidrol, Brasil) 0,01 mol/L até pH 8,2 e expressa em ácido cítrico, conforme AOAC (1997). Os sólidos solúveis totais (SST) foram medidos em refratômetro digital PAL-1 Pocket (Atago, China), com resolução de 0,1 °Brix a 25°C.

Para análise de cor foi utilizado colorímetro Konica Minolta CR 400, conforme descrito por Antunes et al. (2013). As especificações empregadas foram: área de leitura 11 mm, iluminante CIE D 65, iluminação em ângulo de 45°, ângulo de observação de 0° e observador padrão CIE 10°. As amostras foram acondicionadas em cubeta de vidro (acessório CR – A103) apropriada para leitura colorimétrica de líquidos do aparelho, onde foram fornecidos por leitura direta, os parâmetros L* (luminosidade), a* (verde - vermelho), b* (azul - amarelo) e Cromo

(saturação da cor). A partir dos parâmetros L^* , a^* e b^* foi calculada a diferença total de cor (ΔE^*_{ab}) entre cada amostra em um determinado tempo e a amostra no tempo zero de armazenamento, da seguinte forma: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ e a tonalidade cromática (h°), calculada como: $h^\circ = \arctan (b^*/a^*)$, sendo que, $0^\circ =$ vermelho puro, $90^\circ =$ amarelo puro, $180^\circ =$ verde puro e $270^\circ =$ azul puro.

4.2.6.1 Determinação de Betalaínas

Para extração das betalaínas, alíquotas de 1 mL de amostra foi dissolvida em 30 mL de água destilada por agitação manual durante 10 segundos e a mistura foi centrifugada (25°C) por $6000 \times g$ durante 20 minutos (Eppendorf centrifuge 5804R, Alemanha).

Os teores de betaxantinas e betacianinas nos sobrenadantes de cada amostra foram analisados espectrofotometricamente, por meio de leitura de absorvância a 476 nm, 538 nm em espectrofotômetro de UV-Vis (Biochrom Libra S22, Inglaterra) respectivamente, além da leitura a 600 nm para correção de possíveis impurezas (turbidez), de acordo com os métodos de Stintzing; Schieber; Carle (2003), com algumas modificações. O conteúdo de cada betalaína (BC), expresso em mg/mL de suco, foi calculado a partir da equação = $[(A \times FD \times PM \times 100) / (\epsilon \times l)]$, em que A é a diferença entre a absorção máxima (476 ou 538 nm) e a absorção de correção em 600 nm, FD o fator de diluição e l o comprimento da trajetória na cubeta (1 cm). Para a quantificação da betacianinas e betaxantinas, as massas moleculares (MM) e absorvidade molar (ϵ) são $MM = 550$ g/mol, $\epsilon = 60.000$ L/mol cm em H_2O e $MM = 308$ g/mol, $\epsilon = 48.000$ L/mol cm em H_2O , respectivamente.

4.2.6.2 Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de polifenóis totais foi determinado utilizando o método de Folin Ciocalteu, conforme descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999). Uma alíquota (0,2 mL) de cada amostra foi adicionada a 1,5 mL de solução aquosa de Folin Ciocalteu (1:10 v/v). A mistura foi deixada em equilíbrio por 5 minutos e, em seguida, misturada com 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio 60 g/L. Após, foi feita incubação à temperatura ambiente durante 90 min e a

absorvância da mistura foi lida a 725 nm em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando o respectivo solvente como o branco. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico (μg EAG/100 mL).

4.2.6.3. Atividade Antioxidante Avaliada pelo Sequestro do Radical Livre DPPH

A capacidade antioxidante total foi avaliada pelo método DPPH conforme Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com algumas modificações. Neste método, a capacidade antioxidante foi medida pela capacidade da amostra em doar íons hidrogênio ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) relativamente estável. Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,5, 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução etanólica de DPPH $250 \mu\text{mol.L}^{-1}$ e 50 μL de cada amostra. Os tubos de ensaio contendo as misturas foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e, posteriormente, a absorvância das soluções lidas a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A quantificação da atividade antioxidante das amostras foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em μmol de Trolox por mililitros de amostra, ou μmol de Trolox/mL.

4.2.6.4 Atividade Sequestradora do Cátion Radical ABTS+

A atividade antioxidante também foi analisada pela capacidade da amostra de eliminar os radicais livres ABTS empregando-se a metodologia modificada relatada por Ozgen et al. (2006). Quando combinado com um oxidante (persulfato de potássio 2,45 mM), o ABTS (7 mM em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4) reage para criar uma solução radical estável, azul escuro esverdeada após 12-16 horas de incubação no escuro. A solução foi então diluída até uma absorvância de $0,7 \pm 0,01$ em 730 nm, para formar o reagente teste. As misturas reacionais contendo 10 μL de amostra e 4 mL de reagente teste foram incubadas em temperatura ambiente por 6 min. A atividade antioxidante foi calculada em relação a uma curva padrão de Trolox e expressa em μmol de Trolox por mililitros de amostra, ou μmol de Trolox/mL.

4.2.6.5 Determinação de Ácido Ascórbico por CLAE

O teor de ácido ascórbico foi determinado adaptando-se as condições sugeridas por Souza et al. (2004). As amostras de suco e bebidas mista foram preparadas pela dissolução das mesmas em ácido metafosfórico 3% (m/v) e filtradas em membrana hidrofílica de PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro (Millex-GV, Millipore, USA). O sistema cromatográfico (Shimadzu, Japão) consistiu de duas bombas (modelo LC-10AD), válvula injetora Rheodyne com alça de amostragem de 20 µL, forno para coluna (modelo CTO-20A), detector espectrofotométrico UV/visível (modelo SPD-10A), interface (modelo CBM-101), e o programa CLASS-CR10, versão 1.2 (Shimadzu, Japão). Foi empregada uma coluna Spherisorb ODS1 (4,6 x 250mm, 5µm) (Waters, Irlanda). A análise foi realizada em temperatura ambiente, eluição isocrática (0,5 mL/min) com solução de ácido sulfúrico pH 2,5 como fase móvel. A detecção do ácido ascórbico foi feita a 254 nm, a identificação baseando-se nos tempos de retenção e co-eluição com padrões e a quantificação, por padronização externa usando curva de calibração com seis pontos (medida em duplicada) na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL.

4.2.7 Avaliações Microbiológicas

Para garantir a segurança microbiológica das amostras para análise sensorial, foram realizadas análises de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores, leveduras e *Salmomella* sp., conforme SILVA; JUNQUEIRA; SILVEIRA (2007).

A análise da viabilidade do *L. acidophilus* na bebida mista probiótica durante armazenamento refrigerado (4°C) foi realizada através da retirada de alíquotas de 1 mL das amostras, diluídas em 9 mL água peptonada 0,1% (p/v) (Difco™, França) esterilizada e agitadas com agitador (Labdancer, IKA, Alemanha). O plaqueamento foi realizado em profundidade com ágar MRS (Neogen Corporation, EUA) e a incubação anaeróbica (Anaerobac, Probac, Brasil) a 37°C por 72 hrs.

4.2.7 Avaliação Sensorial

Para realização da análise sensorial foram empregados julgadores não treinados, consumidores habituais de suco de frutas, sendo sua potencialidade de consumo do produto determinada conforme ficha em Apêndice B.

No presente trabalho a avaliação sensorial ocorreu em dois momentos, sendo no primeiro (Parte 1), realizado o teste de aceitação nas formulações do suco misto de beterraba e laranja sem a cultura probiótica e no suco de beterraba pasteurizado, sendo as amostras apresentadas uma por vez ao provador.

Os testes de aceitação de atributos (cor, aroma, sabor e impressão global) foram conduzidos com escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente), de acordo com a ficha no Apêndice C.

Já no segundo momento (Parte 2) do experimento as duas preparações de suco misto de beterraba e laranja, conforme item 4.2.4, foram analisados sensorialmente por meio de um teste de aceitação nas mesmas condições da Parte 1 como citado anteriormente. E ainda, para os sucos mistos probióticos, junto ao teste de aceitação foi aplicado o teste de intenção de compra no qual se utilizou uma escala de 5 pontos com variações de “definitivamente não - compraria” a “definitivamente compraria”, conforme ficha no Apêndice D.

Os testes foram conduzidos em laboratório de Análise Sensorial sob luz branca em cabines individuais em uma única sessão. Os julgadores receberam as amostras, aproximadamente 30 mL, servidas a temperatura de 6 a 8°C em taças de acrílico codificadas com números de três dígitos ao acaso, e em ordem aleatória (STONE; SIDEL, 1993), juntamente com água filtrada em temperatura ambiente e biscoitos cream cracker para a limpeza da boca antes e entre as avaliações, conforme ilustrado na Figura 11.

Figura 11 – Apresentação das amostras no Teste de Aceitação Sensorial



Fonte: o próprio autor.

O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, parecer CEP/UEL 342/2011, nº CAAE 0319.0.268.000-11, cujo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) está em Anexo A.

4.3 DELINEAMENTO EXPERIMENTAL E ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os experimentos (Parte 1 e 2) seguiram delineamento experimental inteiramente casualizado repetidos três vezes. Para o estudo durante o armazenamento refrigerado utilizou-se o esquema de tratamentos em parcelas subdivididas, onde o tratamento principal foram os sucos e o secundário, o tempo de armazenamento. Na análise sensorial foi realizado o delineamento de blocos completos casualizados, onde os tratamentos foram os sucos e os blocos os julgadores.

Os dados submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de médias Tukey ($p < 0.05$). Os resultados foram processados pelo Excel (Microsoft Office 2007) e Statistical Analysis System versão 9.1.3. (SAS, 2009).

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABECITRUS, Associação Brasileira de Exportadores de Cítricos. **Exportação de Laranja**. Disponível em: <http://www.abecitrus.com.br>. Acesso em: 05/08/2010.

ALMARES-ABARCA, N.; CAMPOS, M.G.; ÁVILA-REYES, J.A.; NAJARO-JIMÉNEZ, N.; CORRAL, J.H.; GONZÁLE-VALDEZ, L.S. Antioxidant activity of polyphenolic extract of monofloral honeybee-collected pollen from mesquite (*Prosopis juliflora*, Leguminosae). **Journal of Food Composition and Analysis**, v.20, n. 2, p.119-124, 2007.

ANKOLEKAR, C.; PINTO, M.; GREENE, D.; SHETTY, K. In vitro bioassay based screening of antihyperglycemia and antihypertensive activities of *Lactobacillus acidophilus* fermented pear juice. **Innovative Food Science; Emerging Technologies**, v. 13, p. 221–230, 2012.

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

ARIHARA, K.; OTA, H.; ITOH, M. et al. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 63, p. 544-547, 1998.

ARYA, S. P.; MAHAJAN, M.; JAIN, P. Non-Spectrophotometric Methods for the Determination of Vitamin C. **Analytica Chimica Acta**. v. 417, n. 1, p. 1-14, 2000.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International**, v. 16, n.2, 1997.

ATTOE, E.L.; ELBE, J.H.V., Oxygen involvement betanine degradation: effect of antioxidants. **Journal of Food Science**, v.50, p.106, 1985.

BAIERLE, M.; de BAIROS, A.; MOREIRA, A. P.; BULCÃO, R., ROEHRS, M.; FREITAS, F.; DURGANTE, J.; BRUCKER, N.; CHARÃO, M.; GARCIA, S. C.; Quantificação Sérica de Vitamina C por CLAE-UV e Estudo de Estabilidade. **Química Nova**, v. 35, n. 2, p. 403-407, 2012.

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 - M1771, 2013.

BONACIN, J. A.; ENGELMANN F. M.; SEVERINO, D.; TOMA H. E.; BAPTISTA, M. S. Singlet Oxygen Quantum Yields ($\Phi\Delta$) in Water using Beetroot Extract and an Array of LEDs. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. v. 20 n.1, p. 31-36, 2009.

BOYCE, M.C. Simultaneous determination of antioxidants, preservatives and sweeteners permitted as additives in food by mixed micellar electrokinetic chromatography. **Journal of Chromatography A**. v.847, n.1-2, p. 369-375, 1999.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft; Technologie**, v. 28, n.1, p. 25–30, 1995.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. **IX Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizada em julho/2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecnologia_lista_alega.htm. Acesso em: 10/12/2014.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portaria nº 33 de 13 de janeiro de 1998. Adota valores como níveis de IDR para as vitaminas, minerais e proteínas. **Diário Oficial da República Federativa do Brasil**, Poder Executivo, Brasília, DF, 1998.

CAI, Y.Z.; SUN, M.; CORKE, H. Characterization and application of betalain pigments from plants of the Amaranthaceae. **Trends Food Science Technology**, v.16, n.9, p.370-376, 2005.

CARMO, M. C. L. et al., Caracterização do mercado consumidor de sucos prontos para o consumo, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 4, p. 305-309, 2014.

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

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

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

CITRUS BR, A indústria brasileira de suco de laranja. **Catálogo Citrus BR**. Disponível em: http://www.citrusbr.com/imagens/biblioteca/CITRUS_APEX_PORTUGUES.pdf. Acesso em: 10/12/2014.

CORDENUNSI, B. R.; NASCIMENTO, J. R. O.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Influence of Cultivar on Quality Parameters and Chemical Composition of Strawberry Fruits Grown in Brazil. **Journal of Agricultural Food Chemistry**. v.50, n. 9, p. 2581-2586, 2002.

CORTÉS, C.; ESTEVE, J.M.; FRÍGOLA, A.; TORREGROSA F. Changes in carotenoids including geometrical isomers and ascorbic acid content in orange-carrot juice during frozen storage. **European Food Research and Technology** v.221, p. 125-131, 2005.

D'AIMMO, M. R., MODESTO, M.,; BIAVATI, B. Antibiotic resistance of lactic acid bacteria and Bifidobacterium spp. Isolated from dairy and pharmaceutical products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 115, n. 1, p. 35–42, 2007.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: carotenoids, anthocyanins, and betalains - characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.40, n.3, p.173-289, 2000.

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

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. PUCPRESS. Curitiba, 2013.

ELLENDERSEN, L. S. N., GRANATO, D., GUERGOLETTI, K. B.,; WOSIACKI, G. Development and sensory profile of a probiotic beverage from apple fermented with *Lactobacillus casei*. **Engineering in Life Sciences**. <http://dx.doi.org/10.1002/elsc.201100136>, 2012.

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

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS
WORLD HEALTH ORGANIZATION. FAOSTAT Disponível em
<<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>>, Acesso em: 10/03/2012.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS.
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation**, Córdoba, Argentina, 2001. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/meeting/009/y6398e.pdf>. Acesso em: 10/11/2014.

FERNÁNDEZ, M. F., BORIS, S., BARBÉS, C. Probiotic properties of human lactobacilli strains to be used in the gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 449-455, 2003.

FERRAREZI, A. C. Interpretação do consumidor, avaliação da intenção de compra e das características físico-químicas do néctar e do suco de laranja pronto para beber. (Dissertação de Mestrado)-Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista, 2008.

FERREIRA, K. A.; ALCÂNTARA, R. L. C. Approaches for implementation of the postponement strategy: a multicase study in the food industry. **Gestão & Produção**, v. 20, n. 2, p. 357-372, 2013.

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

FRANCO, R. C. Análise comparativa de legislações referentes aos alimentos funcionais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo. São Paulo-SP, 2006.

GERMAN, B.; SCHIFFRIN, E. J.; RENIERO, R.; MOLLET, B.; PFEIFER, A.; NEESER, J. The development of functional foods: lesson from the gut. **Tibtech**, v. 17, p. 492-499, 1999.

GOMES, A. M. P. e MALCATA F. X. *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**. v. 10, p. 139-157, 1999.

GUEDES NETO, L. G.; PENNA, C. F. A. M.; FONSECA, L. M.; CERQUEIRA, M. M. O. P.; LEITE, M. O.; SOUZA, M. R. *Lactobacillus acidophilus* e a indústria de laticínios. In. **Leites e Derivados**, n. 66, 2002. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/leite>. Acesso em: 19/12/2012.

GIBBONS, E.; ALLWOOD, M.C.; NEAL, T.; HARDY, G. Degradation of dehydroascorbic acid in parenteral nutrition Mixtures. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**, v.25, n.3-4, p. 605-611, 2001.

GILLILAND, S. E. Health and nutritional benefits from lactic acid bacteria. **FEMS Microbiology Letters**, v. 87, n. 1–2, p. 175–188, 1990.

HERNANDES, N. K.; CONEGLIAN, R. C. C.; GODOY, R. L. O.; VITAL, H. C.; FREIRE JUNIOR, M. Testes Sensoriais de Aceitação da Beterraba Vermelha (*Beta vulgaris ssp. Vulgaris L.*), cv. Early Wonder, minimamente processada e irradiada. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 64-68, 2007.

HERRERO, M.; IBANEZ, E.; CIFUENTES, A. Analysis of natural antioxidants by capillary electromigration methods. **Journal of Separation Science**, v. 28, p. 883-897, 2005.

HOLANDA, L. B.; ANTUNES, A. E. C.; DEL SANTO, R.; MUNIZ, V. O. Conhecimento sobre probióticos entre estudantes de uma instituição de ensino superior. **Intellectus**, n.5, 2008.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., SNEL, J., SCHILLINGER, U.,; HUISIN'T VELD, J. H. J. Overview of gut flora and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 85–101, 1998.

HORWITZ, W. (Ed.). Vitamin C in foods. In: HORWITZ, W. (Ed.). **Official Methods of Analysis of the Association of Official Analytical Chemists**. 18th ed. Gaithersburg: AOAC, 2005. (Official Method 967.26).

ITSARANUWAT, P.; AL-HADDAD, K. S. H.; ROBINSON, R. K. The potential therapeutic benefits of consuming 'health-promoting' fermented dairy products: a brief update. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, n. 4, p. 203-210, 2003.

JONES, P. J. Functional foods – more than just nutrition. **Canadian Medical Association Journal**, v. 166, n.12, p. 1555-1563, 2002.

KANNER, J.; HAREL, S., GRANIT, R., Betalains: a new class of dietary cationized antioxidants **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.59, n.11, p. 5178-5185, 2001.

KNORR, D. Technology aspects related to microorganisms in functional foods. **Trends in Food Science and Technology**. v. 9, p. 295-306, 1998.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.

LEE, Y. K.,; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and Prebiotics** (2nd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc., 2009.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science & Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LIAO, T.; WU, J.S.B.; WU, M.C.; CHANG, H.M. Epimeric Separation of L-Ascorbic Acid and D-Isoascorbic Acid by Capillary Zone Electrophoresis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.48, n. 1, p.37-41, 2000.

LILA, M. A. Plant pigments and human health. In: DAVIS, K. M. Plant pigments and their manipulation. **Annual Plant Reviews**, v. 14, p.248-274, 2004.

LOURENS-HATTINGH, A., VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, n. 1–2, p. 1–17, 2001.

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

LUCKOW, T.; SHEHAN, V.; FITZGERALD, G.; DELAHUNTY, C. Exposure, health information and flavor-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. **Appetite**, v.47, p. 315-323, 2006.

MAPA - MINISTÉRIO DA AGRICULTURA, **Citrus**; Disponível em: <<http://www.agricultura.gov.br/vegetal/culturas/citrus>> Acesso em: 15/05/2013.

- MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; VANZELA, E. S. L.; STRINGHETA, P. C.; PINTO, C. L. O.; MARTINS, J. M.V. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v.51, p.764-770, 2013.
- MÄTTÖ, J., ALAKOMI, H. L., VAARI, A., VIRKAJÄRVI, I.,; SAARELA, M. Influence of processing conditions on *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* functionality with a special focus on acid tolerance and factors affecting it. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1029–1037, 2006.
- MATTILA-SANDHOLM, T., MYLLARINEN, P. M., CRITTENDEN, R., MOGENSEN, G., FONDEN, R., SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173–182, 2002.
- MOUSAVI, Z. E., MOUSAVI, S. M., RAZAVI, S. H., EMAM-DJOMEH, Z., KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 27, p. 123–128, 2011.
- NETZEL, M. et al. Renal excretion of antioxidative constituents from red beet in humans. **Food Research International**, v.38, n. 8-9, p.1051-1058, 2005.
- NIGHSWONGER, B. D.; BRASHEARS, M. M. GILLILAND, S. E. Viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in fermented milk products during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**. v. 79, p. 212-219, 1996.
- NOVÁKOVÁ, L.; SOLICH, P.; SOLICHOVÁ, D.; HPLC methods for simultaneous determination of ascorbic and dehydroascorbic acids. **TrAC Trends in Analytical Chemistry**, v. 27, n.10, p. 942-958, 2008.
- NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 111–117, 2011.
- OLIVEIRA, R. G. Identificação, quantificação e caracterização antioxidante de flavonóides e vitamina C presentes em geléias de frutas. Tese de Doutorado. Universidade Estadual de Campinas. Campinas, São Paulo, 2010.
- de OLIVEIRA, M. A., DE SOUZA, V. M., BERGAMINI, A. M. M.,; DE MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil. **Food Control**, v. 22, p. 1400–1403, 2011.
- OZGEN, M., REESE, R. N., TULIO, A. Z., SCHEERENS, J. C.,; MILLER, A. R. Modified 2, 2- azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.4, p. 1151–1157, 2006.
- PACHECO, M. T. B.; SGARBIERI, V. C. **Alimentos Funcionais**. Campinas: ITAL, p. 69, 1999.

