

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

BIOCONSERVAÇÃO POR *LACTICASEIBACILLUS CASEI* DE SUCO DE
MAÇÃ Prensado a Frio

CRISTINA BARBOSA PEREIRA

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS

BIOCONSERVAÇÃO POR *LACTICASEIBACILLUS CASEI* DE SUCO DE MAÇÃ
PRENSADO A FRIO

CRISTINA BARBOSA PEREIRA

Sob orientação da professora Doutora

Elisa Helena da Rocha Ferreira

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ
Fevereiro de 2021

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

P436b Pereira, Cristina Barbosa, 1988-
Bioconservação por *Lacticaseibacillus casei* de suco
de maçã prensado a frio / Cristina Barbosa Pereira. -
Rio de Janeiro, 2021.
71 f.: il.

Orientadora: Elisa Helena da Rocha Ferreira.
Dissertação (Mestrado). -- Universidade Federal Rural
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Ciência
e Tecnologia de Alimentos, 2021.

1. Suco de maçã prensado a frio. 2. Bioconservação.
3. *Lacticaseibacillus casei*. 4. Avaliação sensorial.
I. Ferreira, Elisa Helena da Rocha, 1977-, orient. II
Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de
Alimentos III. Título.



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS



TERMO Nº 208/2021 - PPGCTA (12.28.01.00.00.00.41)

Nº do Protocolo: 23083.014692/2021-39

Seropédica-RJ, 02 de março de 2021.

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

CRISTINA BARBOSA PEREIRA

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de **Mestre**, no Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 09/02/2021

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA (Dr^a) UFRRJ

(orientadora)

ROSIRES DELIZA (Dr^a) EMBRAPA

ANDRE FIORAVANTE GUERRA (Dr) CEFET/RJ

Conforme deliberação número 001/2020 da PROPPG, de 30/06/2020.

Documento não acessível publicamente

(Assinado digitalmente em 02/03/2021 14:51)

ELISA HELENA DA ROCHA FERREIRA

PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR

DTA (12.28.01.00.00.00.46)

Matrícula: 1806986

(Assinado digitalmente em 02/03/2021 15:35)

ROSIRES DELIZA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 024.950.088-44

(Assinado digitalmente em 02/03/2021 17:02)

ANDRÉ FIORAVANTE GUERRA

ASSINANTE EXTERNO

CPF: 064.179.236-06

208, ano: 2021, tipo: TERMO, data de emissão: 02/03/2021 e o código de verificação: 633cbfd2a

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me permitir escolher a vida acadêmica em um mundo em que muitas vezes as escolhas são impostas pela necessidade, Por me conceder oportunidades e por sempre estar presente em minha vida.

À minha querida orientadora Elisa, por despertar minha paixão pelo tema desde o primeiro contato e por entender e me auxiliar em todas as minhas limitações e dificuldades. Agradeço de coração por todo incentivo, paciência e compreensão. Espero na minha vida profissional nunca me esquecer de tentar ser para os meus alunos tão acolhedora, competente e humana quanto você é.

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro por ter me acolhido e por ter sido meu lar durante todo o período de realização do Mestrado.

Aos docentes do PPGCTA pelo conhecimento transmitido dentro e fora de sala de aula.

Aos amigos que junto comigo dividiram momentos de incertezas e felicidade. Aos amigos do meu grupo de pesquisa, sempre tão ativos, cheios de determinação e disposição para as atividades propostas. Aos que estiveram presentes desde o começo, especialmente meu amigo Paulo César que abraça a todos que entram nesta Universidade e comigo não foi diferente. Aos que encontrei durante a caminhada, especialmente as amigas Mariá e Inayara. Agradeço também aos amigos do laboratório de Microbiologia que fizeram parte das minhas descobertas.

Ao meu marido Thiago, pelo companheirismo e compreensão em todos os momentos!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

MUITO OBRIGADA!

Resumo

PEREIRA, Cristina Barbosa. **Bioconservação por *Lacticaseibacillus casei* de suco de maçã prensado a frio** 2021. 65p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Ciência de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021.

A produção de sucos prensados a frio tem crescido continuamente. Para manter a qualidade, o processamento do suco não inclui o uso do calor ou aditivos químicos como método de conservação, resultando em um produto com melhores características nutricionais e sensoriais. No entanto, apresentam vida útil curta. Nesse sentido, a bioconservação por se tratar de um método natural, sem perdas nutricionais e de fácil implementação, surge como uma alternativa aos métodos de conservação. Embora a bioconservação tenha se mostrado uma estratégia viável, sabe-se que o processo pode afetar as características sensoriais do produto ao longo de toda a cadeia produtiva. Assim, o presente trabalho objetivou utilizar *Lacticaseibacillus casei* como agente bioconservador, para estender a vida útil do produto, além de avaliar a influência da temperatura de armazenamento (4 °C, 8 °C, 10 °C) do suco de maçã prensado a frio bioconservado sob diferentes aspectos sensoriais. Dessa forma, através do processo de bioconservação associado ao armazenamento refrigerado foi possível garantir a segurança microbiológica do produto durante toda a vida útil do suco garantindo um prazo três vezes mais longo do que a atualmente oferecido pela maioria das empresas, passando de 5 dias para 15 dias. Durante às 6 h de exposição do suco de maçã prensado a frio ao *Lacticaseibacillus casei* a 37 °C foi possível identificar através das análises físicas, químicas e microbiológicas que não houve mudanças significativas no produto. Porém, durante o armazenamento a frio, o aumento dos níveis de pH e redução de acidez, indicam a ocorrência da fermentação malolática. O armazenamento a 10 °C se mostrou a melhor condição em relação à viabilidade do *Lacticaseibacillus casei*, propiciando aumento das células viáveis em 1 ciclo logarítmico, após 7 dias de armazenamento. Esse resultado está relacionado aos maiores índices de pH e menores de acidez, influenciando negativamente a aceitação do consumidor. A aceitação de oito amostras do suco de maçã prensado a frio bioconservado, armazenado por 15 dias sob diferentes as temperaturas (4 °C, 8 °C, 10 °C) foi avaliada por 55 consumidores. A maioria das amostras alcançou médias adequadas, evidenciando boa aceitabilidade, desde que ajustado o tempo e a temperatura de armazenamento do produto. A vida útil sensorial foi estimada e todas as amostras, mesmo as com menores médias de aceitação, apresentaram vida útil estendida de acordo com a distribuição Weibull. Através do Napping® associado ao perfil ultra-flash, foi possível identificar que os consumidores perceberam diferenças entre as amostras, oriundas do tempo e da temperatura de armazenamento, demonstrando que quando não ajustados corretamente podem influenciar negativamente o produto. O armazenamento à 8 °C mostrou-se uma alternativa viável para a comercialização do produto, pois apresentou vida útil sensorial estendida, atendendo a dificuldade da indústria na manutenção a cadeia de frios (4 °C), além de garantir a estabilidade microbiológica do produto. Quanto à aplicação do suco de maçã bioconservado como base para *blends* de frutas e vegetais, embora nem todos os *blends* tenham obtido boa aceitação, a estratégia pode ser viável pois garantiu a vida útil do produto por 15 dias armazenado a 8 °C.

Palavras chaves: suco de maçã prensado a frio; bioconservação; *Lacticaseibacillus casei*; vida útil sensorial; Napping

Abstract

PEREIRA, Cristina Barbosa. **Biopreservation by *Lacticaseibacillus casei* of the cold pressed apple juice** 2021. 65p. Dissertation (Master Science in Food Science and Technology, Food Science). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2021

The production of cold-pressed juices has grown continuously. To maintain quality, the processing of the cold-pressed juice does not include the use of heat and additives chemical as preservation method, resulting in a product with better nutritional and sensory characteristics. However, have short shelf life. In this sense, biopreservation it is a natural method, without nutritional losses and easy implementation, emerges as an alternative to thermal and chemical preservation methods in food. Although biopreservation has proved to be a viable strategy, it is known that the process can affect the sensory characteristics of the product throughout the production chain. The present work aimed to use *Lacticaseibacillus casei* as a biopreservative agent, extending the shelf life of the product, besides evaluating the influence of storage temperature of bioconserved cold-pressed apple juice, under different sensory aspects. Thus, through the bioconservation process associated with refrigerated storage it was possible to guarantee the microbiological safety of the product during the shelf life of the juice ensuring a period three times longer (15 days) than currently offered by most companies (3- 5 days). During the 6 h of exposure of cold pressed apple juice to *Lacticaseibacillus casei* at 37 °C it was possible to identify through physical, chemical, and microbiological analyses that there were no significant changes in the product. However, during cold storage, increased pH levels and reduced acidity indicate the occurrence of malolactic fermentation. The storage at 10 °C proved to be the best condition according to the viability of *Lacticaseibacillus casei*, providing an increase in viable cells in 1 logarithmic cycle after 7 days of storage. This result is related to higher pH and lower acidity, negatively influencing consumer acceptance. The acceptance the 8 samples of biopreserved cold-pressed apple juice, stored 15 for days under different temperatures (4°C, 8°C, 10°C), was evaluated by 55 consumers. Most of the samples achieved positive means, evidencing good acceptability, provided that the time and storage temperature of the product were adjusted. The sensory shelf-life life was estimated and all samples, even those with smaller acceptance means, presented shelf-life above that offered by most industries in the category according to a Weibull distribution. Through Napping® associated with the ultra-flash profile, it was possible to identify that consumers noticed differences between samples, arising from storage time and temperature. storage at 8 °C proved to be a viable alternative for the sale of the product, because it presented extended sensory service life, meets the difficulty of the industry in maintaining the cold chain (4 °C), besides ensuring the microbiological stability of the product. About the application of biopreserved apple juice as a basis for fruit and vegetable blends, although not all blends have obtained good acceptance, the strategy may be feasible the strategy may be feasible as it has ensured the shelf-life of the product for 15 days stored at 8 °C.

Keywords: cold-pressed apple juice; biopreservation; *Lacticaseibacillus casei*; sensory shelf-life; Napping®.

Lista de Figuras

Figura 1 Representação esquemática das vias catabólicas do L-malato e possíveis vias biossintéticas.....	4
Figura 2 Imagem ilustrativa de sucos prensados a frio.....	11
Figura 3 Fluxograma de trabalho com a realização das etapas I e II.....	13
Figura 4 Esquema de obtenção do suco de maçã prensado a frio	14
Figura 5 Recipiente utilizado para fermentação do suco com mecanismo <i>airlock</i> adaptado..	15
Figura 6 Viabilidade do <i>Lacticaseibacillus casei</i> no suco de maçã prensado a frio bioconservado durante a fermentação.....	21
Figura 7 Viabilidade do <i>Lacticaseibacillus casei</i> no suco de maçã prensado a frio bioconservado durante o armazenamento.....	23
Figura 8 Probabilidade de rejeição do suco de maçã prensado a frio bioconservado pelos consumidores durante o armazenamento a frio de acordo com o modelo Weibull.....	27
Figura 9 (A) Gráfico da AFM de localização das 8 amostras de suco de maçã prensado a frio bioconservados de acordo o método Napping®.....	29
Figura 9 (B) Descritores sensoriais correspondentes utilizados como variáveis suplementares avaliadas pelo método Napping® associado ao perfil ultra-flash.....	30
Figura 10 Viabilidade do <i>Lacticaseibacillus casei</i> nos diferentes blends durante o armazenamento.....	33
Figura 11 Representação biplot das 12 amostras de bends (círculos) e os atributos sensoriais (triangulos) utilizados para descrevê-los, nas duas primeiras dimensões da Análise de Correspondência (CA) na frequência apresentada na questionário CATA.....	35

Lista de Tabelas e Quadros

Tabela 1 Codificação numérica das amostras de acordo com o tratamento utilizado.....	17
Quadro 1 Benefícios atribuídos à ingestão de <i>Lacticaseibacillus casei</i>	06
Quadro 2 Lista de ingredientes e percentual da concentração utilizada para elaboração dos blends.....	19
Tabela 2 Códigos das amostras (blends) e respectivos tratamentos.....	19
Tabela 3 pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (% ácido lático) do suco de maçã prensado a frio bioconservado durante a fermentação.....	20
Tabela 4 pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (% ácido lático) do suco de maçã prensado a frio bioconservado durante o armazenamento.....	24
Tabela 5 Valores obtidos no teste de aceitação e índice de aceitabilidade (IA%)	13
Tabela 6 Estimativa da vida útil (dias), para cada uma das três temperaturas de armazenamento avaliadas (valor \pm erro padrão) e parâmetros μ e σ de acordo com a distribuição de Weibull.....	27
Tabela 7 Atributos mencionados por no mínimo 10% dos avaliadores na abordagem Napping.....	31
Tabela 8 Valores obtidos no teste de aceitação dos blends.....	33
Tabela 9 Frequência de menção aos termos Aroma de Fermentado e Sabor de Fermentado...	34

Sumário

1.	INTRODUÇÃO.....	1
2.	OBJETIVO	2
2.1	Objetivos específicos.....	2
3.	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA.....	2
3.1	Bactérias ácido lácticas (BAL)	2
3.1.1	<i>Lacticaseibacillus casei</i>	5
3.1.2	Atividade bioconservadora das Bactérias ácido lácticas (BAL)	6
3.1.2.1	Bioconservação de sucos de Frutas.....	9
3.2	Sucos de frutas prensados a frio.....	10
3.2.1	Suco de maçã	12
4.	MATERIAL E MÉTODOS.....	112
4.1	Produção do suco de maçã prensado a frio.....	13
4.2	Inoculação do <i>Lacticaseibacillus casei</i> no suco de maçã prensado a frio: análises físicas, químicas e microbiológicas.....	14
4.3	Análises físico-químicas e microbiológica do suco de maçã bioconservado durante o armazenamento.	15
4.3.1	Viabilidade do <i>Lacticaseibacillus casei</i> durante o armazenamento.....	16
4.4	Avaliação Sensorial do suco de maçã prensado a frio bioconservado por <i>L. casei</i>	16
4.4.1	Participantes do estudo.....	16
4.4.2	Procedimentos experimentais.....	16
4.4.3	Avaliação da aceitação.....	17
4.4.4	Estimativa da vida útil sensorial.....	17
4.4.5	Napping® associado ao perfil ultra-flash.....	17
4.5	Aplicação do suco de maçã prensado a frio bioconservado por <i>Lacticaseibacillus casei</i> como base para <i>blends</i> de frutas e vegetais.....	18
4.6.	Análises estatística dos dados	19
5.	RESULTADO E DISCUSSÃO.....	20

5.1	Viabilidade do <i>Lactocaseibacillus casei</i> BGP93 e análises físico-químicas durante o processo de fermentação.....	20
5.2	Avaliação microbiológica do suco de maçã prensado a frio bioconservado por <i>Lactocaseibacillus casei</i> BGP93.....	22
5.3	Avaliações da viabilidade de <i>Lactocaseibacillus casei</i> BGP93 e análises físico-químicas durante o armazenamento refrigerado em diferentes temperaturas.....	22
5.4	Teste de aceitação.....	25
5.5	Estimativa da vida útil sensorial.....	26
5.6	Napping® associado ao perfil ultra-flash.....	27
5.7	Aplicação do suco de maçã prensado a frio bioconservado por <i>Lactocaseibacillus casei</i> como base para blends de frutas e vegetais.....	31
6.	CONCLUSÃO.....	35
6.1	Sugestão de trabalhos futuros.....	36
7.	REFERÊNCIAS	37
	APÊNDICES.....	50
	APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	51
	ANEXO.....	54
	ANEXO A – Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética da UNIRIO.....	55

1. INTRODUÇÃO

Os consumidores que estão mais conscientes dos benefícios à saúde oriundos dos hábitos alimentares, vêm aumentando a procura por alimentos mais naturais e de melhor valor nutricional (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015; ROMANO et al., 2016). Dessa forma, a produção dos sucos prensados a frio tem apresentado crescimento constante, porém, apresentam vida útil curta devido às características de processamento, dificultando o atendimento à demanda do mercado (BIANCANIELLO et al., 2018).

Com o intuito de manter a qualidade do produto, as indústrias de sucos e as instituições de pesquisa vêm investindo em tecnologias alternativas ao processamento térmico, incluindo técnicas que resultam em produtos frescos, minimamente processados, sem o uso de aditivos químicos, com maior prazo de validade e que garantam a segurança microbiológica do produto, atendendo assim, a demanda do mercado (DHUNDALE et al., 2018; HATAB et al., 2016; JUAREZ-ENRIQUEZ et al., 2015; MA et al., 2017; USAGA; WOROBO, 2018). Dessa forma, nos últimos anos, a utilização da bioconservação tem sido amplamente estudada com o objetivo de evitar a contaminação por microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, preservando a qualidade e garantindo a segurança do produto (SADIQ et al., 2019; WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015).

A bioconservação utiliza microrganismos e/ ou seus compostos antimicrobianos com o objetivo de melhorar a segurança dos alimentos e estender sua vida útil (REIS et al., 2012). Por ser um método de conservação natural, sem prejuízos à saúde do consumidor, sem perdas das propriedades nutricionais do produto, fácil de implementar, uma vez que não requer altos investimentos e grandes habilidades tecnológicas, a bioconservação tem se mostrado uma alternativa viável para a conservação de alimentos (GÓMEZ-SALA et al., 2016; REIS et al., 2012).

As bactérias ácido lácticas (BAL) tem sido amplamente utilizadas como agentes bioconservadores, pois produzem metabólitos como ácido láctico e acético, dióxido de carbono, diacetil, acetaldeído, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas (O'CONNOR et al., 2015). Estes compostos, além de atuarem na conservação dos alimentos inibindo microrganismos indesejáveis, contribuem para alterações no sabor e textura dos alimentos (DIAS et al., 2018; NURAIIDA, 2015; SINGH, 2018). Dentre as BAL, o gênero *Lactobacillus* tem seu uso destacado no processamento de alimentos, pois apresentam resistência ao pH baixo, se adaptam a diversos substratos alimentares e possuem atuação probiótica, gerando benefícios à saúde do consumidor (FREIRE et al., 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014). Cepas da espécie *Lacticaseibacillus casei* tem sido bastante utilizadas em sucos de frutas, produzindo bebidas bioconservadas e probióticas (COSTA et al., 2013; FONTELES et al., 2012; KAPRASOB et al., 2017; PEREIRA; MACIEL; RODRIGUES, 2011). Dentre alguns sucos de frutas, Espirito-Santo et al., (2015) identificaram o suco de maçã como meio contendo melhores substratos para o desenvolvimento e viabilidade de diferentes espécies de *Lacticaseibacillus*. Além disso, o suco de maçã é amplamente utilizado pela indústria como base para outros sucos de frutas, pois apresenta um menor custo e por ter um sabor mais adocicado, contribui para menor adição de açúcar no produto (DE SOUZA, 2019).

Além das mudanças naturalmente causadas pelo metabolismo das BAL, abusos na temperatura de armazenamento e distribuição do produto podem ser pontos críticos do processo, acelerando mudanças nas características (SPAGNOL et al., 2018). Assim, se faz necessário avaliações sensoriais durante o processo de desenvolvimento de um produto de modo a alcançar características ideais na fabricação e distribuição (DIMITROVSKI et al., 2015; GRANATO et al., 2010; SHORI, 2016).

Embora alguns estudos já tenham realizado análises sensoriais em sucos de frutas

contendo BAL, nenhum deles considerou a temperatura de armazenamento como fator acelerador, simulando assim, possíveis alterações no produto durante a distribuição e ao longo de sua vida útil. Além disso, a bioconservação tem sido associada a outros processos como por exemplo a pasteurização ou clarificação, que podem ter influência no perfil sensorial do produto (DIAS et al., 2018; HASHEMI et al., 2017; MALDONADO et al., 2017; NEMATOLLAHI et al., 2016; PIMENTEL et al., 2015).

O presente trabalho realizado em parceria com a empresa Da Natu® (São Paulo, Brasil), teve como principal objetivo produzir suco de maçã prensado a frio de elevado valor nutricional, sem adição de conservantes ou aditivos com a vida útil estendida.

2. OBJETIVO

Este trabalho objetivou utilizar *Lacticaseibacillus casei* (Lyofast BGP 93®) como agente bioconservador do suco de maçã prensado a frio, a fim de obter vida útil estendida para o produto.

2.1 Objetivos específicos

- Acompanhar a viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* (Lyofast BGP 93®) durante a vida útil do suco de maçã bioconservado, armazenado sob diferentes temperaturas (4 °C, 8 °C e 10 °C);
- Investigar a viabilidade de *Lacticaseibacillus casei* em relação às possíveis alterações físico-químicas e sensoriais no suco de maçã prensado a frio;
- Avaliar a aceitabilidade do suco de maçã prensado a frio bioconservado durante a vida útil (0, 7 e 15 dias), armazenado sob diferentes temperaturas (4 °C, 8 °C e 10 °C);
- Estimar a vida útil sensorial do produto;
- Avaliar a percepção do consumidor em relação às características sensoriais de suco de maçã bioconservado, armazenado em diferentes tempos (0, 7 e 15 dias) e temperaturas de armazenamento (4 °C, 8 °C e 10 °C);
- Avaliar a aplicação do suco de maçã prensado a frio bioconservado como base para produção de *blends* de frutas e vegetais quanto a aceitação e percepção das características sensoriais oriundas do processo de fermentação.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias ácido lácticas (BAL)

Há mais de um século, Elie Metchnikoff, cientista russo, ganhador do prêmio Nobel e professor do Instituto Pasteur em Paris, especulou que as BAL ofereciam benefícios à saúde que levavam à longevidade. Desde então, estudos com esse grupo de microrganismos continuam a surgir (WGO, 2017).

