

THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* E *Lactobacillus casei* ENCAPSULADOS EM SORVETE DE CAJÁ

RECIFE-PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DOS ALIMENTOS

THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* E *Lactobacillus casei* ENCAPSULADOS EM SORVETE DE CAJÁ

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, área de concentração Ciência dos Alimentos (Universidade Federal de Pernambuco) como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre.

Orientadora: Prof. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-orientadora: Prof. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

RECIFE-PE

2017

Catálogo na Fonte
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

F224v Farias, Thaísa Gabriela Silva de.
Viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* encapsulados em sorvete de cajá / Thaísa Gabriela Silva de Farias. – 2017.
72 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lucia Montenegro Stamford.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco, CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2017.

Inclui referências, apêndices e anexos.

1. Alimento funcional. 2. Probióticos. 3. Gelados comestíveis. 4. Quitosana. 5. Alginato de cálcio. I. Stamford, Tânia Lucia Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2017-094)

Thaísa Gabriela Silva de Farias

**VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* E *Lactobacillus casei*
ENCAPSULADOS EM SORVETE DE CAJÁ**

Dissertação aprovada em: 20/02/2017

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Profa. Dra. Celiane Gomes Maia da Silva

Profa. Dra. Patrícia Moreira Azoubel

**Recife
2017**

Universidade Federal de Pernambuco – UFPE
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Nutrição
Programa de Pós-Graduação em Nutrição
Ciência dos Alimentos

Reitor

Prof. Anísio Brasileiro de Freitas Dourado

Vice-Reitora

Prof. Florisbela de Arruda Câmara e Siqueira Campos

Pró-Reitor para Assuntos de Pesquisa e Pós-Graduação

Prof. Ernani Rodrigues de Carvalho Neto

Diretor do Centro de Ciências da Saúde

Prof. Nicodemos Teles de Pontes Filho

Chefe do Departamento de Nutrição

Prof. Raul Manhães de Castro

Subchefe do Departamento de Nutrição

Prof. Edigleide Maria Figuerôa Barreto

Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof. Elizabeth do Nascimento

Vice- Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Nutrição

Prof. Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

AGRADECIMENTOS

Acho que nunca escrevi algo com tanta gratidão como esta seção da dissertação.

Portanto, começo registrando meu primeiro agradecimento ao Autor do Universo, da vida e da fé. Porque dele e por ele, e para ele, são todas as coisas; glória, pois, a ele eternamente (Romanos 11:36). Pela oportunidade única, pela capacidade que me concedeu, pelo que aprendi e vivi, pelas forças multiplicadas quando parecia não haver mais possibilidade. Obrigada porque sei que nada foi por acaso. O Senhor me provou que nunca estive só. Sou grata a Deus pela Sua imensa bondade, demonstrada das mais diversas formas e que foi revelada também através das pessoas citadas aqui.

Agradeço a mainha (Lindinalda) e painho (Adolfo), que foram meus primeiros incentivadores, nunca mediram esforços e que se pudessem estariam me levando nos braços ainda hoje. Pelos almoços congelados, por ligarem sempre pra saber como eu estava e por estarem presentes nas horas mais difíceis, não importando o que. Eu sei que todo filho diz que tem os melhores pais do mundo, mas é porque eles não conhecem vocês. Muita gratidão. Amo vocês.

Igor, obrigada. Por ser mais que meu namorado, por ser meu melhor amigo. Pelos incentivos de sempre, por me despertar, pelas risadas nos momentos de tensão. Agradeço sua imensa compreensão e apoio, mesmo quando as coisas ficaram complicadas. Pela paciência e ouvidos. E obrigada por todas as revisões, leituras e ajuda científica!

Karine, obrigada por tudo, por ser tão maravilhosa, pelas suas orações, palavras sábias, visão positiva e incentivo na fé. Mylena, Deus cruzou nossos caminhos na hora certa; sua amizade inesperada é um presente diário de valor inestimável, pelo qual nem sei agradecer. Jovem Samyres, agradeço sua presença tão constante na minha vida, pela torcida sincera, leveza e tanto carinho, apesar das pegadinhas. Karol, obrigada por ser minha amiga desde que eu me lembro. Amo vocês.