- PADILHA, P. C.; PINHEIRO, R. L. O papel dos alimentos funcionais na prevenção e controle do câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.50, n.3, p.251-260, 2004.
- PARVEZ, S., MALIK, K. A., AH KANG, S.,; KIM, H. Y. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, p. 1171–1185, 2006.
- PATRIGNANI F., LANCIOTTI R., MATHARA J. M., GUERZONI M. E., HOLZAPFEL W. H. Potential of functional strains, isolated from traditional Maasai milk, as starters for the production of fermented milks. **International Journal Food Microbiological**, 107 (1): p.1-11, 2006.
- PERES, C. M., PERES, C., HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.,; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria — With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science & Technology**, v. 26, p. 31–42, 2012.
- PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, p. 1276–1283, 2011.
- PHILLIPS M., KAILASAPATHY K., TRAN L.. Viability of commercial probiotic cultures (*L. acidophilus*, *Bifidobacterium sp.*, *L. casei*, *L. paracasei* and *L. rhamnosus*) in cheddar cheese. **International Journal Food Microbiological**. 108 (2): p. 276-280, 2006.
- PHILLIPS, K. M.; TARRAGO-TRANI, M. T.; GEBHARDT, S. E.; EXLER, J.; PATTERSON, K. Y.; HAYTOWITZ, D. B.; PEHRSSON, P. R.; HOLDEN, J. M. Stability of Vitamin C in Frozen Raw Fruit and Vegetable Homogenates. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 23, n. 3, p. 253-259, 2010.
- PIMENTEL, C. V. M. B.; FRANCKI, V. M.; GOLLUCKE, A. P. B. **Alimentos funcionais: introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, 1ª edição, p.95, 2005.
- 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.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H., Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, p. 838-846, 2015.
- PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H., Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei ssp.paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, p. 415-422, 2015.
- PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, p.111-123, 2008.

PRATES, J. A. M.; MATEUS, C. M. R. P. Componentes com actividade fisiológica dos alimentos de origem animal. **Revista Portuguesa de Ciências Veterinárias**. v.97, n.541, p.3-12, 2002.

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

RASIC, J. L. Microflora of the intestine probiotics. In B. CABALLERO, TRUGO, L. FINGLAS, P. (Eds.), **Encyclopedia of food sciences and nutrition**. Oxford: Academic Press, p. 3911–3916, 2003.

RAY, C. R.; SIVAKUMAR, P. S. Traditional and novel fermented foods and beverages from tropical root and tuber crops: review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1073-1087, 2009.

REGALADO, C., GARCIA-ALMENDÁREZ, B.E., DUARTE-VÁZQUEZ, M.A., Biotechnological applications of peroxidases. **Phytochemistry. Reviews**. v. 3, n. 1–2, p. 243–256, 2004.

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

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digest and Liver Disease**. v.34, n.2, p.105-110, 2002.

RÖBLE, 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.

RODRÍGUEZ, M.B.S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Functional foods and optimum nutrition: A way or away? **Revista Espanola de Salud Publica**, v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.

ROSA, C. O. B.; COSTA, N. M. B. Alimentos Funcionais: Histórico, Conceitos e Atributos. In: COSTA, N. M. B.; ROSA, C. O. B. (Eds). **Alimentos Funcionais – componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. Rio de Janeiro: Rubio, Cap. 1, p.3-8, 2010.

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

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n.1, 2006.

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**. SãoPaulo, Brasil: Editora Varela, p. 23–49, 2011.

- 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, p. 8 - 13, 2013.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Review**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SANTO, E. F.; JACOBUCCI, H. B.; QUEIROZ, M. M.; DIAS, M. F. G. P. "Alimentos Funcionais". **Revista de Pesquisas Biológicas da UNIFEV**, n.1, p. 13-19, 2006.
- SANTO, A. P. E., PEREGO, P., CONVERTI, A., OLIVEIRA, M. N.. Influence of food matrices on probiotic viability A review focusing on the fruity bases. **Trends Food Science and Technology**, n. 111, p. 377-385, 2011.
- SALGADO, S.M.A, Estudo da estabilidade de betalaína extraída da beterraba-vermelha de mesa (*Beta vulgaris* L.), Dissertação de mestrado, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa, 1997.
- SALMINEN, S., VON WRIGHT, A. Lactic acid bacteria, **New York: Marcel Dekker**, p. 442, 1993.
- SALMINEN, S. Uniqueness of probiotic strains. **IDF Nutrition Newsletter**, v. 5, p. 16–18, 1996.
- SALMINEN, S.; WRIGHT, V., MORELLI, L. et al. Demonstration of safety of probiotics – a review. **International Journal of Food Microbiology**. v. 44, p. 93 – 106, 1998.
- SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.
- SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SAW, L. K., CHEN, S., WONG, S. H., TAN, S. A., GOH, K. K. T. Fermentation of tropical fruit juices by lactic acid bacteria. **12 th ASEAN Food Conference**, 16–18 June, Kangkok, Thailand. p. 80–87, 2011.
- SCHOEFS, B. Determination of pigments in vegetables. **Journal of Chromatography A**, v.1054, n. 1-2, p.217-226, 2004.
- SHAH, N. P., RAVULA, R. Selling the cells in desserts. **Dairy Industries International**, v. 69, p. 31–32, 2004.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.
- 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, 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 Emerging Technology**, v. 8, n. 2, p. 279-284, 2007.
- SHEELA, T.,; SUGANYA, R. S. Studies on anti-diarrhoeal activity of synbiotic plums juice. **International Journal of Scientific and Research Publications**, v. 2, p. 1–5, 2012.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 317, 2007.
- SINGH, K., KALLALI, B., KUMAR, A.,; THAKER, V. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, p. 287–290, 2011.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants**, Part A, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SOCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., SPIER, M. R., MEDEIROS, A. B. P., YAMAGUISHI, C. T., LINDNER, J. D., et al. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p. 413–434, 2010.
- SOUZA, M. C. C.; BENASSI, M. T.; MENEGHEL, R. F. A.; SILVA, R. S. S. F. Stability of Unpasteurized and Refrigerated Orange Juice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n. 3, p. 391-397, 2004.
- SPINOLA, V.; BERTA, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.
- STINTZING, F. C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. **European Food Research and Technology**, v. 216, p. 303–311, 2003.
- STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food, and in human nutrition. **Trends Food Science Technology**, v.5, p.19-38, 2004.
- STONE, H., SIDEL, J. L. **Sensory Evaluation Practices**, 2ª ed., Academic Press, San Diego, CA, 1993.
- STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, n.62, p.247-269, 2003.
- TABNUT - Tabela de Composição Química dos Alimentos. Escola paulista de Medicina/Unifesp. **Relatório completo: Suco de laranja, concentrado congelado, sem adocante, não diluído**. Disponível em: <http://www2.unifesp.br/dis/servicos/nutri/public/alimento/nutriente/relatorio/2/id/09214/seqQuant/4>> Acesso em: 01/12/2014.

- TACO. Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4ed. revisada e ampliada. Campinas, SP: UNICAMP, 2011. Disponível em http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=ta_co_4-versao_ampliada_e_revisada.pdf. Acesso em: 10/01/2015.
- 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, p. 1–8, 2004.
- TAMIME, A. Y., SAARELA, M., SONDERGAARD, A. K., MISTRY, V. V.,; SHAH, N. P. Production and maintenance of viability of probiotic microorganisms in dairy products. In Tamime, A. Y. (Ed.), **Probiotic dairy products**. London: Blackwell Publishing Ltd. p. 39–72, 2005.
- TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1-2, p. 12-25, 2012.
- TESORIERE, L.; ALLEGRA, M.; BUTERA, D.; LIVREA, M. A. Absorption, excretion, and distribution o dietary antioxidant betalains in LDLs: potencial health effects of betalains in humans. **The American Journal Clinical Nutrition**, v.80, n. 4, p.941-945, 2004.
- TIVELLI S. W.; FACTOR T. L.; TERAMOTO J. R. S.; FABRI E. G.; MORAES A. R. A.; TRANI P. E.; MAY A. Beterraba: do Plantio à Comercialização. **Boletim Técnico Instituto Agrônômico Campinas**, Brasil, v. 210, p. 45, 2011.
- TOMELIN, B.; PEPLAU, P. *Lactobacillus*: Características, processos de fermentação e seus produtos, n. 84, 2005. Disponível em: <http://www.dipemar.com.br/leite>. Acesso em: 19/12/2012.
- TRIBESS, T.B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. Dissertação de Mestrado, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2003.
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v.9, p. 225-241, 2014.
- 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.
- URALA, N.; LAHTEENMAKI, L. Consumer responses to an off-flavor in juice in the presence of specific health claims. **Food Quality and Preference**, v. 18, p.1-12, 2007.
- VALOR ECONÔMICO - Jornal Valor Econômico, Exportação brasileira 'patina' em volume, mas receita sobe. 26/08/2011, Disponível em: <http://www.valor.com.br/empresas/988842/exportacao-brasileira-patina-em-volume-mas-receita-sobe> Acesso em: 20/05/2012.

- VANNUCCHI, H.; ROCHA, M. M. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Ácido ascórbico (Vitamina C). **International Life Sciences Institute Brasil**, v. 21, p. 1-11, 2012.
- VENTURA, M., PEROZZI, G. Probiotic bacteria and human gut microbiota. **Genes & Nutrition**, v. 6, p. 203–204, 2011.
- VENTURI, A., GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., JOHANSSON, R., ZUCCONI, E., BRIGIDI, P. Impact on the composition of the faecal flora by a new probiotic preparation: Preliminary data on maintenance treatment of patients with ulcerative colitis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 13, n. 8, p. 1103–1108, 1999.
- VERGARA, C. M. A. C., HONORATO, T. L., MAIA, G. A.,; RODRIGUES, S. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale*L) juice. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, p. 141–145, 2010.
- VINDEROLA, C. G.; PROSELO W.; GHIBERTO D.; REINHEIMER, J. A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in argentinian fresco cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1905-1911, 2000.
- VINDEROLA, C. G., REINHEIMER, J. A. Lactic acid bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. **Food Research International**, v. 36, p. 895–904, 2003.
- VINSON, J. A., HAO, Y., SU, X.; ZUBIK, L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, n. 9, p. 3630–3634, 1998.
- VITTI, M. C. D.; KLUGE, R. A.; YAMAMOTTO, L. K; JACOMINO, A. P. Comportamento da beterraba minimamente processada em diferentes espessuras de corte. **Horticultura Brasileira**, v. 21, n. 4, p.623-626, 2003.
- WANSINK, B. Environmental factors that increase the food intake and consumption volume of unknowing consumers. **Annual Reviews of Nutrition**, v. 24, p. 455-479, 2004.
- ZINELLU, A.; CARRU, C.; SOTGIA, S.; DEIANA, L. Optimization of ascorbic and uric acid separation in human plasma by free zone capillary electrophoresis ultraviolet detection. **Analytical Biochemistry**, v.330, v. 2, p.298-305, 2004.
- ZITNANOVA, I., RANOSTAJOVA, S., SOBOTOVA, H., DEMELOVA, D., PECHAN, I., DURACKOVA, Z. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. **Biologia**, v. 61, n. 3, p. 279–284, 2006.
- YOON, K. Y., WOODAMS, E. E.,; HANG, Y. D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 315–318, 2004.
- YOON, K. Y., WOODAMS, E. E.,; HANG, Y. D. Fermentation of beet juice by beneficial lactic acid bacteria. **LWT- Food Science and Technology**, v. 38, p. 73–75, 2005.

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

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

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

ARTIGO CIENTÍFICO 1: Suco misto de beterraba e laranja: Conteúdo de betalaínas, ácido ascórbico, atividade antioxidante e cor durante o armazenamento refrigerado e aceitação

ARTIGO CIENTÍFICO 2: Adição de *L. acidophilus* em suco misto de beterraba e laranja: estabilidade do produto e viabilidade do probiótico sob armazenamento refrigerado

6.1 ARTIGO CIENTÍFICO 1

Suco misto de beterraba e laranja: Conteúdo de betalaínas, ácido ascórbico, atividade antioxidante e cor durante o armazenamento refrigerado e aceitação

Resumo

O estudo teve como objetivo combinar o suco de beterraba com o suco de laranja em duas proporções (1:1 e 1:2 v/v), estudar sua estabilidade físico-química durante armazenamento a 4°C por 30 dias e avaliar sua aceitação. Como controles foram estudados os sucos de beterraba puro com e sem pasteurização e suco de laranja puro. A acidez dos sucos mistos (0,43 – 0,59% de ácido cítrico e pH de 4,17 – 4,03) contribuiu para a estabilidade das betacianinas (30,29-22,32 mg/100mL), redução de apenas 7% e 10% na intensidade de cor amarela e aumento na pureza da cor (Croma) de 22% e 27%, durante o armazenamento. O teor de ácido ascórbico apresentou perda de 25% no suco de laranja pasteurizado após 30 dias e nos sucos mistos, a redução mais significativa ocorreu logo após 5 dias de armazenamento, sendo perdido completamente já aos 15 dias. Os sucos mistos apresentaram teores elevados de compostos fenólicos totais (484-485 µg ácido gálico/mL), alta capacidade sequestrante de DPPH (2083-1930 µg Trolox/mL) e ABTS (1854-1840

µg Trolox/mL) assim como, uma melhor aceitação sensorial, quando comparada ao suco de beterraba puro pasteurizado. Suco misto de beterraba e laranja é uma bebida funcional alternativa que pode contribuir para o aumento do consumo de beterraba e laranja, sendo uma adição positiva à dieta.

Palavras-chave: fenólicos, betacianinas, ácido ascórbico, cor, sensorial

1. INTRODUÇÃO

A beterraba (*Beta vulgaris L.*) é uma das principais hortaliças cultivadas no Brasil, sendo o Paraná o maior produtor no país (TIVELLI et al., 2011). O suco de beterraba é uma alternativa conveniente para o consumo deste vegetal que contém compostos benéficos à saúde, tais como potássio, magnésio, ácido fólico, ferro, zinco, cálcio, fósforo, sódio, niacina, biotina, B6, fibra solúvel, além de ser uma fonte rica de compostos polifenólicos (KAUR; KAPOOR, 2002), que são antioxidantes biologicamente disponíveis (WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011a, WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011; PITALUA et al., 2010).

A cor intensa e atraente da beterraba e seus produtos é devido à presença de pigmentos naturais hidrossolúveis chamados betalaínas. Estes compostos são derivados do ácido betalâmico e divididos em duas sub-classes: betacianinas (pigmentos vermelho-violeta) e betaxantinas (pigmentos amarelo-laranja) (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000; STINTZING; CARLE, 2004). Estes pigmentos, além de fornecerem cor à beterraba, são importantes substâncias antioxidantes, benéficos à saúde, com efeitos antimicrobianos, antivirais (KANNER; HAREL; GRANIT, 2001; STRACK; VOGT; SCHLIEMANN, 2003), anti-inflamatórios, anti-radicais livres (GENTILE et al., 2004), e na inibição da proliferação de células de tumores humanos (REDDY et al., 2005), como as células de câncer da bexiga e ovariano (ZOU et al., 2005), conforme estudos *in vitro*.

No Brasil há uma diversidade de sucos de frutas, porém o suco de laranja (*Citrus sinensis*) tem destaque, sendo o país responsável pela metade do suco produzido no mundo (TAVARES, 2006; BRANCO et al., 2007). De julho de 2012 a maio de 2013, foram 1,094 milhão de toneladas de suco concentrado, o que corresponde a 80% do suco concentrado que é comercializado no mercado

internacional. O suco de laranja, além da grande aceitabilidade devido ao sabor, é fonte de ácido ascórbico, um nutriente que além da ação vitamínica, é um cofator em diversos processos fisiológicos, incluindo a hidroxilação de prolina e lisina na síntese de colágeno e outras proteínas do tecido conjuntivo, a síntese de norepinefrina e de hormônios adrenais, a ativação de hormônios peptídicos e a síntese de carnitina. O ácido ascórbico age ainda como antioxidante, além de facilitar a absorção intestinal de ferro e a manutenção do íon ferroso no plasma sanguíneo (TARRAGO-TRANI et al., 2012).

Segundo recomendações da Organização Mundial da Saúde (OMS) e da Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO), o consumo mínimo de frutas e hortaliças para adultos deve ser de 400g por dia (5 ou mais porções diárias), recomendação também adotada pelo Ministério da Saúde do Brasil. Porém, segundo dados de uma Pesquisa de Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico (Vigitel), apenas 20,2% dos brasileiros consomem frequentemente o recomendado (BRASIL, 2012).

Uma das alternativas para re-equacionar o equilíbrio entre a ingestão real e a recomendada de cinco porções de frutas e hortaliças na dieta, é o consumo de bebidas funcionais ricas em antioxidantes à base de frutas e/ou hortaliças, desde que contenham preservados seus componentes funcionais e sejam amplamente aceitas pelos consumidores (SHENOY et al., 2010; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011b).

Em suco de beterraba, para garantir uma ótima pigmentação e retenção da cor, deve ser considerada a estabilidade das betalaínas que é influenciada por diferentes fatores intrínsecos, tais como, teor de pigmentos, pH, teor de umidade e de fatores externos, que catalisam sua degradação. Como exemplo, a retenção de betalaínas após o tratamento térmico pode ser aumentada consideravelmente com a exclusão ou remoção de condições desfavoráveis, tais como presença de íons metálicos, luz e oxigênio, e/ou por utilização sistemática de aditivos comuns, tais como o ácido ascórbico (antioxidante) e ácido cítrico (agente quelante) (HERBACH; STINTZING; CARLE, 2006a). Assim, a combinação de suco de beterraba, rico em compostos antioxidantes, com o suco de laranja muito aceito sensorialmente, rico em ácido ascórbico e polifenóis, resulta em uma bebida interessante. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar a aceitabilidade e a estabilidade das betalaínas, ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, atividade

antioxidante e da cor de sucos a base de beterraba e laranja durante armazenamento refrigerado por 30 dias.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matérias-primas

Beterrabas (*Beta vulgaris L.*) cv. Early Wonder frescas foram obtidas na CEASA (Central de Abastecimento do Paraná S.A.) na cidade de Londrina, Brasil. O suco de laranja utilizado foi um concentrado congelado comercial com 66 °Brix, sem açúcar e conservante adquirido em supermercado na mesma cidade.

2.2. Processamento do Suco de Beterraba

As beterrabas frescas foram lavadas com água potável, sanitizadas em água clorada a 150 mg/L por 30 min, enxaguadas com água potável e descascadas manualmente. Em seguida o suco puro foi obtido por centrífuga doméstica de 700 W marca Mondial.

2.3. Preparo do Suco Diluído de Laranja

O suco concentrado de laranja foi diluído com água esterilizada na proporção de 1:6 (v/v), conforme recomendação do fabricante.

2.4. Preparo do Suco Misto de Beterraba e Laranja

A partir do suco puro de beterraba e suco diluído de laranja foram preparadas as bebidas mistas em duas proporções, 1:1 e 1:2 (v/v), respectivamente.

2.5. Pasteurização dos Sucos

Após o envase dos sucos em frascos de vidro transparentes estéreis de 50 mL, efetuou-se a pasteurização em banho-maria a 70 °C/30 min.

2.6. Armazenamento dos Sucos

O estudo do efeito do armazenamento refrigerado (4 °C) sobre o conteúdo de betalaínas, ácido ascórbico, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante durou 30 dias e foi realizado com os seguintes sucos: suco de beterraba puro não pasteurizado (SB), suco de beterraba puro pasteurizado (SBP), suco de laranja diluído pasteurizado (SLP), suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado (SMBL 1:1) e suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado (SMBL 1:2).

As análises foram realizadas nos tempos: 0, 5, 10, 15, e 30 dias de armazenamento.

2.7. Delineamento Experimental

O experimento físico-químico foi repetido três vezes e seguiu o delineamento inteiramente casualizado com emprego de esquema de tratamento em parcelas subdivididas, onde os tratamentos principais foram os sucos e os tratamentos secundários, os tempos de armazenamento. A análise sensorial seguiu delineamento de blocos completos casualizados, onde os tratamentos foram os sucos e os blocos os julgadores. Em cada experimento, as análises foram feitas em triplicata.