As BAL são principalmente mesófilas, com poucas cepas termófilas e capazes de se multiplicar em um intervalo de temperatura de 5 °C a 45 °C, são ácido-tolerantes e podem multiplicar-se em alimentos de baixo pH. Pertencem à microbiota autóctone de mamíferos, colonizando a mucosa da pele, respiratória, vaginal e intestinal. Podem fazer parte do grupo dos filos *Firmicutes* ou *Actinobacteria*. (FORSYTHE, 2013; SAUER, et al., 2017; WEDAJO,

2015), pertencendo aos gêneros bacterianos *Aerococcus*, *Carnobacterium*, *Enterococcus*, *Lactobacillus*, *Lactococcus*, *Leuconostoc*, *Oenococcus*, *Bifidobacterium*, *Pediococcus*, *Streptococcus*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus* e *Weissella* (CHOLAKOV et al., 2017; HLADÍKOVÁ et al., 2012; PLAZA-DIAZ et al., 2019; TUMBARSKI; LANTE; KRASTANOV, 2018). Vale ressaltar que o gênero *Lactobacillus* foi recentemente reclassificado em outros 25 gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus*, que compreende espécies importantes no campo probiótico, como *Lacticaseibacillus casei* (ZHENG ET AL., 2020).

BAL é um grupo de microrganismos com classificação funcional de não-patogênicas, não esporuladas, não-toxicogênicas, Gram-positiva, anaeróbicas facultativas, bastonetes ou cocos e não móveis. São bactérias fermentativas associadas à produção de ácido lático a partir de carboidratos, tornando-os úteis para a fermentação de alimentos. Fermentam carboidratos para quase inteiramente ácido lático, através da via Embden-Meyerhof-Parnass (homofermentação), ou para uma mistura de ácido lático, dióxido de carbono e ácido acético e/ou etanol através da via 6- fosfogluconato/fosfocetolase (heterofermentação) (NURAI DA, 2015; ZANIRATI et al., 2015).

A composição e as condições do meio de crescimento, como a presença de açúcares, ácidos, meio sob condição anaeróbica, temperatura, entre outros fatores, podem alterar a formação do produto por diferentes bactérias lácticas. A fermentação facilita a digestibilidade, pois promove a degradação de estruturas complexas em simples, catabolizando carboidratos, gorduras, proteínas e outros componentes. Compostos como diacetil, acetaldeído e peróxido de hidrogênio, também são produzidos durante a fermentação, estes compostos contribuem para o sabor e textura dos alimentos, além de contribuir para a inibição de microrganismos indesejáveis (CASTRO et al., 2016; LINH; SAKAI; TAOKA, 2018; NURAI DA, 2015).

As BAL homo e heterofermentativas através da fermentação dos açúcares são capazes de produzir ácido lático, entretanto, essas bactérias também são capazes de metabolizar ácidos orgânicos como fonte de energia para a produção de ácido lático. Essa conversão pode ocorrer por duas vias: a primeira seria através de enzima malolática (MLE), sendo esse mecanismo dependente de NAD^+ e Mn^{2+} , descarboxilando L- malato diretamente para L- lactato, embora essa via seja capaz de gerar energia para a célula, ela não é capaz de sustentar o seu crescimento. A segunda via seria através da enzima málica (ME) essa via converte L-malato em piruvato, que pode ser posteriormente direcionado para a produção de energia, equilíbrio redox ou utilizado em outras vias como apresentado na Figura 1. A via através da ME é capaz de sustentar o crescimento celular. Enquanto a MLE é amplamente distribuída entre as BAL, a ME está presente em poucas espécies, como *Lacticaseibacillus casei*, *Enterococcus faecalis* e *Streptococcus bovis* (DIMITROVSKI et al., 2015; LANDETE et al., 2009, 2013). Sendo *Lacticaseibacillus casei* possuidor das duas vias de dissimilação de L- malato.

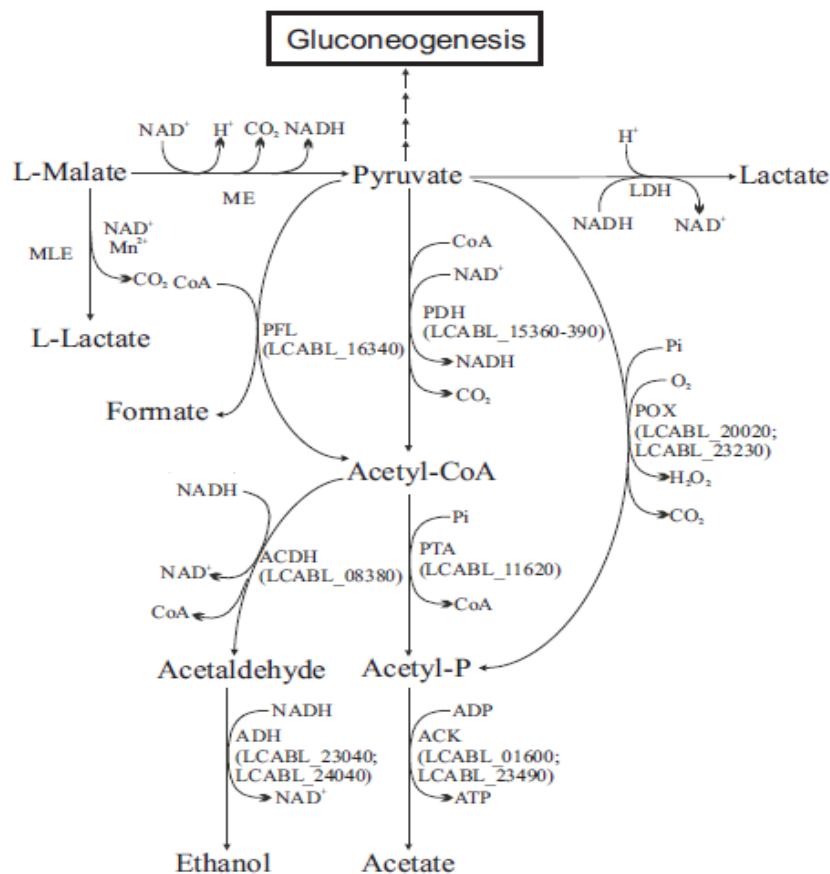


Fig. 1 Representação esquemática das vias catabólicas do L-malato e possíveis vias biossintéticas. Acetaldeído desidrogenase (ACDH); acetato-cinase (ACK); álcool desidrogenase (ADH); lactato desidrogenase (LDH); enzima málica (ME); enzima malolática (MLE); piruvato desidrogenase (PDH); piruvato formato-liase (PFL); piruvato oxidase (POX). Adaptado de Landete et al. (2013).

O metabolismo do L- malato pelas BAL apresenta grande importância na produção de vinhos, pois leva a uma redução da acidez do produto, já que o ácido láctico seria um ácido mais fraco quando comparado ao ácido málico, além de fornecer estabilidade microbológica ao impedir o crescimento secundário da BAL após o engarrafamento (DIMITROVSKI et al., 2015; REUSS et al., 2010).

As BAL possuem grande utilização na indústria de alimentos de forma geral, pois são geralmente reconhecidas como seguras de acordo com Food and Drug Administration (FDA) dos EUA e possuem presunção qualificada de segurança, de acordo com European Food Safety Authority (EFSA), dando-lhes isenção de risco para a aplicação na utilização humana (EFSA, 2018; FIELD; ROSS; HILL, 2018; WGO, 2017). Desempenham papel importante na produção de diferentes tipos de alimentos devido às características metabólicas específicas, são comumente associadas aos produtos lácteos, porém, também desempenham papel fundamental em outras matérias-primas e alimentos. Essa multifuncionalidade incentiva os pesquisadores a procurarem novas aplicações para obtenção de novos produtos para um mercado de alimentos em crescimento contínuo (MOLINA, et. al., 2012; TUMBARSKI; LANTE; KRASTANOV, 2018).

Muitas cepas de BAL possuem alta tolerância a ácidos gástricos e a bile, sobrevivência através do trato gastrointestinal, capacidade de aderir à superfície intestinal, atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas e boas propriedades tecnológicas,

o que possibilita sua utilização como probióticos na saúde humana (NURAIDA, 2015; TUMBARSKI; LANTE; KRASTANOV, 2018). Probióticos são definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014) entretanto, em estudo recente esta definição foi ampliada, não restringindo o termo somente às células de microrganismos viáveis, considerando como probiótico "célula microbiana viável ou inviável (vegetativa ou esporo; intacta ou rompida) que seja potencialmente saudável para o hospedeiro" (ZENDEBOODI et al., 2020).

As BAL mais utilizadas como probióticas são pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* com várias cepas demonstrando excelentes propriedades *in vitro* e *in vivo*. Encontradas em alimentos fermentados tradicionais, as espécies de *Lactobacillus* são tecnologicamente adequadas para aplicação em alimentos, pois são mais resistentes ao baixo pH e têm adaptação a vários substratos alimentares (EVIVIE, et al., 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014).

A adição de microrganismos probióticos aos alimentos é uma tendência crescente. A ingestão regular desses microrganismos está associada à regulação da função intestinal, melhora da digestão da lactose, estimulação do sistema imunológico e inibição de patógenos (AMORIM; PICCOLI; DUARTE, 2018; LIU et al., 2017). O mercado global de probióticos foi avaliado em US\$ 35,9 bilhões em 2016, espera-se que esse mercado cresça ainda mais, juntamente com a preocupação em relação à saúde em todo o mundo (GRAND VIEW RESEARCH, 2018). Em 2017, cerca de 40% dos consumidores, procuraram probióticos em alimentos (SLOAN, 2019).

Para conceder os benefícios à saúde que são relacionados ao consumo dos probióticos, as recomendações para as contagens mínimas viáveis de cada cepa probiótica em gramas ou mililitros de produto, são bastante variáveis. Uma dose diária mínima de 10^8 - 10^9 UFC /mL para consumo de produtos probióticos tem sido recomendada, o que corresponde a 100 g ou mililitros destes produtos contendo entre 10^6 e 10^7 UFC /mL de células viáveis probióticas por dia (BRASIL, 2017; KARIMI; MORTAZAVIAN; DA CRUZ, 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014).

3.1.1 *Lacticaseibacillus casei*

Entre os *Lactobacillus* sp., *Lacticaseibacillus casei* é uma espécie Gram-positiva, muito utilizada para produção de laticínios, queijos, vários outros produtos fermentados e consequentemente na produção de produtos funcionais. *Lacticaseibacillus casei* é uma bactéria ácido láctica facultativamente heterofermentativa isolada de uma ampla variedade de habitats, incluindo leite cru e fermentado, tratos gastrointestinais de animais e materiais vegetais. Devido ao seu bom desempenho tecnológico na aplicação de alimentos, é uma das espécies mais estudadas entre o grupo (DIMITRELOU et al., 2016; LANDETE et al., 2013; MISHRA; PRASAD, 2005; ULLAH et al., 2017).

Algumas cepas de *Lacticaseibacillus casei* são capazes de produzir compostos antimicrobianos, atuando como bioconservadores em alimentos. São capazes de produzir bacteriocinas e biosurfactantes, conferindo potencial atuação do microrganismo na conservação dos alimentos (LI et al., 2013; SHARMA; SAHARAN, 2014). Cepas de *Lacticaseibacillus casei* mostraram-se produtoras de bacteriocina do tipo Lactocina 705 de espectro inibitório contra *Listeria monocytogenes* (PARADA et al., 2007) e em recente estudo, foi possível identificar uma nova bacteriocina produzida por *Lacticaseibacillus casei*, a LiN333, a qual foi capaz de atuar contra patógenos Gram-negativo e Gram-positivos, incluindo microrganismos importantes na produção de doenças de origem alimentar como

linhagens de *Salmonella*, *Escherichia* e de *Listeria monocytogenes*, apresentando grande potencial como alternativa aos conservantes alimentares convencionais (ULLAH et al., 2017).

Estudos recentes evidenciaram que bacteriocinas produzidas por *Lacticaseibacillus casei* apresentaram atividade antimicrobiana em ampla faixa de pH (2-10) e às altas temperaturas (121 °C), sugerindo que essas bacteriocinas podem ser utilizadas como conservadoras em processos de diferentes condições de pH e que envolvam tratamentos térmicos (ULLAH et al., 2017; SARI; SARI; UNTARI, 2018).

Lacticaseibacillus casei também podem ter grande atuação como agente antifúngico. Li et al., (2013), através da aplicação de *L. casei* AST18 em iogurte, observaram capacidade de controle no crescimento de fungos filamentosos e aumento na vida útil do produto. Além da produção de bacteriocinas, a atuação bactericida também pode ser observada através da sua potente atuação na produção de peróxido de hidrogênio (REIS et al., 2012).

Além da atuação na conservação de alimentos, cepas de *Lacticaseibacillus casei* tem demonstrado atuações probióticas garantindo inúmeros benefícios (Quadro 1).

Quadro 1 Benefícios atribuídos à ingestão de *Lacticaseibacillus casei*

Benefício	Referência
Redução das chances de desenvolvimento de diabetes	YADAV; JAIN; SINHA, 2007
Melhorias dos sintomas de osteoporose	KIM et al., 2009
Auxílio na remissão da diverticulite	TURSE et al., 2013
Efeito de hipocolesterolemia	GUO; LI, 2013
Melhoria da saúde bucal e dentária	SUTULA et al., 2013
Redução da prevalência de diarreia associada ao tratamento com antibióticos	DIETRICH; KOTTMANN; ALAVI, 2014
Efeitos positivos na redução do movimento intestinal e melhorias na função renal e contra inflamações	AKOGLU et al., 2015
Inibição tumoral	TIPTIRI-KOURPETI et.al, 2016
Contribuição na perda de peso de crianças obesas e melhoria no metabolismo de lipídios	NAGATA et al., 2017
Melhoria no tratamento da erradicação de <i>Helicobacter pylore</i> em crianças com gastrite	ALBERDA et al., 2018
Redução de adesão do rotavírus em células	FERNANDEZ-DUARTE et al., 2018

Fonte: Própria autoria, 2021

3.1.2 Atividade bioconservadora das Bactérias ácido lácticas (BAL)

A procura dos consumidores por produtos processados o mais natural possível e as recomendações nutricionais e/ ou diretrizes legislativas que exigem uma redução da concentração de certos ingredientes (sal, enxofre, nitrito e açúcar), incentivam a indústria alimentícia a criar novas maneiras de manter a qualidade e garantir a segurança dos alimentos. Além disso, a população que está cada vez mais interessada em aspectos de saúde e sustentabilidade do seu modo de vida em geral e sua dieta em específico, têm exigido produtos com melhor valor nutricional, frescor e sabores (ASCHEMANN-WITZEL; VARELA; PESCHEL, 2019; HUANG et al., 2017; VERRAIN; SIJTSEMA; ANTONIDES, 2016; ZEMSER, 2015). Assim, o interesse no desenvolvimento de novos agentes antimicrobianos naturais para combater o crescimento de microrganismos patogênicos e/ ou deteriorantes de

alimentos é crescente (WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015). Nesse sentido, como já mencionado as BAL tem sido amplamente estudadas por serem conhecidas por suas propriedades probióticas e pela capacidade de produzir compostos antimicrobianos, como as bacteriocinas, ácidos orgânicos, diacetil, peróxido de hidrogênio e por sua capacidade de inibir o crescimento de microrganismos nocivos por competição, devido à rápida utilização de substratos (carboidrato), com acúmulo simultâneo de ácidos láctico e acético com consequente redução do pH (GÄNZLE, 2015; KANDYLIS et al., 2016; TENEA e YEPEZ, 2016).

A utilização desses microrganismos e/ ou seus compostos antimicrobianos para a melhoria da segurança dos alimentos e a extensão da vida útil do produto, é chamado de bioconservação (REIS et al., 2012).

Dentre as propriedades de bioconservação, as BAL apresentam atividade contra fungos, além de possuírem capacidade de reduzir ou remover totalmente micotoxinas. Essa atuação, ocorre através da produção de metabólitos antimicotoxinogênicos, ou pela capacidade de ligação das células bacterianas com as micotoxinas adsorvendo-as (BINTSIS, 2018; CHEONG et al., 2014; HAWAR et al., 2013; PERCZAK et al., 2018).

Entre os ácidos orgânicos, os ácidos láctico, acético, fenilático (PLA), *p*-OH-fenilático (OH-PLA), ácidos fórmico, propiônico, butírico, e indol-3-lácteo, desempenham papel na inibição do crescimento fúngico e bacteriano. A produção de ácidos orgânicos pelas BAL tem sido o mecanismo antifúngico mais relatado (GUIMARÃES et al., 2018; ÖZCELIK; KULEY; ÖZOGUL, 2016; VALERIO et al., 2016). Os níveis e tipos de ácidos orgânicos produzidos durante o processo de fermentação dependem das espécies de BAL utilizadas, composição da cultura e condições de crescimento (LAU e LIONG, 2014). O mecanismo sinérgico entre os ácidos orgânicos e outros metabólitos, pode aumentar substancialmente a atividade antimicrobiana (CORTÉS-ZAVALA et al., 2014).

No que se refere à ação contra as micotoxinas, numerosos estudos demonstraram que muitas espécies de BAL podem removê-las ou biotransformá-las (FASHANDI; ABBASI; KHANEGHAH, 2018; HAWAR et al., 2013). Existem vários mecanismos de remoção, porém, o mais eficiente seria o da ligação entre as micotoxinas e as BAL (PERCZAK et al., 2018). As superfícies das células das BAL além da capacidade de se ligarem à toxinas, também podem se ligar à metais pesados. Essa ligação é baseada na capacidade de adsorção pelas células bacterianas, onde peptidoglicanos e os exopolissacarídeos desempenham um importante papel (PERCZAK et al., 2018; ZOGHIA; KHOSRAVI-DARANI; SOHRABVANDI, 2014).

As BAL também possuem a capacidade de sintetizar bacteriocinas que atuam na conservação dos alimentos, possuindo grande atividade antimicrobiana. Os primeiros registros sobre bacteriocinas datam de 1925, quando André Gratia publicou um estudo referente ao antagonismo promovido por uma linhagem de *Escherichia coli* sobre outras linhagens da mesma espécie, sendo nomeada de colicina. Em 1933, ocorre então a descoberta de uma nova bacteriocina, desta vez oriunda de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*, uma bactéria ácido láctica, sendo esta substância posteriormente, em 1947, nomeada como nisina. (GRATIA, 1925; MATTICK; HIRSCH, 1947; WHITEHEAD, 1933). Desde então, a nisina tem sido usada como conservante de alimentos, porém, sua aprovação pela Food and Drug Administration (FDA), em queijos processados pasteurizados ocorreu somente em 1988. A nisina continua sendo a bacteriocina comercialmente mais importante, embora outras bacteriocinas tenham sido caracterizadas e desenvolvidas para possível aprovação e uso. Apesar do crescente número de estudos sobre as bacteriocinas, apenas a nisina, pediocina PA-1/AcH e Micocina® possuem aprovação pela FDA para uso como agentes de conservação de alimentos, embora algumas bacteriocinas como a sakacina, plantaricina e a carnosina também estejam comercialmente disponíveis (BALCIUNAS et al., 2013; CAMARGO et al., 2018; RADAIC; DE JESUS; KAPILA, 2020).

As bacteriocinas são peptídeos ribossomicamente sintetizados, e podem ser categorizados em três grupos: classe I, classe II e classe III (ALVAREZ-SIEIRO, et al., 2016). As bacteriocinas podem ser de espectro restrito, quando possuem ação inibitória contra bactérias da mesma espécie da que foi responsável pela sua produção ou de amplo espectro, quando possuem ação contra bactérias pertencentes por espécies diferentes. Células bacterianas que produzem bacteriocinas são resistentes ao seu próprio peptídeo antimicrobiano (JUTURU; WU, 2018). Sua estrutura pode ser linear ou globular e a sequência e formação de aminoácidos determina sua atividade bacteriocida, sensibilidade a enzimas, solubilidade e estabilidade em diferentes pH e temperatura (VERMA et al., 2014).

Bacteriocinas classe I e II são termoestáveis e possuem tamanhos menores (<10 kDa) enquanto as de classe III são termolábeis e possuem tamanhos maiores (>10 kDa). As bacteriocinas classe I compreendem de 19 a 50 aminoácidos e sofrem modificações pós-tradução resultando em aminoácidos não padronizados promovendo impacto em suas propriedades, como a lantionina, β -metil-lantionina, dehidrobutirina e dehidroalanina. A classe I é ainda subdividida em lantibióticos (Nisin A), sanctibióticos (Subtilosin A), peptídios cíclicos (Enterocin AS-48), peptídeos lassos (Microcin J25) e peptídeos glicosinados (Glycocin F). A classe II compreende peptídeos não modificados e pode ser subdividida em bacteriocinas semelhantes a pediocinas (Pediocin PA-1), bacteriocinas de dois peptídeos (Lactococcin Q), bacteriocinas circulares (Lacticin Q) e bacteriocinas lineares não pediocinas (Laterosporulin). As bacteriocinas semelhantes à pediocina são as bacteriocinas de classe II mais dominantes. As bacteriocinas de classe III compreendem o grupo com informações mais escassas. Colicina é um dos exemplos de bacteriocinas de classe III produzidas por *E. coli*, além das bacteriocinas Helveticina M, Helveticina J, Enterolisina A e Caseicina produzidas por *Lactobacillus crispatus*, *Lactobacillus helveticus*, *Enterococcus faecalis* e por *Lacticaseibacillus casei* respectivamente (ALVAREZ-SIEIRO et al., 2016; KUMARIYA et al., 2019).