Ao time do laboratório/turma de mestrado: Hayane, por ter sido minha “dupla de mestrado” por muito tempo e pelas diversas vezes que lavou minhas vidrarias. Aprendi demais contigo e sou grata pela sua vida (mas ainda estou esperando minha dieta!); vivemos tudo juntas. Raíssa, obrigada por todos os auxílios virtuais,

socorros no laboratório, pela boa vontade sempre que precisei e pela amizade além da sala de aula. Darlley, obrigada por repartir tudo conosco e pela generosidade – bem que dizem que coração de mãe é imenso. Juliana A1, “gracias” por toda sua contribuição. Fábria e Anne, vocês são ótimas. Nossa turma foi maravilhosa. Quase me senti nutricionista convivendo com vocês. Todo o sucesso do mundo a todas vocês.

Ao grupo de oração por todo o amor para com minha família e por sempre acreditar em mim e no meu progresso. Parte de eu estar aqui hoje se deve à intercessão de vocês. Deus os abençoe.

Aos amigos do vôlei Valéria e Aldo que sempre me apoiaram de alguma forma. Mesmo a muitos de quilômetros de distância me fizeram companhia nos intervalos dos experimentos pelo celular.

Ao LEAAL, pelo apoio logístico prestado. Camilo, agradeço todas as mini-aulas e sua disposição. Vivaldo, você é espetacular! Obrigada por ser uma pessoa tão bondosa e que nunca mediu esforços pra me ajudar nas análises, inclusive nas férias.

Professora Tânia, sou muito feliz por ter a senhora como orientadora. Com certeza uma das melhores pessoas que tive o prazer de conhecer na vida. Obrigada por sua enorme sabedoria, por partilhar seus vastos conhecimentos comigo, pela compreensão, paciência, carinho e conselhos oportunos. Posso dizer que me senti parte da família Stamford!

À minha co-orientadora, Prof. Thatiana Stamford, por todas as correções, disposição, incentivo, compreensão, torcida e por estar sempre acessível. Obrigada por todas as palavras animadoras, sempre no momento certo, pelas vezes que acreditou mais no meu trabalho do que eu mesma.

Agradeço ainda à Prof. Thayza pelo bom humor, seu interesse, dicas, soluções e valioso conhecimento. A senhora é maravilhosa e lhe conhecer é um presente.

À Bruna Mendonça, pessoa maravilhosa e de coração enorme. Sem ela eu ainda estaria pensando em com o que iria trabalhar. Todo o sucesso pra você, Bruna.

Isabela, obrigada por trazer tanta leveza aos meus dias. Quando você crescer eu lhe mostro isso – e os milhões de vídeos do meu celular com suas artes.

À Dra. Mayra Garcia Maia Costa, que muito pacientemente me instruiu por e-mail e me auxiliou com a metodologia.

Agradeço ainda às professoras que gentilmente se dispuseram a compor a banca de defesa.

À CAPES, pela concessão da bolsa de mestrado, a qual foi muito importante para minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.