2.8. Determinação do pH e Acidez Total

Foram determinados o pH em potenciômetro digital e a acidez total titulável por meio da titulação com solução de NaOH 0,01 mol/L até pH 8,2, expressa em ácido cítrico (mg/100 mL), conforme AOAC (1997).

2.9. Determinação de Ácido Ascórbico por CLAE

O teor de ácido ascórbico foi determinado adaptando-se as condições sugeridas por Souza et al. (2004). As amostras de sucos foram preparadas pela dissolução das mesmas em ácido metafosfórico 3% e filtradas em membrana 0,22 µm (Millipore®). O sistema cromatógrafo (Shimadzu®) consistiu de duas bombas (modelo LC-10AD), válvula injetora (Rheodyne®) com alça de amostragem de 20 µL, forno para coluna (modelo CTO-20A), detector espectrofotométrico UV/visível (modelo SPD-10A), interface (modelo CBM-101), e o programa CLASS-CR10, versão 1.2 (Shimadzu®). Foi empregada uma coluna Spherisorb ODS1 (4,6 x 250mm, 5µm) (Waters®). A análise foi realizada em temperatura ambiente, eluição isocrática (0,5 mL/min) com solução de ácido sulfúrico pH 2,5 como fase móvel. A detecção do ácido ascórbico foi feita a 254 nm, a identificação baseando-se nos tempos de retenção e co-eluição com padrão de ácido ascórbico e a quantificação, por padronização externa usando curva de calibração com seis pontos (medida em duplicada) na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL.

2.10. Determinação de Betalaínas

Para extração das betalaínas, alíquota de 1 mL de cada suco, exceto o SLP, de cada tempo de armazenamento foi dissolvida em 30 mL de água destilada, agitadas manualmente durante 10 segundos e a mistura centrifugada (25°C) por 6000 x g durante 20 min (Eppendorf centrifuge 5804R, Alemanha).

Os teores de betaxantinas e betacianinas nos sobrenadantes de cada amostra foram analisados espectrofotometricamente, por meio de leitura de absorvância a 476 nm e 538 nm em espectrofotômetro de UV-Vis Biochrom Libra S22, respectivamente, além da leitura a 600 nm para correção de possíveis impurezas (turbidez), de acordo com os métodos de Stintzing, Schieber; Carle (2003), com algumas modificações.

O conteúdo de cada betalaína (BC), expresso em mg/mL de suco, foi calculado a partir da equação $= [(A \times FD \times PM \times 100) / (\epsilon \times l)]$, em que A é a diferença entre a absorção máxima (476 ou 538 nm) e a absorção de correção em 600 nm, FD o fator de diluição e l o comprimento da trajetória na cubeta (1 cm). Para a

quantificação da betacianinas e betaxantinas, as massas moleculares (MM) e absorvidade molar (ϵ) são MM = 550 g/mol, ϵ = 60.000 L/mol cm em H₂O e MM = 308 g/mol, ϵ = 48,000 L/mol cm em H₂O, respectivamente.

2.11. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

O conteúdo de compostos fenólicos totais foi determinado nos sucos em cada tempo de armazenamento, utilizando o método de Folin Ciocalteu conforme descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999). Uma alíquota (0,2 mL) de cada amostra foi adicionada a 1,5 mL de solução aquosa de Folin Ciocalteu (1:10 v/v). A mistura foi deixada em repouso por 5 minutos e, em seguida, misturada com 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio 60 g/L. Após, foi feita incubação à temperatura ambiente durante 90 min e a absorvância da mistura foi lida a 725 nm em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando o respectivo solvente como o branco. Os resultados foram expressos em μg de equivalentes de ácido gálico (μg EAG/100 mL).

2.12. Atividade Antioxidante Avaliada pelo Sequestro do Radical Livre DPPH

A capacidade antioxidante total pelo método DPPH foi medida nos sucos em cada tempo de armazenamento conforme Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com algumas modificações. Neste método, a capacidade antioxidante foi medida pela capacidade da amostra em doar íons hidrogênio ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) relativamente estável. Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,5, 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 50 μL de cada amostra. Os tubos de ensaio contendo as misturas foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e, posteriormente, a absorvância das soluções lidas a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A quantificação da atividade antioxidante das amostras foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em μmol de Trolox por mililitros de amostra, ou μmol de Trolox/mL.

2.13. Atividade Sequestradora do Cátion Radical ABTS+

A atividade antioxidante também foi analisada pela capacidade da amostra de eliminar os radicais livres ABTS[•] usando a metodologia modificada relatada por Ozgen et al. (2006). Quando combinado com um oxidante (persulfato de potássio 2,45 mM), o ABTS (7 mM em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4) reage para criar uma solução radical estável, azul escuro esverdeada após 12-16 horas de incubação no escuro. A solução foi então diluída até uma absorvância de $0,7 \pm 0,01$ em 730 nm, para formar o reagente teste. As misturas reacionais contendo 10 μ L de amostra e 4 mL de reagente teste foram incubadas em temperatura ambiente por 6 min. A atividade antioxidante foi calculada em relação a uma curva padrão de Trolox e expressa em μ mol de Trolox por mililitros de amostra, ou μ mol de Trolox/mL.

2.14. Análise de Cor

Para análise de cor foi utilizado colorímetro Konica Minolta CR 400, conforme descrito por Antunes et al. (2013). As especificações empregadas foram: área de leitura 11 mm, iluminante CIE D 65, iluminação em ângulo de 45°, ângulo de observação de 0° e observador padrão CIE 10°. As amostras foram acondicionadas em cubeta de vidro (acessório CR – A103) apropriada para leitura colorimétrica de líquidos do aparelho, onde foram fornecidos por leitura direta, os parâmetros L* (luminosidade), a* (verde - vermelho), b* (azul - amarelo) e Cromo (saturação da cor). A partir dos parâmetros L*, a* e b* foi calculada a diferença total de cor (ΔE^*_{ab}) entre cada amostra em um determinado tempo e a amostra no tempo zero de armazenamento, da seguinte forma: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$.

2.15. Análise Sensorial

Os sucos SBP, SMBL (1:1) e SMBL (1:2) no 5º dia de armazenamento foram avaliados quanto à aceitação. Antes da análise foi realizada a pesquisa de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores, leveduras e *Salmonella* sp., conforme Silva; Junqueira; Silveira (2007), para garantir a segurança microbiológica dos sucos.

O teste de aceitação de atributos (cor, aroma, sabor e impressão global) foi conduzido com escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente) e seguiu delineamento de blocos completos, onde os tratamentos foram os sucos e os blocos os julgadores.

As amostras, codificadas com números de três dígitos ao acaso, foram apresentadas em taças de acrílico e a temperatura de 10 °C em ordem aleatória aos julgadores. A equipe sensorial contou com 72 julgadores não treinados, consumidores habituais de sucos de frutas. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, parecer CEP/UDEL 342/2011, nº CAAE 0319.0.268.000-11.

2.16. Análise Estatística

Os dados foram tratados por análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey ($p < 0.05$). Os resultados foram processados pelo Excel (Microsoft Office 2007) e Statistical Analysis System versão 9.1.3. (SAS, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características Físico-químicas

Os resultados de pH e a acidez total titulável dos sucos, durante o armazenamento de 30 dias sob refrigeração, estão apresentados na Tabela 1.

A acidez titulável, entre 0,43 a 0,59% de ácido cítrico, dos sucos mistos (SMBL 1:1 e 1:2) resultante da combinação do suco de beterraba (SB) com acidez de 0,08% de ácido cítrico e o suco de laranja (SLP) com acidez de 0,78% ácido cítrico, foi satisfatória, pois segundo Strack; Vogt; Schliemann (2003), o ácido cítrico pode melhorar a estabilidade das betacianinas.

O valores de pH, entre 4,17 e 4,03, encontrados nos SMBL 1:1 e SMBL 1:2, respectivamente, demonstram que quanto maior a proporção de suco de laranja menor o pH e que ambos estão entre os valores observados para o suco de beterraba (5,71) e o suco de laranja (3,88).

O pH tem importância fundamental na limitação dos tipos de microrganismos capazes de se desenvolver em alimentos (Silva; Junqueira; Silveira, 2007). De acordo com Stintzing; Carle (2007) a alteração de pH para cerca de 4,0 é recomendável durante o processamento de beterraba, para precipitação de proteínas sobre substâncias coloidais, e também por permitir que se faça pasteurização ao invés de tratamento de esterilização com temperaturas em torno de 100 °C.

Tabela 1 - Acidez e pH de sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

Acidez (% de ácido cítrico)					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	0,08 ± 0,00 ^{CD}	0,08 ± 0,00 ^{CD}	0,09 ± 0,00 ^{CD}	0,09 ± 0,01 ^{BD}	0,14 ± 0,06 ^{AA}
SBP	0,08 ± 0,00 ^{AD}	0,08 ± 0,00 ^{AD}	0,09 ± 0,00 ^{AD}	0,08 ± 0,00 ^{AD}	0,09 ± 0,01 ^{AB}
SLP	0,78 ± 0,00 ^{abA}	0,78 ± 0,01 ^{abA}	0,78 ± 0,00 ^{abA}	0,79 ± 0,00 ^{AA}	0,77 ± 0,01 ^{bC}
SMBL 1:1	0,43 ± 0,01 ^{acC}	0,42 ± 0,00 ^{bC}	0,43 ± 0,01 ^{cC}	0,42 ± 0,00 ^{abC}	0,41 ± 0,00 ^{BD}
SMBL 1:2	0,59 ± 0,01 ^{AB}	0,57 ± 0,01 ^{BB}	0,57 ± 0,00 ^{bcB}	0,56 ± 0,01 ^{CB}	0,54 ± 0,00 ^{DE}

pH					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	5,71 ± 0,02 ^{AA}	5,62 ± 0,01 ^{abA}	5,56 ± 0,02 ^{BB}	5,36 ± 0,21 ^{CB}	4,84 ± 0,26 ^{DB}
SBP	5,70 ± 0,01 ^{AA}	5,69 ± 0,01 ^{abA}	5,68 ± 0,01 ^{AA}	5,68 ± 0,01 ^{AA}	5,49 ± 0,40 ^{bA}
SLP	3,88 ± 0,00 ^{AD}	3,83 ± 0,01 ^{AD}	3,87 ± 0,00 ^{AE}	3,83 ± 0,00 ^{AE}	3,88 ± 0,00 ^{AE}
SMBL 1:1	4,17 ± 0,01 ^{AB}	4,18 ± 0,01 ^{AB}	4,16 ± 0,00 ^{AC}	4,21 ± 0,03 ^{AC}	4,16 ± 0,01 ^{AC}
SMBL 1:2	4,03 ± 0,00 ^{AC}	4,00 ± 0,01 ^{AC}	4,02 ± 0,00 ^{AD}	4,03 ± 0,02 ^{AD}	4,03 ± 0,01 ^{AD}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

Durante o armazenamento, a acidez do SB aumentou de 0,08 para 0,14% de ácido cítrico e da SBP não variou. O pH do SB e SBP diminuiu, possivelmente por crescimento de microrganismos, provavelmente leveduras, que produziu uma pequena quantidade de ácidos orgânicos, mesmo após tratamento térmico. Enquanto que, SMBL 1:1 e SMBL 1:2 mantiveram o valor inicial de pH e apresentaram uma diminuição na acidez, o que pode ser creditado ao suco de laranja, que com sua maior acidez inicial e presença de compostos terpênicos, especialmente o limoneno, tem reconhecida atividade antimicrobiana (TAJKARIMI; IBRAHIM; CLIVER, 2010).

3.2. Conteúdo de Ácido Ascórbico por CLAE

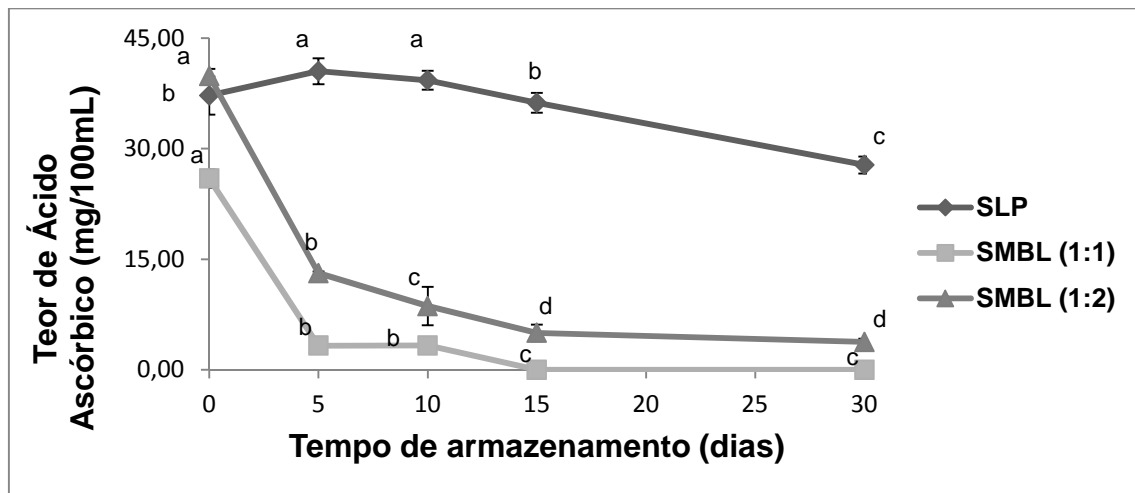
O conteúdo de ácido ascórbico por CLAE, para os sucos analisados no presente trabalho, está apresentado na Figura 1, sendo os valores iniciais (Tempo 0) de 37,19; 25,93; 39,84 mg/100mL para SLP, SMBL 1:1 e SMBL 1:2, ou seja, quanto maior a proporção de suco de laranja, maior o conteúdo de ácido ascórbico.

O suco de laranja pasteurizado (SLP) apresentou perda do teor de ácido ascórbico de 25% após 30 dias de armazenamento ($p > 0,05$), ainda assim, o valor encontrado atende à Instrução Normativa nº 01 de 7 de janeiro de 2000, do Ministério da Agricultura e do Abastecimento, que estabelece para o suco de laranja o limite mínimo de ácido ascórbico em 25 mg/ 100 mL de suco. Essa redução já era esperada, pois sabe-se que o teor de ácido ascórbico diminui com o aumento do tempo e temperatura de armazenamento (BELTRÁN et al., 2009; RAIMUNDO et al., 2007), sendo o tempo o principal fator responsável pela redução de AA no SLP, uma vez que a temperatura de 4°C manteve-se constante durante todo o armazenamento.

Durante o período de armazenamento, o teor de ácido ascórbico foi reduzido nos sucos mistos (SMBL 1:1 e SMBL 1:2), sendo a redução mais significativa logo após 5 dias de armazenamento. No SMBL 1:1 o teor de ácido ascórbico, além da redução, foi perdido completamente já aos 15 dias. Essa diferença já era esperada pela diferença de acidez inicial dos sucos, uma vez que existe uma direta correlação entre a concentração de íons H^+ no meio e a estabilidade do ácido ascórbico (SPINOLA et al., 2013).

O ácido ascórbico está sujeito a perdas significativas ao longo do armazenamento ou do processamento, sendo oxidado (química ou enzimaticamente) a ácido deidroascórbico, que apresenta atividade vitamínica, mas é ainda menos estável e sofre oxidação a ácido dicetogulônico, que se degrada em diferentes produtos, como: ácido oxálico, ácido xilônico e xilose. Sabe-se que diversos fatores afetam a estabilidade do ácido ascórbico durante o armazenamento, incluindo o pH do meio, a presença de oxigênio e de íons metálicos, e a temperatura (TARRAGO-TRANI et al., 2012; SPINOLA et al., 2013).

Figura 1 - Conteúdo de Ácido Ascórbico (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias



Valores representam a média \pm desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

3.3. Conteúdo de Betalaínas

Nas Tabelas 2 e 3 estão os resultados dos teores de betacianinas e betaxantinas ao longo de 30 dias de armazenamento sob refrigeração (4°C) dos sucos de beterraba e mistos de beterraba e laranja.

O teor inicial de betacianinas do suco de beterraba puro pasteurizado (SBP) (53,39 mg/100mL) foi menor que no suco de beterraba *in natura* (SB) (65,32 mg/100mg), indicando que a pasteurização ocasionou uma redução de 18% de betacianinas. Para as betaxantinas o tratamento térmico não resultou efeito significativo no tempo inicial do estudo, mas ao final dos trinta dias de armazenamento observou-se que o SB teve uma perda 1,27% maior que SBP. Segundo Delgado-Vargas; Jiménez; Paredes-López (2000), uma prévia inativação da enzima por um curto tratamento de calor de 70 °C durante 2 min em extrato de beterraba já é suficiente e desejável para evitar a degradação enzimática das betalaínas, mas na presente pesquisa a pasteurização a 70°C por 30 min provocou a degradação das betacianinas, o que era previsto, pois os autores Barrera; Reynoso; Mejía (1998), afirmaram em seus estudos que a temperatura é fator importante, que influencia a estabilidade das betalaínas onde aumento das taxas de degradação resultam de temperaturas crescentes.

Os teores iniciais (tempo 0) de betacianinas e betaxantinas dos sucos mistos SMBL 1:1 (31,12 mg/100mL e 11,96 mg/100mL) e SMBL 1:2 (22,31 mg/100mL e 8,80 mg/100mL) foram menores que os do suco de beterraba *in natura* (SB) (65,32 mg/100mL e 29,99 mg/100mL) e do suco de beterraba pasteurizado (SBP) (53,39 mg/100mL e 31,76 mg/100mL), como já era esperado, devido à diluição do suco de beterraba com suco de laranja, proporcional a cada formulação de bebida mista.

Ao final do armazenamento, os sucos de beterraba *in natura* (SB) e de beterraba pasteurizado (SBP) apresentaram decréscimo significativo de 37,78% (de 65,32 para 40,64 mg/100mL) e 40,90% (de 53,39 para 31,55 mg/100mL), respectivamente, do teor de betacianinas, enquanto para as betaxantinas, a perda foi menor, sendo significativa de 24,0% para o SB e 19,11% para SBP.

Os teores de betacianinas e betaxantinas dos dois sucos mistos (SMBL 1:1 e SMBL 1:2) mantiveram-se estáveis ao longo dos trinta dias sob refrigeração, sendo, ao final observados valores de betacianinas e betaxantinas de 30,29 mg/100mL e 10,74 mg/100mL para SMBL 1:1 e 22,32 mg/100mL e 7,82 mg/100mL para SMBL 1:2, respectivamente.

Esses resultados indicam que o suco de laranja contribuiu para a estabilidade de ambas as classes de betalaínas nos sucos mistos, provavelmente pela ação do ácido cítrico e do ácido ascórbico. Conforme constatado, houve redução do conteúdo de ácido ascórbico nos sucos mistos mais acentuada que no suco de laranja puro (Figura 1) durante armazenamento, isso pode ser o indicativo parcial de sua contribuição na estabilidade das betalaínas, pelo seu poder pró-antioxidante, que previne reações oxidativas em frutas e vegetais, incluindo aquelas causadas por enzimas como a polifenoloxidase e a peroxidase, que degradam os pigmentos da beterraba (ESCRIBANO et al., 2002).