As bacteriocinas podem atuar de forma bactericida ou bacteriostática. A sua atividade antibacteriana pode ocorrer através da formação de poros na membrana celular, resultando na inibição da síntese de DNA, RNA, proteína e polissacarídeo; inibição da biossíntese dos componentes da parede celular, inibindo a síntese de peptidoglicano; promovem efeito na atividade de enzimas autolíticas, levando à lise celular e atuam também na inibição de esporos bacterianos. A maioria das bacteriocinas atuam como bactericida em células sensíveis, frequentemente induzindo a formação de poros na membrana celular (KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016).

Os produtos alimentares alvo de utilização de bacteriocinas incluem carnes e produtos de carnes, produtos de peixe, produtos lácteos, cereais, frutas, hortaliças e bebidas (VERMA et al., 2014).

Na bioconservação de alimentos as bacteriocinas podem ser utilizadas de algumas formas, sendo elas: adição direta de bacteriocinas purificadas ou semi-purificadas aos produtos alimentares; inoculação de BAL em uma matriz alimentar, com consequente produção das bacteriocinas; através do uso de um ingrediente no processamento de alimentos que foi previamente fermentado com cepas bacterianas produtoras de bacteriocinas, ou serem incorporados na superfície de alimentos como frutas, como revestimento comestível ou na matriz de filmes plásticos usados para embalagem (BARBOSA; MANTOVANI; JAIN, 2017; KARPÍSKI; SZKARADKIEWICZ, 2015).

Embora as bacteriocinas possam ser produzidas por uma variedade de bactérias Gram-positiva e Gram-negativa, as produzidas por BAL são de particular interesse para a indústria, além de não serem tóxicas para células eucarióticas, as bacteriocinas oriundas de BAL são extremamente potentes contra muitos microrganismos deteriorantes e patogênicos oriundos de alimentos e possuem espectro mais abrangente que as oriundas de bactérias Gram-negativa. As bacteriocinas também são incolores, inodoras e insípidas, o que aumenta ainda mais a sua

utilidade, não alterando as características sensoriais dos alimentos. São geralmente termoestáveis e tolerantes ao pH; demonstram um modo de ação bactericida agindo sobre a membrana citoplasmática bacteriana, não são tóxicos em células eucarióticas; tornam-se inativas por proteases digestivas, não levando a resistência cruzada aos antibióticos convencionais e têm influência insignificante sobre a microbiota intestinal normal (FIELD; ROSS; HILL, 2018; KARPINSKI; SZKARADKIEWICZ, 2016; PEREZ; ZENDO; SONOMOTO, 2014; TUMBARSKI; LANTE; KRASTANOV, 2018).

3.1.2.1 Bioconservação de sucos de frutas e seu perfil sensorial

Para fabricação de sucos, o tratamento térmico é um dos métodos de conservação mais utilizados, uma vez que a ação do calor promove a inativação de microrganismos e enzimas. No entanto, a utilização de temperaturas elevadas pode levar a perda de compostos nutricionais, propriedades antioxidantes e alterações físico-químicas indesejáveis nos produtos. Com isso, tecnologias não térmicas vêm sendo exploradas a fim de melhorar a qualidade dos produtos e garantir a estabilidade microbiológica ao longo de sua vida útil.

Diversos estudos tem demonstrado os efeitos do uso de tecnologias não térmicas no processamento de sucos de frutas como método de conservação (ABDUL KARIM SHAH et al., 2016; ANEJA et al., 2014; BEVILACQUA et al., 2018; FUNDO et al., 2019; JIMÉNEZ-SÁNCHEZ et al., 2017; WIBOWO et al., 2019; YI et al., 2017). Jermann et al. (2015), identificaram que tecnologias como luz ultravioleta (UV) e processamento por alta pressão (HPP), foram as mais utilizadas entre as indústrias de bebidas participantes do estudo. Porém, quando se trata da implementação do HPP em escala industrial, limitações são encontradas. O fato do sistema ocorrer necessariamente em lotes, diminuindo a produtividade, o alto investimento em que a tecnologia está associada e a necessidade de embalagens específicas para realização do procedimento, dificultam a utilização pelas indústrias (BIANCANIELLO et al., 2018; HUANG et al., 2017; PANIAGUA-MARTÍNEZ et al., 2018). Além disso, sucos pressurizados foram recentemente associados a algumas características indesejáveis como “alimentos processados”, “adição de aditivos e conservantes”, “produtos artificiais” e “ruins”, demonstrando a visão negativa que alguns consumidores ainda apresentam em relação a tecnologia HPP (MARTINS et al., 2019) devido à falta de conhecimento sobre referida tecnologia. Quanto à utilização de luz UV como método de conservação de sucos, estudos demonstram restrições. A eficácia do processo é dependente da composição do produto e das doses de luz UV a que são submetidos. Características como viscosidade, coloração, turbidez e teor de sólidos solúveis, influenciam na absorção da luz UV, o que pode acarretar em produtos de qualidade sensorial, nutricional e/ou microbiológica inferiores (FUNDO et al., 2019; KOUTCHMA et al., 2016; USAGA & WOROBO, 2018). Diante das dificuldades expostas e da crescente pressão do consumidor sobre a indústria para evitar o uso de conservantes químicos, se faz necessário a identificação de estratégias alternativas, seguras e de baixo custo que atendam à demanda do mercado e garantam a segurança microbiológica do produto (LEYVA SALAS et al., 2017; SADIQ et al., 2019).

Nos últimos anos, a utilização da bioconservação tem sido amplamente estudada com o intuito de evitar microrganismos patogênicos e deteriorantes nos alimentos, preservando a qualidade e garantindo a segurança do produto (SADIQ et al., 2019; WEISS; LOEFFLER; TERJUNG, 2015). Por se tratar de um método de conservação natural, sem prejuízo à saúde, e manutenção das propriedades nutricionais, de fácil implementação, já que não necessita de altos investimentos e grandes habilidades tecnológicas, a bioconservação tem se mostrado uma alternativa viável para conservação de alimentos (GÓMEZ-SALA et al., 2016; REIS et al., 2012). Hashemi et al (2017) verificaram a atividade bioconservadora do suco de limão pasteurizado, fermentado por *Lactiplantibacillus plantarum* LS5, e evidenciaram que

as propriedades antibacterianas aumentaram durante a fermentação. Pimentel et al (2015) demonstraram que o suco de maçã submetido ao tratamento térmico e enzimático seria um meio adequado para a incorporação de *Lactocaseibacillus paracasei* ssp. *paracasei*, garantindo vida útil do suco de 14 a 28 dias sob refrigeração (4°C). Thakur e Josh (2017) relataram aumento no número de células viáveis de *Lactiplantibacillus plantarum* em suco de maçã pasteurizado durante o processo de fermentação, com consequente incremento da atividade antimicrobiana e redução de microrganismos contaminantes.

Embora a bioconservação tenha se mostrado uma estratégia viável, estudos demonstram que alterações no perfil sensorial do produto podem ocorrer. As BAL possuem diferentes atuações, que são dependentes da cepa e da matriz a serem utilizadas em determinado processo (CHEN et al., 2019; SHORI, 2016). Ricci et al. (2018) examinaram os efeitos de 15 BAL sobre as características aromáticas do suco de amora e identificaram *Lactiplantibacillus plantarum* 285, a responsável pela maior produção de compostos voláteis totais. Os ácidos orgânicos, que são importantes metabólitos no suco fermentado também afetam o sabor do produto. Ellendersen et al. (2012) mostraram que o teor de ácido málico no suco de maçã gala fermentado com *L. casei* foi reduzido em 87%, enquanto o ácido láctico aumentou 31%. Esses estudos evidenciam o papel da cepa utilizada no perfil sensorial do produto revelando que o metabolismo pode realçar o “amargor”, “acidez” e “adstringência”(GRANATO et al., 2010); entretanto, se a seleção da cepa e a matriz foram adequadas, podem resultar em concentrações de ácidos orgânicos e compostos voláteis que levarão a alterações benéficas no perfil sensorial de sucos de frutas (CHEN et al., 2019; DE GODOY ALVES FILHO et al., 2017; DI CAGNO; FILANNINO; GOBBETTI, 2017; KAPRASOB et al., 2017; RICCI et al., 2018).

Tais alterações, oriundas da formação de inúmeros compostos podem influenciar na qualidade do produto e aceitação do consumidor, gerando grande impacto comercial.

3.2 Sucos de frutas prensados a frio.

Motivados pelos consumidores que estão cada vez mais em busca de produtos naturais e saudáveis, as indústrias de alimentos e bebidas estão cada vez mais se adequando a esta tendência, oferecendo produtos mais nutritivos, funcionais e com características sensoriais que satisfaçam as expectativas dos consumidores (ANDRÉS; TENORIO; VILLANUEVA, 2015; ROMANO et al., 2016). Movidos por essa realidade, a indústria de sucos *premium* prensados a frio obteve crescimento rápido em todo o mundo (BIANCANIELLO et al., 2018). Os sucos de qualidade *premium* são obtidos diretamente de frutas e outros vegetais, apresentam melhor valor nutricional e sensorial (BIANCANIELLO et al., 2018; KOUTCHMA et al., 2016; VERVOORT et al., 2011). Embora os sucos *premium* custem mais que os sucos de outras categorias, pesquisas indicam que consumidor está disposto a pagar mais pelas características diferenciadas, não impedindo o seu crescente consumo (BARDZIK et al., 2016; ZHU et al., 2018).

De forma generalizada, a popularidade dos sucos prensados a frio (Figura 2) se deu pela sua conveniência e pelas alegações de saúde que foram atribuídas ao produto (VUCHNICH, 2015). O número de consumidores que dizem que a conveniência teve impacto significativo nas decisões de compra de alimentos foi de 5% no ano de 2017 para 54% em 2018, e a escolha dos alimentos baseada na marca e forma do produto, deu espaço às escolhas definidas por benefícios oferecidos pelo consumo de determinado produto (IFIC, 2018; SLOAN, 2019).

A prensagem a frio é um processo de dois estágios: em primeiro lugar ocorre a moagem de frutas ou legumes previamente armazenados em temperaturas refrigeradas e, em seguida, extrai-se o suco pressionando suavemente os ingredientes evitando assim a oxidação e perdas de compostos (BIANCANIELLO et al., 2018; KOUTCHMA et al., 2016). Embora essa

tecnologia ainda não seja bem reconhecida pelos consumidores brasileiros, foi demonstrado que foram feitas associações positivas aos sucos prensados a frio, sendo percebidos como naturais e saudáveis (MARTINS et al., 2019).

Com o objetivo de manter a qualidade, o processamento do suco prensado a frio não inclui a utilização de tratamento térmico como método de conservação, necessitam de distribuição sob refrigeração e apresentam prazo de validade relativamente curto (HATAB et al., 2016; VERVOORT et al., 2011). O crescimento constante da indústria de sucos prensados a frio em mercados regionais ou nacionais tem exigido maior rendimento, maior estabilidade após prensagem e prolongamento do prazo de validade do produto (KOUTCHMA et al., 2016). Até 2021 é esperado um crescimento CAGR (Taxa composta de crescimento anual) de mais de 8% do mercado de sucos prensados a frio (MICROMARKET BRASIL, 2017). Nesse sentido, a indústria de sucos e as instituições de pesquisa vêm investindo em tecnologias alternativas ao processamento térmico, incluindo técnicas que resultam em produtos frescos, minimamente processados, sem o uso de aditivos químicos, com maior prazo de validade e que garantam a segurança microbiológica do produto, atendendo assim, a demanda do mercado (DHUNDALE et al., 2018; HATAB et al., 2016; JUAREZ-ENRIQUEZ et al., 2015; MA et al., 2017; USAGA; WOROBO, 2018).

Atualmente uma das maiores produtoras de suco prensado a frio no país, a Greepeople®, utiliza como método de conservação o HPP, oferecendo aos seus clientes, segurança microbiológica e extensão da vida útil do produto. Porém, pelas dificuldades já citadas, não é a realidade da grande maioria das empresas produtoras de sucos prensados a frio. Fabricantes como Detox Food Marketing®, Puro+®, Pure Food® e Urban Remedy®, Fit UP!®, Da Natu®, dentre outras, não utilizam outro método de conservação além da refrigeração e os produtos alcançam de três a cinco dias de vida útil do seu produto quando mantidos sob refrigeração (4 °C). De forma geral, essas empresas inauguraram suas atividades com suco prensado a frio no Brasil há poucos anos e vendem 100 mL de seus sucos por um valor médio de R\$4,00 a R\$5,00 e as alegações mencionam: 100 % natural, não pasteurizado, sem conservantes, sem aditivos, sem glúten, sem lactose e seis vezes mais nutrientes.



Fig. 2 Imagem ilustrativa de sucos prensados a frio.

3.2.1 Suco de maçã

Como uma das frutas mais nutritivas, a maçã é fonte de minerais, vitaminas, fibras alimentares e fitoquímicos, como os polifenóis que exercem função antioxidante (TSAO, 2016), sendo o consumo associado à redução de riscos de doenças degenerativas e cardiovasculares, causadas pelo estresse oxidativo, especialmente por radicais livres e espécies reativas de oxigênio (KSCHONSEK, et al., 2018).

Na produção dos sucos de frutas, a pasteurização tem sido utilizada de forma tradicional no processo de conservação. Porém, a qualidade do produto e frescor podem estar bastante reduzidos, devido aos nutrientes sensíveis ao calor e compostos voláteis que podem ser afetados negativamente pelo processamento térmico, o que vai em desacordo com interesse crescente dos consumidores por bebidas mais naturais, minimamente processadas, com características nutricionais e sensoriais inalteradas (LIU et al., 2015; MENA et al., 2013; YI et al., 2017).

O suco de maçã tem grande popularidade e sua cor e sabor são importantes indicadores de qualidade. A cor do suco de maçã tende a mudar durante ou após o processamento, devido às reações enzimáticas e não enzimáticas. Enzimas como polifenoloxidasas (PPO) e peroxidase (POD) têm grande influência nesses indicadores (YI et al., 2017; TEREFE; BUCKOW; VERSTEEG, 2014). No entanto, tem havido uma tendência crescente de mercado para o suco de maçã natural, de coloração mais escura e turva, devido às suas qualidades sensoriais e nutricionais, que se assemelham às do produto fresco (LIU et al., 2015).

O suco de maçã tem sido um ingrediente comumente utilizado pela indústria de sucos para substituir os adoçantes artificiais e o açúcar em outros sucos de frutas, néctares e seus *blends*, proporcionando um gosto adocicado e reduzindo o total de calorias da bebida (DE SOUZA, 2019). Além disso, estudos demonstraram que o suco de maçã pode ser uma boa matriz para o desenvolvimento e viabilidade de diferentes espécies de *Lactobacillus* (ESPIRITO-SANTO et al., 2015).

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho é resultado a parceria entre a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e a empresa Da Natu®. Todas as ações técnicas foram realizadas no Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. As matérias primas, equipamento de prensagem a frio, meios de cultura e outros materiais necessários, foram doados pela empresa parceira para o desenvolvimento do trabalho. As análises foram realizadas em duas etapas. A primeira compreendeu um estudo prévio objetivando a escolha da cepa de melhor viabilidade no suco de maçã prensado a frio, que foi realizada previamente pelo grupo de pesquisa. A segunda etapa, resultado do presente trabalho, compreendeu a determinação da vida útil do suco de maçã prensado a frio, análise da viabilidade do *Lactocaseibacillus casei*, estudos relacionados ao seu perfil sensorial durante o armazenamento refrigerado e aplicação do suco de maçã prensado a frio como base para outros blends de frutas e vegetais. Ambas as operações estão descritas nos fluxogramas apresentado na Figura 3. É importante destacar que a vida útil do suco de maçã prensado a frio comercializado pela empresa parceira é de 5 dias, com temperaturas de armazenamento e distribuição que variam de -18 °C a 10 °C. Além disso, a empresa dispunha de um tempo máximo de 6 horas para realizar a bioconservação no suco de maçã prensado a frio.

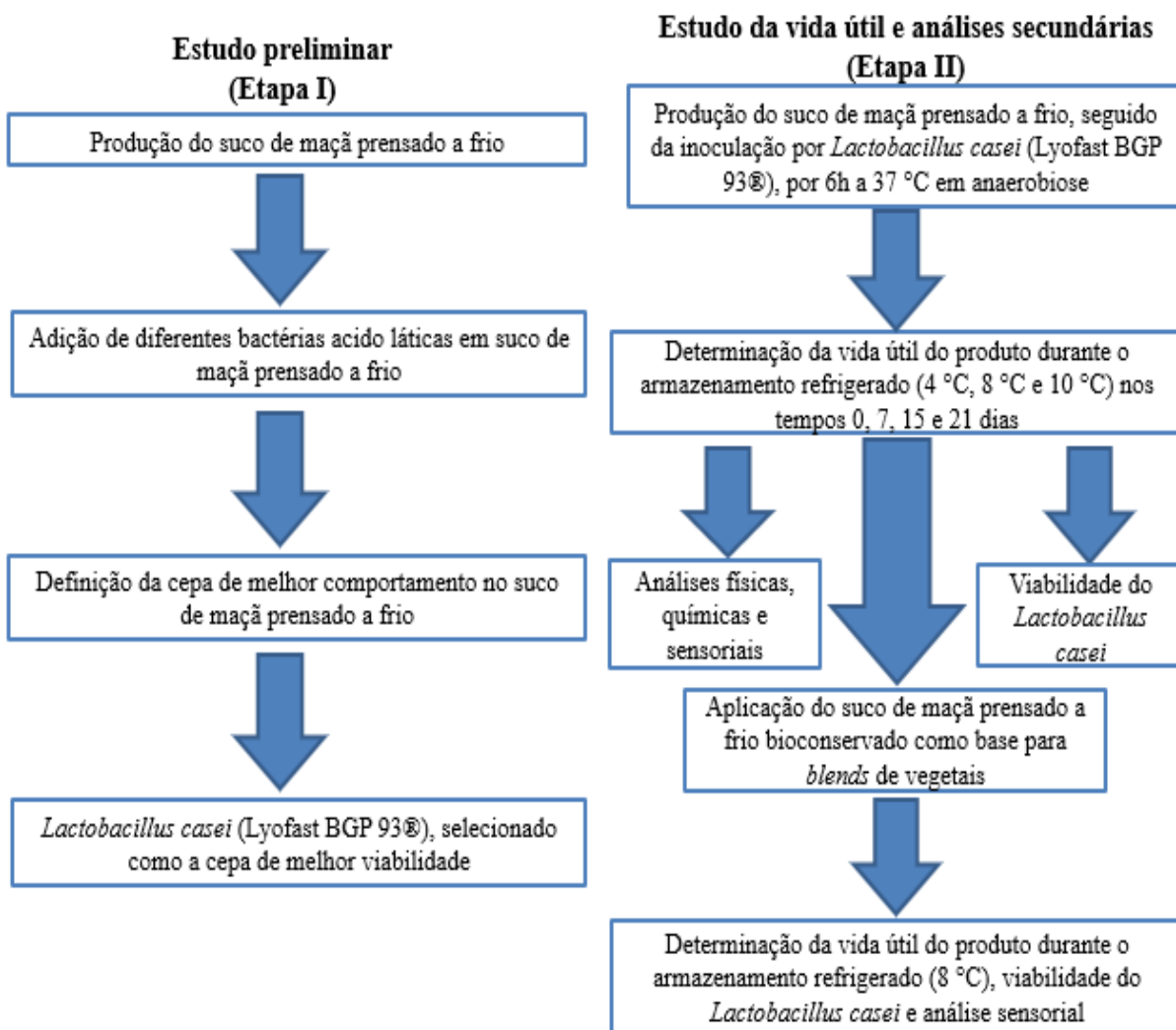


Figura 3 Fluxograma de trabalho com a realização das etapas I e II

4.1 Produção do suco de maçã prensado a frio.

Maçãs de variedade Gala adquiridas no CEASA – Rio de Janeiro, foram utilizadas para produção do suco. As maçãs foram selecionadas e as impróprias para o consumo ou que apresentavam injúrias foram descartadas. Maçãs em grau de maturação ideal (bem vermelhas, lisas e firmes), seguiram para etapa de higienização, com lavagem em água corrente seguida da sanitização com imersão da fruta em solução clorada 200 ppm, por 15 min. Após a higienização, as maçãs foram enxaguadas em água corrente e secas com papel toalha não reciclável e depois armazenadas sob refrigeração (4 °C) por aproximadamente 1 hora. As maçãs já refrigeradas passaram pelo processo de prensagem em um extrator do tipo prensa da marca Omega Juicer®, conforme Figura 4. Após a prensagem, o suco seguiu para a etapa de inoculação do *Lactobacillus casei*, como descrita no tópico 4.2.



Figura 4 Esquema de obtenção do suco de maçã prensado a frio

4.2 Inoculação do *Lactocaseibacillus casei* no suco de maçã prensado a frio: análises físicas, químicas e microbiológicas

Cepas liofilizado de *Lactocaseibacillus casei* BGP93 (Lyofast BGP 93®) adquiridas da empresa Sacco®, mantidas sob temperatura de congelamento (-18 °C), foram adicionadas ao suco de maçã prensado a frio. A bebida foi armazenada em balde fermentador com mecanismo do tipo *airlock* adaptado (Figura 5) e mantida por um período de 6 h a 37 °C, quando alíquotas foram coletadas para a realização de análises físico-químicas e microbiológicas, logo após a adição do microrganismo (tempo 0) e depois a cada 1 hora. Todas as análises foram realizadas em triplicata.



Figura 5 Recipiente utilizado para armazenamento do suco durante as 6h a 37 °C com mecanismo *airlock* adaptado.

As análises físico-químicas compreenderam: teor de sólidos solúveis (°Brix), determinado por refratometria através de equipamento analógico (Akso, RHB32); pH, determinado através da utilização de potenciômetro digital (Simpla, PH140-03-0619) e acidez titulável, medida a partir do volume de NaOH utilizado na titulação, sendo expressa em porcentagem de ácido láctico, de acordo com AOAC (2006).

Com a finalidade de acompanhar a viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* BGP93 durante o processo, amostras da bebida foram diluídas de forma seriada (10^{-1} a 10^{-6}). Primeiramente adicionou-se 25 mL da bebida a um erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada estéril, obtendo-se a primeira diluição. Em seguida a solução foi homogeneizada, retirada 1,0 mL, o qual foi inserido em outro tubo contendo 9,0 mL de água peptonada. Homogeneizou-se obtendo a segunda diluição e assim sucessivamente até a obtenção das seis diluições. As diluições foram semeadas em placas contendo ágar MRS, por meio de adaptação da técnica da microgota (CHAVES et al., 1999). As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas e acondicionadas em jarras de anaerobiose, utilizando o sistema de geração de atmosfera anaeróbica (Probac do Brasil®). Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro de suco (UFC/mL).

4.3 Análises físicas, químicas e microbiológicas do suco de maçã bioconservado durante o armazenamento refrigerado

Ao final do período de 6 h a 37 °C, o suco de maçã bioconservado foi armazenado em garrafas plásticas de 200ml previamente higienizadas, fechadas hermeticamente e mantidas a 4 °C, 8 °C e 10 °C por 0, 7, 15 e 21 dias, totalizando 12 amostras. Para determinação da vida útil do produto e viabilidade do *Lacticaseibacillus casei*, foram realizadas análises microbiológicas, físicas e químicas assim como, análises sensoriais para avaliar a aceitação do produto, vida útil

sensorial e a percepção do consumidor em relação às características sensoriais. Os estudos são detalhados nos tópicos 4.3.1; 4.3.2; 4.3.3; 4.3.4. 4.3.5 e 4.3.6.

As análises seguiram os critérios e padrões microbiológicos estabelecidos pela resolução vigente no período (BRASIL, 2001), sendo elas: 1) enumeração de Coliformes termotolerantes (45 °C) realizado em placas petrifilmes 3M (3M™ Petrifilm™), através de diluições seriadas em água peptonada estéril, diluição 1:10, seguida da inoculação de 1 mL de suco diluído. A placa foi incubada a 36 °C por 48hrs para posterior contagem das colônias. 2) Ausência de *Salmonella* sp em 25ml de suco que seguiu a metodologia de Andrews et al. (2014). Em paralelo as análises microbiológicas, foram realizadas análises físicas e químicas, como teor de sólidos solúveis (°Brix), pH e acidez titulável sendo expressa em porcentagem de ácido lático como descrito no tópico 4.2.1 Todas as análises foram realizadas em triplicata e em conjunto com as análises descritas abaixo.

4.3.1 Viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* durante o armazenamento

Com a finalidade de acompanhar a viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* BGP93 durante o armazenamento sob refrigeração, análises microbiológicas para quantificação do microrganismo no suco de maçã prensado a frio foram realizadas e seguiram como descrito em 4.2. As contagens foram realizadas nos tempos 0 (logo após o período de 6 h a 37 °C), 7 e 15 dias de armazenamento, dentro das temperaturas de 4 °C, 8 °C e 10 °C. As amostras foram diluídas de forma seriada (de 10⁻¹ a 10⁻⁶). Primeiramente adicionou-se 25 mL da amostra do suco de maçã prensado a frio bioconservado a um Erlenmeyer contendo 225 mL de água peptonada estéril, obtendo-se a primeira diluição. Os resultados foram expressos em unidades formadoras de colônias por mililitro de suco (UFC/mL).

4.4 Avaliação Sensorial do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *L. casei*

4.4.1 Participantes do estudo

Cinquenta e cinco avaliadores não treinados foram recrutados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro entre estudantes e funcionários, homens e mulheres, com idade entre 20 e 50 anos, todos consumidores de suco de frutas. Os participantes foram convidados a ler e assinar o Termo de consentimento livre e esclarecido antes de realizar o teste (CAAE 31405719.1.0000.5285).

4.4.2 Procedimentos experimentais

Amostras de suco de maçã prensado a frio bioconservado foram produzidas em diferentes momentos, para que todos os produtos com diferentes tempos de armazenamento fossem avaliados no mesmo dia. Todas as amostras foram oferecidas à temperatura de 7 ± 2 °C em copo descartável de 50 ml, codificados com números de três dígitos aleatórios em cabines sob iluminação vermelha para mascarar a cor do produto. A ordem de apresentação das amostras foi balanceada (WILLIAMS, 1949). Água à temperatura ambiente e biscoitos de água foram fornecidos para lavas a boca entre as amostras.

A avaliação sensorial foi realizada com oito amostras, pois estudo preliminar realizado com quinze indivíduos identificou que a amostra com 15 dias de armazenamento à temperatura de 10 °C, apresentou características sensoriais inaceitáveis, apesar de estar dentro dos padrões microbiológicos, tendo sido rejeitada por todos os participantes. Assim, para que tal amostra

não influenciasse de forma negativa o restante das avaliações, sua retirada do estudo foi realizada. As amostras de tempo 0 correspondem a um armazenamento de 1 dia a 4 °C, 8 °C e 10 °C, respectivamente. Primeiramente o avaliador foi orientado a realizar o teste de aceitação, seguido da vida útil sensorial e por final o Napping® associado ao perfil ultra-flash. As codificações numéricas experimentais estão apresentadas na Tabela 1.

Tabela 1
Codificação numérica das amostras de acordo com o tratamento utilizado

Código	Tratamento (armazenamento)	
	Tempo (dias)	Temperatura (°C)
T04D	0	4
T08D	0	8
T010D	0	10
T74D	7	4
T78D	7	8
T710D	7	10
T154D	15	4
T158D	15	8

4.4.3 Avaliação da aceitação

Os cinquenta e cinco participantes (DRAKE, 2007), foram orientados a avaliar as amostras de acordo com o grau de aceitação global através da escala hedônica (EH) de 9 pontos, variando de 1- Desgostei extremamente a 9- Gostei extremamente (MEILGAARD; CIVILLE; CARR, 2015).

4.4.4 Estimativa da vida útil sensorial

Junto ao teste de aceitação, ao final do questionário foi solicitado aos cinquenta e cinco avaliadores (CRUZ et al., 2010), que respondessem “sim” ou “não” para a seguinte pergunta: “Você consumiria esse produto normalmente?”. Através das respostas (sim ou não), o prazo de validade do suco de maçã prensado a frio bioconservado foi estimado pela metodologia da análise de sobrevivência (GIMENEZ; ARES; GAMBARO, 2007).

4.4.5 Napping® associado ao perfil ultra-flash

Mediante solicitação, uma lista de atributos, previamente levantados por quinze componentes do grupo de pesquisa, consumidores de suco de maçã, foi usada para descrever as principais características sensoriais das amostras. A lista foi fornecida de forma a ajudar os avaliadores a descrever as amostras usando características apropriadas (KIM; KIM; CHUNG, 2019). Os cinquenta e cinco avaliadores (VIDAL et al., 2014), foram orientados a provar cada amostra, escrever as descrições das características sensoriais percebidas e posiciona-las de acordo com os seus próprios critérios, em uma folha retangular de tamanho 60 cm × 40 cm (PAGÈS, 2005), de modo que amostras que apresentassem propriedades sensoriais mais semelhantes fossem distribuídas mais próximas umas das outras, enquanto que amostras menos similares foram colocadas mais afastadas. Nesta etapa os avaliadores foram autorizados a refazer o teste das amostras para confirmar ou alterar suas posições quando necessário. Depois

que os avaliadores finalizaram as posições de todas as amostras, o código de três dígitos foi repassado para a folha. Foi solicitado que agrupassem as amostras com base na semelhança de seus perfis sensoriais, em quantos grupos desejassem, formando pelo menos 2 grupos, de forma que cada amostra só pudesse pertencer a um único grupo. Durante a formação dos grupos os avaliadores foram instruídos a descreverem livremente as características sensoriais dos grupos que haviam classificado (PERRIN; PAGÈS, 2009).

4.5 Aplicação do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *Lacticaseibacillus casei* como base para *blends* de frutas e vegetais

A fim de identificar a possibilidade de utilização do suco de maçã prensado a frio bioconservado como base para outras bebidas, foram adquiridos da empresa parceira quatro *blends* com diferentes ingredientes (Quadro 1). Todos os *blends* foram obtidos na sua concentrada e misturadas ao suco de maçã prensado a frio bioconservado de acordo com as suas respectivas diluições. Depois de preparadas, as diluições foram armazenadas por 15 dias sob a temperatura de 8 °C para determinação da vida útil do produto. Foram realizadas análises microbiológicas que seguiram os mesmos critérios e padrões microbiológicos estabelecidos no tópico 4.3. A viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* durante a vida útil do produto também foi avaliada e foi realizada como descrito no tópico 4.3.1.

Foi aplicado o teste de aceitação, através da escala hedônica de 9 pontos, variando de 1- Desgostei extremamente a 9- Gostei extremamente, o teste *Check-All-That-Apply* (CATA) a fim de investigar a percepção dos consumidores em relação às ingredientes e as características sensoriais do produto (DOOLEY, LEE, MEULLENET, 2010; MEILGAARD; CEVILLE; CARR, 2015). Para tal, estudo preliminar foi realizado com quinze consumidores de sucos de frutos que identificaram quinze atributos, para descrever as bebidas. Em seguida oitenta e oito avaliadores foram recrutados na Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, entre estudantes e funcionários, homens e mulheres, com idade média entre 19 e 52 anos. Os consumidores foram primeiramente orientados a avaliar as amostras de acordo com o grau de aceitação global e em seguida deveriam marcar com um “x” aos atributos percebidos para cada amostra avaliada.

Os *blends* foram preparados em diferentes momentos para que todos os produtos com diferentes tempos de armazenamento (0, 7 e 15 dias) fossem avaliados no mesmo dia. Todas as amostras foram oferecidas à 7 ± 2 °C em copo descartável de 50 ml, codificados com números de três dígitos aleatórios. A ordem de apresentação das amostras foi balanceada (WILLIAMS, 1949) totalizando 12 amostras. Água em temperatura ambiente e biscoitos de água foram fornecidos para limpar a boca entre as amostras. As codificações numéricas experimentais estão apresentadas no Tabela 2.

Quadro 2. Lista de ingredientes e percentual da concentração utilizada para elaboração dos *blends*

	Ingredientes	Blend concentrado (%)	Suco de maçã Bioconservado (%)
Fortificante	pepino, couve, gengibre e limão	46%	54%
Purificante	abacaxi, água de coco, limão, gengibre e hortelã	59%	41%
Revigorante	água de coco, salsão, limão, gengibre e ginseng	22%	78%
Energizante	chá de capim santo, couve, alface, água de coco, limão e gengibre	42%	58%

Fonte: Própria autoria, 2020

Tabela 2

Códigos das amostras (*blends*) e respectivos tratamentos

Código	Amostra	Tempo (dias)
ENER T0	Energizante	0
ENER T7	Energizante	7
ENER T15	Energizante	15
PURI T0	Purificante	0
PURI T7	Purificante	7
PURI T15	Purificante	15
FORT T0	Fortificante	0
FORT T7	Fortificante	7
FORT T15	Fortificante	15
REV T0	Revitalizante	0
REV T7	Revitalizante	7
REV T15	Revitalizante	15

4.6 Análises estatísticas dos dados

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada nos dados do teste de aceitação, microbiológicos e físico-químicos, com posterior comparação pelo teste de Tukey ($p < 0,05$), usando o software *STASTICA*® versão 10 para Windows. De acordo com a pontuação, também foi demonstrado os Índices de aceitabilidade (IA%) de cada amostra através da expressão matemática abaixo (LAFARGA et al., 2019).

$$\text{Índice de aceitabilidade (\%)} = \frac{\text{Médias de pontuação obtidas no teste de aceitação} \times 100}{\text{Maior pontuação obtida na escala}}$$

Para estimativa da vida útil sensorial, foi utilizada a metodologia da análise de sobrevivência (HOUGH, 2010). A distribuição Weibull foi usada para modelar a rejeição do consumidor em função do tempo de armazenamento, quando 50% dos consumidores rejeitaram o produto (GIMÉNEZ; ARES; ARES, 2012).

Para os dados obtidos pelo *Napping*®, foi aplicado *Multiple Fator Analysis* (MFA) considerando as coordenadas X e Y das amostras no mapa de cada avaliador, onde o canto inferior esquerdo seria a origem do sistema de coordenadas (PAGÈS, 2005). A MFA foi realizada usando o pacote FactoMineR (HUSSON et al., 2011) e todas os cálculos referentes aos testes sensoriais foram realizados em linguagem R (R CORE TEAM, 2017).

Para identificação das características sensoriais obtidas através do questionário CATA foi realizada a aplicação do teste estatístico Q de Cochran para verificação das diferenças entre as amostras de acordo com as características sensoriais e Análise de Correspondência (AC) para caracterização de cada amostra através de uma representação bidimensional (MANOUKIAN, 1986). Ambos os testes foram realizados em linguagem R (R CORE TEAM, 2017).

5. RESULTADO E DISCUSSÃO

5.1 Viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* BGP93 e análises físicas e químicas do suco de maçã prensado a frio durante 6h a 37 °C

Durante as 6 h a 37 °C, não houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre os valores de pH e acidez (Tabela 3) e aumento na concentração celular do *Lacticaseibacillus casei* (Figura 6). A quantidade do microrganismo se manteve estável finalizando o processo com a mesma concentração inicial de 10^6 UFC/ml e as alterações ocorridas não caracterizaram um processo fermentativo, configurando um período de adaptação do microrganismo à matriz alimentar. Tal resultado pode estar relacionado ao fato do *Lacticaseibacillus casei* BGP93 ser uma cepa característica de utilização em leites fermentados e queijos (SACCO, 2020). Outro fato, seria o tempo destinado ao processo (6 h), o microrganismo pode necessitar de um período maior para adaptação ao meio e conseguir se desenvolver. Mesmo que o processo não tenha promovido um aumento na quantidade de células viáveis ou até mesmo o processo de fermentação, o período de 6 h foi mantido durante a realização das etapas seguintes, pois estudos demonstram a sua importância no processo de conservação, já que BAL que são submetidas a esse processo apresentam melhor desempenho na sua viabilidade durante o armazenamento do produto, pois favorece a adaptação do microrganismo ao meio a que foi introduzido (ESPIRITO-SANTO; CARLIN; RENARD, 2015; ROBERTS et al., 2018). Além disso, BAL promovem a formação de compostos voláteis e ácidos orgânicos que podem afetar positivamente o sabor do produto (CHEN et al., 2019).

Tabela 3

Médias[§] de pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (% ácido láctico) do suco de maçã prensado a frio durante o processo de inoculação

Tempo (Horas) ^a	pH	Acidez %	Sólidos solúvel (°Brix)
0	3,90 ± 0,01 ^a	0,401 ± 0,01 ^a	11,5 ± 0,00 ^a
1	3,90 ± 0,00 ^a	0,350 ± 0,01 ^b	11,5 ± 0,00 ^a
2	3,90 ± 0,00 ^a	0,418 ± 0,01 ^{ca}	11,5 ± 0,00 ^a
3	3,90 ± 0,00 ^a	0,423 ± 0,00 ^c	11,5 ± 0,00 ^a
4	3,90 ± 0,01 ^a	0,406 ± 0,00 ^{ca}	11,5 ± 0,00 ^a
5	3,91 ± 0,01 ^a	0,406 ± 0,00 ^{ca}	11,5 ± 0,00 ^a
6	3,91 ± 0,01 ^a	0,406 ± 0,00 ^{ca}	11,5 ± 0,00 ^a

[§]Médias de 3 repetições ± desvios padrão. As médias com diferentes letras nas colunas representam diferenças significativas entre as amostras ($p < 0,05$).

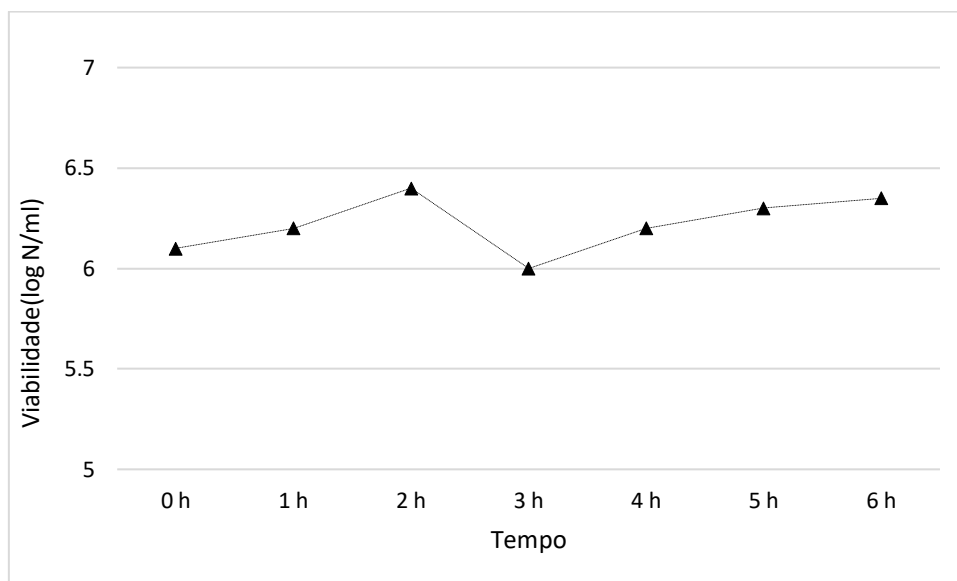


Figura 6 Viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* no suco de maçã prensado a frio durante o período de fermentação

5.2 Avaliação microbiológica do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *Lacticaseibacillus casei* BGP93

As análises microbiológicas, do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *L. casei* e armazenado por 21 dias sob refrigeração em diferentes temperaturas (4 °C, 8 °C, 10 °C) não revelaram colônias microbianas de Coliformes termotolerantes nas placas petrifilmes com suco de maçã prensado a frio bioconservado por *L. casei* durante os primeiros 15 dias de armazenamento nas diferentes temperaturas, assim como, ausência de *Salmonella* sp. em 25 mL do suco. Porém, no 21 ° dia de armazenamento, foi possível perceber visualmente a presença de fungos filamentosos no produto, dessa forma, para evitar possíveis contaminações, o produto não foi aberto, descartado com a embalagem intacta e a vida útil do produto determinado 15 dias. Esse período de vida útil já garantiu ao produto uma extensão de 3 vezes mais a oferecida pela indústria produtora do suco prensado a frio que atualmente é de 5 dias. Esses resultados confirmam os dados da literatura sobre a capacidade de cepas de *L. casei* atuarem como bioconservadores, aumento a vida útil dos alimentos (LI et al., 2013; SHARMA; SINGH SAHARAN, 2014) e corroboram com os achados de Pereira et al. (2011), que através da fermentação do suco de caju por *L. casei*, garantiu uma bebida segura durante 42 dias sob armazenamento refrigerado. Ambos resultados demonstram que a bioconservação por *L. casei* pode ser uma opção viável a utilização de conservantes químicos ou processamentos térmicos.

5.3 Avaliações da viabilidade de *Lacticaseibacillus casei* BGP93 e análises físico-químicas durante o armazenamento refrigerado em diferentes temperaturas

A viabilidade do *L. casei* em diferentes amostras durante o armazenamento em diferentes temperaturas (4 °C, 8 °C, 10 °C), com a mesma concentração inicial de *L. casei* (10^6 UFC/mL) pode ser observada na Figura 7. O suco armazenado à 4 °C demonstrou ser a condição de armazenamento menos favorável para manutenção da viabilidade do microrganismo. Nos primeiros sete dias de armazenamento houve redução de 2 ciclos logarítmicos, chegando ao

final da vida útil com 10^4 UFC/mL, evidenciando que temperaturas mais baixas implicam na instabilidade quantitativa do *L. casei* (BOZA-MÉNDES; LÓPES-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012). Esse resultado é contrário aos encontrados por Pereira et al. (2011), onde mesmo armazenado à 4 °C, o suco de caju fermentando por *L. casei*, aumentou a sua viabilidade durante os primeiros sete dias, continuando a aumentar por vinte um dia de armazenamento. Essa diferença pode ser explicada pela matriz alimentar e a cepa utilizada, apresentarem grande influência na viabilidade do microrganismo (GOMAND et al., 2019). O armazenamento à 8 °C apresentou a melhor condição em relação à estabilidade celular do microrganismo no produto. A contagem das células viáveis de *L. casei* permaneceram na quantidade de 10^6 UFC/mL até o final da vida útil (15 dias), possibilitando uma bebida bioconservada e com quantidades adequadas de microrganismos probióticos (SIDIRA et al., 2014). O armazenamento à 10 °C propiciou aumento das células de *L. casei* em 1 ciclo logarítmico, após 7 dias de armazenamento, chegando a 10^7 UFC/ml no 15 ° dia, demonstrando a adaptabilidade do *L. casei* mesmo fora da temperatura (30 a 40 °C) e pH (5,5-6,2) ideais de crescimento (COSTA et al., 2013).