Tabela 2 - Conteúdo de Betacianinas (vermelho-violeta) (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

Sucos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	30
SB	65,32 ± 1,58 ^{AA}	61,18 ± 1,72 ^{BA}	55,34 ± 2,09 ^{CA}	51,76 ± 3,51 ^{CA}	40,64 ± 7,79 ^{DA}
SBP	53,39 ± 3,31 ^{AB}	50,52 ± 5,89 ^{BCB}	49,48 ± 2,61 ^{CB}	42,31 ± 3,68 ^{DB}	31,55 ± 5,64 ^{EB}
SMBL (1:1)	31,12 ± 0,89 ^{AC}	31,99 ± 0,59 ^{AC}	31,63 ± 0,76 ^{AC}	28,27 ± 5,19 ^{BC}	30,29 ± 1,94 ^{abC}
SMBL (1:2)	22,31 ± 0,98 ^{abD}	23,17 ± 0,77 ^{ad}	22,85 ± 0,78 ^{abD}	20,37 ± 3,77 ^{bd}	22,32 ± 1,40 ^{abD}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

Tabela 3 - Conteúdo de Betaxantinas (amarelo) (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

Sucos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	30
SB	29,99 ± 1,86 ^{AA}	28,84 ± 0,79 ^{abB}	28,42 ± 2,34 ^{BB}	27,82 ± 2,77 ^{BA}	22,79 ± 5,61 ^{CB}
SBP	31,76 ± 0,51 ^{AA}	30,43 ± 0,08 ^{BA}	30,40 ± 2,29 ^{BA}	27,80 ± 1,44 ^{CA}	25,69 ± 0,22 ^{DA}
SMBL (1:1)	11,96 ± 0,30 ^{abB}	12,08 ± 0,16 ^{ac}	11,76 ± 0,25 ^{abC}	11,44 ± 0,29 ^{abB}	10,74 ± 0,93 ^{bc}
SMBL (1:2)	8,80 ± 0,29 ^{ac}	8,84 ± 0,16 ^{ad}	8,52 ± 0,16 ^{ad}	8,21 ± 0,18 ^{ac}	7,82 ± 0,60 ^{ad}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

O ácido cítrico é um agente antioxidante e quelante e age sinergicamente com o ácido ascórbico. Strack; Vogt; Schliemann (2003) evidenciaram que a acidificação melhora a estabilidade da betacianina e evita a oxidação pelas polifenoloxidasas, como um exemplo, a perda de betacianina em sucos de pitayas acidificada a pH 4 foi 10% menor durante a pasteurização a 80 °C durante 5 min (VAILLANT et al., 2005). Estudos de Pasch; Von Elbe (1979), Han; Kim; Kim (1998), Herbach; Stintzing; Carle (2006b) demonstraram que além dos estereoisômeros de ácido ascórbico, os agentes quelantes, como o ácido cítrico, foram adequados para a estabilização de betalainas, possivelmente por neutralizar parcialmente o centro eletrofílico da betanina através de associação com o nitrogênio do grupo amino de carga positiva. Herbach; Stintzing; Carle (2006a) comprovaram também que o ácido cítrico melhora a estabilidade das betacianinas, apesar de ser menos eficaz do que os ácidos ascórbico e isoascórbico.

3.4. Teor de Compostos Fenólicos Totais nos Sucos

Os resultados do conteúdo total de fenólicos das amostras de sucos de beterraba, laranja, sucos mistos de beterraba e laranja 1:1 e 1:2, ao longo do tempo de 30 dias de armazenamento a 4°C, estão apresentados na Tabela 4. Todos os sucos foram fontes significativas de polifenóis, sendo que os sucos de beterraba, *in natura* (SB) e pasteurizado (SBP), com 521 e 497 µg EAG/mL, respectivamente, incluindo as bebidas mistas estudadas, com 484 µg EAG/mL na SMBL 1:1 e SMBL 1:2 com 485 µg EAG/mL, mostraram uma quantidade maior que o suco de laranja (SLP) com 448 µg EAG/mL. Sucos de laranja são boas fontes de compostos polifenólicos, incluindo ácidos hidroxicinâmicos e flavonóides (em especial flavonas) (VINSON et al. 2001; GLISZCZYNSKA-SWIGLO et al., 2004), enquanto que o suco de beterraba possui uma atividade antioxidante elevada e é fonte rica de polifenóis, comparando-se, inclusive, com sucos de frutas escuras como a romã e cranberry, que contêm os mais altos níveis de compostos polifenólicos (ex. flavonóides e taninos). Entre os ácidos fenólicos de extratos de beterraba, o ácido 4-hidroxibenzoico é o principal constituinte, seguido pelo ácido cinâmico, vanílico, clorogênico, ácido trans ferúlico e ácido caféico (WOOTTON-BEARD; MORAN; RYAN, 2011).

Tabela 4 - Compostos Fenólicos Totais (µg EAG/mL) em sucos armazenados a 4°C/30 dias

Sucos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	30
SB	521 ± 19 ^{bA}	518 ± 9 ^{bA}	571 ± 86 ^{aA}	515 ± 62 ^{bA}	448 ± 48 ^{cB}
SBP	497 ± 26 ^{bABD}	494 ± 20 ^{bAB}	555 ± 76 ^{aA}	517 ± 54 ^{bA}	431 ± 19 ^{cB}
SLP	448 ± 19 ^{abC}	473 ± 10 ^{ab}	477 ± 18 ^{abD}	458 ± 15 ^{abb}	433 ± 41 ^{bB}
SMBL (1:1)	484 ± 33 ^{cD}	499 ± 18 ^{abcAB}	519 ± 50 ^{aC}	514 ± 48 ^{abA}	485 ± 65 ^{bca}
SMBL (1:2)	485 ± 50 ^{abb}	506 ± 29 ^{aA}	505 ± 42 ^{aCD}	490 ± 42 ^{aA}	459 ± 59 ^{bAB}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa (p≤0,05) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

Com relação à estabilidade dos compostos fenólicos, no presente trabalho, os resultados demonstraram que apenas os sucos de beterraba (SB e SBP) e o suco de laranja (SLP) apresentaram perda significativa de 14%, 13% e 3%,

respectivamente, no teor de compostos fenólicos ao final do armazenamento. Enquanto que, os sucos mistos não sofreram variação significativa ao longo do tempo de armazenamento sob refrigeração, onde SMBL 1:1 manteve teor médio de 484 – 485 µg EAG/mL e SMBL 1:2 entre 485-459 µg EAG/mL. Provavelmente isso ocorreu pela ação conjunta do ácido cítrico e ácido ascórbico na inibição de reações oxidativas dos compostos fenólicos presentes nos sucos.

3.5. Atividade Antioxidante nos Sucos Avaliada pelo Sequestro do Radical Livre DPPH e Radical ABTS+

No que se refere à atividade antioxidante, expressa em concentração de Trolox (µg/mL), evidenciou-se que a intensidade da ação foi diferenciada entre os métodos utilizados (Tabela 5 e 6).

As amostras analisadas apresentaram diferença significativa na capacidade em seqüestrar o radical DPPH, mas não na atividade seqüestradora do cátion ABTS. Pelo método DPPH, as amostras com maior atividade antioxidante foram os sucos de beterraba *in natura* (2733 µg Trolox/mL) e o suco de beterraba pasteurizado (2813 µg Trolox/mL), enquanto o suco de laranja apresentou 50% do poder antioxidante, com 1408 µg Trolox/mL, estando de acordo com autores que afirmam que a atividade antioxidante das betalainas é maior que do ácido ascórbico (Stintzing et al., 2005). E segundo Vinson et al. (1998) e Zitnanova et al. (2006) a beterraba é uma das hortaliças mais potentes no que diz respeito à atividade antioxidante, sendo o suco de beterraba comparado favoravelmente com outros bem aceitos de alto teor de antioxidantes, como sucos de romã e cranberry, particularmente em termos de biodisponibilidade (Ryan; Prescott, 2010). Com um valor intermediário entre os sucos de beterraba e o suco de laranja, mas ainda assim elevado, o conteúdo de antioxidantes dos sucos mistos, foi de 2083 µg Trolox/mL (SMBL 1:1) e 1930 µg Trolox/mL no SMBL 1:2.

Os resultados encontrados por Pellegrini et al. (2007) indicam que na laranja a contribuição do ácido ascórbico e compostos fenólicos é de 76% no valor da atividade antioxidante total e Gardner et al. (2000) observaram que tanto a vitamina C quanto fenólicos totais em sucos de frutas estão fortemente relacionados com a capacidade antioxidante.

A perda de ácido ascórbico, a instabilidade dos compostos fenólicos totais e das betalaínas, são as prováveis causas da diminuição da capacidade antioxidante das amostras de sucos analisadas no trabalho.

Durante o armazenamento, verificou-se que o suco de beterraba pasteurizado apresentou a maior perda (37%) da capacidade antioxidante de sequestrar o radical livre DPPH, seguido por o SLP com perda de 32%, SB com 21%, SMBL 1:2 com 19% e SMBL 1:1 sem uma perda significativa. A diminuição da capacidade de seqüestrar o cátion ABTS foi significativa em todas as amostras, sendo para SLP (25%), SB (21%), SBP (14%), SMBL 1:1 (13%) e SMBL 1:2 (12%).

Tabela 5 - Atividade Antioxidante de DPPH Trolox ($\mu\text{g/mL}$) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

Sucos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	30
SB	2733 \pm 188 ^{aA}	2527 \pm 255 ^{abA}	2307 \pm 325 ^{bCA}	2323 \pm 419 ^{bA}	2157 \pm 243 ^{CA}
SBP	2813 \pm 264 ^{aA}	2210 \pm 285 ^{bB}	2040 \pm 296 ^{bcB}	1870 \pm 236 ^{cdB}	1760 \pm 261 ^{dB}
SLP	1408 \pm 245 ^{aC}	773 \pm 96 ^{bcD}	1037 \pm 153 ^{bD}	797 \pm 167 ^{bcD}	957 \pm 135 ^{bcC}
SMBL (1:1)	2083 \pm 89 ^{aB}	2027 \pm 187 ^{abBC}	1317 \pm 318 ^{cC}	1670 \pm 369 ^{bBC}	1853 \pm 231 ^{abB}
SMBL (1:2)	1930 \pm 246 ^{aB}	1803 \pm 146 ^{abC}	1452 \pm 120 ^{cC}	1596 \pm 200 ^{bcC}	1554 \pm 119 ^{cb}

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

Tabela 6 - Atividade Antioxidante de ABTS Trolox ($\mu\text{g/mL}$) em sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

Sucos	Tempo de Armazenamento (dias)				
	0	5	10	15	30
SB	2179 \pm 126 ^{aA}	1972 \pm 209 ^{bA}	1950 \pm 173 ^{bA}	2059 \pm 145 ^{bA}	1720 \pm 352 ^{cAD}
SBP	2081 \pm 142 ^{aA}	1741 \pm 155 ^{cb}	1957 \pm 206 ^{bA}	1999 \pm 63 ^{abA}	1798 \pm 62 ^{cA}
SLP	1872 \pm 241 ^{ab}	1515 \pm 93 ^{bc}	1507 \pm 103 ^{bcB}	1575 \pm 148 ^{bB}	1400 \pm 113 ^{cb}
SMBL (1:1)	1854 \pm 75 ^{ab}	1746 \pm 136 ^{abB}	1642 \pm 61 ^{bcC}	1711 \pm 92 ^{bcC}	1604 \pm 54 ^{cC}
SMBL (1:2)	1840 \pm 131 ^{ab}	1667 \pm 68 ^{bB}	1552 \pm 51 ^{cbC}	1605 \pm 84 ^{bcBC}	1614 \pm 146 ^{bcCD}

Valores representam a média \pm desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

3.6. Cor dos Sucos

Os parâmetros de cor (L^* , a^* , b^* e Cromo) dos sucos durante o armazenamento refrigerado a 4°C está apresentada na Tabela 7.

Os valores iniciais de a^* para SB de 0,78 e SBP de 0,95, respectivamente, representam a cor vermelho-violeta da beterraba proveniente das betacianinas, e de b^* para SB (1,56) e SBP (1,67) a leve predominância de amarelo pela presença das betaxantinas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ; PAREDES-LÓPEZ, 2000), enquanto que os valores de SLP para L^* , a^* e b^* de 36,61; -2,49; 16,34, respectivamente, demonstram a cor amarela do suco de laranja.

Tabela 7 - Parâmetros de cor de sucos armazenados a 4°C durante 30 dias

L^*					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	22,45 ± 0,16 ^{CD}	22,87 ± 0,04 ^{BD}	22,31 ± 0,07 ^{CD}	22,37 ± 0,02 ^{CD}	24,16 ± 0,47 ^{AD}
SBP	22,37 ± 0,02 ^{CD}	22,71 ± 0,10 ^{BD}	22,34 ± 0,14 ^{CD}	22,23 ± 0,06 ^{CD}	23,72 ± 0,20 ^{AE}
SLP	36,61 ± 0,14 ^{DA}	38,18 ± 0,04 ^{BA}	36,73 ± 0,03 ^{DA}	37,04 ± 0,17 ^{CA}	42,42 ± 0,73 ^{AA}
SMBL 1:1	23,21 ± 0,04 ^{CC}	23,76 ± 0,06 ^{BC}	23,15 ± 0,02 ^{CC}	23,14 ± 0,05 ^{CC}	24,78 ± 0,17 ^{AC}
SMBL 1:2	23,77 ± 0,04 ^{CB}	24,33 ± 0,07 ^{BB}	23,81 ± 0,06 ^{CB}	24,15 ± 0,04 ^{BB}	26,18 ± 0,27 ^{AB}
a^*					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	0,78 ± 0,06 ^{BD}	0,68 ± 0,03 ^{CD}	0,74 ± 0,03 ^{BCD}	0,81 ± 0,03 ^{BC}	1,07 ± 0,16 ^{AD}
SBP	0,95 ± 0,03 ^{BC}	0,82 ± 0,04 ^{CC}	0,87 ± 0,06 ^{BC}	0,91 ± 0,03 ^{BC}	1,19 ± 0,13 ^{AC}
SLP	-2,49 ± 0,02 ^{DE}	-2,87 ± 0,02 ^{BE}	-2,51 ± 0,04 ^{DE}	-2,63 ± 0,05 ^{CD}	-3,64 ± 0,14 ^{AE}
SMBL 1:1	4,80 ± 0,05 ^{CB}	5,18 ± 0,03 ^{BB}	4,78 ± 0,07 ^{CB}	4,59 ± 0,13 ^{DB}	6,13 ± 0,18 ^{AB}
SMBL 1:2	6,65 ± 0,04 ^{CA}	7,07 ± 0,05 ^{CA}	6,65 ± 0,03 ^{CA}	6,68 ± 0,10 ^{CA}	8,76 ± 0,32 ^{AA}
b^*					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	1,56 ± 0,04 ^{AE}	1,52 ± 0,03 ^{AD}	1,56 ± 0,03 ^{AD}	1,57 ± 0,03 ^{AC}	0,97 ± 0,16 ^{BE}
SBP	1,67 ± 0,02 ^{AD}	1,61 ± 0,03 ^{AD}	1,63 ± 0,05 ^{AD}	1,64 ± 0,03 ^{AC}	1,21 ± 0,11 ^{BD}
SLP	16,34 ± 0,31 ^{DA}	17,03 ± 0,02 ^{BA}	16,46 ± 0,08 ^{CA}	15,95 ± 0,16 ^{EA}	18,34 ± 0,17 ^{AA}
SMBL 1:1	2,39 ± 0,03 ^{AC}	2,38 ± 0,03 ^{AC}	2,35 ± 0,04 ^{AC}	2,19 ± 0,14 ^{BB}	2,23 ± 0,07 ^{BC}
SMBL 1:2	2,75 ± 0,03 ^{ABB}	2,82 ± 0,03 ^{AB}	2,68 ± 0,02 ^{BB}	2,26 ± 0,06 ^{DB}	2,47 ± 0,02 ^{CB}
Cromo					
Sucos	Tempo de Armazenamento				
	0	5	10	15	30
SB	1,74 ± 0,03 ^{AE}	1,66 ± 0,02 ^{AE}	1,73 ± 0,03 ^{AA}	1,77 ± 0,02 ^{AA}	1,45 ± 0,12 ^{BA}
SBP	1,92 ± 0,02 ^{AD}	1,80 ± 0,03 ^{ABD}	1,85 ± 0,03 ^{AB}	1,88 ± 0,03 ^{AA}	1,69 ± 0,16 ^{BB}
SLP	16,53 ± 0,31 ^{DA}	17,27 ± 0,02 ^{BA}	16,65 ± 0,08 ^{CC}	16,16 ± 0,16 ^{EB}	18,70 ± 0,19 ^{AC}
SMBL 1:1	5,36 ± 0,05 ^{CC}	5,70 ± 0,03 ^{BC}	5,33 ± 0,05 ^{CD}	5,08 ± 0,17 ^{DC}	6,52 ± 0,17 ^{AD}
SMBL 1:2	7,19 ± 0,04 ^{CB}	7,61 ± 0,04 ^{BB}	7,17 ± 0,02 ^{CD}	7,05 ± 0,11 ^{DD}	9,10 ± 0,31 ^{AE}

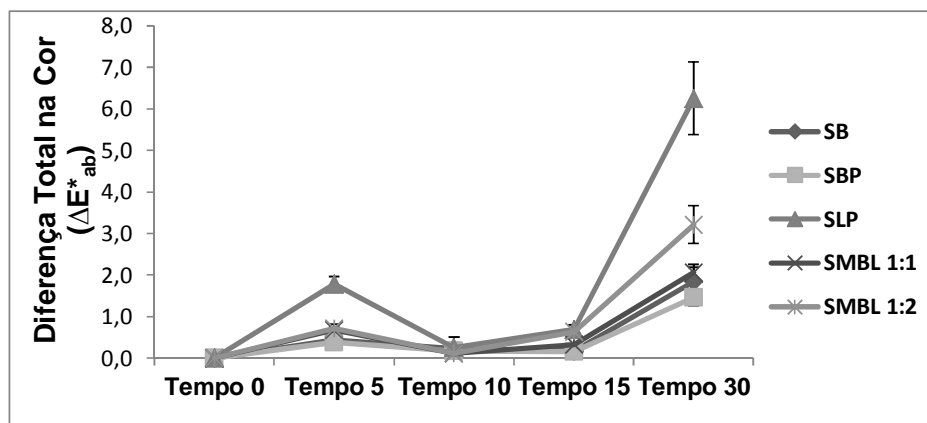
Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado). L^* = 0 (preto), L^* = 100 (branco); a^* = - a^* (verde), + a^* (vermelho); b^* = - b^* (azul), + b^* (amarelo).

Os sucos mistos de beterraba e laranja (SMBL 1:1, SMBL 1:2) apresentaram valores de a^* de (4,80, 6,65, respectivamente), indicando cor vermelha e de b^* 2,39 e 2,75, respectivamente, presença de componente amarelo.

Durante os 30 dias de armazenamento, observou-se que a diferença total na cor (ΔE^*_{ab}), Figura 2, foi maior no suco de laranja (SLP) (6,25), possivelmente pelo aumento do componente amarelo (b^*) e do verde ($-a^*$) ocasionado por um escurecimento do suco durante o armazenamento.

Tanto os sucos mistos como os sucos de beterraba apresentaram diferença total da cor (ΔE^*_{ab}), escurecimento (redução de L^*), aumento na cor vermelha (a^*) e redução na intensidade da cor amarela (b^*), após os 30 dias de armazenamento, indicando uma degradação das betalaínas. Porém, os sucos mistos de beterraba e laranja apresentaram menores alterações, onde SMBL 1:1 e SMBL 1:2 tiveram redução de 7% e 10% na intensidade de cor amarela e aumentaram a pureza da cor (Croma) de 22% e 27%, respectivamente, provavelmente pela estabilidade das betalaínas (Tabela 2 e 3).

Figura 2 - Diferença Total na Cor (ΔE^*_{ab}) de sucos armazenados a 4°C durante 30 dias.



SB (suco de beterraba *in natura*), SBP (suco de beterraba pasteurizado), SLP (suco de laranja pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado).

3.7. Análises Microbiológicas

Foi observada ausência de coliformes totais, coliformes termotolerantes e *Salmonella* sp. nos sucos no tempo 0.

3.8. Aceitação Sensorial

A aceitação dos consumidores em relação aos atributos de cor, aroma, sabor e aceitação global do suco de beterraba pasteurizado (SBP) e do suco misto de beterraba e laranja (SMBL) nas proporções 1:1 e 1:2 está apresentada na Tabela 8. Nota-se que valores hedônicos médios situaram-se entre 5,6 e 8,0, numa escala de nove pontos, exceto o sabor de SBP que recebeu nota 4,9, indicando aprovação dos sucos.

A aceitação do suco de beterraba pasteurizado (SBP) foi inferior aos sucos mistos em todos os atributos, com exceção do atributo cor, que não se diferenciou do SMBL 1:2.

O aroma, o sabor, e a aceitação global dos sucos mistos de beterraba e laranja nas duas proporções analisadas (1:1 e 1:2) tiveram maior aceitação, situando-se entre às categorias “gostei ligeiramente/gostei regularmente”. Ainda o suco SMBL 1:1 se destacou pela maior aceitação quanto a cor (gostaram muito). Estes resultados já eram esperados para ambas as amostras, pois no Brasil o suco de laranja é amplamente aceito pelo seu sabor conhecido e grande disponibilidade, ao contrário do suco de beterraba, onde apesar de ser uma raiz bastante cultivada e popular, o consumo é comum em saladas prontas e alimentos minimamente processados, não sendo utilizada na produção comercial de sucos e bebidas.

Uma alternativa, para aumentar a ingestão total de frutas e hortaliças é aumentar o consumo de bebidas à base da mistura de ambas, mas vale lembrar que para um produto ter boa aceitação no mercado consumidor, não basta que apresente nutrientes e compostos bioativos balanceados, é necessário também que o consumidor não o rejeite por causa de algum atributo sensorial, como sabor, gosto, aroma, textura e aparência.

No Reino Unido o número de sucos de hortaliças, e sucos com a mistura de frutas/hortaliças comercialmente disponíveis parece estar aumentando

segundo Wootton-Beard; Moran; Ryan (2011), entre eles tem tido grande destaque o suco de beterraba pelo seu alto poder antioxidante, mas no Brasil não há informações.

Atualmente, diversos estudos focam a capacidade antioxidante e benefícios do consumo de sucos de frutas e hortaliças, dentre eles o suco de beterraba (Ravichandran et al., 2012; Ravichandran et al. 2013; Wootton-Beard; Moran; Ryan 2011; Wootton-Beard; Ryan, 2011), porém não apresentam dados relativos à aceitação sensorial desses tipos de bebidas para consumo pela população.

Tabela 8 - Aceitação de atributos de sucos

Sucos	Cor	Aroma	Sabor	Aceitação Global
SBP	7,5 ± 1,8 ^b	5,9 ± 1,7 ^b	4,9 ± 2,2 ^b	5,6 ± 1,8 ^b
SMBL (1:1)	8,0 ± 0,9 ^a	6,6 ± 1,7 ^a	6,3 ± 1,7 ^a	6,8 ± 1,5 ^a
SMBL (1:2)	7,8 ± 1,1 ^{ab}	6,9 ± 1,9 ^a	6,6 ± 2,0 ^a	6,9 ± 1,8 ^a

Valores representam a média ± desvio padrão onde diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sucos para um mesmo atributo ou aceitação global. SBP (suco de beterraba pasteurizado), SMBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) pasteurizado) e SMBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) pasteurizado). 1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente.

4. CONCLUSÃO

O suco misto a base de beterraba e laranja, pode proporcionar aos consumidores uma fonte de compostos antioxidantes naturais e fitoquímicos bioativos, com boa aceitação. O suco de laranja ao ser adicionado ao suco de beterraba, possivelmente pela presença de seus ácidos orgânicos, contribui positivamente para a estabilidade das betalaínas, resulta em excelente potencial antioxidante e faz com que o suco misto adquira uma maior aceitação sensorial, quando comparado ao suco de beterraba pasteurizado.

REFERÊNCIAS

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

Association of Official Analytical Chemists, AOAC, **Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International**, v. 16, n. 2, 1997.

BARRERA, F., C. REYNOSO Y E. MEJÍA. Estabilidad de betalaínas extraídas del garmbullo (*Myrtillocactus geometrizans*). **Food Science and Technology International**, v. 4, p. 115–120, 1998.

BELTRÁN, F.; PÉREZ-LÓPEZ, A. J.; LÓPEZ-NICOLÁS, J. M.; CARBONELL-BARRACHINA, A. A. Color and vitamin C content in mandarin orange juice as affected by packaging material and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 33, p. 27-40, 2009.

BRANCO, I. G., SANJINEZ-ARGANDOÑA, E. J., SILVA, M. M., de PAULA, T. M. Avaliação sensorial e estabilidade físico-química de um *blend* de laranja e cenoura. **Revista de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 7-12, 2007.

BRAND-WILLIAMS, W., CUVELIER, M. E.,; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft & Technologie**, v. 28, n. 1, p. 25–30, 1995.

BRASIL, Vigitel Brasil 2011: Vigilância de Fatores de Risco e Proteção para Doenças Crônicas por Inquérito Telefônico. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – Brasília: Ministério da Saúde, Série G. **Estatística e Informação em Saúde**, p. 58-59, 2012.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173–289, 2000.

ESCRIBANO, J., GANDÍA-HERRERO, F., CABALLERO, N.,; PEDREÑO, M. A. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6123–6129, 2002.

GARDNER, P. T., WHITE, T. A. C., McPHAIL, D. B., DUTHIE, G.G. The relative contributions of vitamin C, carotenoids and phenolics to the antioxidant potential of fruit juices. **Food Chemistry**, v. 68, n. 4, p. 471-474, 2000.

GENTILE, C., TESORIERE, L., ALLEGRA, M., LIVREA, M. A., ALESSIO, P. D. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, p. 481–486, 2004.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A., WROBLEWSKA, J., LEMANSKA, K., KLIMCZAK, I.,; TYRAKOWSKA, B. The contribution of polyphenols and vitamin C to the antioxidant activity of commercial orange juices and drinks. **Proceedings of the 14th IGWT symposium focussing new century: commodity-trade environment**, p. 121–126, 2004.

- HAN, D.; KIM, S.J.; KIM, D.M. Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 69–72, 1998.
- HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalain stability and degradation — Structural and chromatic aspects. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 41–50, 2006 a.
- HERBACH, K.M.; STINTZING, F.C.; CARLE, R. Stability and color changes of thermally treated betanin, phyllocactin, and hylocerenin solutions. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, p. 390–398, 2006 b.
- KANNER, J., HAREL, S., GRANIT, R., Betalains. A new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, p. 5178–5185, 2001.
- KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153–161, 2002.
- OZGEN, M., REESE, R. N., TULIO, A. Z., SCHEERENS, J. C., MILLER, A. R. Modified 2, 2- azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n. 4, p. 1151–1157, 2006.
- PASCH, J.H.; von ELBE, J.H. Betanine stability in buffered solutions containing organic acids, metal cations, antioxidants, or sequestrants. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 72–74, 1979.
- PELLEGRINI, N. et al. Evaluation of antioxidant capacity of some fruit and vegetable foods: efficiency of extraction of a sequence of solvents. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 87, n. 1, p. 103-111, 2007.
- PITALUA, E., JIMENEZ, M., VERNON-CARTER, E. J., BERISTAIN, C. I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 253–258, 2010.
- RAIMUNDO, E.; KRUGER, R.; DI LUCCIO, M.; CICHOSKI, A. J. Cor, viscosidade e bactérias lácticas em suco de laranja pasteurizado e submetido ao efeito da luz durante armazenamento. **Alimentos e Nutrição**, v. 18, n. 4, p. 449-456, 2007.
- RAVICHANDRAN, K., AHMED, A. R., KNORR, D., SMETANSKA, I., The effect of different processing methods on phenolic acid content and antioxidant activity of red beet. **Food Research International**, v. 48, p. 16–20, 2012.
- RAVICHANDRAN, K., SAW, N. M. M. T., MOHDALY, A. A. A., GABR, A. M. M., KASTELL, A., RIEDEL, H., CAI, Z., KNORR, D., SMETANSKA, I., Impact of processing of red beet on betalain content and antioxidant activity. **Food Research International**, v. 50, p. 670–675, 2013.

RYAN, L.; PRESCOTT, S. L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 45, n. 6, p. 1191–1197, 2010.

REDDY, K. M., RUBY, L., LINDO, A., NAIR, G. M. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumor cells proliferation by natural food color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9268–9273, 2005.

SHENOY, S. F., KAZAKS, A. G., HOLT, R. R., CHEN, H. J., WINTERS, B. L., KHOO, C. S. The use of a commercial vegetable juice as a practical means to increase vegetable intake: a randomized controlled trial. **Nutrition Journal**, v. 9, p. 38–49, 2010.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 317, 2007.

SOUZA, M. C. C.; BENASSI, M. T.; MENEGHEL, R. F. A.; SILVA, R. S. S. F. Stability of Unpasteurized and Refrigerated Orange Juice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n. 3, p. 391-397, 2004.

SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants**, Part A, v. 299, p. 152–178, 1999.

SPINOLA, V.; BERTA, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.

STINTZING, F. C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. **European Food Research and Technology**, v. 216, p. 303–311, 2003.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 19–38, 2004.

STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalains – emerging prospects for food scientists. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, p. 514–525, 2007.

STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247–269, 2003.

TAJKARIMI, M. M.; IBRAHIM, S. A.; CLIVER, D. O. Antimicrobial Herb and Spice Compounds in Food. **Food Control**, Guildford, v. 21, p. 1199-1218, 2010.

TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix-Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 2, p. 12-25, 2012.

TAVARES, M. F. F. O Mercado futuro de suco de laranja concentrado e congelado: Um enfoque analítico. **Centro de estudos e pesquisa em agronegócios (CEPAN)**. p. 200- 279, 2006.

TIVELLI S. W.; FACTOR T. L.; TERAMOTO J. R. S.; FABRI E. G.; MORAES A. R. A.; TRANI P. E.; MAY A. Beterraba: do Plantio à Comercialização. **Boletim Técnico Instituto Agrônomo Campinas**, Brasil, v. 210, p. 45, 2011.

VAILLANT, F., PEREZ, A., DAVILA, I., DORNIER, M.; REYNES, M. Colourant and antioxidant properties of red-purple pitahaya (*Hylocereus* sp.) **Fruits**, v. 60, p. 1–10, 2005.

VINSON, J. A., HAO, Y., SU, X.; ZUBIK, L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 46 n. 9, p. 3630–3634, 1998.

VINSON, J. A., SU, X. H., ZUBIK, L., BOSE, P. Phenol antioxidant quantity and quality in foods: Fruits. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 49, n. 11, p. 5315–5321, 2001.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion as measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, p. 217–224, 2011.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 329 – 334, 2011 a.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. Improving public health?: The role of antioxidant-rich fruit and vegetable beverages. **Food Research International**, v. 44, p. 3135 – 3148, 2011 b.

ZITNANOVA, I., RANOSTAJOVA, S., SOBOTOVA, H., DEMELOVA, D., PECHAN, I.; DURACKOVA, Z. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. **Biologia**, v. 61, p. 279–284, 2006.

ZOU, D., BREWER, M., GARCIA, F., FEUGANG, J. M., WANG, J., ZANG, R., et al. Cactus pear: A natural product in cancer chemoprevention. **Nutrition Journal**, v. 4, p. 25-30, 2005.

6.2 ARTIGO CIENTÍFICO 2

Adição de *L. acidophilus* em suco misto de beterraba e laranja: estabilidade do produto e viabilidade do probiótico sob armazenamento refrigerado

Resumo

O objetivo deste estudo foi avaliar a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus*, em duas formulações de suco misto de beterraba e laranja (1:1 e 1:2 v/v). Avaliaram-se as alterações do pH, acidez total titulável, °Brix, conteúdo de betalaínas, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante em DPPH e ABTS, parâmetros de cor, viabilidade do microrganismo durante o armazenamento refrigerado (4 °C/28 dias), aceitação sensorial e intenção de compra. As características físico-químicas e atividade antioxidante dos sucos mistos probióticos não sofreram alterações indesejáveis durante armazenamento. O número de probióticos viáveis nos sucos manteve-se dentro do estabelecido pelo regulamento brasileiro de alimentos funcionais. A manutenção da viabilidade probiótica possivelmente ocorreu pela presença de compostos antioxidantes (betalaínas, ácido ascórbico e compostos fenólicos) encontrados em ambos os sucos mistos de beterraba e laranja. Os sucos apresentaram boa aceitação sensorial e intenção de compra, se destacando positivamente a cor do produto. O suco misto de beterraba e laranja é um meio adequado para manter a viabilidade de *L. acidophilus* durante armazenamento refrigerado com tempo de vida útil de 28 dias.

Palavras-chave: betalaínas, ácido ascórbico, antioxidantes, aceitação, funcional

1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (FAO/WHO, 2002). Podem exercer alguns efeitos benéficos, incluindo a prevenção ou o tratamento de infecções intestinais, síndrome do intestino irritável e doença inflamatória do intestino, a estimulação do sistema imunológico, controle dos

níveis de colesterol no sangue, e prevenção de alergias atópicas (GIONCHETTI et al, 2002; KAJANDER et al, 2005; SAGGIORO, 2004).

Em particular *Lactobacillus* e *Bifidobacterium spp.*, são encontrados em leites fermentados e iogurtes comerciais, e devido à sua fisiologia, são muito bem adequados a este tipo de matrizes alimentares. No entanto, estudos recentes têm sugerido sucos e néctar de frutas como um veículo alternativo para a incorporação de probióticos, por não conterem qualquer alérgeno lácteo que possa impedir o uso por determinados segmentos da população (PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011; PIMENTEL et al., 2015; OKINA, 2014; COSTA et al., 2013; ANTUNES et al., 2013).

Sucos de frutas e/ou hortaliças são alimentos ricos em minerais e vitaminas, fibras alimentares, polifenóis, antioxidantes e elevadas quantidades de açúcares, que podem estimular o crescimento de microrganismos probióticos. Além disso, não contêm culturas iniciadoras, que competem por nutrientes com os probióticos, e possuem perfis de sabor que agradam a todos os grupos etários, sendo percebidas como saudáveis e refrescantes (SOCCOL et al., 2010; TUORILA; CARDELLO, 2002; DING; SHAH, 2008). Adição de probióticos em bebidas a base de frutas e hortaliças é mais complexa do que em produtos lácteos, devido ao baixo pH dos sucos e quantidades insuficientes de alguns dos pequenos peptídeos e aminoácidos livres necessários para crescimento dos probióticos (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008).

A viabilidade de bactérias probióticas é de suma importância para a comercialização do alimento funcional probiótico (KAILASAPATHY, 2006). No Brasil, os alimentos funcionais são regulamentados pela ANVISA (Agência Nacional de Vigilância Sanitária), e estipula que a quantidade mínima viável de cultura probiótica deve estar entre 10^8 e 10^9 UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por porção diária do produto e a espécie do microrganismo deve estar indicada no rótulo do produto (ANVISA, 2002).

Suco de beterraba é uma alternativa conveniente para o consumo deste vegetal que contém compostos benéficos à saúde, tais como potássio, magnésio, ácido fólico, ferro, zinco, cálcio, fósforo, sódio, niacina, biotina, B6, fibra solúvel, além de ser uma fonte rica em compostos polifenólicos (KAUR ; KAPOOR, 2002; WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011, WOOTTON-BEARD et al., 2011; PITALUA et al., 2010). A cor intensa e atraente da beterraba e seus produtos é devido à

presença de pigmentos naturais hidrossolúveis chamados betalaínas (DELGADO-VARGAS, JIMÉNEZ,; PAREDES-LÓPEZ, 2000; STINTZING; CARLE, 2004). Estes pigmentos, além de fornecerem cor à beterraba, são importantes substâncias antioxidantes, benéficos à saúde, com efeitos antimicrobianos, antivirais (KANEER et al., 2001, STRACK et al, 2003), anti-inflamatórios, anti-radicais (GENTILE et al., 2004) na inibição da proliferação de células de tumores humanos (REDDY et al., 2005).

Suco de laranja é amplamente consumido pelos brasileiros, devido ao seu baixo custo de produção, ótima aceitabilidade e suas propriedades nutricionais (vitamina B, potássio, fibras e vitamina C). Estudos relataram que, alimentos funcionais à base de suco de frutas com altos níveis de compostos antioxidantes e vitamina C, podem promover um ambiente mais favorável para as bactérias probióticas durante o armazenamento, presumivelmente pela remoção de oxigênio, promovendo, assim, um ambiente anaeróbico mais favorável (DING; SHAH, 2008; TEIXEIRA et al. 1995; DAVE; SHAH, 1997).

O objetivo deste estudo foi desenvolver uma bebida funcional probiótica a base de suco misto de beterraba e laranja adicionado de *Lactobacillus acidophilus*, avaliar a aceitação e a estabilidade do produto durante o período de vida útil de 28 dias sob armazenamento refrigerado (4 °C), quanto à sobrevivência da bactéria probiótica, valores de pH, acidez titulável total, sólidos solúveis totais (°Brix), conteúdo de betalaínas, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, capacidade antioxidante e avaliação da cor.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1. Matérias-primas

As beterrabas frescas foram obtidas na CEASA (Central de Abastecimento do Paraná S.A.) na cidade de Londrina, Brasil. O suco de laranja utilizado foi um concentrado comercial com 66°Brix, sem açúcar e conservante adquirido em supermercado na mesma cidade.

2.2. Extração do Suco de Beterraba

As beterrabas frescas foram lavadas com água potável, sanitizadas por 30 minutos em água clorada (150 mg/L de hipoclorito de sódio Dinâmica, Brasil), enxaguadas com água potável e descascadas manualmente. Em seguida o suco puro foi obtido por meio de centrífuga doméstica (Mondial, Brasil).

2.3. Preparo do Suco de Laranja

O suco concentrado de laranja (66°Brix) foi diluído com água esterilizada na proporção de 1:6 (v/v), conforme recomendação do fabricante, até o valor de sólidos solúveis próximo de 12°Brix.

2.4. Preparo do Suco Misto de Beterraba e Laranja

A partir do extrato puro de beterraba e suco diluído de laranja foram preparados os sucos mistos em duas proporções, 1:1 e 1:2 (v/v), respectivamente.

2.5. Pasteurização e Adição de Probiótico no Suco Misto

Os sucos foram pasteurizados em banho-maria a 70 °C/30 min e logo após o tratamento térmico, a cultura de *Lactobacillus acidophilus* LA-05 (Christian Hansen, Dinamarca) liofilizada e de uso direto, foi dissolvida assepticamente aos sucos mistos de beterraba e laranja na proporção de 0,2% (p/v)

2.6. Armazenamento dos Sucos

Os sucos mistos adicionados de *Lactobacillus acidophilus* foram envasados em frascos de vidro transparentes estéreis de 50 mL para estudo da estabilidade durante armazenamento refrigerado (4 °C) por 28 dias quanto a viabilidade dos microrganismos probióticos, valores de pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais (°Brix), conteúdo de betalaínas, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais, atividade antioxidante e cor. As amostras foram

codificadas como: suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico (SMPBL 1:1) e suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico (SMPBL 1:2).

As análises foram realizadas nos tempos: 1, 7, 14, 21, e 28 dias de armazenamento.

2.7. Avaliações Físico-químicas

A determinação de pH das amostras foi realizada em potenciômetro digital (Tecnal, Brasil) previamente calibrado com tampões fosfato (Synth, Brasil) pH 4,0 e 7,0. A acidez foi medida por meio de titulação com solução de NaOH (Anidrol, Brasil) 0,01 mol/L até pH 8,2 e expressa em ácido cítrico, conforme AOAC, 1997. Os sólidos solúveis totais (SST) foram medidos em refratômetro digital PAL-1 Pocket Atago, China, com resolução de 0,1 °Brix.

2.8. Determinação de Ácido Ascórbico por CLAE

O teor de ácido ascórbico foi determinado adaptando-se as condições sugeridas por Souza et al. (2004). As amostras de sucos foram preparadas pela dissolução em ácido metafosfórico 3% e filtradas em membrana hidrofílicas de PVDF com 0,22 µm de tamanho de poro (Millex-GV, Millipore, USA). O sistema cromatógrafo (Shimadzu, Japão) consistiu de duas bombas (modelo LC-10AD), válvula injetora Rheodyne com alça de amostragem de 20 µL, forno para coluna (modelo CTO-20A), detector espectrofotométrico UV/visível (modelo SPD-10A), interface (modelo CBM-101), e o programa CLASS-CR10, versão 1.2 (Shimadzu, Japão). Foi empregada uma coluna Spherisorb ODS1 (4,6 x 250mm, 5µm) (Waters, Irlanda). A análise foi realizada em temperatura ambiente, eluição isocrática (0,5 mL/min) com solução de ácido sulfúrico pH 2,5 como fase móvel. A detecção do ácido ascórbico foi feita a 254 nm, a identificação baseando-se nos tempos de retenção e co-eluição com padrões e a quantificação, por padronização externa usando curva de calibração com seis pontos (medida em duplicada) na faixa de concentração de 5 a 50 µg/mL.

2.9. Determinação de Betalaínas

Para extração das betalaínas, alíquotas de 1 mL de amostra foram dissolvidas em 30 mL de água destilada por agitação manual durante 10 segundos e a mistura foi centrifugada (25 °C) por 6000 x g durante 20 minutos. (Eppendorf centrifuge 5804R, Alemanha). Os teores de betaxantinas e betacianinas nos sobrenadantes de cada amostra foram analisados espectrofotometricamente, por meio de leitura de absorvância a 476 nm e 538 nm em espectrofotômetro de UV-VIS (Biochrom Libra S22, Inglaterra) respectivamente, além da leitura a 600 nm para correção de possíveis impurezas (turbidez), de acordo com os métodos de Stintzing, Schieber; Carle (2003), com algumas modificações. O conteúdo de betalaína (BC), expresso em mg/mL de suco, foi calculado a partir da equação = $[(A \times FD \times PM \times 100) / (\epsilon \times l)]$, em que A é a diferença entre a absorção máxima (476 ou 538 nm) e a absorção de correção em 600 nm, FD o fator de diluição e l o comprimento da trajetória na cubeta (1 cm). Para a quantificação da betacianinas e betaxantinas, as massas moleculares (MM) e absorvidade molar (ϵ) são MM = 550 g/mol, ϵ = 60.000 L/mol cm em H₂O e MM = 308 g/mol, ϵ = 48,000 L/mol cm em H₂O, respectivamente.