O aumento nos valores de pH e redução da acidez titulável (Tabela 4), contrariam os resultados geralmente encontrados em processos fermentativos gerados por BAL, quando ocorre consumo dos açúcares disponíveis no meio, com produção de ácidos orgânicos e consequente aumento da acidez e redução do pH (GÄNZLE, 2015; RICCI et al., 2018). Estudos demonstram que algumas BAL, como *L. casei*, através do metabolismo bacteriano, possuem a capacidade de consumir ácido málico e concomitantemente produzir ácido lático e gás carbônico, desacidificando o meio, dando origem a fermentação malolática (LANDETE et al., 2013; REUSS et al., 2010). Esse processo sofre grande influência de diversos fatores, como pH e temperatura (REUSS et al., 2010). No caso do suco de maçã os índices de pH são muito baixos, mas como o estudo foi realizado para aplicação direta na indústria, não foi realizado ajuste de pH do suco, como alguns estudos realizam para facilitar o desenvolvimento e sobrevivência do *Lactobacillus* (ROBERTS et al., 2018; NEMATOLLAHI et al., 2016). Tal fato pode ter favorecido a ocorrência da fermentação malolática no produto. Dimitrovski et al. (2015), demonstraram resultados semelhantes ao produzir suco de maçã fermentado por *Lactobacillus plantarum*, favorecendo o aumento no pH do suco, associado ao seu crescimento.

Estudos mostraram que cepas de *L. casei* podem metabolizar o ácido L- málico via enzima malolática (MLF) ou através da enzima málica (ME). Em todas as temperaturas de armazenamento (Tabela 4), *L. casei* teria convertido L-ácido málico em L-ácido lático, gerando aumento do pH e diminuição da acidez, pois o ácido lático é um ácido “menos severo” do que o ácido málico. A diferenciação entre as vias é demonstrada através da capacidade de favorecer o crescimento de *L. casei*, já que a via ativada através da ME, favorece o crescimento celular do microrganismo, enquanto a via ativada por MLF, não favoreça tal condição, conferindo a estabilidade microbiológica do produto encontrada durante o armazenamento a 8 °C (LANDETE et al., 2009; SCHÜTZ; RADLER, 1974). A via málica é geralmente ativada na presença de ácido málico e baixas concentrações de glicose (LANDETE et al., 2009), que pode ser visualizada pela leve redução do °Brix na amostra com 15 dias de armazenamento sob 10 °C, estando relacionada a um consumo do próprio *L. casei*, ou da microbiota nativa da matriz alimentar. Além disso, estudos demonstraram que o pH pode exercer influência na expressão dos genes codificadores da enzima MLE (BROADBENT et al., 2010; LEMME; SZTAJER; WAGNER-DÖBLER, 2010) e da enzima ME (LANDETE et al., 2013), justificando assim, o aumento da quantidade de cepas de *L. casei* após os 7 dias de armazenamento sob a temperatura de 10 °C, na qual foram encontrados os maiores valores de pH ($4,16 \pm 0,00$).

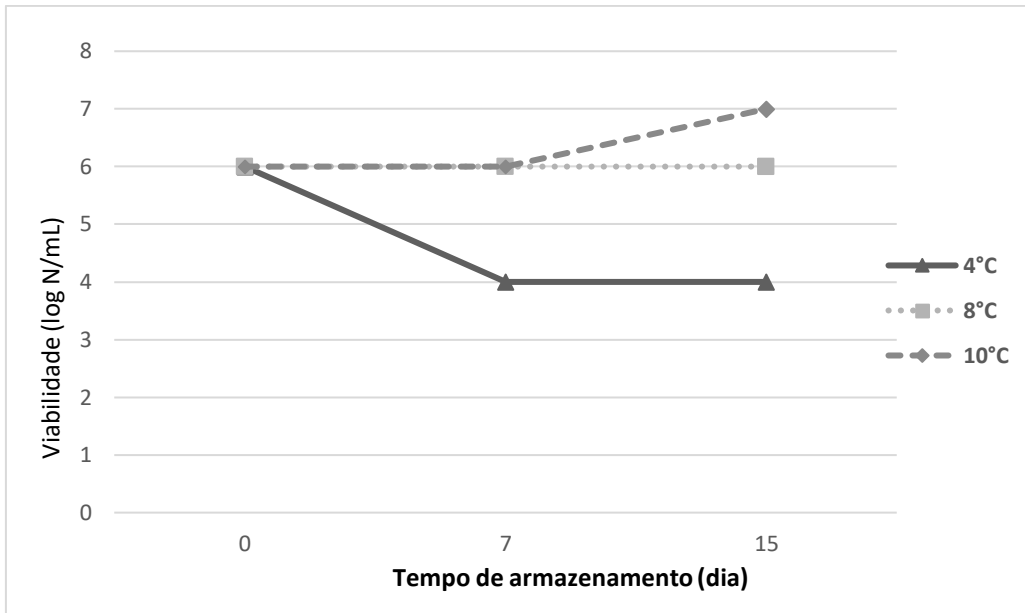


Figura 7 Viabilidade do *Lactocaseibacillus casei* no suco de maçã prensado a frio bioconservado durante o armazenamento

Tabela 4

Médias [§] de pH, sólidos solúveis (°Brix) e acidez titulável (% ácido láctico) do suco de maçã prensado a frio bioconservado durante o armazenamento a frio

Armazenamento (dias)	pH			Sólidos solúveis (°Brix)			Acidez %		
	4 °C	8 °C	10 °C	4 °C	8 °C	10 °C	4 °C	8 °C	10 °C
0	3,91 ± 0,01aA	3,91 ± 0,01aA	3,91 ± 0,01aA	11,5 ± 0,00aA	11,5 ± 0,00aA	11,5±0,00aA	0,406 ± 0,00aAB	0,406 ± 0,00aA	0,406 ± 0,00aA
7	3,92 ± 0,01aB	3,93 ± 0,01aB	3,95 ± 0,00bB	11,5 ± 0,00aA	11,5 ± 0,00aA	11,5±0,00aA	0,423 ± 0,03aA	0,406 ± 0,00aA	0,406 ± 0,00aA
15	3,97 ± 0,00aC	4,02 ± 0,00bC	4,16 ± 0,00cC	11,5 ± 0,00aA	11,5 ± 0,00aA	11,2±0,29bB	0,389 ± 0,00aB	0,373 ± 0,00abB	0,356 ± 0,00bB

[§] Médias de três repetições ± desvios padrão. As médias mostradas com diferentes letras minúsculas e maiúsculas representam diferenças significativas ($p < 0,05$) em cada linha e coluna, respectivamente.

5.4 Teste de aceitação

As médias de aceitação e o índice de aceitabilidade (IA%) das amostras de suco de maçã prensados a frio e bioconservados por *L. casei* armazenados sob refrigeração à 4 °C, 8 °C e 10 °C nos tempos 0, 7 e 15 dias (com exceção da amostra armazenada à 10 °C com 15 dias de armazenamento) estão apresentados na Tabela 5. A média da aceitação variou de $6,8 \pm 1,64$ a $3,2 \pm 2,08$. A maioria das amostras recebeu notas posicionados na faixa correspondente a “gostei ligeiramente a “gostei moderadamente” na escala hedônica de 9 pontos, o que demonstra boa aceitação, considerando se tratar de produto sem adição de açúcares, que contém microrganismos probióticos e com grande utilização pela indústria como base para outras bebidas. Esse resultado corrobora com os achados por Włodarska et al. (2016) que analisaram variedades de suco de maçã e sucos à base de maçã padrão e *premium* adquiridos comercialmente obtendo médias de aceitação variando entre “desgostei ligeiramente” a “gostei ligeiramente”. Essa semelhança é de grande importância, pois demonstra que a bioconservação por *L. casei* possivelmente não tenha exercido grande influência na aceitação geral do produto.

As amostras T04D, T08D, T010D, T74D e T154D não se diferiram significativamente quanto à aceitação. Essas amostras obtiveram as maiores médias, sugerindo a preferência dos consumidores pelas amostras mais frescas além disso, demonstram que o tempo de armazenamento não influenciou na aceitação das amostras armazenadas à temperatura de 4 °C. Esse resultado é desejável, pois confirma a semelhança do produto recém-fabricado, com o mesmo durante o armazenamento até o final da sua vida útil. As amostras armazenadas à 4 °C alcançaram os melhores índices de aceitação (IA%) e médias de aceitação, revelando-se a temperatura mais adequada para o armazenamento do produto em termos de aceitação global. Os sucos armazenados à 8 °C mantiveram sua estabilidade ($p > 0,05$) sensorial somente até os 7 dias, apresentando IA% de 61 e médias de aceitação de $5,7 \pm 2,11$. Com 15 dias de armazenamento houve diferenciação significativa ($p < 0,05$) e média de aceitação reduziu para $4,4 \pm 2,33$ e IA% de 50. A amostra T710D recebeu pontuações mais baixas, com IA% de 36 e média de $3,22 \pm 2,08$, assim, os avaliadores demonstraram “desgostar moderadamente” do produto, evidenciando que de acordo com a aceitabilidade, o armazenamento a 10°C por 7 dias já seria prejudicial a qualidade do produto.

É possível verificar que de forma geral o aumento no tempo de armazenamento influenciou negativamente a aceitabilidade do produto, sendo mais à 10 °C. A baixa aceitação de tal amostra pode ser justificada pelo aumento de 1 ciclo de log, chegando a 10^7 UFC/mL de *L. casei*, que além de propiciar maiores valores de pH, podem ter produzido quantidades maiores de metabólitos secundários como álcoois, ésteres, aldeídos, cetonas, terpenos e ácidos orgânicos alterando sensorialmente o produto (CHEN et al., 2019; KAPRASOB et al., 2017).

Tabela 5
Médias[§] de aceitação e índice de aceitabilidade (IA%)

Amostras	Tempo (dias)	Temperatura(°C)	Aceitação	AI%
T04D	0	4	6,8 ± 1,64 ^a	76
T74D	7	4	6,7 ± 1,77 ^a	74
T154D	15	4	6,2 ± 1,64 ^{ab}	69
T08D	0	8	6,6 ± 2,06 ^{ab}	73
T78D	7	8	5,7 ± 2,11 ^{bc}	61
T158D	15	8	4,4 ± 2,33 ^c	50
T010D	0	10	6,4 ± 2,33 ^{ab}	71
T710D	7	10	3,2 ± 2,08 ^d	36

[§] Médias de três repetições ± desvios padrão. Os valores médios com diferentes letras subscritas são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey (p < 0,05).

5.5 Estimativa da vida útil sensorial

A vida útil sensorial foi estimada através dos princípios da análise de sobrevivência pela distribuição Weibull, considerando a rejeição de 50% no consumo do produto nas três temperaturas de armazenamento avaliadas. A projeção pode ser mostrada na Figura 8. A estimativa da vida útil do produto em diferentes temperaturas (4°C, 8°C e 10°C) pode ser acompanhada na Tabela 6. Como esperado, a vida útil sensorial do produto reduziu de acordo com o aumento das temperaturas de armazenamento, assim como as médias de aceitabilidade encontrados no teste de aceitação (Tabela 5). Conforme mostrado na Tabela 6, a vida útil sensorial do produto reduziu aproximadamente três vezes, com o aumento da temperatura de armazenamento de 4 °C para 10 °C, atingindo vida útil de apenas seis dias, a menor entre as três temperaturas avaliadas. Esse fato está relacionado com o aumento mais expressivo do pH, redução de acidez e maior quantidade de células viáveis de *L. casei* já a partir do sétimo dia de armazenamento, evidenciados nas análises anteriores. Além disso, temperaturas de armazenamento mais altas, estão associadas ao aumento das taxas de reações bioquímicas de frutas, influenciando na vida útil do produto (FONSECA; OLIVEIRA; BRECHT, 2002). Mesmo apresentando as menores projeções de vida útil sensorial, com seis dias a 10 °C já supera o prazo de validade de cinco dias estipulado pelas indústrias produtores de sucos da categoria *premium*.

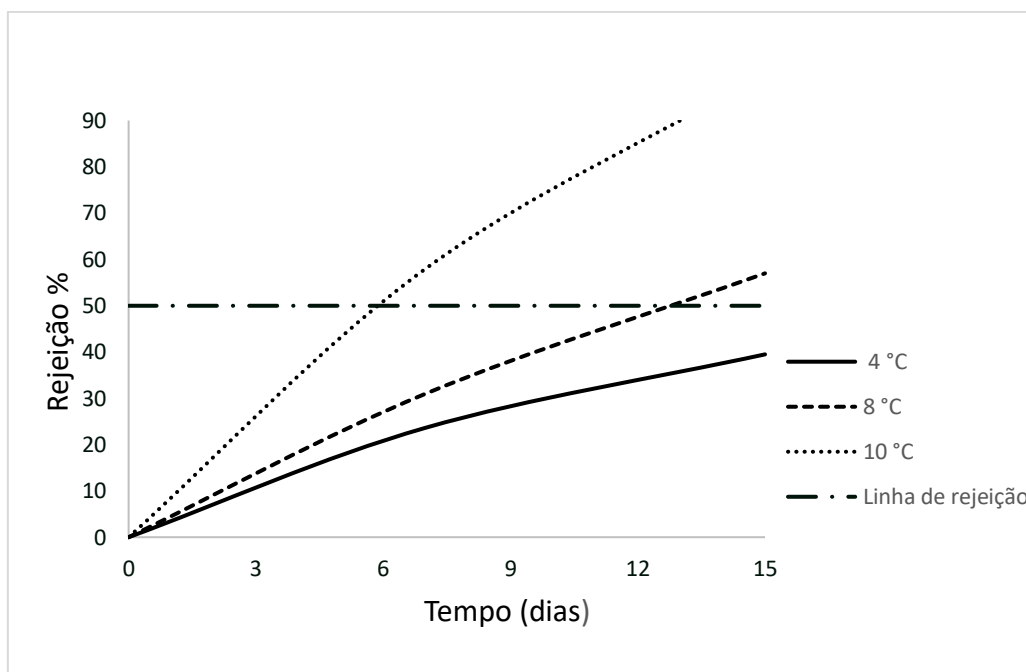


Figura 8 Probabilidade de rejeição do suco de maçã prensado a frio bioconservado pelos consumidores durante o armazenamento a frio de acordo com o modelo Weibull

Tabela 6

Estimativa da vida útil (dias), para cada temperatura de armazenamento avaliada (valor \pm erro padrão) e parâmetros μ e σ de acordo com a distribuição de Weibull.

Temperatura de armazenamento (°C)	50% rejeição dos consumidores		
	Vida útil (dias) \pm D.P	μ	σ
4	19 \pm 2,20	3.04	0.33
8	13 \pm 1,51	2.79	0.52
10	6 \pm 0,24	1.92	0.18

5.6 Napping® associado ao perfil ultra-flash

A Análise de Múltiplos Fatores (MFA) gerou mapas com o posicionamento das oito amostras e seus respectivos atributos sensoriais, os quais são apresentados nas Figuras 9 A e B. Os atributos utilizados para caracterizar cada grupo formado, foram incluídos como variável suplementar a MFA, se fossem citados por mais de 10% dos avaliadores em pelo menos uma das amostra (KIM; KIM; CHUNG, 2019). Os atributos e suas frequências de menção são mostrados na Tabela 7. Dentre os atributos descritos “sabor de suco de maçã”, “gosto doce” e “aroma de maçã” foram os mais mencionados entre os avaliadores, indicando que o conjunto principal de atributos sensoriais correspondia às descrições usuais de sucos de maçã.

O fator 1 (F1) e o fator 2 (F2) explicaram 47,69% da variância total dos dados usando apenas duas dimensões, sendo elas, F1 igual a 31,87% e F2 15,82%. Através dos atributos sensoriais analisados como variáveis suplementares, foi possível verificar que características relacionadas ao processo de fermentação (“muito sabor de fermentado x “pouco sabor de fermentado”) foram os principais fatores presentes no eixo F1. “Muito sabor de fermentado” apresentou fortes correlações com “muito gosto ácido” e “gosto amargo”, enquanto “pouco sabor de fermentado” apresentou correlação com “muito sabor de suco de maçã” e “gosto doce”.

O agrupamento das amostras deu origem a quatro grupos distintos, constatando que foi perceptível as diferenças entre elas. Através do mapeamento, como já esperado, as amostras T04D, T08D e T010D não apresentaram diferenças entre si de acordo com a percepção dos avaliadores, formando um único grupo. Essa percepção demonstra que a análise foi corretamente realizada pelos provadores, já que de fato, pelo curto tempo de armazenamento a que tais amostras foram submetidas, a temperatura não foi capaz de causar diferenças entre elas. Esse resultado é evidenciado pelas análises físicas e químicas e pelo teste de aceitação que não apresentaram diferenças ($p > 0,05$) entre as mesmas amostras. Os avaliadores posicionaram todas essas amostras próximas formando um único grupo, sendo caracterizadas com “gosto doce”, “pouco gosto ácido”, “aroma doce” e “sabor de maçã”, assim como no estudo de Ellendensen et al. (2012), onde amostras recém fabricadas foram caracterizadas como mais doces e menos ácidas.

A amostra T78D e T154D foram posicionadas próximas, sendo percebidas como “sabor de fermentado”, evidenciando que essas amostras já estariam no limite das características sensoriais desejáveis. As amostras T710D e T158D localizadas no eixo F1 negativo apresentaram características sensoriais oriundas de um produto fermentado, sendo essas características mais evidentes na amostra T710D, que foi posicionada de forma mais distante e única no eixo F1 e F2 negativos, demonstrando que quando comparada com as demais amostras, apresentaram características sensoriais mais discrepantes. T710D e T158D foram associadas a descritores do tipo “muito sabor de fermentado” e “aroma de fermentado” evidenciando que a percepção do processo fermentativo foi maior para essas amostras, provavelmente o metabolismo de *Lactobacillus casei* resultou na produção de componentes que contribuem negativamente para o aroma e sabor das amostras (BOZAMÉNDIS; LÓPES-CALVO; CORTÉS-MUÑOZ, 2012). Além disso, a avaliação resultou em características como “gosto amargo” e “muito gosto ácido”, assemelhando-se aos produtos com microrganismos probióticos (GRANATO et al., 2010).

Curiosamente o gosto mais ácido não foi percebido pelas amostras realmente mais ácidas de acordo com as análises instrumentais. A percepção da acidez se mostrou negativamente relacionada à percepção dos atributos característicos de suco de maçã, como “muito aroma de maçã” e “muito sabor de suco de maçã” comprovando que sucos de frutas podem atuar mascarando o sabor gerado por microrganismos probióticos (LUCKOW et al., 2006).

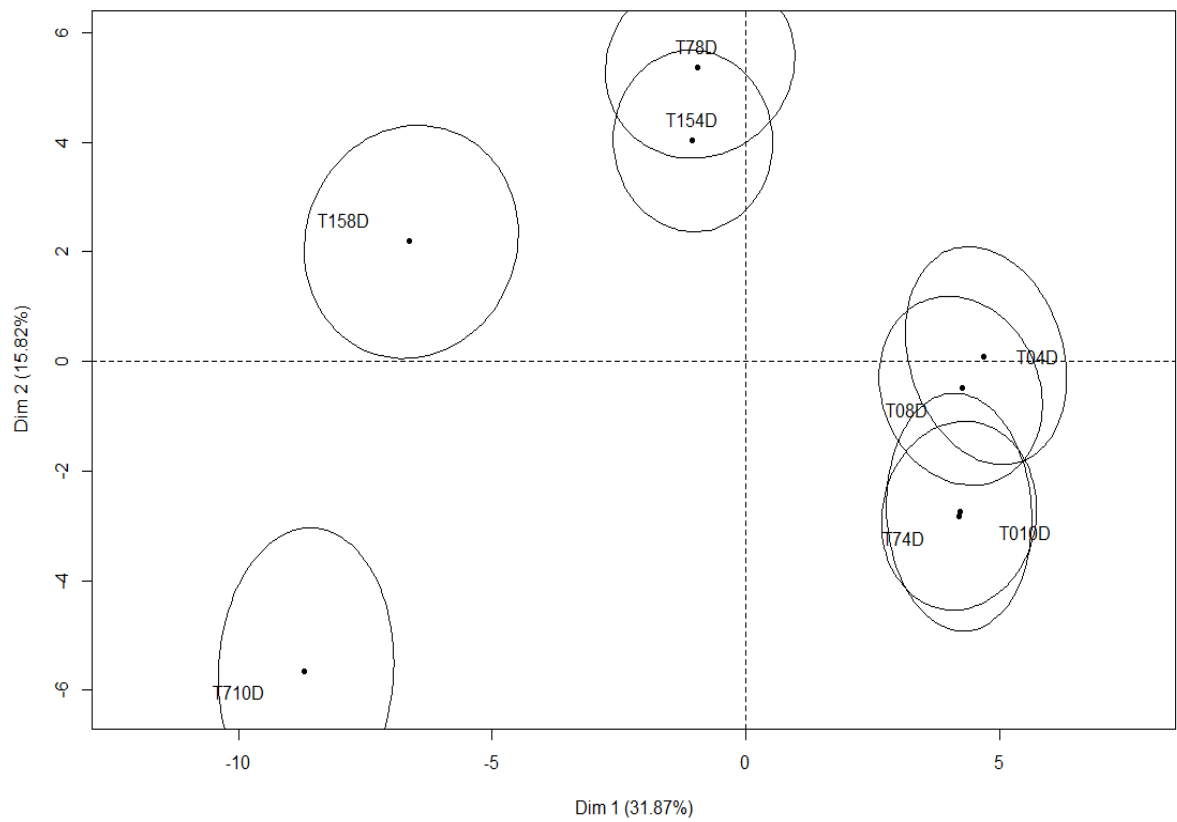


Figura 9 (A) Gráfico da AFM de localização das 8 amostras de suco de maçã prensado a frio bioconservados de acordo o método Napping®.