2.10. Determinação do Teor de Compostos Fenólicos Totais

Os compostos fenólicos foram determinados nos sucos em cada tempo de armazenamento, utilizando o método de Folin Ciocalteu , conforme descrito por Singleton; Orthofer; Lamuela-Raventos (1999). Uma alíquota (0,2 mL) de cada amostra foi adicionada a 1,5 mL de solução aquosa de Folin Ciocalteu (1:10 v/v). A mistura foi deixada em equilíbrio por 5 minutos e, em seguida, misturada com 1,5 mL de uma solução de carbonato de sódio 60 g/L. Após, foi feita incubação à temperatura ambiente durante 90 min e a absorvância da mistura foi lida a 725 nm em espectrofotômetro UV-VIS, utilizando o respectivo solvente como o branco. Os resultados foram expressos em μ g de equivalentes de ácido gálico (μ g EAG/100 mL).

2.11. Atividade Antioxidante Avaliada pelo Sequestro do Radical Livre DPPH

A capacidade antioxidante total foi avaliada pelo método DPPH conforme Brand-Williams, Cuvelier; Berset (1995), com algumas modificações. Neste método, a capacidade antioxidante foi medida pela capacidade da amostra em doar íons hidrogênio ao radical livre 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH) relativamente estável. Em um tubo de ensaio foram misturados 1 mL de tampão acetato de sódio 100 mM em pH 5,5, 1 mL de etanol absoluto, 0,5 mL de solução etanólica de DPPH 250 $\mu\text{mol.L}^{-1}$ e 50 μL de cada amostra. Os tubos de ensaio contendo as misturas foram mantidos a temperatura ambiente por 30 minutos no escuro e, posteriormente, a absorvância das soluções lidas a 517 nm em espectrofotômetro UV-VIS. A quantificação da atividade antioxidante das amostras foi realizada por meio de uma curva padrão de Trolox e os resultados expressos em μmol de Trolox por mililitros de amostra, ou μmol de Trolox/mL.

2.12. Atividade Sequestradora do Cátion Radical ABTS+

A atividade antioxidante também foi analisada pela capacidade da amostra de eliminar os radicais livres ABTS empregando-se a metodologia modificada relatada por Ozgen et al. (2006). Quando combinado com um oxidante (persulfato de potássio 2,45 mM), o ABTS (7 mM em tampão fosfato 20 mM, pH 7,4) reage para criar uma solução radical estável, azul escuro esverdeada após 12-16 horas de incubação no escuro. A solução foi então diluída até uma absorvância de $0,7 \pm 0,01$ em 730 nm, para formar o reagente teste. As misturas reacionais contendo 10 μL de amostra e 4 mL de reagente teste foram incubadas em temperatura ambiente por 6 min. A atividade antioxidante foi calculada em relação a uma curva padrão de Trolox e expressa em μmol de Trolox por mililitros de amostra, ou μmol de Trolox/mL.

2.13. Análise de Cor

A análise de cor foi realizada em colorímetro Konica Minolta CR 400, conforme descrito por Antunes et al. (2013). As especificações empregadas foram: área de leitura 11 mm, iluminante CIE D 65, iluminação em ângulo de 45°,

ângulo de observação de 0° e observador padrão CIE 10°. As amostras foram acondicionadas em cubeta de vidro (acessório CR – A103) apropriada para leitura colorimétrica de líquidos do aparelho. Foram fornecidos os parâmetros L* (luminosidade), a* (verde - vermelho), b* (azul - amarelo) e Croma (saturação da cor). A partir dos parâmetros L*, a* e b* foi calculada a diferença total de cor (ΔE^*_{ab}) entre cada amostra em um determinado tempo e a amostra no tempo zero de armazenamento, da seguinte forma: $\Delta E^*_{ab} = [(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2]^{1/2}$ e a tonalidade cromática (h^0), calculada como: $h^0 = \arctan (b^*/a^*)$, sendo que, 0° = vermelho puro, 90° = amarelo puro, 180° = verde puro e 270° = azul puro.

2.14. Avaliações Microbiológicas

Para garantir a segurança microbiológica dos sucos contendo *L. acidophilus* para análise sensorial, foram realizadas análises de coliformes totais, coliformes termotolerantes, bolores, leveduras e *Salmonella* sp., conforme SILVA, JUNQUEIRA; SILVEIRA (2007).

A análise da viabilidade do *L. acidophilus* dos sucos mistos probióticos durante armazenamento refrigerado (4 °C) foi realizada através da retirada de alíquotas de 1 mL das amostras, diluídas em 9 mL água peptonada 0,1% (p/v) (Difco™, França) esterilizada e agitadas com agitador (Labdancer, IKA, Alemanha). O plaqueamento foi realizado em profundidade com ágar MRS (Neogen Corporation, EUA) e a incubação anaeróbica (Anaerobac, Probac, Brasil) a 37°C por 72 hrs, conforme Ding; Shah (2008).

2.15. Análise Sensorial

A análise sensorial foi realizada nos sucos SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2 no 5º dia de armazenamento. O teste de aceitação de atributos (cor, aroma, sabor e impressão global) foi conduzido com escala hedônica estruturada de nove pontos (1 = desgostei extremamente e 9 = gostei extremamente). Juntamente com o teste de aceitação foi aplicado o teste de intenção de compra no qual se utilizou uma escala de 5 pontos com variações de “definitivamente não compraria” a “definitivamente compraria”

As amostras, codificadas com números de três dígitos ao acaso, foram apresentadas em taças de acrílico e a temperatura de 10 °C em ordem aleatória aos julgadores. A equipe sensorial contou com 74 julgadores não treinados, consumidores habituais de suco de frutas. O projeto foi aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Estadual de Londrina, parecer CEP/UEL 342/2011, nº CAAE 0319.0.268.000-11.

2.16. Delineamento Experimental e Análise Estatística

O experimento físico-químico e de viabilidade do probiótico foi conduzido de acordo com o delineamento de parcelas subdivididas, sendo os sucos mistos probióticos (SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2) o tratamento principal e o tempo de armazenamento o tratamento secundário. O experimento foi repetido três vezes. Em cada repetição do experimento, as análises foram realizadas em triplicata. O experimento sensorial seguiu delineamento de blocos completos casualizados, onde os tratamentos foram os sucos e os blocos os julgadores. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e teste de comparação de médias Tukey ($p < 0.05$). As análises estatísticas foram realizadas usando o programa Statistical Analysis System versão 9.1.3. (SAS, 2009).

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1. Características Físico-químicas

Os sólidos solúveis totais (°Brix), a acidez titulável total e o pH dos sucos mistos probióticos estão apresentados na Tabela 1. Os sólidos solúveis totais durante os 28 dias de armazenamento no SMPBL 1:1 não mostraram alteração (valor médio de 8,83 °Brix), já no SMPBL 1:2 teve um aumento de 9,14 para 9,28 °Brix. A acidez titulável diminuiu de 0,43 para 0,42% no SMPBL 1:1 e de 0,56 para 0,53% no SMPBL 1:2 e o pH aumentou em ambas as amostras, de 4,11 para 4,19 no SMPBL 1:1 e de 3,98 para 4,04 no SMPBL 1:2. Esses resultados indicam que não houve consumo dos açúcares disponíveis e produção de ácido lático pelo crescimento da cultura probiótica nos sucos mistos analisados, o que era esperado no estudo, já que os *Lactobacillus acidophilus* foram adicionados para que não

houvesse fermentação, e a multiplicação dos microrganismos não ocorresse durante armazenamento na temperatura de 4°C, sendo apenas mantida sua viabilidade nos 28 dias.

Tabela 1- Acidez, pH e sólidos solúveis (°Brix) de sucos mistos de beterraba e laranja probióticos armazenados a 4 °C durante 28 dias

	Tempo (dias)	Amostras	
		SMPBL 1:1	SMPBL 1:2
Acidez titulável (% ácido cítrico)	1	0,43 ± 0,01 ^{aB}	0,56 ± 0 ^{aA}
	7	0,42 ± 0,01 ^{bB}	0,55 ± 0,01 ^{bA}
	14	0,42 ± 0 ^{bB}	0,52 ± 0,01 ^{dA}
	21	0,42 ± 0 ^{bB}	0,53 ± 0 ^{cA}
	28	0,42 ± 0 ^{bB}	0,53 ± 0 ^{cA}
pH	1	4,11 ± 0,01 ^{dA}	3,98 ± 0,01 ^{dB}
	7	4,25 ± 0 ^{aA}	4,14 ± 0 ^{aB}
	14	4,16 ± 0,01 ^{cA}	4,04 ± 0,01 ^{cB}
	21	4,19 ± 0 ^{bA}	4,05 ± 0 ^{bB}
	28	4,19 ± 0 ^{bA}	4,04 ± 0 ^{cB}
Sólidos solúveis Totais (°Brix)	1	8,81 ± 0,09 ^{bB}	9,14 ± 0,11 ^{cA}
	7	8,87 ± 0,05 ^{abB}	9,19 ± 0,11 ^{bcA}
	14	8,72 ± 0,10 ^{cB}	9,18 ± 0,20 ^{bcA}
	21	8,93 ± 0,09 ^{aB}	9,26 ± 0,09 ^{abA}
	28	8,84 ± 0,05 ^{bB}	9,28 ± 0,07 ^{aA}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa (p<0,05) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa (p<0,05) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

Conforme Qizhou et al. (2009) e Faria et al. (2006), a adição de cultura probiótica difere da produção uma bebida fermentada, onde ocorre um grande aumento na acidez e redução no pH durante o processo de fermentação e durante o armazenamento. No estudo de Okina (2014), a adição de *Lactobacillus paracasei* em suco integral de uva apresentou um aumento da acidez titulável, ainda que sem alteração dos sólidos totais e pH durante o armazenamento a 4 °C por 28 dias, indicando que o microrganismo teve baixa habilidade em produzir ácido, não alterando significativamente o pH.

Em néctar de pêssigo (PIMENTEL; PRUDENCIO; RODRIGUES, 2011) e em suco de maçã clarificado (PIMENTEL et al., 2015), a adição de *L. paracasei*, resultou na redução de pH e sólidos solúveis e aumento na acidez durante armazenamento refrigerado (4°C/ 28 dias), onde, de acordo com os autores, os açúcares presentes nas bebidas (adicionado ou naturais) podem ter sido

metabolizados pelos microrganismos para a sua sobrevivência e, como consequência, houve uma pequena produção de ácidos orgânicos.

Champanhe; Gardner (2008) estudaram a estabilidade de armazenamento a 4 °C, de 9 estirpes de lactobacilos probióticos em bebida a base de 10 ingredientes de fruta e produtos lácteos, e observaram que o pH permaneceu inalterado após 28 dias de armazenamento, indicando que os lactobacilos têm baixa atividade metabólica a 4 °C.

3.2. Teor de ácido ascórbico

O teor de ácido ascórbico nos sucos mistos probióticos está apresentado na Figura 1. O teor de ácido ascórbico dos dois sucos mistos apresentou um declínio durante o estudo. O suco SMPBL 1:1 apresentou uma diminuição de 50% no teor de ácido ascórbico nos primeiros 7 dias, enquanto que o SMPBL 1:2 não apresentou perda significativa ($p < 0,05$) no teor de ácido ascórbico (20,16 mg/100mL) até 21 dias de armazenamento refrigerado. Em ambos os sucos houve esgotamento total do ácido ascórbico ao final dos 28 dias de armazenamento a 4°C.

A estabilidade do ácido ascórbico, segundo Oliveira (2010), está sujeita a perdas significativas ao longo do armazenamento ou do processamento, sendo oxidado (química ou enzimaticamente) a ácido deidroascórbico, que apresenta atividade vitamínica, mas que é ainda menos estável e sofre oxidação a ácido dicetogulônico, que se degrada em diferentes produtos, como: ácido oxálico, ácido xilônico e xilose.

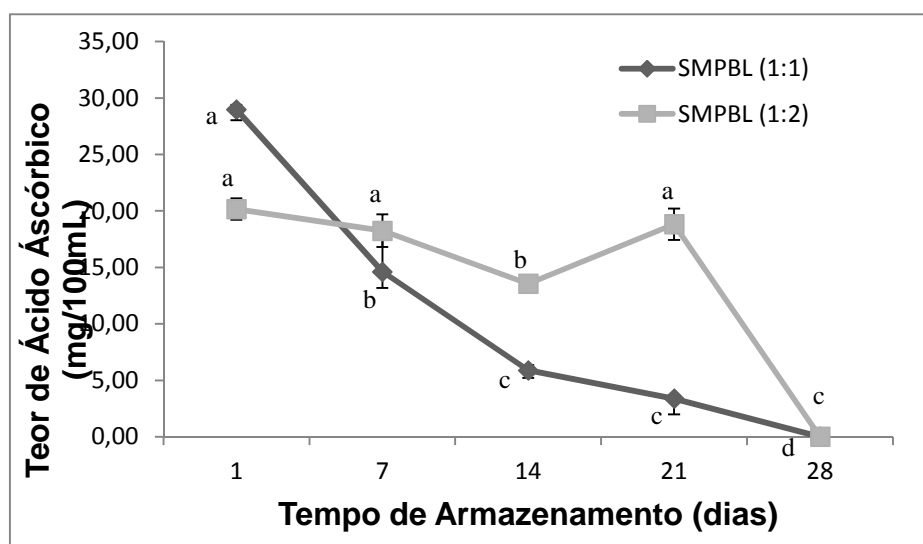
Sabendo-se que diversos fatores afetam a estabilidade do ácido ascórbico durante o armazenamento, incluindo o pH do meio, a presença de oxigênio e de íons metálicos, e a temperatura (TARRAGO - TRANI et al., 2012; SPINOLA et al., 2013), a diferença encontrada na estabilidade do ácido ascórbico nos sucos mistos estudados, provavelmente se deve à diferença de acidez e pH entre as amostras, visto que as condições de processamento e armazenamento dos sucos mistos probióticos foram iguais.

Comparando o conteúdo de ácido ascórbico nos sucos mistos probióticos SMBPL 1:1 (3,38 mg/100mL) e SMPBL 1:2 (18,83 mg/100mL), no tempo de 21 dias de armazenamento a 4°C, com os valores encontrados em Porto et al.

(2015, artigo 1) para os sucos mistos de beterraba e laranja sem adição de probiótico, de SMBL 1:1 com perda total e SMBL 1:2 com 5 mg/100mL restantes em 15 dias, percebe-se, que a adição do *Lactobacillus acidophilus* permitiu a manutenção do conteúdo de ácido ascórbico nos sucos mistos por um período maior de armazenamento refrigerado. No entanto, não há nenhuma informação sobre o papel dos probióticos na estabilidade de vitaminas, apenas estudos de como a suplementação vitamínica melhora a sobrevivência do probiótico, onde estudos demonstraram que a vitamina C pode ser benéfica para a sobrevivência probiótico durante o armazenamento, presumivelmente porque é um eliminador de oxigênio, promovendo, assim, um ambiente anaeróbio mais favorável (TEIXEIRA et al., 1995; DAVE; SHAH, 1997, DING; SHAH et al., 2010).

A Ingestão Diária Recomendada (IDR) de vitamina C varia conforme a idade e condições de saúde. De acordo com a RDC nº 269 da ANVISA, a recomendação de ingestão de vitamina C é de 45 mg/ dia (BRASIL, 2005). Assim, mesmo com a perda após 21 dias de armazenamento refrigerado, para adquirir 89,6% da quantidade diária necessária de vitamina C, considerando a legislação brasileira e os resultados obtidos, basta ingestão de 200 mL de SMPBL 1:2.

Figura 1 - Conteúdo de Ácido Ascórbico (mg/100mL) em sucos armazenados a 4°C durante 28 dias.



Valores representam a média \pm desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

3.3. Conteúdo de Betalaínas (Betacianinas e Betaxantinas)

O conteúdo de betalaínas nos sucos mistos de beterraba e laranja adicionados de probiótico está apresentado na Tabela 2.

Em beterraba, as betalaínas compreendem dois grupos principais: betaxantinas (por exemplo, vulgaxantina I e II) e betacianinas (por exemplo, betanina e isobetanina), que são responsáveis pelos tons de amarelo e vermelho-violeta, respectivamente (GLISZCZYNSKA-SWIGLO; SZYMUSIAK; MALINOWSKA, 2006; KANNER; HAREL; GRANIT, 2001); destes, betanina, isobetanina e vulgaxantina-I representam cerca de 95% dos pigmentos da beterraba (NILSSON, 1970; WILEY; LEE, 1978).

A concentração inicial de betacianinas de 20,57 mg/100 mL no SMPBL 1:1 e de 13,45 mg/100 mL no SMPBL 1:2 se mantiveram estáveis, visto que não houve diferença ($p < 0,05$) em relação aos valores encontrados no 28º dia de armazenamento. No entanto, os sucos mistos apresentaram redução do conteúdo das betaxantinas de 9,11 para 8,19 mg/100 mL no SMPBL 1:1, e de 6,17 para 5,19 mg/100 mL no SMPBL 1:2 ao final do armazenamento. Com relação à estrutura química, pesquisadores já haviam relatado que betacianinas demonstraram ser mais estáveis do que as betaxantinas à temperatura ambiente e após aquecimento SAPERS; HORNSTEIN, (1979) SINGER; von ELBE, (1980) e HERBACH et al., (2004).

Durante processamento de beterrabas, as betalaínas são liberadas do seu compartimento de proteção (vacúolos) e sua estabilidade é afetada por vários fatores, tais como o pH, atividade da água, exposição à luz, oxigênio, íons metálicos, temperatura e atividade enzimática (DELGADO-VARGAS et al., 2000; HERBACH et al., 2006; STINTZING; CARLE, 2004).

No presente trabalho não ocorreu a degradação das betacianinas durante os 28 dias de armazenamento refrigerado (4 °C) nos sucos mistos probióticos, provavelmente pela contribuição da laranja, ao reduzir o pH dos sucos, além da presença de ácido ascórbico (pró-antioxidante) e ácido cítrico (agente quelante).

Tabela 2 - Conteúdo de Betacianinas (mg/100mL) e Betaxantinas (mg/100mL) em sucos mistos probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias

	Tempo (dias)	Amostras	
		SMPBL 1:1	SMPBL 1:2
Betacianinas (mg/100mL)	1	20,57 ± 0,41 ^{aA}	13,45 ± 0,32 ^{bcB}
	7	19,85 ± 1,30 ^{bA}	13,67 ± 0,07 ^{bB}
	14	20,93 ± 0,50 ^{aA}	13,91 ± 0,13 ^{abB}
	21	19,87 ± 0,55 ^{bA}	13,34 ± 0,13 ^{bcB}
	28	20,66 ± 0,82 ^{aA}	12,92 ± 0,56 ^{cbB}
Betaxantinas (mg/100mL)	1	9,11 ± 0,20 ^{aA}	6,17 ± 0,17 ^{abB}
	7	8,43 ± 0,61 ^{bA}	5,91 ± 0,03 ^{abB}
	14	8,48 ± 0,21 ^{bA}	5,75 ± 0,06 ^{bB}
	21	7,75 ± 0,20 ^{cA}	5,25 ± 0,05 ^{cbB}
	28	8,19 ± 0,62 ^{bA}	5,09 ± 0,21 ^{cbB}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

Attoe; von Elbe (1985) demonstraram que a adição de ácido ascórbico em extratos de beterraba mostrou efeitos benéficos na estabilidade das betalaínas e alguns estudos relataram que a adição do ácido ascórbico antes do processamento protege tais pigmentos mais do que quando adicionados após processamento (BILYK; HOWARD, 1982; HAN et al., 1998) e concluíram que o ácido ascórbico não só ajuda na regeneração do pigmento, como exerce um efeito protetor durante o processamento, como a prevenção da degradação térmica do pigmento (HERBACH et al, 2006; HERBACH et al., 2006).

Na extração de betaninas, para maximizar o rendimento e manter os pigmentos estáveis, diversos pesquisadores utilizam o ácido ascórbico como antioxidante na remoção do oxigênio e controle da atividade das enzimas polifenoloxidasas, quando o pH do meio de extração foi maior do que 3,5 (MCEVILY; IYENGAR, 1992; CHETANAH; NAYAK; RAGHAVARAO, 2007; LÓPEZ et al., 2009; CARDOSO-UGARTE et al., 2014).

Além dos efeitos do pH, ácido ascórbico e ácido cítrico, a adição dos *Lactobacillus acidophilus* (bactérias microaerófilas), pode ter contribuído para a exclusão de oxigênio dos sucos. Há poucos relatos na literatura sobre o efeito de culturas probióticas na estabilidade das betalaínas. Klewicka & Czyżowska (2011) analisaram o conteúdo de betalaínas em suco de beterraba fermentado com as bactérias probióticas *Lactobacillus brevis* 0944 e *Lactobacillus paracasei* 0920 em

armazenamento a 4°C por 180 dias, e observaram estabilidade dos pigmentos vermelhos até 30 dias de armazenamento.

3.4. Teor de Compostos Fenólicos Totais e Atividade Antioxidante Avaliada pelo Sequestro do Radical Livre DPPH e Radical ABTS+

O teor de compostos fenólicos totais e a atividade antioxidante pelos métodos DPPH e ABTS, nos sucos mistos probióticos durante os 28 dias de armazenamento refrigerado (4 °C), estão apresentados na Tabela 3.

Os sucos mistos probióticos apresentaram diferença no teor de compostos fenólicos totais, sendo de 818 µg EAG/ mL no SMPBL 1:1 e de 873 µg EAG/ mL no SMPBL 1:2. Não há relatos em pesquisas anteriores do teor de compostos fenólicos em sucos mistos de beterraba e laranja, mas Wootton-Beard; Ryan (2011) ao quantificar o conteúdo de fenóis totais de 23 sucos (tomate, cenoura, beterraba, sucos mistos de frutas e/ou hortaliças) comercializados no Reino Unido concluíram que todos eram fontes significativas, se destacando entre as amostra, o suco de beterraba com uma maior quantidade de compostos fenólicos totais.

Durante o armazenamento, o teor de compostos fenólicos totais do SMPBL 1:1 aumentou para 942 µg EAG/ mL, enquanto que no SMPBL 1:2 o teor foi reduzido em 14%, resultando em 797 µg EAG/ mL ao final dos 28 dias. Isto indica que as condições de processamento e acondicionamento dos sucos mistos probióticos não acelerou a destruição dos ácidos fenólicos, que são sensíveis à oxidação e à degradação, a exposição à luz, oxigênio e calor (HAN; KOH, 2011).

Os compostos fenólicos, substâncias que possuem um anel aromático com um ou mais grupos hidroxilas, são importantes constituintes de muitas frutas e hortaliças sendo que a quantificação dos mesmos revela informações a respeito da atividade antioxidante, qualidade dos alimentos e dos potenciais benefícios à saúde (TALCOTT et al, 2003). Na beterraba, o ácido 4-hidroxibenzóico é o principal ácido fenólico, seguido pelo ácido cinâmico, vanílico, clorogênico, ácido trans ferúlico e ácido caféico (WOOTTON-BEARD et al., 2011).

Com relação à atividade antioxidante, os resultados encontrados para os sucos mistos probióticos, pelos métodos DPPH e ABTS, estão apresentados na Tabela 3. Em ambos os métodos, os sucos mistos probióticos demonstraram alta

atividade antioxidante, sendo no método DPPH, valores de 1514 µg de Trolox / mL para SMPBL 1:1 e 1250 µg de Trolox / mL para SMPBL 1:2 e no método de atividade antioxidante por ABTS, valores de 1781 µg de Trolox / mL para SMPBL 1:1 e 1816 µg de Trolox / mL para SMPBL 1:2.

Tabela 3 - Teor de Compostos Fenólicos Totais (µg EAG/mL), Atividade Antioxidante de DPPH Trolox (µg/mL) e ABTS Trolox (µg/mL) em sucos mistos probióticos armazenados a 4°C durante 28 dias

Compostos Fenólicos Totais (µg EAG/ mL)	Tempo (dias)	Amostras	
		SMPBL 1:1	SMPBL 1:2
	1	818 ± 30 ^{CB}	873 ± 20 ^{AA}
	7	848 ± 22 ^{CA}	827 ± 17 ^{BA}
	14	906 ± 18 ^{BA}	873 ± 57 ^{AB}
	21	826 ± 21 ^{CA}	758 ± 18 ^{CB}
	28	942 ± 29 ^{AA}	797 ± 55 ^{BB}
DPPH (µg/ mL)	1	1514 ± 163 ^{CA}	1250 ± 88 ^{CB}
	7	1644 ± 135 ^{BA}	1414 ± 113 ^{BB}
	14	1838 ± 108 ^{AA}	1550 ± 106 ^{AB}
	21	1461 ± 70 ^{CA}	1108 ± 80 ^{DB}
	28	1325 ± 91 ^{DA}	1069 ± 78 ^{DB}
ABTS (µg/ mL)	1	1781 ± 63 ^{BA}	1816 ± 94 ^{AA}
	7	1797 ± 55 ^{BA}	1809 ± 94 ^{AA}
	14	1832 ± 59 ^{abA}	1652 ± 96 ^{BB}
	21	1660 ± 66 ^{CA}	1500 ± 100 ^{CB}
	28	1884 ± 72 ^{AA}	1817 ± 117 ^{AA}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

Os resultados estão de acordo com outros pesquisadores que apontam a beterraba como uma das hortaliças mais potentes, no que diz respeito à atividade antioxidante, sendo o suco de beterraba comparado favoravelmente com outros conhecidos pelo alto teor de antioxidantes, como sucos de romã e cranberry, particularmente em termos de biodisponibilidade (VINSON et al., 1998; ZITNANOVA et al., 2006; RYAN; PRESCOTT, 2010, WOOTTON-BEARD; RYAN, 2011).

Com relação à estabilidade da capacidade antioxidante apresentada pelos sucos mistos adicionados de probiótico, os resultados foram satisfatórios, visto que, SMPBL 1:1 apresentou uma redução de apenas 12,5% e 5% e o suco misto SMPBL 1:2 uma redução de 14% e uma estabilidade nos métodos DPPH e ABTS, respectivamente, ao final dos 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C. Estes resultados indicam que os sucos mistos (SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2), pela alta

capacidade antioxidante, podem ser um meio adequado para a incorporação de microrganismos probióticos, já que pesquisadores afirmam que compostos antioxidantes, tais como as catequinas, limitam os efeitos negativos da exposição ao oxigênio sobre as bactérias durante o seu crescimento e armazenamento em produtos alimentares (TEIXEIRA et al., 1995; DING; SHAH, 2010; GAUDREAU et al., 2013).

3.5. Cor dos Sucos

Na Tabela 4 estão apresentados os parâmetros de cor (L^* , C e h°) dos sucos mistos de beterraba e laranja adicionados de probiótico.

Para o suco misto SMPBL 1:1 foram encontrados os valores de L^* , C e h° 23,48; 5,94 e 24,64, respectivamente e para o SMPBL 1:2 valores de 23,85; 7,53 e 22,96, respectivamente. Apesar das diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$) para C^* e h° , os valores de tonalidade cromática (h°) mostram que a cor vermelha é mais presente em ambos os sucos mistos.

Tabela 4 - Parâmetros de cor de sucos mistos probióticos armazenados a 4 °C durante 28 dias

	Tempo (dias)	Amostras	
		SMPBL 1:1	SMPBL 1:2
L^* (Luminosidade)	1	23,48 ± 0,04 ^{abA}	23,85 ± 0,14 ^{bA}
	7	23,41 ± 0,05 ^{bB}	23,93 ± 0,25 ^{bA}
	14	20,55 ± 0,48 ^{cB}	22,28 ± 0,92 ^{cA}
	21	23,83 ± 0,13 ^{aB}	26,07 ± 0,65 ^{aA}
	28	23,24 ± 0,23 ^{bA}	22,41 ± 0,17 ^{cB}
C (Croma)	1	5,94 ± 0,04 ^{dB}	7,53 ± 0,05 ^{cA}
	7	5,80 ± 0,09 ^{dB}	7,44 ± 0,22 ^{cA}
	14	9,96 ± 0,15 ^{aB}	12,15 ± 0,72 ^{aA}
	21	8,58 ± 0,06 ^{cB}	10,42 ± 0,41 ^{bA}
	28	9,04 ± 0,23 ^{bA}	6,98 ± 0,10 ^{dB}
h° (hue)	1	24,64 ± 0,38 ^{bA}	22,96 ± 0,30 ^{aB}
	7	25,75 ± 0,37 ^{aA}	22,84 ± 0,26 ^{aB}
	14	14,64 ± 0,36 ^{eA}	14,84 ± 0,34 ^{bA}
	21	18,77 ± 0,82 ^{dA}	15,00 ± 0,80 ^{bB}
	28	21,38 ± 0,79 ^{cB}	23,00 ± 0,43 ^{aA}

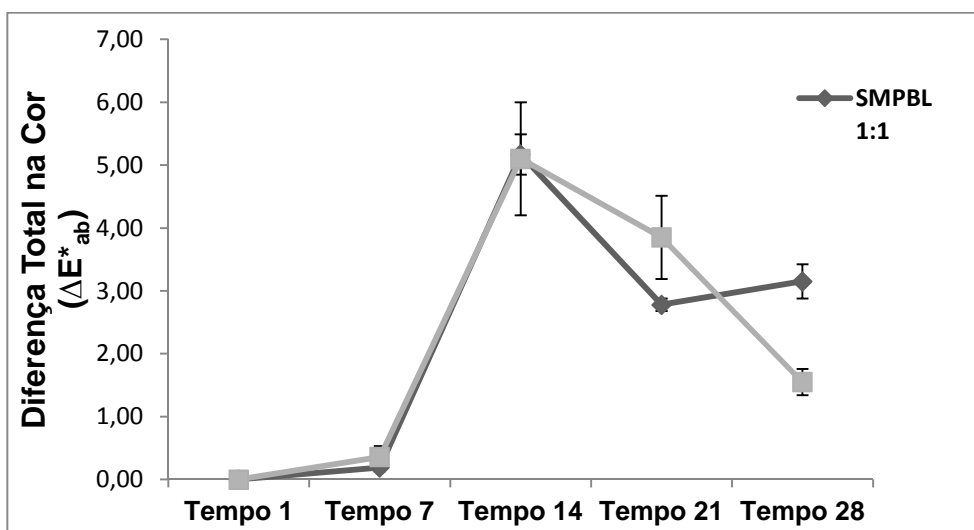
Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico). $L^* = 0$ (preto), $L^* = 100$ (branco); $a^* = -a^*$ (verde), $+a^*$ (vermelho); $b^* = -b^*$ (azul), $+b^*$ (amarelo), C = Croma (saturação da cor), h° (tonalidade cromática): $\arctan(b^*/a^*)$, 0° = vermelho puro, 90° = amarelo puro, 180° = verde puro, 270° = azul puro.

Após o armazenamento, o SMPBL 1:1 apresentou coloração mais vermelha sem mudança na luminosidade, pois ocorreu diminuição de h^0 , enquanto que L^* se manteve estável, já o suco SMPBL 1:2 demonstrou um escurecimento (redução de L^*), mantendo a tonalidade vermelha (h^0 estável). Em relação à saturação da cor, SMPBL 1:1 apresentou um aumento de intensidade de cor (Croma), enquanto que SMPBL 1:2 demonstrou uma perda na intensidade da cor, com valor reduzido de Croma (C) ao longo dos 28 dias de armazenamento refrigerado (4 °C).

A diferença total de cor (ΔE^*_{ab}) nos sucos mistos probióticos, ou seja, a diferença média entre os parâmetros cor nos sucos armazenados por 7, 14, 21 e 28 dias em relação à cor do suco recém-preparado (1° dia), estão apresentadas no Figura 2.

Observa-se que, o SMPBL 1:1 apresentou maior diferença total de cor após 28 dias ($\Delta E^*_{ab} = 3,15$) em comparação com SMPBL 1:2 ($\Delta E^*_{ab} = 1,55$), ainda assim, as diferenças de cor encontradas no suco SMPBL 1:2 e SMPBL 1:1, respectivamente, são pouco perceptíveis, uma vez que a mínima variação de cor (ΔE^*_{ab}) necessária para ser detectada pela visão humana é $\Delta E^*_{ab} = 2,0$ (CHOI et al., 2002). A presença da cultura probiótica de *Lactobacillus acidophilus*, por ser microaerófila, pode ter contribuído para que não houvesse uma alta diferença total de cor (ΔE^*_{ab}).

Figura 2 - Diferença Total na Cor (ΔE^*_{ab}) de sucos armazenados a 4°C por 28 dias.



SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

3.6. Viabilidade da cultura probiótica

A viabilidade da cultura probiótica nos sucos mistos a base de beterraba e laranja está apresentada na Tabela 5. No primeiro dia de armazenamento, os sucos SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2 apresentaram contagens sem diferença significativa ($p < 0,05$) de *Lactobacillus acidophilus*, indicando que a cultura probiótica estava presente na mesma quantidade em ambos os sucos.

Tabela 5 – Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* (log UFC/200 mL) de sucos mistos probióticos armazenados a 4 °C durante 28 dias

	Tempo (dias)	Amostras	
		SMPBL 1:1	SMPBL 1:2
Viabilidade (log UFC/200 mL)	1	10,59 ± 0,13 ^{aA}	10,47 ± 0,24 ^{abA}
	7	10,52 ± 0,30 ^{aA}	10,69 ± 0,10 ^{aA}
	14	10,64 ± 0,05 ^{aA}	10,34 ± 0,19 ^{bB}
	21	10,71 ± 0,14 ^{aA}	10,04 ± 0,24 ^{cB}
	28	10,59 ± 0,20 ^{aA}	9,4 ± 0,15 ^{dB}

Valores representam a média ± desvio padrão (n=9). Diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para cada suco em relação ao tempo de armazenamento. Diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os sucos para o mesmo dia de armazenamento. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico).

Durante o armazenamento, a cultura de *Lactobacillus acidophilus* permaneceu viável até o 28^o dia, sob refrigeração a 4°C, nos sucos SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2, com contagem variando de 10,71 a 10,52 log UFC/200 mL e de 9,4 a 10,69 log UFC/200 mL, respectivamente, apresentando o mínimo recomendado de acordo com a legislação brasileira vigente da ANVISA (BRASIL, 2008), que estabelece que para o alimento ser considerado probiótico, deve apresentar quantidade superior a 10⁸ a 10⁹ UFC (8-9 log UFC/mL) em sua porção diária (no caso, 200 mL).

Não há pesquisas anteriores com adição de cultura probiótica em suco misto de beterraba e laranja e posterior avaliação quanto à sobrevivência, sendo encontrados apenas estudos em suco de beterraba fermentado, como o trabalho dos pesquisadores Yoon; Woodam; Hang (2005), que avaliaram a viabilidade de produção de suco de beterraba esterilizado e fermentado, utilizando as culturas probióticas *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *L. delbrueckii* e *L. plantarum*. Como resultado, foi verificado que *L. acidophilus* e *L. plantarum* foram mais eficientes na redução do pH do suco (para valores inferiores a 4,5, a partir de

valor inicial de 6,3) durante a fermentação. Entretanto, *L. plantarum* revelou-se mais resistente à estocagem em temperatura de 4°C durante quatro semanas (10^6 - 10^8 UFC/mL de produto).

Shah (2007) relatou que a viabilidade celular depende das estirpes utilizadas, as características do substrato, o teor de oxigênio e a acidez final do produto. Assim, a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* no presente estudo pode estar relacionada à presença dos constituintes do suco misto de beterraba e laranja, visto que sucos e bebidas a base de frutas e hortaliças, conforme Ding; Shah (2008) podem ser um veículo alternativo para a incorporação de probióticos, porque eles são ricos em nutrientes, contendo quantidades elevadas de açúcares que podem incentivar o crescimento/viabilidade de probióticos e não contêm outros microrganismos que competem por nutrientes com probióticos.

Além disso, a sobrevivência da cultura probiótica durante os 28 dias de armazenamento refrigerado a 4 °C, pode estar relacionada aos resultados satisfatórios de conteúdo de betalaínas, teor de ácido ascórbico, compostos fenólicos totais e atividade antioxidante encontradas para os sucos mistos de beterraba e laranja analisados, pois sabe-se que compostos antioxidantes podem ser usados para limitar os efeitos negativos da exposição ao oxigênio sobre as bactérias (GAUDREAU et al., 2013), como o ácido ascórbico, que tem sido associado com a sobrevivência de *L. acidophilus* em iogurte, por atuar como um eliminador de oxigênio (SHAH, 2000; ZARATE et al., 2005).

O teor de oxigênio e o potencial redox estão entre os fatores que mais afetam a viabilidade das bactérias probióticas, especialmente durante o período de armazenamento (LEE; SALMINEN, 2009). O oxigênio molecular pode ser tóxico para algumas células bacterianas, já que algumas culturas produzem peróxidos tóxicos em presença de oxigênio e radicais livres a partir da oxidação de componentes (por exemplo, gorduras), que são tóxicos para as células (KORBKANDI; MORTAZAVIAN; IRAVANI, 2011), por isso, a maioria das espécies são estritamente anaeróbias (DE VUYST, 2000; HOLZAPFEL et al., 2001).

Nos sucos mistos de beterraba e laranja probióticos, os compostos fitoquímicos presentes (betalaínas, ácido cítrico, ácido ascórbico e fenólicos), possivelmente, atuaram sinergicamente com a cultura de *Lactobacillus acidophilus* na remoção do oxigênio do produto, inibindo possíveis reações oxidativas e

enzimáticas promovendo a estabilidade físico-química dos sucos mistos e a viabilidade dos microrganismos, durante os 28 dias de armazenamento refrigerado.

3.7. Análises microbiológicas para a segurança do produto

Os resultados microbiológicos para os sucos mistos a base de beterraba e laranja adicionados de *Lactobacillus acidophilus*, elaborados no presente trabalho, atenderam aos padrões microbiológicos estabelecidos pela RDC nº 12 da ANVISA (BRASIL, 2001), para sucos pasteurizados e refrigerados, incluindo água de coco, caldo de cana, de açaí e similares, isolados ou em mistura, uma vez que esta legislação preconiza até 5 NMP/mL para coliformes a 45 °C e ausência de *Salmonella* sp em 25 mL do produto. Dessa forma os sucos mistos probióticos encontravam-se adequados para serem analisados sensorialmente.

3.8. Aceitação Sensorial

Na Tabela 6 está apresentada a aceitação sensorial em relação aos atributos cor, aroma, sabor e aceitação global e a intenção de compra dos sucos mistos de beterraba e laranja, adicionados de *Lactobacillus acidophilus* (SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2), não havendo diferença entre os dois sucos mistos. As notas para cor, aroma e sabor foram satisfatórias, uma vez que foram iguais ou maiores que 6 em escala de 9 pontos. A cor se destacou com maior nota que os demais atributos, provavelmente pela cor intensa e atraente que a beterraba proporciona em seus produtos, devido à presença de pigmentos naturais hidrossolúveis, as betalaínas (DELGADO-VARGAS; JIMÉNEZ,; PAREDES-LÓPEZ, 2000).

Quanto à aceitação global, os julgadores gostaram ligeiramente dos sucos mistos SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2, apresentando valores hedônicos próximos de 6 numa escala de 9 pontos, e a intenção de compra mostrou que talvez comprariam os produtos (notas 3,1 e 3,3, respectivamente, em escala de cinco pontos), não havendo diferença significativa entre os sucos ($p > 0,05$).

Tabela 6 - Aceitação de atributos e intenção de compra de sucos mistos de beterraba e laranja com *Lactobacillus acidophilus*

Amostras	Cor	Aroma	Sabor	Aceitação Global	Intenção de Compra
SMPBL (1:1)	8,0 ± 1,3 ^a	6,1 ± 2,0 ^a	5,8 ± 2,1 ^a	6,2 ± 1,8 ^a	3,1 ± 1,2 ^a
SMPBL (1:2)	7,7 ± 1,3 ^a	6,4 ± 2,1 ^a	6,1 ± 2,2 ^a	6,3 ± 1,9 ^a	3,3 ± 1,3 ^a

Valores representam a média ± desvio padrão onde diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferença significativa ($p < 0,05$) entre os sucos para um mesmo atributo, aceitação global e intenção de compra. SMPBL 1:1 (suco misto de beterraba e laranja 1:1 (v/v) probiótico) e SMPBL 1:2 (suco misto de beterraba e laranja 1:2 (v/v) probiótico). Valores hedônicos (cor, aroma, sabor e aceitação global): 1 = desgostei extremamente - 9 = gostei extremamente. Intenção de compra: 1=certamente não compraria - 5=certamente compraria.

Manter a qualidade sensorial dos alimentos após a incorporação de probióticos é importante, pois segundo Tuorila; Cardello (2002), os consumidores não estão interessados em consumir bebidas funcionais se os ingredientes adicionados ocasionarem aroma e sabores estranhos ou desagradáveis nos produtos, mesmo levando em consideração os benefícios à saúde.

A aceitação global para SMPBL 1:1 e SMPBL 1:2 está de acordo com o esperado, visto que Porto et al. (2015, artigo 1), ao avaliar a aceitação sensorial de sucos mistos de beterraba e laranja sem probióticos, também encontrou valores de 6,8 e 6,9 (em escala de 9 pontos) para suco misto de beterraba e laranja nas proporções 1:1 (v/v) e 1:2 (v/v), respectivamente, indicando que a adição de probióticos no presente estudo, não resultou em perda de qualidade sensorial. Provavelmente isso ocorreu porque a adição de probióticos nos sucos de frutas e/ou hortaliças, sem o processo de fermentação não alterou a composição química, características sensoriais como gosto ácido, ou a produção de compostos aromáticos que alteram o perfil de sabor e aroma do produto final (LEROY; DE VUYST, 2004). Destaca-se ainda, que a presença de biomassa celular também não alterou a aceitação dos sucos.