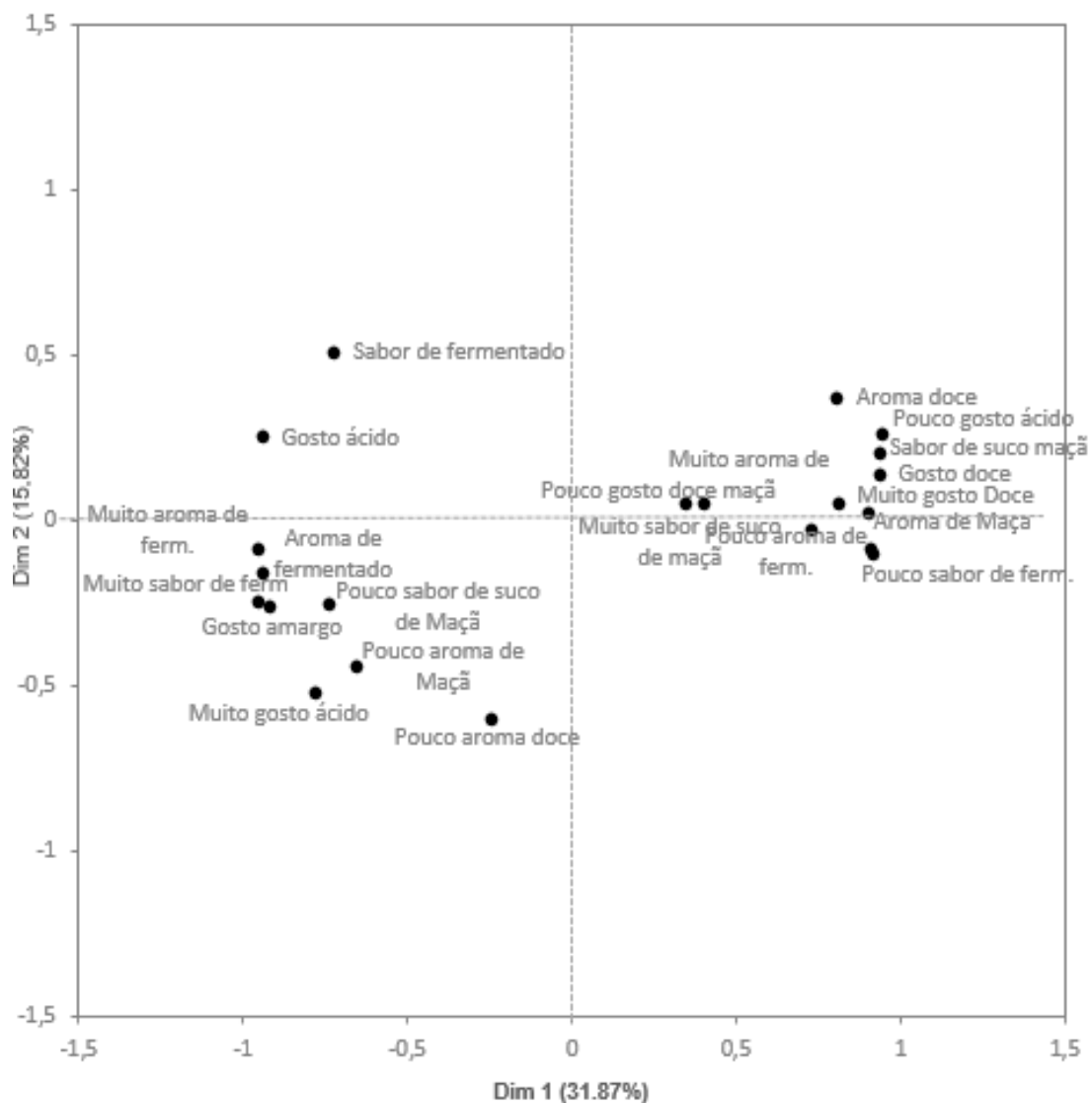


Figura 9 (B) Descritores sensoriais correspondentes utilizados como variáveis suplementares avaliadas pelo método Napping® associado ao perfil ultra-flash.

Tabela 7

Atributos mencionados por no mínimo 10% dos avaliadores na abordagem Napping

Atributos	Frequência de Menção
Pouco aroma de Maçã	64
Aroma de Maça	89
Muito aroma de maçã	38
Pouco aroma doce	35
Aroma doce	50
Pouco aroma de fermentado	45
Aroma de fermentado	50
Muito aroma de fermentado	32
Pouco sabor de suco de Maçã	63
Sabor de suco maçã	111
Muito sabor de maçã	35
Pouco sabor de fermentado	72
Sabor de fermentado	78
Muito sabor de fermentado	51
Pouco gosto doce	58
Gosto doce	92
Muito gosto doce	72
Gosto amargo	48
Pouco gosto ácido	42
Gosto ácido	59
Muito gosto ácido	23

5.7 Aplicação do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *Lacticaseibacillus casei* como base para *blends* de frutas e vegetais

Através das análises microbiológicas, não foram observadas colônias microbianas de Coliformes termotolerantes nas placas petrifilmes nos diferentes *blends* utilizando como base o suco de maçã prensado a frio bioconservado por *L. casei* durante os 15 dias de armazenamento refrigerado (8 °C), assim como, ausência de *Salmonella* sp. em 25 mL do suco. A viabilidade de *L. casei* nas 12 amostras foi avaliada durante os 15 dias de armazenamento refrigerado (Figura 10). Todos os *blends* iniciaram o período de armazenamento com a mesma concentração inicial de *L. casei*, 10⁴ UFC/mL. Os *blends* Fortificante e Energizante demonstraram ser as melhores matrizes para viabilidade e desenvolvimento de *L. casei*, já que ao final da vida útil do produto apresentaram respectivamente concentrações de 10⁷ UFC/ml. e 10⁵ UFC/ml. Este resultado pode estar associado a presença de couve, ingrediente comum nas duas formulações, que segundo Silva et al. (2013), representa uma boa matriz para espécies de *Lactobacillus*.

Quanto à aceitação dos blends foi possível observar na Tabela 8 que o sabor Purificante obteve as maiores médias de aceitação, enquanto os outros sabores obtiveram média abaixo de seis evidenciando que os consumidores desgostaram do produto, o que pode estar associado ao fato dos consumidores recrutados não serem consumidores específicos para este produto, já que os *blends* apresentavam sabores bem acentuados e característicos de frutas e vegetais. De forma geral, com exceção do *blend* Revigorante o tempo de armazenamento não influenciou a aceitação do produto já que não houve variação significativa ($p < 0,05$) entre as amostras armazenadas nos diferentes tempos.

Através da Tabela 9 foi possível verificar que os consumidores demonstraram perceber em todas as amostras características do processo fermentativo, variando a quantidade mencionada de acordo com o *blend* avaliado. Com relação ao aroma de fermentado, apenas a amostra Revigorante apresentou diferença significativa ao longo do armazenamento, sendo o tempo 15 dias percebido com mais aroma de fermentado. Com relação ao sabor de fermentado, as amostras Energizante e Purificante apresentaram diferença significativa ao longo do armazenamento. No entanto, observa-se que a amostra Revigorante apresenta maiores frequências para sabor de fermentado desde o T0, quando comparada as demais amostras de suco. O *blend* Fortificante foi a matriz que melhor inibiu as características oriundas do processo de fermentação, apesar de apresentar as maiores quantidade de *Lacticaseibacillus casei*. Provavelmente por seus ingredientes apresentarem sabores mais expressivos.

Como mostrado na Figura 11 o *blend* Revigorante foi associado às características como “gosto doce”, “gosto muito doce”, “sabor de fermentado” e inversamente associado aos descritores “amargo”, “couve”, e “gosto pouco doce”. O *blend* Fortificante e o Energizante foram inversamente associados ao “sabor de fermentado”, e fortemente associado aos descritores “couve”, “amargo”, “aroma forte de erva” e “gosto pouco doce”. O *blend* Purificante foi associado a características como “abacaxi”, “refrescante”, “cítrico”, “sabor ácido” e “hortelã”, características essas mais comuns em sucos de frutas que podem ter favorecido as melhores médias recebidas no teste de aceitação.

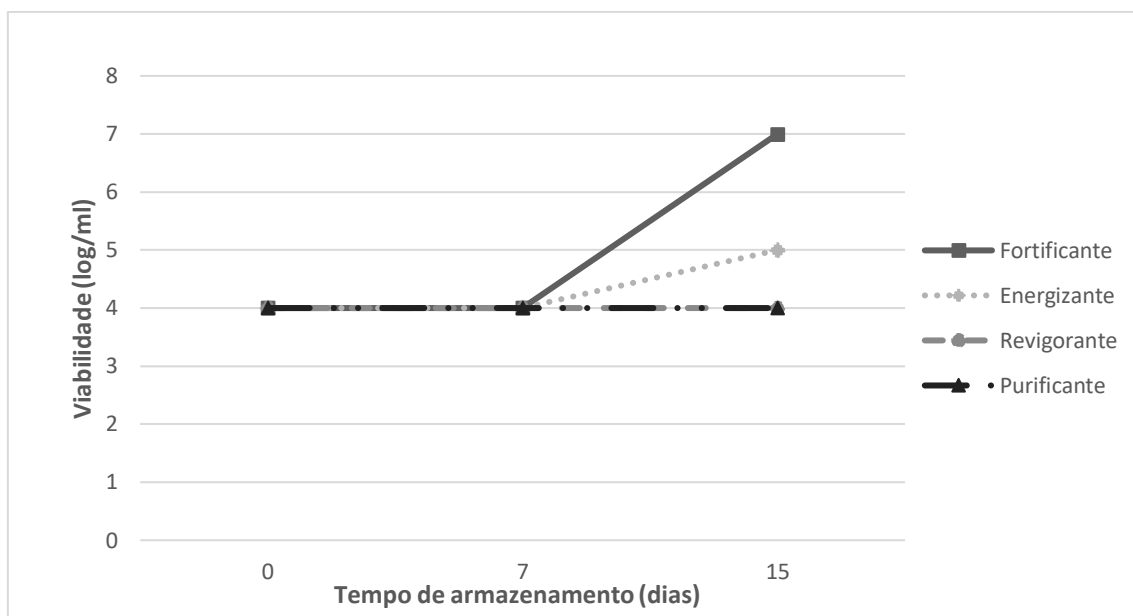


Figura 10 Viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* nos diferentes blends durante o armazenamento

Tabela 8

Valores obtidos no teste de aceitação dos blends

Amostras ^a	Aceitação
PURI T0	7,0 ± 1,96 ^a
PURI T7	7,0 ± 2,05 ^a
PURI T15	6,2 ± 2,18 ^{ab}
REVI T0	5,7 ± 2,35 ^b
REVI T7	5,6 ± 2,05 ^{bc}
REVI T15	4,7 ± 2,30 ^{cd}
FORT T0	4,4 ± 2,35 ^d
FORT T7	4,1 ± 1,92 ^d
FORT T15	3,9 ± 2,05 ^d
ENER T0	4,6 ± 2,28 ^d
ENER T7	3,9 ± 2,16 ^d
ENER T15	3,7 ± 2,22 ^d

Os valores apresentados são médias ± desvios padrão. Os valores médios com diferentes letras sobrescritas são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

Tabela 9

Frequência de menção aos termos Aroma de Fermentado e Sabor de Fermentado

Amostras^a	Frequência	
	Aroma de fermentado	Sabor de fermentado
PURI T0	10 ^a	8 ^a
PURI T7	16 ^a	19 ^b
PURI T15	15 ^a	21 ^b

Amostras^a	Frequência	
	Aroma de fermentado	Sabor de fermentado
REVI T0	11 ^a	17 ^a
REVI T7	12 ^a	21 ^a
REVI T15	24 ^b	23 ^a

Amostras^a	Frequência	
	Aroma de fermentado	Sabor de fermentado
FORT T0	7 ^a	8 ^a
FORT T7	8 ^a	12 ^a
FORT T15	11 ^a	12 ^a

Amostras^a	Frequência	
	Aroma de fermentado	Sabor de fermentado
ENER T0	9 ^a	10 ^a
ENER T7	11 ^a	17 ^{ab}
ENER T15	17 ^a	22 ^b

^aOs valores apresentados são médias e os valores com diferentes letras sobrescritas na vertical são significativamente diferentes de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

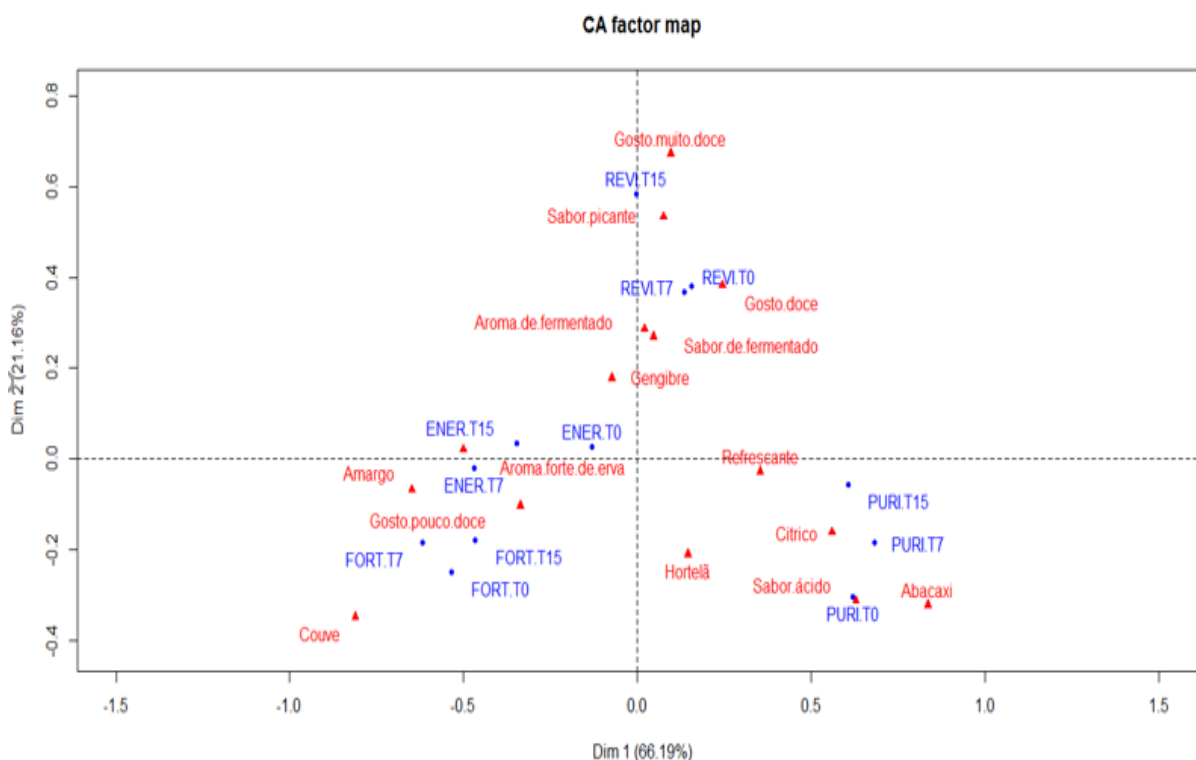


Figura 11 Representação biplot das 12 amostras de *bends* (círculos) e os atributos sensoriais (triângulos) utilizados para descrevê-los, nas duas primeiras dimensões da Análise de Correspondência (CA) na frequência apresentada nas questões CATA.

6. CONCLUSÃO

O suco de maçã prensado a frio bioconservado por *Lacticaseibacillus casei* alcançou vida útil estendida três vezes mais longos quando comparado ao atualmente oferecido pelas indústrias produtora de sucos prensado a frio (3 a 5 dias) com temperatura de armazenamento que variam de 4°C a 10°C . A bioconservação atrelada ao armazenamento refrigerado garantiu ao produto segurança microbiológica durante toda vida útil. De acordo com a viabilidade do *Lacticaseibacillus casei* a temperatura de 10 °C foi a que melhor favoreceu o desenvolvimento de *L. casei*, aumentando em 1 ciclo logarítmico, após 7 dias de armazenamento, chegando a 10⁷ UFC/ml no 15 ° dia, demonstrando a adaptabilidade do *L. casei* mesmo fora da temperatura e pH ideais para o desenvolvimento. As mudanças resultantes do metabolismo de *Lacticaseibacillus casei* ao longo do armazenamento causaram grande influência nas características sensoriais do produto. Durante o armazenamento foi possível verificar a ocorrência da fermentação malolática, caracterizada pelo aumento do pH e redução da acidez, estando seus maiores índices mais relacionados às amostras com maiores números de células viáveis de *L.casei* . O produto mostrou-se viável à comercialização e consumo da população, apresentando boa aceitação, desde que ajustado o tempo e a temperatura de armazenamento. De acordo com a aceitabilidade as amostras armazenadas a 4 °C receberam as melhores médias,

estando diretamente relacionada as menores quantidades de *Lacticaseibacillus casei* e menores índices de pH, assim como, aos menores médias de aceitabilidade (armazenamento sob 10 °C) foram associadas às maiores quantidades de *Lacticaseibacillus casei* e maiores índices de pH. De acordo com a rejeição de 50% no consumo do produto, a maior vida útil, dezenove dias, foi estimada para a amostra armazenada à 4 °C, a menor estimativa, seis dias, para os sucos armazenados à 10 °C. Entretanto, esse curto prazo, superou a vida útil do produto oferecido pelas indústrias produtoras de sucos *premium*. Através da técnica do Napping® associado ao perfil ultra-flash foi possível perceber diferenças entre as amostras armazenadas em diferentes tempos e temperaturas. As características sensoriais dos sucos processados às temperaturas mais altas, diferiram do produto recém-fabricado, enquanto o armazenamento à 4 °C apresentou características mais similares. O armazenamento à 8 °C mostrou-se uma alternativa viável, pois atende à dificuldade da indústria em manter a temperatura do produto (4 °C) durante a cadeia do frio, apresenta vida útil sensorial estendida mantendo a estabilidade microbiológica, originando um produto bioconservado e com ótima quantidade de microrganismos probióticos (10⁶ UFC/mL). A utilização do suco de maçã prensado a frio bioconservado por *Lacticaseibacillus casei* como base para blends de frutas e vegetais se mostrou uma estratégia viável, pois embora nem todos os blends tenham apresentado boa aceitação, o que pode estar relacionado ao fato dos consumidores recrutados não serem os mais adequados para a realização do estudo, o produto se manteve seguro durante os 15 dias de armazenamento a 8 °C.

6.1 Recomendações de trabalhos futuros

Devido às diferenças percebidas entre as amostras, sugerimos que seja realizado estudo mais detalhado a fim de identificar os compostos produzidos em diferentes temperaturas de armazenamento, assim como a utilização de outros métodos de conservação combinados com a bioconservação objetivando estabilizar o produto e estender ainda mais a vida útil. Além disso, são necessárias pesquisas adicionais sobre o controle do processo de fermentação e da possibilidade da extensão da vida útil do produto assim como a avaliação do perfil sensorial somente com a inoculação do microrganismo, seguido do armazenamento refrigerado, sem a necessidade do período das 6 h para adaptação do microrganismo na tentativa de otimizar o processo. Todos esses estudos podem contribuir para obtenção de produtos mais naturais, de vida útil mais longa, de melhor qualidade nutricional e com características sensoriais mais desejáveis pelos consumidores.

7. REFERÊNCIAS

- ABDUL KARIM SHAH, N. et al. Fruit Juice Production Using Ultraviolet Pasteurization: A Review. **Beverages**, v. 2, n. 3, p. 22, 2016.
- ALBERDA, C.; MARCUSHAMER, S.; HEWER, T.; JOURNAULT, N.; KUTSOGIANNIS, D. Feasibility of a *Lactocaseibacillus casei* Drink in the Intensive Care Unit for Prevention of Antibiotic Associated Diarrhea and *Clostridium difficile*. **Nutrients**, v. 10, p. 1-13, 2018.
- ALVAREZ-SIEIRO, P. et al. Bacteriocins of lactic acid bacteria : extending the family. **App. Microbiol Biotechnol**, v.100, p. 2939–2951, 2016.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION – APHA. **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**, 4. ed. Washington, p. 676, 2001.
- AMORIM, C. J.; PICCOLI H. R.; DUARTE F. W. Probiotic potential of yeasts isolated from pineapple and their use in the elaboration of potentially functional fermented beverages. **Food. Research. International**, v. 107, p. 518-527, 2018
- ANDRÉS, V.; TENÓRIO, M. D.; VILLANUEVA, J. Sensory profile, soluble sugars, organic acids, and mineral content in milk- and soy-juice based beverages. **Food Chemistry**, v.173, p.1100-1106, 2015.
- ANDREWS, W. H.; JACOBSON, A.; HAMMACK, T. S. Salmonella. In: UNITED STATES FOOD DRUG ADMINISTRATION – FDA (Ed.). **Bacteriological analytical manual online**. 8th ed. Rockville: FDA, 2014. chap. 5. Disponível em: <<http://www.cfsan.fda.gov/ebam/bam-5.html>>. Acesso em: 10 abril de 2019.
- ANEJA, K. R. et al. Emerging preservation techniques for controlling spoilage and pathogenic microorganisms in fruit juices. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.
- AOAC. **Official Methods of Analysis (18 th ed.)**. Washington, DC., USA: Association of Official Analytical Chemists. Gaithersburg: 2006.
- ASCHEMANN-WITZEL, J.; VARELA, P.; PESCHEL, A. O. Consumers categorization of food ingredients: Do consumers perceive them as ‘clean label’ producers expect? An exploration with projective mapping. **Food Quality and Pref.**, v. 71, p. 117- 128, 2019.
- AKOGLU, B. et al. Probiotic *Lactocaseibacillus casei* Shirota improves kidney function, inflammation and bowel movements in hospitalized patients with acute gastroenteritis – A prospective study. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 305-313, 2015.
- BALCIUNAS, E. M. et al. Novel biotechnological applications of bacteriocins: A review. **Food Control**, v. 32, n. 1, p. 134–142, 2013.
- BARBOSA, A. A. T.; MANTOVANI, H. C.; JAIN, S. Bacteriocins from lactic acid bacteria

and their potential in the preservation of fruit products. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 7, p. 852–864, 2017.

BEVILACQUA, A. et al. Nonthermal Technologies for Fruit and Vegetable Juices and Beverages: Overview and Advances. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 17, n. 1, p. 2–62, 2018.

BIANCANIELLO, M. et al. Feasibility of a Novel Industrial-Scale Treatment of Green Cold-Pressed Juices by UV-C Light Exposure. **Beverages**, v. 4, n. 2, p. 29, 2018.

BINTSIS, T. Lactic acid bacteria: their applications in foods. **J. Bacteriol Mycology**, v. 6, n. 2, p.89–94. 2018.

BOZA-MÉNDES, E.; LÓPEZ-CALVO, R.; CORTÉS-MUÑOZ, M. Innovative Dairy Products Developmente Usin Probiotics: Challenges and Limitations. In: **Intech**. [s.l: s.n.]. p. 13.

BRASIL, A. N. DE V. S. **RDC 02 janeiro de 2001**. Disponível em: <https://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2001/res0012_02_01_2001.html>. Acesso em: 20 mar. 2019.

BRASIL, A. N. DE V. S. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Portal Anvisa - Probióticos: Construção da lista de linhagens probióticas (2017). Construção da Lista de Linhagens Probióticas (2017). Dispõe sobre a lista de linhagens de probióticos a serem autorizadas para o uso em suplementos alimentares. Disponível em: <http://antigo.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/An%C3%A1lise+das+Linhagens+de+Probi%C3%B3ticos__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95>. Acesso em: 20 de abril de 2019

BROADBENT, J. R. et al. Physiological and transcriptional response of *Lactocaseibacillus casei* ATCC 334 to acid stress. **Journal of Bacteriology**, v. 192, n. 9, p. 2445–2458, 2010.

CAMARGO, A. C. et al. Lactic Acid Bacteria (LAB) and Their Bacteriocins as Alternative Biotechnological Tools to Control *Listeria monocytogenes* Biofilms in Food Processing Facilities. **Molecular Biotechnology**, v. 60, n. 9, p. 712–726, 2018.

CASTRO, R. et al. Lactic acid microbiota identification in water, raw milk, endogenous starter culture, and fresh Minas artisanal cheese from the Campo das Vertentes region of Brazil during the dry and rainy seasons. **J. Dairy Science**, v. 99 , p. 6086-6096, 2016.

CHAVES, A. H.; DA SILVA, J. F. C.; DE CAMPOS, O. F.; PINHEIRO, A. J. R.; VALADARES, S. D. Effect of one strain of *Lactobacillus acidophilus* (LT 29 516) as probiotic for calves. **Brazilian Journal of Animal Science**, v. 28, n.5, p. 1075-1085, 1999.

CHEN, C. et al. Influence of 4 lactic acid bacteria on the flavor profile of fermented apple juice. **Food Bioscience**, v. 27, n. October 2018, p. 30–36, 2019.

- CHEONG, E. Y. L. Isolation of lactic acid bacteria with antifungal activity against the common cheese spoilage mould *Penicillium commune* and their potential as biopreservatives in cheese. **Food Control**, v. 46, p 91- 97, 2014.
- CHOLAKOV, R. et al. Antimicrobial activity of *Leuconostoc Lactis* strain bt17, isolated from a spontaneously fermented cereal beverage (Boza). **J. Microbiol. Biotech. Food Sci.**, v. 7, p. 47- 49, 2017.
- COSTA, M. G. M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 261–266, 2013.
- CORTÉS-ZAVALA, O. et al. Antifungal activity of lactobacilli and its relationship with 3-phenyllactic acid production. **International J. of Food Microbiology**, v. 173, p. 30-35, 2014
- CRUZ, A. G. et al. Survival analysis methodology to predict the shelf-life of probiotic flavored yogurt. **Food Research International**, v. 43, n. 5, p. 1444–1448, 2010.
- DE GODOY ALVES FILHO, E. et al. Chemometric evaluation of the volatile profile of probiotic melon and probiotic cashew juice. **Food Research International**, v. 99, n. March, p. 461–468, 2017.
- DE SOUZA, L. J. Soluções para redução de açúcar. **Brasil - 2018 Opiniões Sobre Sucos**, p. 55, 2019.
- DHUNDALE, V. et al. Evaluation and Exploration of Lactic Acid Bacteria for Preservation and Extending the Shelf Life of Fruit. **International Journal of Fruit Science**, v. 18, n. 4, p. 355–368, 2018.
- DI CAGNO, R.; FILANNINO, P.; GOBBETTI, M. Lactic acid fermentation drives the optimal volatile flavor-aroma profile of pomegranate juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 248, p. 56–62, 2017.
- DIAS, J. F. et al. Acid Lactic Bacteria as a Bio-Preservant for Grape Pomace Beverage. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 2, n. September, p. 1–8, 2018.
- DIETRICH, C. G, KOTTMANN, T., ALAVI, M. Commercially available probiotic drinks containing *Lactobacillus casei* DN-114001 reduce antibiotic-associated diarrhea; **World J Gastroenterology**, v.20, n.42, p. 15837-15844, 2014.
- DIMITRELLOU, D. et al. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 169–174, 2016.
- DIMITROVSKI, D. et al. Apple juice as a medium for fermentation by the probiotic *Lactobacillus plantarum* PCS 26 strain. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 4, p. 2161–2170, 2015.

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

DOOLEY, L. LEE, Y-S., MEULLENET J-F. The application of check-all-that-apply (CATA) consumer profiling to preference mapping of vanilla ice cream and its comparison to classical external preference mapping. **Food Quality and Preference**, v. 21, n. 4, p. 394–401, 2010.

EFSA. Panel on Biological Hazards (BIOHAZ). Update of the list of QPS-recommended biological agents intentionally added to food or feed as notified to EFSA 7: suitability of taxonomic units notified to EFSA until September 2017. **EFSA Journal**, v. 16, n. 1, 2018.

ESPIRITO-SANTO, A. P.; CARLIN, F.; RENARD, C. M. G. C. Apple, grape or orange juice: Which one offers the best substrate for lactobacilli growth? - A screening study on bacteria viability, superoxide dismutase activity, folates production and hedonic characteristics. **Food Research International**, v. 78, p. 352–360, 2015.

EVIVIE, E. S. et al. Some current applications, limitations and future perspectives of lactic acid bacteria as probiotics. **Food Nutr Research**, v.61, p. 1-16, 2017.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. London, Ontario, Canada, 2002.

FASHANDI, H. M.; ABBASI, R.; KHANEGHAH, A. M. The detoxification of aflatoxin M1 by *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp.: A review. **J. Food Process Preservation**, v.42, p.1-10, 2018.

FERNANDEZ-DUARTE, K. P. et al. *Bifidobacterium adolescentis* (DSM 20083) and *Lactobacillus casei* (Lafti L26-DSL): Probiotics Able to Block the In Vitro Adherence of Rotavirus in MA104 Cells. **Probiotics and Antimicrobial proteins**, v. 10, p. 56–63, 2018.

FIELD, D.; ROSS, R. P.; HILL, C. Developing bacteriocins of lactic acid bacteria into next generation biopreservatives. **Current Opinion in Food Science**, v. 20, p.1- 6, 2018.

FONSECA, S. C.; OLIVEIRA, F. A. R.; BRECHT, J. K. Modelling respiration rate of fresh fruits and vegetables for modified atmosphere packages: A review. **Journal of Food Engineering**, v. 52, n. 2, p. 99–119, 2002.

FONTELES, T. V. et al. Optimization of the Fermentation of Cantaloupe Juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, n. 7, p. 2819–2826, 2012.

FORSYTHE, S. J. **Microbiologia da segurança dos alimentos**. 2 ed. Porto Alegre : Artmed, p.176, 2013.

FREIRE, A. L. et al. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food**

Microbiology, v. 248, p. 39–46, 2017.

FUNDO, J. F. et al. UV-C light processing of Cantaloupe melon juice: Evaluation of the impact on microbiological, and some quality characteristics, during refrigerated storage. **Lwt**, v. 103, n. May 2018, p. 247–252, 2019.

GÄNZLE, M. G. Lactic metabolism revisited: Metabolism of lactic acid bacteria in food fermentations and food spoilage. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, n. Figure 2, p. 106–117, 2015.

GIMÉNEZ, A.; ARES, F.; ARES, G. Sensory shelf-life estimation: A review of current methodological approaches. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 311–325, 2012.

GIMENEZ, A.; ARES, G.; ADRIANA, G. Using Acceptability Scores. **Journal of Sensory Studies**, v. 23, n. 2008, p. 571–582, 2007.

GOMAND, F. et al. Food Matrix Design for Effective Lactic Acid Bacteria Delivery. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 10, n. 1, p. 285–310, 2019.

GÓMEZ-SALA, B. et al. Strategies to increase the hygienic and economic value of fresh fish: Biopreservation using lactic acid bacteria of marine origin. **International Journal of Food Microbiology**, v. 223, p. 41–49, 2016.

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292–302, 2010.

GRATIA, A. Sur un remarquable exemple d'antagonisme entre deux souches de coilbacille. **Compt. Rend. Soc. Biologie**, v. 93, p. 1040-1041, 1925

GUIMARÃES, A. et al. Anti-aflatoxigenic effect of organic acids produced by *Lactobacillus plantarum*. **International J. of Food Microbiology**, v. 264, p. 31-38, 2018.

GUO, C. F.; LI, J. Y. Hypocholesterolaemic action of *Lactobacillus casei* F0822 in rats fed a cholesterol-enriched diet. *International Dairy Journal*, v. 32, p. 144-149, 2013.

HASHEMI, S. M. B. et al. Fermented sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5: Chemical composition, antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 409–414, 2017.

HATAB, S. et al. Survival and Reduction of Shiga Toxin-Producing *Escherichia coli* in a Fresh Cold-Pressed Juice Treated with Antimicrobial Plant Extracts. **Journal of Food Science**, v. 81, n. 8, p. M1987–M1995, 2016.

HAWAR, S. et al. Biotransformation of patulin to hydroascladiol by *Lactobacillus Plantarum*. **Food Control**, v. 34, p. 502-508, 2013

HILL, C. et al. Expert consensus document. The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol.**, v. 11, p. 506-514, 2014.

HOUGH, G. **Sensory shelf life estimation of food products.** [s.l: s.n.].

HLADÍKOVÁ, Z. et al. Antimicrobial activity of selected lactic acid cocci and production of organic acids. **Acta Chimica Slovaca**, v.5, p. 80- 85, 2012.

HUANG, H. W. et al. Current status and future trends of high-pressure processing in food industry. **Food Control**, v. 72, n. 12, p. 1–8, 2017.

IFIC, 2018. **13th Food and Health Survey.** Disponível em: <<https://foodinsight.org/2018-food-and-health-survey/>> Acesso em: 22 de abril de 2019.

Diário Oficial da República Federativa do Brasil, DF, 10 de janeiro de 2001. INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos e físico-químicos para análise de alimentos.** 4.ed. São Paulo, 2008. Disponível em: <<http://www.ial.sp.gov.br>>. Acesso em: 03 abr. 2019

JERMANN, C. et al. Mapping trends in novel and emerging food processing technologies around the world. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 31, p. 14–27, 2015.

JIMÉNEZ-SÁNCHEZ, C. et al. Alternatives to conventional thermal treatments in fruit-juice processing. Part 1: Techniques and applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 3, p. 501–523, 2017.

JUAREZ-ENRIQUEZ, E. et al. Shelf life studies on apple juice pasteurised by ultrahigh hydrostatic pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, n. 1, p. 915–919, 2015.

JUTURU, V.; WU, J. C. Microbial production of bacteriocins: Latest research development and applications. **Biotechnology Advances**, v. 36, p. 2187-2200, 2018.

KANDYLIS, P. et al. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Curr. Opin. Food Science**, v. 7, p. 58 – 63, 2016.

KAPRASOB, R. et al. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, n. April, p. 141–149, 2017.

KARIMI, R.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Viability of probiotic microorganisms in cheese during production and storage: A review. **Dairy Science and Technology**, v. 91, n. 3, p. 283–308, 2011.

KARPÍSKI, T. M.; SZKARADKIEWICZ, A. K. Bacteriocins. **Encyclopedia of Food and Health**, p. 312–319, 2015.

KIM, J. G. et al. Effects of a *Lactocaseibacillus casei* 393 fermented milk product on bone

metabolism in ovariectomised rats. *International Dairy Journal*, v. 19, p. 690-695, 2009.

KIM, M. R.; KIM, K. P.; CHUNG, S. J. Utilizing hedonic frame for projective mapping: A case study with Korean fermented soybean paste soup. **Food Quality and Preference**, v. 71, n. July 2018, p. 279–285, 2019.

KSCHONSEK, J. et al. Polyphenolic compounds analysis of old and new apple cultivars and contribution of polyphenolic profile to the In vitro antioxidant capacity. **Antioxidants**, v.7, p. 2-14, 2018.

KOUTCHMA, T. et al. Effects of Ultraviolet Light and High-Pressure Processing on Quality and Health-Related Constituents of Fresh Juice Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 15, n. 5, p. 844–867, 2016.

KUMARIYA, R. et al. Microbial Pathogenesis Bacteriocins : Classification , synthesis , mechanism of action and resistance development in food spoilage causing bacteria. **Microbial Pathogenesis**, v. 128, n. January, p. 171–177, 2019.

LAFARGA, T. et al. Effect of microalgae incorporation on the physicochemical, nutritional, and sensorial properties of an innovative broccoli soup. **Lwt**, v. 111, n. May, p. 167–174, 2019.

LANDETE, J. M. et al. Requirement of the Lacticaseibacillus casei maeKR two-component system for L-malic acid utilization via a malic enzyme pathway. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 76, n. 1, p. 84–95, 2009.

LANDETE, J. M. et al. Malic enzyme and malolactic enzyme pathways are functionally linked but independently regulated in Lacticaseibacillus casei BL23. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 79, n. 18, p. 5509–5518, 2013.

LAU, A. S. Y.; LIONG, M. T. Lactic acid bacteria and bifidobacteria-inhibited *Staphylococcus epidermidis*. **Wounds**, v. 26, p. 121-131, 2014.

LEMME, A.; SZTAJER, H.; WAGNER-DÖBLER, I. Characterization of mleR, a positive regulator of malolactic fermentation and part of the acid tolerance response in Streptococcus mutans. **BMC Microbiology**, v. 10, 2010.

LEYVA SALAS, M. et al. Antifungal Microbial Agents for Food Biopreservation—A Review. **Microorganisms**, v. 5, n. 3, p. 37, 2017.

LI, H. et al. Potential use of Lacticaseibacillus casei AST18 as a bioprotective culture in yogurt. **Food Control**, v. 34, n. 2, p. 675–680, 2013.

LINH, N. T. H.; SAKAI, K.; TAOKA, Y. Screening of lactic acid bacteria isolated from fermented food as potential probiotics for aquacultured carp and amberjack. **Fisheries Science**, v.84, p. 101-111, 2018.

LI, Z. et al. Enhanced antioxidant activity for apple juice fermented with *Lactobacillus plantarum* ATCC14917. **Molecules**, v. 24, n.1, p. 2-12, 2019.

- LIU, F. et al. Purification and structural analysis of membrane-bound polyphenol oxidase from Fuji apple. **Food Chemistry**, v. 183, p. 72–77, 2015.
- LIU, L. et al. Effect of microencapsulation with Maillard reaction products of whey proteins and isomaltooligosaccharide on the survival of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 79, p. 44–49, 2017.
- LUCKOW, T. et al. Exposure, health information and flavour-masking strategies for improving the sensory quality of probiotic juice. **Appetite**, v. 47, n. 3, p. 315–323, 2006.
- MA, L. et al. Recent developments in novel shelf life extension technologies of fresh-cut fruits and vegetables. **Trends in Food Science and Technology**, v. 64, p. 23–38, 2017.
- MALDONADO, R. R. et al. Potential application of four types of tropical fruits in lactic fermentation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 86, p. 254–260, 2017.
- MANOUKIAN E. B. Mathematical nonparametric statistics. Gordon & Breach, New York, 1986
- MARTINS, I. B. A. et al. Brazilian consumer's perception of food processing technologies: A case study with fruit juice. **Food Research International**, v. 125, n. July, p. 108555, 2019.
- MATTICK, A. T. R.; HIRSCH, A. Further observations on an inhibitory substance (nisin) from lactic streptococci. **The Lancet**, v.250, p.5- 8, 1947.
- MEILGAARD, M. C.; CIVILLE, G. V.; CARR, B. T. **Sensory Evaluation Techniques, Fifth Edition**. [s.l: s.n.].
- MENA, P. et al. Combinatory Effect of Thermal Treatment and Blending on the Quality of Pomegranate Juices. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 11, p. 3186–3199, 2013.
- MICROMARKET BRASIL. Mercado global de sucos prensados a frio deve crescer em um CAGR de 8% até 2021. 2017. Disponível em: <<https://www.micromarketbrasil.com.br>> Acesso em: 08/04/2019.
- MISHRA, V, PRASAD, D. N. Application of in vitro methods for selection of *Lactocaseibacillus casei* strains as potential probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 103, n. 1, p. 109-115, 2005.
- MOLINA, V. et al. Soybean-based functional food with vitamin B₁₂-producing lactic acid bacteria. **J. funct. Foods**, v. 4, p. 831- 836, 2012.
- NAGATA, S. et al. The effects of the *Lactocaseibacillus casei* strain on obesity in children: a pilot study. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 4, p. 535-543, 2017.
- NEMATOLLAHI, A. et al. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory

characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49–53, 2016.

NURAI DA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 2, p. 47–55, 2015.

O'CONNOR, P. M. et al. Antimicrobial antagonists against food pathogens: A bacteriocin perspective. **Current Opinion in Food Science**, v. 2, p. 51–57, 2015.

ÖZCELİK, S.; KULEY, E.; ÖZOGUL, F. Formation of lactic, acetic, succinic, propionic, formic and butyric acid by lactic acid bacteria. **LWT- Food Sci. and Technology**, v. 73, p. 536–542, 2016.

PAGÈS, J. Collection and analysis of perceived product inter-distances using multiple factor analysis: Application to the study of 10 white wines from the Loire Valley. **Food Quality and Preference**, v. 16, n. 7, p. 642–649, 2005.

PANIAGUA-MARTÍNEZ, I. et al. Non-thermal Technologies as Alternative Methods for *Saccharomyces cerevisiae* Inactivation in Liquid Media: a Review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 11, n. 3, p. 487–510, 2018.

PLAZA-DIAZ, J. et al. Mechanisms of Action of Probiotics. **Adv. Nutrition**, v. 10, p. 49- 66, 2019.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011.

PERCZAK, A. et al. The efficiency of lactic acid bacteria against pathogenic fungi and mycotoxins. **Arh Hig Rada Toksikol**, v. 69, p. 32-45, 2018.

PEREZ, R. H.; ZENDO, T.; SONOMOTO, K. Novel bacteriocins from lactic acid bacteria (LAB): various structures and applications. **Microbial Cell Factories**, v.13, 2014.

PERRIN, L.; PAGÈS, J. Construction of a product space from the ultra-flash profiling method: Application to 10 red wines from the loire valley. **Journal of Sensory Studies**, v. 24, n. 3, p. 372–395, 2009.

PIMENTEL, T. C. et al. 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, n. 1, p. 415–422, 2015.

R CORE TEAM. R: **A language and environment for statistical computing**. Vienna, Austria: R Foundation for Statistical Computing. 2017.