Não há relatos de estudos com adição de probióticos em sucos mistos a base de beterraba e laranja, e as pesquisas com suco de beterraba ou suco de laranja como meio para probióticos, utilizam o processo de fermentação e, em várias dessas pesquisas, não é realizada a avaliação de aceitação sensorial (KLEWICKA; MOTYL; LIBUDZISZ, 2004; KLEWICKA; ZDUJCZYK; JUMKIEWICZ, 2009; YOON; WOODAM; HANG, 2005; LUCKOW; DELAHUNTY, 2004). No trabalho de Pimentel et al. (2011) a adição de *L. paracasei ssp. paracasei* não influenciou a

aceitabilidade (aparência, aroma, sabor, textura e global) e a intenção de compra de néctares de pêssego, visto que os julgadores indicaram que gostaram moderadamente (valores entre 7 e 8 em escala hedônica de 9 pontos) e que provavelmente comprariam os produtos (valores próximos de 4 de intenção de compra em escala de 5 pontos). Em sucos clarificados de maçã também adicionados de *L. paracasei ssp. paracasei*, a presença de sacarose, oligofrutose ou cultura probiótica não interferiu na aceitabilidade (cor, aroma, sabor e global) e na intenção de compra, assim como o tipo de embalagem; indicando que, embora a adição da cultura probiótica tenha promovido um aumento na turbidez dos sucos de maçã e 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, conforme verificado por Pimentel et al. (2015).

4. CONCLUSÃO

A produção de uma bebida funcional por meio da adição de *Lactobacillus acidophilus* La-5 em suco misto de beterraba e laranja é promissora, visto que durante os 28 dias de armazenamento à 4 °C, a contagem mínima de cultura probiótica viável ficou dentro dos valores estipulados pela legislação brasileira para alimentos funcionais probióticos. Além disso, os sucos atendem ao conceito de alimentos funcionais com benefícios à saúde do consumidor, uma vez que agregam probióticos, compostos antioxidantes naturalmente presentes na beterraba e na laranja (betalaínas, ácido ascórbico e compostos fenólicos), boa aceitação sensorial e intenção de compra, com vida útil de 28 dias, desde que armazenados à 4 °C.

REFERÊNCIAS

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

ANVISA. (2008). 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. Disponível

em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em Janeiro, 2015.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS, AOAC. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C. International**, v. 16, n.2, 1997.

ATTOE, E.L.; von ELBE, J.H., Oxygen involvement betanine degradation: effect of antioxidants. **Journal of Food Science**, v.50, p.106, 1985.

BILYK, A.; HOWARD, M. Reversibility of thermal degradation of betacyanins under the influence of isoascorbic acid. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 30, n. 5, p. 906-908, 1982.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity. **Food Science and Technology-Lebensmittel-Wissenschaft; Technologie**, v. 28, n.1, p. 25–30, 1995.

BRASIL – ANVISA, “Regulamento técnico sobre a ingestão diária recomendada (IDR) de proteína, vitaminas e minerais. **Resolução RDC nº 269, de 22 de setembro, 2005**.

CARDOSO-UGARTE, G.A., SOSA-MORALES, M.E., BALLARD, T., LICEAGA, A., SAN MARTÍN-GONZÁLEZ, M.F., Microwave-assisted extraction of betalains from red beet (*Beta vulgaris*), **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 276-282, 2014

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

CHETANAH, S.; NAYAK, C.; RAGHAVARAO, K., Aqueous two phase extraction for purification and concentration of betalains. **Journal of Food Engineering**, v. 81, n.4, p. 679-687, 2007.

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

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 435–443, 1997.

DELGADO-VARGAS, F.; JIMÉNEZ, A. R.; PAREDES-LÓPEZ, O. Natural pigments: Carotenoids, anthocyanins, and betalains — characteristics, biosynthesis, processing, and stability. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 40, p. 173–289, 2000.

DE VUYST, L. Technology aspects related to the application of functional starter cultures. **Food Technology and Biotechnology**, v. 38, p. 105–112, 2000.

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

ESCRIBANO, J., GANDÍA-HERRERO, F., CABALLERO, N.; PEDREÑO, M. A. Subcellular localization and isoenzyme pattern of peroxidase and polyphenol oxidase in beet root (*Beta vulgaris* L). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 50, p. 6123–6129, 2002.

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/wgreqport2.pdf>. Acesso: 10/11/2015.

FARIA, C. P.; BENEDET, H. D.; GUERROUE, J. R., Parâmetros de produção de leite de búfala fermentado por *Lactobacillus casei*. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 41, n. 3, p. 511-516, 2006.

GAUDREAU, H., CHAMPAGNE, C. P., REMONDETTO, G. E., BAZINET, L.; SUBIRADE, M. Effect of catechins on the growth of oxygen-sensitive probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 53, p. 751–757, 2013.

GENTILE, C., TESORIERE, L., ALLEGRA, M., LIVREA, M. A., ALESSIO, P. D. Antioxidant betalains from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*) inhibit endothelial ICAM-1 expression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1028, p. 481–486, 2004.

GIONCHETTI, P., RIZZELLO, F., VENTURI, A., PALMONARI, V., MORSELLI, C., Probiotics: role in inflammatory bowel disease. **Digestive and Liver Diseases**, v. 34, p. 58–62, 2002.

GLISZCZYNSKA-SWIGLO, A.; SZYMUSIAK, H.; MALINOWSKA, P., Betanin, the main pigment of red beet: molecular origin of its exceptionally high free radical scavenging activity. **Food Additives and Contaminants**, v. 23, n. 11, p. 1079 -1087, 2006.

HAN, D., KIM, S., KIM, S., KIM, D., Repeated regeneration of degraded red beet juice pigments in the presence of antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 1, p. 69-72, 1998.

HAN, H. M.; KOH, B. Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, n/a, 2011.

HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R., Thermal degradation of betacyanins in juices from purple pitaya (*Hylocereus polyrhizus* [Weber] Britton; Rose) monitored by highperformance liquid chromatography-tandem mass spectrometric analyses. **European Food Research and Technology**, v. 219, p. 377–385, 2004.

HERBACH, K. M.; STINTZING, F. C.; CARLE, R. Betalain stability and degradation — Structural and chromatic aspects. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 41–50, 2006.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJO RKROTH, J., SCHILLINGER, U., Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365S–373S, 2001.

KAJANDER, K., HATAKKA, K., POUSSA, T., FARKKILA, M., KORPELA, R., A probiotic mixture alleviates symptoms in irritable bowel syndrome patients: a controlled 6-month intervention. **Alimentary Pharmacology; Therapeutics**, v. 22, p. 387–394, 2005.

KANNER, J., HAREL, S., GRANIT, R., Betalains. A new class of dietary cationized antioxidants. **Journal of. Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 5178–5185, 2001.

KAUR, C.; KAPOOR, H. C. Anti-oxidant activity and total phenolic content of some Asian vegetables. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 37, p. 153–161, 2002.

KAILASAPATHY, K., Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT Food Science and Technology**, v. 39, p. 1221–1227, 2006.

KLEWICKA, E.; MOTYL, I.; LIBUDZISZ, L., Fermentation of beet juice by bacteria of genus *Lactobacillus* sp., **European Food Research and Technology**, v. 218, p. 178–183, 2004.

KLEWICKA E.; ZDUJCZYK, Z.; JUMKIEWICZ, J., Effect of lactobacillus fermented beetroot juice on composition and activity of cecal microflora of rats, **European Food Research and Technology**, v. 229, p. 153–157, 2009.

KLEWICKA, E.; CZYŻOWSKA, A., Biological Stability of Lactofermented Beetroot Juice During Refrigerated Storage. **Polish Journal of Food Nutrition Sciences**. v. 61, n. 4, p. 251-256, 2011.

KORBKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A. M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks. em N. Shah, A. G. Cruz,; J. A. F. Faria (Eds.), **Probiotic and prebiotic foods: Technology, stability and benefits to the human health** (p.131–169). Nova York: Nova Science Publishers, 2011.

LEE, Y. K.,; SALMINEN, S. **Handbook of probiotics and Prebiotics** (2nd ed.). Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc., 2009.

LEROY, F., DE VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. **Trends in Food Science; Technology**, v. 15, n. 2, p. 67-78, 2004.

LÓPEZ, N., PUÉRTOLAS, E., CONDÓN, S., RASO, J., ÁLVAREZ, I., Enhancement of the extraction of betanine from red beetroot by pulsed electricfields. **Journal of Food Engineering**, v. 90, n. 1, p. 60-66, 2009.

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

MCEVILY, A.J.; IYENGAR, R., Inhibition of enzymatic browning in foods and beverages. **Critical Review in Food Science and Nutrition** v. 32, p. 253–273, 1992.

NILSSON, T. Studies into the pigments in beetroot (*Beta vulgaris L. ssp. vulgaris var. rubra L.*). **Lantbrukhögskolans Annaler**, v. 36, p. 179–219, 1970.

OKINA, V. S., Suco integral de uva branca com *Lactobacillus paracasei* ssp. **Trabalho de Conclusão de Curso de Farmácia** - Universidade Estadual de Londrina, Londrina, Paraná, 2014.

OZGEN, M., REESE, R. N., TULIO, A. Z., SCHEERENS, J. C.,; MILLER, A. R. Modified 2, 2- azino-bis-3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid (ABTS) method to measure antioxidant capacity of selected small fruits and comparison to ferric reducing antioxidant power (FRAP) and 2, 2-diphenyl-1-picrylhydrazyl (DPPH) methods. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 54, n.4, p. 1151–1157, 2006.

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.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H., Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT – Food Science and Technology**, v. 62, p. 838-846, 2015.

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

PITALUA, E., JIMENEZ, M., VERNON-CARTER, E. J., BERISTAIN, C. I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioproducts Processing**, v. 88, p. 253–258, 2010.

QIZHOU, J. W.; ZHUANG, L. Y.; QING, Z.; WEI, C.; XIAO-MING, L.; HE-PING, Z., Fermentation characteristics and transit tolerance of *Lactobacillus casei* Zhang in reconstituted mare milk during storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 249-254, 2009.

REDDY, K. M., RUBY, L., LINDO, A., NAIR, G. M. Relative inhibition of lipid peroxidation, cyclooxygenase enzymes and human tumor cells proliferation by natural food color. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, p. 9268–9273, 2005.

RYAN, L.; PRESCOTT, S. L. Stability of the antioxidant capacity of twenty-five commercially available fruit juices subjected to an in vitro digestion. **International Journal of Food Science; Technology**, v. 45, n. 6, p. 1191–1197, 2010.

- SAGGIORO, A., Probiotics in the treatment of irritable bowel syndrome. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 38, p. 104–106, 2004.
- SAPERS, G.M.; HORNSTEIN, J.S. Varietal differences in colorant properties and stability of red beet pigments. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1245–1248, 1979.
- SHAH, N.P., Probiotic bacteria: selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.
- SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.
- 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, 2010.
- SILVA, N.; JUNQUEIRA, V.C.A.; SILVEIRA, N.F.A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. São Paulo: Livraria Varela, p. 317, 2007.
- SINGER, J. W.; von ELBE, J. H. Degradation rates of vulgaxanthin-I. **Journal of Food Science**, v. 45, p. 489–491, 1980.
- SINGLETON, V. L.; ORTHOFER, R.; LAMUELA-RAVENTOS, R. M. Analysis of total phenols and other oxidation substrates and antioxidants by means of Folin–Ciocalteu reagent. **Oxidants and Antioxidants**, Part A, v. 299, p. 152–178, 1999.
- SOCCOL, C. R., VANDENBERGHE, L. P. S., SPIER, M. R., MEDEIROS, A. B. P., YAMAGUISHI, C. T., LINDNER, J. D., et al. The potential of probiotics. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, p. 413–434, 2010.
- SOUZA, M. C. C.; BENASSI, M. T.; MENEGHEL, R. F. A.; SILVA, R. S. S. F. Stability of Unpasteurized and Refrigerated Orange Juice. **Brazilian Archives of Biology and Technology**, v.47, n. 3, p. 391-397, 2004.
- SPINOLA, V.; BERTA, B.; CÂMARA, J. S.; CASTILHO, P. C. Effect of Time and Temperature on Vitamin C Stability in Horticultural Extracts. UHPLC-PDA vs. Iodometric Titration as Analytical Methods. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 50, n. 2, p. 489-495, 2013.
- STINTZING, F. C.; CARLE, R. Functional properties of anthocyanins and betalains in plants, food and in human nutrition. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 19–38, 2004.
- STINTZING, F. C.; SCHIEBER, A.; CARLE, R. Evaluation of colour properties and chemical quality parameters of cactus juices. **European Food Research and Technology**, v. 216, p. 303–311, 2003.
- STRACK, D.; VOGT, T.; SCHLIEMANN, W. Recent advances in betalain research. **Phytochemistry**, v. 62, p. 247–269, 2003.
- TALCOTT, S. T; PERCIVAL, S. S.; PITTET-MOORE, J.; CELORIA, C. Phytochemical composition and antioxidant stability of fortified yellow passion fruit

(*Passiflora edulis*), **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 51, p. 935-941, 2003.

TARRAGO-TRANI, M. T.; PHILLIPS, K. M.; COTTY, M. Matrix Specific Method Validation for Quantitative Analysis of Vitamin C in Diverse Foods. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 26, n. 1-2, p. 12-25, 2012.

TEIXEIRA, P., CASTRO, H., MALCATA, F. X., KIRBY, R. M., Survival of *Lactobacillus delbruekii* spp. *bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1025–1031, 1995.

TRIBESS, T.B. Estudo da cinética de inativação térmica da pectinesterase em suco de laranja natural minimamente processado. **Dissertação de Mestrado**, Escola Politécnica da Universidade de São Paulo, 2003.

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.

VINSON, J. A., HAO, Y., SU, X.; ZUBIK, L. Phenol Antioxidant Quantity and Quality in Foods: Vegetables. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v.46, n. 9, p. 3630–3634, 1998.

WILEY, R.C.; LEE, Y.N. Recovery of betalaines from red beets by a diffusion-extraction procedure. **Journal of Food Science**, v. 43, p. 1056–1058, 1978.

WOOTTON-BEARD, P. C.; MORAN, A.; RYAN, L. Stability of the antioxidant capacity and total polyphenol content of 23 commercially available vegetable juices before and after in vitro digestion as measured by FRAP, DPPH, ABTS and Folin Ciocalteu methods. **Food Research International**, v. 44, p. 217–224, 2011.

WOOTTON-BEARD, P. C.; RYAN, L. A beetroot juice shot is a significant and convenient source of bioaccessible antioxidants. **Journal of Functional Foods**, v. 3, p. 329 – 334, 2011.

ZARATE, G., TOMAS, M.S., NADER-MACIAS, M.E., Effect of some pharmaceutical excipients on the survival of probiotic vaginal lactobacilli. Canadian. **Journal of Microbiology**, v. 51, p. 483–489, 2005.

ZITNANOVA, I., RANOSTAJOVA, S., SOBOTOVA, H., DEMELOVA, D., PECHAN, I., DURACKOVA, Z. Antioxidative activity of selected fruits and vegetables. **Biologia**, v. 61, n. 3, p. 279–284, 2006.

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

7 CONCLUSÕES

- O suco misto de beterraba e laranja, pelo valor de pH, acidez e presença dos ácidos cítrico e ascórbico da laranja, é mais estável quanto ao conteúdo de betalaínas, compostos fenólicos e atividade antioxidante, do que o suco de beterraba puro em armazenamento refrigerado a 4°C ao longo de 30 dias.
- A obtenção de um produto alimentício funcional com estabilidade físico-química, atividade antioxidante e viabilidade da cultura probiótica, durante 28 dias de armazenamento refrigerado à 4°C, é possível com a adição da cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* em sucos mistos de beterraba e laranja nas proporções 1:1 e 1:2 (v/v).
- Há aceitação sensorial dos sucos mistos de beterraba e laranja puro e com probiótico, tendo os julgadores boa intenção de compra dos sucos mistos probióticos.

APÊNDICES

APÊNDICE A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO NA FORMA DE CONVITE PARA PARTICIPANTES DA SESSÃO DE TESTE DE ACEITAÇÃO

“Estabilidade de Suco Misto de Beterraba e Laranja puro e com *Lactobacillus acidophilus*”

Prezado(a) Senhor(a):

Gostaríamos de convidá-lo (a) a participar da pesquisa “ESTABILIDADE DE SUCO MISTO DE BETERRABA E LARANJA PURO E COM *Lactobacillus acidophilus*”, realizada no Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos/UEL, LONDRINA/PR”. O objetivo da pesquisa é desenvolver um suco misto probiótico para consumo a base de suco de laranja e suco de beterraba com *Lactobacillus acidophilus*. A sua participação é muito importante, como integrante de uma equipe de provadores, que avaliará através dos principais atributos a aceitação de diferentes formulações em estudo de bebida mista de suco de laranja e extrato de beterraba. A sessão levará no máximo 30 minutos e você poderá fazê-la no horário que tiver maior disponibilidade. 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. O benefício esperado é medir a aceitação das formulações de bebida mista de suco de laranja e extrato de beterraba, para posteriormente ser adicionada de probiótico no decorrer do projeto. 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, Prof^a Sandra Helena Prudencio, DCTA/UEL, telefone (43) 3371-4986, sandrah@uel.br, 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 33712490. 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: _____

APÊNDICE B**FICHA DE RECRUTAMENTO****Dados pessoais**

Nome: _____ Data: ____ / ____ / ____

Sexo: Fem MascIdade: < 25 25-35 36-50 > 50 anos

Com que frequência você consome suco de frutas?

- Diariamente
- 2 a 3 vezes por semana
- 1 vez por semana
- Nunca

Você já consumiu/consume suco de frutas com extrato de vegetais?

- Diariamente
- 2 a 3 vezes por semana
- 1 vez por semana
- Nunca

Indique o quanto você gosta de suco de frutas:

- Muitíssimo
- Apenas Gosto
- Gosto Pouco
- Não Gosto

APÊNDICE C

FICHA DE TESTE DE ACEITAÇÃO E FICHA DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

Teste de Escala Hedônica

Você está recebendo três amostras codificadas de “Bebida mista de suco de laranja e extrato de beterraba”, por favor, prove da esquerda para a direita e avalie cada amostra utilizando a escala de valores abaixo para cada atributo:

- 9 - Gostei muitíssimo
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei regularmente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei, nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei regularmente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei muitíssimo

Amostra: _____

Cor	Aroma	Sabor	Impressão Global

Comentários:

APÊNDICE D

FICHA DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

Teste de Escala Hedônica e Intenção de Compra

Você está recebendo uma amostra codificada de Suco misto de beterraba e laranja com probiótico (*Lactobacillus acidophilus*). Por favor, prove e avalie a amostra utilizando as escalas de valores abaixo para cada atributo, e sua intenção de compra:

- 9 - Gostei muitíssimo
- 8 - Gostei muito
- 7 - Gostei regularmente
- 6 - Gostei ligeiramente
- 5 - Não gostei, nem desgostei
- 4 - Desgostei ligeiramente
- 3 - Desgostei regularmente
- 2 - Desgostei muito
- 1 - Desgostei muitíssimo

Amostra: _____			
Cor	Aroma	Sabor	Impressão Global

Intenção de Compra

- 5 – Certamente compraria
- 4 – Provavelmente compraria
- 3 – Talvez comprasse, talvez não comprasse
- 2 – Provavelmente não compraria
- 1 – Certamente não compraria

ANEXOS

ANEXO A

APROVAÇÃO DO PROJETO PELO COMITÊ DE ÉTICA



Universidade
Estadual de Londrina



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

Parecer CEP/UEL:	342/2011
CAAE:	0319.0.268.000-11
Processo:	33575/2011
Folha de Rosto:	477301
Pesquisador(a):	Sandra Helena Prudencio
Unidade/Órgão:	CCA – Departamento de Ciências e Tecnologia de Alimentos

Prezado(a) Senhor(a):

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:

"ELABORAÇÃO E ESTUDO DA ESTABILIDADE UMA BEBIDA MISTA PROBIÓTICA A BASE DE SUCO DE LARANJA E EXTRATO DE BETERRABA COM LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS"

Situação do Projeto: **APROVADO**

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.

Londrina, 12 de novembro de 2011.



Prof. Dra. Alexandrina Aparecida Maciel Cardelli
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos
Universidade Estadual de Londrina