- RADAIC, A.; DE JESUS, M. B.; KAPILA, Y. L. Bacterial anti-microbial peptides and nano-sized drug delivery systems: The state of the art toward improved bacteriocins. **Journal of Controlled Release**, v. 321, n. February, p. 100–118, 2020.
- REIS, J. A. et al. Lactic Acid Bacteria Antimicrobial Compounds: Characteristics and Applications. **Food Engineering Reviews**, v. 4, n. 2, p. 124–140, 2012.
- REUSS, R. M. et al. Malolactic fermentation as a technique for the deacidification of hard apple cider. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 1, 2010.
- RICCI, A. et al. Volatile profile of elderberry juice: Effect of lactic acid fermentation using *L. plantarum*, *L. rhamnosus* and *L. casei* strains. **Food Research International**, v. 105, n. November 2017, p. 412–422, 2018.
- ROBERTS, D. et al. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **Lwt**, v. 97, n. April, p. 144–150, 2018.
- ROMANO, K. R. et al. Willingness to pay more for value-added pomegranate juice (*Punica granatum* L.): Na open-ended contingent valuation. **Food Research International**, v. 89, p. 359-364, 2016.
- RUSSO, P. et al. *Lactobacillus plantarum* strains for multifunctional oat-based foods. **LWT - Food Sc. and Technology**, v. 68, p. 288- 294, 2016.
- SACCO SYSTEM SUPPORTING FOOD CULTURE & LIFE - SACCO. **Culturas Probióticas para Leites fermentados e Queijos**. Disponível em: <http://saccobrasil.com.br/culturas-lacteas>. Acesso em : 10 de outubro de 2020.
- SADIQ, F. A. et al. Lactic Acid Bacteria as Antifungal and Anti-Mycotoxigenic Agents: A Comprehensive Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 18, n. 5, p. 1403–1436, 2019.
- SAUER, M. et al. The Efficient Clade: Lactic Acid Bacteria for Industrial Chemical Production. **Trends in Biotechnology**, v.35, p. 756-769, 2017.
- SARI, N. P.; SARI, R.; UNTARI, E. K. Antibacterial activity test of bacteriocin from *Lactobacillus brevis*, *Lacticaseibacillus casei* and *Lactobacillus plantarum* against gram positive pathogenic bacteria. **J. Trop. Biodiv. Biotechnology**, vol. 3, p. 85-91, 2018.
- SCHÜTZ, M.; RADLER, F. Das Vorkommen von Malatenzym und Malo-Lactat-Enzym bei verschiedenen Milchsäurebakterien. **Archives of Microbiology**, v. 96, n. 1, p. 329–339, 1974.
- SHARMA, D.; SINGH SAHARAN, B. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lacticaseibacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, 2014.
- SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

- SIDIRA, M. et al. Evaluation of *Lacticaseibacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. **Food Control**, v. 42, p. 315–320, 2014.
- SINGH, V. P. Recent approaches in food bio-preservation-A review. **Open Veterinary Journal**, v. 8, n. 1, p. 104–111, 2018.
- SILVA, F.J. M. et al. Stability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* in minimally processed cabbage. **International Journal of Postharvest Technology and Innovation**, v. 3, p. 140–150, 2013.
- SLOAN, E. A. Top 10 Food Trends: A dramatic turnaround for frozen foods, an explosion in healthy beverages, and an uptick in center store sales are driving food and beverage revenues. **Institute of Food Technologists**, v.73, p.31-47, 2019.
- SPAGNOL, W. A. et al. Monitoramento da cadeia do frio: Novas tecnologias e recentes avanços. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 21, p. 2–8, 2018.
- SUTULA, J. et al. The effect of a commercial probiotic drink containing *Lacticaseibacillus casei* strain Shirota on oral health in healthy dentate people. **Microbial Ecology in Health & Disease**, v. 24, p. 1-12, 2013
- TENEA, G. N.; YEPEZ, L. Bioactive compounds of lactic acid bacteria. Case study: **Evaluation of antimicrobial activity of bacteriocin-producing lactobacilli isolated from native ecological niches of Ecuador**. In Venketeshwer, R. (Ed.) Prebiotics and probiotics in human nutrition and health, InTech, p. 147-169, 2016.
- TEREFE, N. S.; BUCKOW, R.; VERSTEEG, C. Quality-Related Enzymes in Plant-Based Products: Effects of Novel Food-Processing Technologies Part 3: Ultrasonic Processing. **Critical Rev. in Food Science and Nutrition**, v.55, p.147-158, 2014.
- THAKUR, A.; JOSHI, V. K. Preparation of Probiotic Apple Juice by Lactic Acid Fermentation. **Intl. J. Food. Ferment. Technology**, v. 7, p. 67-85, 2017
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.
- TIPTIRI-KOURPETI, A. et al. *Lacticaseibacillus casei* exerts anti-proliferative effects accompanied by apoptotic cell death and up-regulation of TRAIL in colon carcinoma cells. **PLoS ONE**, v.11, n.2, p.1-20, 2016.
- TSAI, J. C.; HUANG, G. J.; CHIU, T. H.; HUANG, S. S.; HUANG, S. C.; HUANG, T. H.; LAI, S. C.; LEE, C. Y. Antioxidant activities of phenolic components from various plants of *Desmodium* species. **African Journal of Pharmacy and Pharmacology**, v. 5, p. 468-476, 2011.

ULLAH, N. et al. Purification and primary characterization of a novel bacteriocin, LiN333, from *Lacticaseibacillus casei*, an isolate from a Chinese fermented food. **LWT - Food Science and Technology**, v. 84, p. 867-875, 2017.

USAGA, J.; WOROBO, R. W. Microbial safety and quality evaluation of UV-treated, cold-pressed colored and turbid juices and beverages. **Journal of Food Protection**, v. 81, n. 9, p. 1549–1556, 2018.

VALERIO, F. et al. Improvement of the antifungal activity of lactic acid bacteria by addition to the growth medium of phenylpyruvic acid, a precursor of phenyllactic acid. **International J. of Food Microbiology**, v. 222, p.1-7, 2016.

VERVOORT, L. et al. Comparing equivalent thermal, high pressure and pulsed electric field processes for mild pasteurization of orange juice: Part II: Impact on specific chemical and biochemical quality parameters. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 12, n. 4, p. 466–477, 2011.

VERAIN, M. C. D.; SIJTSEMA, S. J.; ANTONIDES, G. Consumer segmentation based on food-category attribute importance: The relation with healthiness and sustainability perceptions. **Food Quality and Preference**, v. 48, p. 99–106, 2016.

VERMA, A. K. et al. **Bacteriocins: Potential in Food Preservation**. In: Batt, C.A., Tortorello, M.L. (Eds.), *Encyclopedia of Food Microbiology*, vol 1. Elsevier Ltd, Academic Press, p. 180–186. 2014.

VIDAL, L. et al. Stability of sample configurations from projective mapping: How many consumers are necessary? **Food Quality and Preference**, v. 34, p. 79–87, 2014.

VUCHNICH, A. 2015. **Cold-pressed juice: convenient and superior nutrition or a fad?** Global News. Disponível em: <http://globalnews.ca/news/2071480/cold-pressed-juice-convenient-and-superior-nutrition-or-a-fad/>. Acessado em 20 de abril de 2019.

WEDAJO, B. Lactic Acid Bacteria: Benefits, Selection Criteria and Probiotic Potential in Fermented Food. **Journal of Probiotics & Health**, v. 3, p. 2-9, 2015.

WEISS, J.; LOEFFLER, M.; TERJUNG, N. The antimicrobial paradox: Why preservatives loose activity in foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 4, n. May, p. 69–75, 2015.

WGO. **World Gastroenterology Organisation Global Guidelines**. 2017. Disponível em: <<http://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english.>> Acesso em: 30/10/2018.

WHITEHEAD, H. R. A substance inhibiting bacterial growth, produced by certain strains of lactic streptococci. **Biochem. Journal**, v. 27, p. 1793-1800, 1933.

WIBOWO, S. et al. Comparing the impact of high pressure, pulsed electric field and thermal

pasteurization on quality attributes of cloudy apple juice using targeted and untargeted analyses. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 54, p. 64–77, 2019.

WILLIAMS, E. J. Experimental Designs Balanced for the Estimation of Residual Effects of Treatments. **Australian Journal of Chemistry**, v. 2, n. 2, p. 149–168, 1949.

WŁODARSKA, K. et al. Perception of Apple Juice: A Comparison of Physicochemical Measurements, Descriptive Analysis and Consumer Responses. **Journal of Food Quality**, v. 39, n. 4, p. 351–361, 2016.

YADAV, H.; JAIN, S.; SINHA, P. R. Antidiabetic effect of probiotic dahi containing *Lactobacillus acidophilus* and *Lacticaseibacillus casei* in high fructose fed rats. **Nutrition**, v. 23, p. 62-68, 2007.

YI, J. et al. Quality change during high pressure processing and thermal processing of cloudy apple juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 85–92, 2017.

ZENDEBOODI, F. et al. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103–123, 2020.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782-2858, 2020.

APÊNDICES

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro

Título: “Bioconservação de suco de maçã prensado a frio com bactérias ácido lácticas probióticas”

OBJETIVO DO ESTUDO: O objetivo deste projeto é avaliar a conservação de suco de maçã prensado a frio pelo metabolismo de bactérias ácido lácticas, sem a adição de conservantes, armazenados sob refrigeração.

ALTERNATIVA PARA PARTICIPAÇÃO NO ESTUDO: Você tem o direito de não participar deste estudo. Estamos coletando informações para avaliar sensorialmente amostras de suco de maçã bioconservado. Se você não quiser participar do estudo, isto não irá interferir na sua vida profissional/estudantil.

PROCEDIMENTO DO ESTUDO: Se você decidir integrar este estudo, você responderá um questionário contendo descritores sensoriais, onde deverá avaliar cada 1 (uma) das 9 (nove) amostras de suco de maçã bioconservado, que serão apresentadas de forma monádica em copos descartáveis de cor branca, contendo um volume aproximado de 40 mL. Não será necessário engolir a amostra, caso não deseje, pois será fornecido um recipiente para descarte. Você terá total e plena liberdade para recusar a participar, bem como retirar seu consentimento, em qualquer fase da pesquisa.

RISCOS: A participação neste estudo trará riscos ou desconfortos mínimos à sua integridade física e psicológica, uma vez que o produto é apto ao consumo e os indivíduos que apresentarem sensibilidade à maçã em geral não participarão deste estudo. As amostras oferecidas foram previamente analisadas no tocante microbiológico e físico-químico e apresentam níveis satisfatórios de qualidade, de acordo com a legislação vigente.

BENEFÍCIOS: Sua entrevista ajudará a entender as características sensoriais da bebida, bem

como compreender sua influência na preferência do consumidor, mas não será, necessariamente, para seu benefício direto, do mesmo modo, que não haverá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Entretanto, fazendo parte deste estudo, você fornecerá informações que possibilitaram a obtenção da caracterização sensorial por públicos distintos.

CONFIDENCIALIDADE: Sua identificação, bem como seu nome serão mantidos em sigilo, no entanto, algumas informações solicitadas e as respostas dadas durante a realização do teste poderão ser utilizadas para a elaboração de relatórios, artigos, publicações e apresentações, sem que haja sua identificação.

DÚVIDAS E RECLAMAÇÕES: Esta pesquisa está sendo realizada no Departamento de Tecnologia de Alimentos. Possui vínculo com a Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro através do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, sendo mestrando Paulo Cezar da Cunha Júnior o pesquisador principal, sob a orientação da Profa. Dra. Elisa Helena da Rocha Ferreira. Os investigadores estão disponíveis para responder a qualquer dúvida que você tenha. Caso seja necessário, contate Paulo Cezar da Cunha Júnior no telefone (21) 96940-0762, no e-mail: pc.cunha.alim@gmail.com. Você fornecerá nome, endereço e telefone de contato apenas para que a equipe do estudo possa lhe contatar em caso de necessidade.

Eu concordo em participar deste estudo.

Assinatura:

Nome Completo:

Data: _____

Endereço:

Telefone de contato:

Assinatura (Pesquisador):



Nome: Paulo Cezar da

Cunha Júnior

Data: _____

ANEXOS

UNIRIO -
UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO



1. PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: BIOCONSERVAÇÃO DE SUCO DE MAÇÃ PRENSADO A FRIO COM BACTÉRIA ÁCIDO LÁTICA PROBIÓTICA (*Lactobacillus casei*)

Pesquisador: PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR

Área Temática:

Versão: 3

CAAE: 31405719.1.0000.5285

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 4.214.161

Apresentação do Projeto:

Conforme descrito no resumo do projeto detalhado modificado reapresentado: “Algumas décadas atrás, o alimento era associado principalmente ao seu valor nutricional, no entanto este cenário vem mudando: o alimento com alegação de propriedade funcional surge como um importante adjuvante na promoção da saúde e, sua participação na modulação de processos fisiológicos tem sido extensivamente investigada pela comunidade científica. Muitas pesquisas evidenciaram correlação significativa entre o

consumo de alimentos funcionais e os benefícios à saúde. Neste contexto, alimentos que contenham agentes probióticos, micro-organismos viáveis que auxiliam na manutenção do equilíbrio da microbiota do trato gastrointestinal, são considerados importantes aliados ao funcionamento adequado do organismo. Outro aspecto importante quando tratamos de alimentos, é a sua segurança. Deste modo, metodologias de conservação devem ser sistematicamente estudadas a fim assegurar a validade descrita no rótulo do produto, sem comprometer a qualidade microbiológica, nutricional e sensorial do mesmo. O objetivo deste projeto é investigar métodos de bioconservação de suco de maçã prensado à frio, fermentado por micro-organismos probióticos, usualmente restritos aos laticínios. Portanto, a nossa proposta consiste na bioconservação do suco de maçã prensado a frio utilizando *Lactobacillus casei*, buscando avaliar a influência do seu metabolismo na vida útil do produto elaborado, bem como implementar ferramentas biotecnológicas que contribuam para o melhoramento do *Lactobacillus casei*. Com isso, esperamos aprimorar o produto, potencializar seu valor nutricional e terapêutico e colaborar com métodos de bioconservação de alimentos. Neste sentido, a obtenção de uma bebida de fruta com atividade probiótica e a sua conservação por meio de *Lactobacillus casei* são dois grandes diferenciais neste trabalho. A possibilidade de aplicação deste micro-organismo em matrizes diversas, de interesse econômico, denota o seu grande potencial tecnológico. Em vista destas perspectivas, o assunto mostra-se atual e inovador. Avaliar a ação do *Lactobacillus casei* na bioconservação de bebidas fermentadas ajudará a melhor compreender as lacunas relacionadas aos mecanismos básicos que levam tanto à deterioração dos alimentos quanto ao aumento de ocorrências de Doenças Transmitidas por Alimentos e assim, impulsionar o delineamento de novas estratégias de conservação que minimizem riscos químicos e microbiológicos inerentes ao consumo de alimentos.”

Objetivo da Pesquisa:

De acordo com o Projeto detalhado modificado reapresentado:

“Avaliar a bioconservação de suco de maçã prensado a frio, por ação de bactéria ácido láctica probiótica *Lactobacillus casei* (Cepa Lyofast BGP 93 - Sacco®), determinando sua vida útil e ação deletéria frente ao fungo micotoxigênico *Penicillium 8 expansum* e à micotoxina patulina, garantindo um produto seguro, potencialmente funcional e que atenda a demanda dos consumidores por produtos mais naturais. 3.2. Objetivos

Específicos Os objetivos específicos deste projeto são: • Determinar as melhores condições de fermentação do *Lactobacillus casei* (Cepa Lyofast BGP 93 - Sacco®) no suco de maçã prensado a frio; • Determinar a vida útil do suco de maçã prensado a frio bioconservado; • Caracterizar o suco de maçã prensado à frio in natura e fermentado quanto à sua composição centesimal, pH, acidez, teor de sólidos solúveis e cor; • Determinar o potencial antioxidante do suco de maçã prensado à frio bioconservado durante a sua vida útil; • Avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei* (Cepa Lyofast BGP 93 - Sacco®) durante a vida útil do produto; • Avaliar a viabilidade in vitro do *Lactobacillus casei* às condições do trato gastrointestinal (Cepa Lyofast BGP 93 - Sacco®) no suco de maçã prensado a frio bioconservado; • Qualificar e quantificar os ácidos carboxílicos e ácidos orgânicos produzidos pelas bactéria ácido lácticas na melhor condição de fermentação; • Avaliar o efeito deletério e de degradação das bactérias ácido lácticas sobre o *Penicillium expansum* e a micotoxina patulina, respectivamente, no suco de maçã prensado a frio bioconservado.”

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

-Os riscos e benefícios foram apresentados nas Informações Básicas do Projeto, no projeto detalhado e no TCLE. Os itens no TCLE estão descritos de forma semelhante. A redação em cada documento está apresentada a seguir:

UNIRIO - UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO



Continuação do Parecer: 4.214.161

TCLE:

“RISCOS: As amostras utilizadas nesse estudo atendem os padrões exigidos pela legislação vigente, estando apta para o consumo. Indivíduos que apresentarem restrições, intolerâncias e/ou sensibilidade à maçã, *Lactobacillus casei* e seus derivados, bem como a produtos fermentados, não poderão participar desse estudo. As amostras oferecidas foram previamente analisadas e são seguras em relação aos seus aspectos

microbiológicos e físico-químicos e apresentando níveis satisfatórios de qualidade. Os sucos podem apresentar sabores ácido, azedo ou amargo, podendo causar algum desconforto ao participante. Além disso, algumas perguntas presentes no questionário de recrutamento sobre o seu estado de saúde em geral e seus hábitos de consumo de sucos podem lhe causar algum desconforto.

BENEFÍCIOS: Sua entrevista ajudará a entender as características sensoriais da bebida, bem como compreender sua influência na preferência do consumidor. Fazendo parte deste estudo, você fornecerá informações que possibilitaram a obtenção da caracterização sensorial por públicos distintos. Não haverá nenhuma compensação financeira relacionada à sua participação. Estudos demonstram que há possibilidade de benefícios a saúde com um consumo regular de uma quantidade adequada de probióticos. O mesmo acontece para o consumo de maçã, por ser fonte de substâncias antioxidantes e outros nutrientes.”

Projeto detalhado e informações básicas do projeto:

A participação nesta pesquisa por voluntários trará riscos ou desconfortos mínimos à integridade física e psicológica dos participantes. As amostras utilizadas nesse estudo atendem os padrões exigidos pela legislação vigente, estando apta para o consumo. Indivíduos que apresentarem restrições, intolerâncias e/ou sensibilidade à maçã, *Lactobacillus casei* e seus derivados, bem como a produtos fermentados, não poderão participar desse estudo. As amostras oferecidas foram previamente analisadas e são seguras em relação aos seus aspectos microbiológicos e físico-químicos e apresentando níveis satisfatórios de qualidade, estando aptas para o consumo. Os sucos podem apresentar sabores doce, ácido, azedo ou amargo, podendo causar algum desconforto ao participante. Perguntas presentes no questionário de recrutamento sobre o estado de saúde em geral e hábitos de consumo de sucos podem causar certo desconforto ao participante. Não há benefícios ou vantagem direta aos participantes da avaliação. Reitera-se que os dados obtidos nesta pesquisa poderão ser utilizados para a elaboração de relatórios, artigos, publicações e apresentações. Entretanto, em hipótese alguma, tais manifestações irão propiciar a identificação, bem como a exposição da identidade dos participantes. Estudos demonstram que há possibilidade de benefícios a saúde com um consumo regular de

uma quantidade adequada de probióticos. O mesmo acontece para o consumo de maçã, por ser fonte de substâncias antioxidantes e outros nutrientes.”

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

- A pesquisa pretende elaborar um suco de maçã contendo bactérias probióticas que possam melhorar a qualidade microbiológica e o tempo de vida útil do produto. Trata-se de uma pesquisa de cunho tecnológico, mas que envolve seres humanos na etapa de avaliação das características sensoriais do produto final obtido.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- Nesta segunda submissão, foram incluídos na Plataforma Brasil:
. Informações básicas do projeto; Projeto de pesquisa detalhado modificado, Termo de Consentimento Livre e Esclarecido modificado; cronograma ajustado; instrumento de coleta de dados modificado e carta de atendimento as pendências.

Recomendações:

Não foi observada a afirmação de que a coleta de dados com os seres humano aconteça em período posterior a pandemia. Sendo assim, orienta-se quanto à adoção de medidas sobre a coleta de dados proposta, considerando-se o contexto atual da pandemia da COVID-19 e os riscos possíveis à pesquisadores e participantes da pesquisa devido à transmissibilidade da doença, conforme orientação da CONEP, disponível no link <https://drive.google.com/file/d/1apmEkc-0fe8AYwt37oQAIX90plvOja3Z/view>

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

As observações/pendências apontadas foram atendidas.

Considerações Finais a critério do CEP:

Prezado Pesquisador,

Por favor, não esqueça de inserir os relatórios parcial e final da pesquisa na Plataforma Brasil na parte de notificação (ícone à direita da tela, na linha do título do projeto).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P	15/07/2020		Aceito

**UNIRIO -
UNIVERSIDADE
FEDERAL DO ESTADO
DO RIO DE JANEIRO**



Continuação do Parecer: 4.214.161

Básicas do Projeto	ETO_1366900.pdf	18:00:16		Aceito
Outros	carta_de_atendimento_a_pendencia_2.pdf	15/07/2020 17:58:26	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	QUESTIONARIO_DE_RECRUTAMENTO_MODIFICADO_2.pdf	15/07/2020 17:57:06	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado_2.pdf	15/07/2020 17:55:22	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_modificado_2.pdf	15/07/2020 17:55:03	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Cronograma	Cronograma_Geral_de_Atividades_modificado_2.pdf	15/07/2020 17:54:07	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	questionario_de_recrutamento_modificado.pdf	09/06/2020 18:12:33	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	carta_de_atendimento_a_pendencia.pdf	09/06/2020 18:12:01	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	Ficha_teste_aceitacao_modificado.pdf	09/06/2020 18:11:19	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto_modificado.pdf	09/06/2020 18:09:44	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_modificado.pdf	09/06/2020 18:09:15	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.pdf	30/04/2020 15:30:18	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	29/04/2020 02:34:14	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	Links_para_o_acesso_aos_curriculos_lattes.pdf	29/04/2020 02:33:07	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	Ficha_teste_aceitacao.pdf	29/04/2020 02:31:48	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Apresentacao.pdf	29/04/2020 02:31:23	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Cronograma	Cronograma_Geral_de_Atividades.pdf	29/04/2020 02:30:55	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	29/04/2020 02:30:32	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Outros	Questionario_recrutamento.pdf	29/04/2020 02:30:18	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito
Declaração de	Autorizacao.pdf	29/04/2020	PAULO CEZAR DA	Aceito

Instituição e Infraestrutura	Autorizacao.pdf	02:29:37	CUNHA JUNIOR	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto.pdf	29/04/2020 02:29:07	PAULO CEZAR DA CUNHA JUNIOR	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIO DE JANEIRO, 14 de
Agosto de 2020

Assinado por:

Renata Flavia Abreu da Silva

(Coordenador(a))