RESUMO

O interesse crescente por uma vida mais saudável tem proporcionado o desenvolvimento de alimentos que forneçam benefícios à saúde, como os que contêm microrganismos probióticos. A técnica de microencapsulação pode oferecer às células probióticas proteção e isolamento das condições adversas do produto, aumentando sua sobrevivência em ambientes extremos, como o trato gastrointestinal. Desta forma, o presente estudo propôs-se a desenvolver microcápsulas de alginato-quitosana contendo *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 e *Lactobacillus casei* ATCC 334 para aplicação em sorvete de cajá. As cápsulas foram produzidas pelo método de extrusão, utilizando a matriz alginato de sódio e quitosana como revestimento adicional. O sorvete foi adquirido na forma liofilizada e reconstituído em laboratório, sendo dividido em quatro grupos: *L. rhamnosus* livres, *L. rhamnosus* encapsulados, *L. casei* livres e *L. casei* encapsulados. As amostras foram armazenadas a -18 °C e analisadas mensalmente durante 150 dias através de avaliações físico-químicas (pH e acidez titulável) e microbiológica (viabilidade celular). Foi realizada uma simulação gastrointestinal *in vitro*, utilizando solução ácida com pepsina e solução alcalina com sais biliares. Testes de aceitabilidade e intenção de compra foram aplicados ao sorvete contendo *L. rhamnosus* encapsulados. Com relação às células livres, o *L. rhamnosus* logo após o congelamento a -18 apresentou redução significativa ($p < 0,05$) da concentração inicial, com perda de 1,77 log UFC/g de sorvete. Nos meses seguintes, houve queda gradativa da viabilidade, contabilizando ao fim do experimento redução de 3,48 log. A espécie microencapsulada com alginato-quitosana não apresentou perda significativa ($p > 0,05$) após o congelamento a -18 °C, com diferença estatística apenas após 30 dias. O *L. casei* livre também sofreu redução significativa de 1,63 log UFC/g logo em seguida ao processo de congelamento. A cepa manteve-se a 10^7 UFC/g até 150 dias de estocagem. Com redução de 1,49 log UFC/g ao final, as cápsulas promoveram a sobrevivência de 84,5% das cepas de *L. casei*. As espécies, tanto livres quanto encapsuladas, diferiram significativamente entre si nos tempos avaliados; o *L. rhamnosus* encapsulado conferiu maior viabilidade em relação ao *L. casei*, enquanto que na forma livre o *L. casei* apresentou menor perda celular comparado à outra espécie. Nenhum grupo causou alterações físico-químicas significativas no produto até 150 dias. Na simulação gastrointestinal, as células livres de *L. rhamnosus* apresentaram redução significativa de 2,04 log ainda na fase ácida. O *L. casei* livre decaiu 1 ciclo logarítmico a cada etapa gástrica, finalizando o teste intestinal com $6,31 \pm 0,21$ log UFC/mL. Com 118 voluntários, a análise sensorial apontou aceitabilidade de $7,58 \pm 0,55$, correspondendo a “gostei muito” e “gostei moderadamente”. Em relação à intenção de compra, os provadores atribuíram uma média de $3,94 \pm 1,00$, que significa que “provavelmente compraria” e “tenho dúvida se compraria” na escala. Os resultados obtidos demonstraram que microcápsulas otimizam a viabilidade celular no armazenamento congelado e nas condições gastrointestinais simuladas. A adição de 10% de cápsulas não interferem sensorialmente no sorvete probiótico.

Palavras-chave: Alimento Funcional. Probióticos. Gelados Comestíveis. Quitosana. Alginato de Cálcio.

ABSTRACT

The growing interest in a healthier life has provided the development of foods that offer health benefits, such as those containing probiotic microorganisms. The microencapsulation technique can provide protection and isolation from the adverse conditions to probiotic cells, increasing their survival in extreme environments such as gastrointestinal tract. Thus, the present study aimed to develop alginate-chitosan microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 for application in yellow mombin ice cream. The capsules were produced by extrusion method, using as matrix sodium alginate and chitosan as additional coating. The ice cream was obtained in lyophilized form and reconstituted in laboratory, posteriorly divided into four groups: free *L. rhamnosus*, encapsulated *L. rhamnosus*, free *L. casei* and encapsulated *L. casei*. Samples were stored at -18 °C and analyzed monthly for 150 days by physico-chemical (pH and titratable acidity) and microbiological (cell viability) evaluations. In vitro gastrointestinal simulation was performed using acidic solution with pepsin and alkaline solution with bile salts. Acceptability and purchase intention tests were carried out in order to obtain information about the consumer's acceptance of the ice cream containing the capsules. In relation to the free cells, *L. rhamnosus* shortly after the slow freezing presented significant reduction ($p < 0.05$) from the initial concentration, with loss of 1.77 log CFU/g of ice cream. In following months, there was a gradual reduction of 3.48 log. The microencapsulated species with alginate-chitosan showed no significant loss ($p > 0.05$) after freezing at -18 °C, with statistical difference only after 30 days. Free *L. casei* also suffered a significant reduction ($p < 0.05$) of 1.63 log CFU/g soon after the freezing process. The strain was maintained at 10^7 CFU/g for up to 150 days of storage. With a reduction of 1.49 log CFU/g at the end, the capsules promoted the survival of 84.5% of *L. casei* strains. The species, both free and encapsulated, differed significantly among themselves at the evaluated times. No group has caused significant physical-chemical changes in the product for up to 150 days. In gastrointestinal simulation, the free cells of *L. rhamnosus* presented significant reduction of 2.04 CFU/g in acid phase. Free *L. casei* declined 1 logarithmic cycle at each gastric stage, ending the intestinal test with 6.31 ± 0.21 log CFU/mL. with 118 volunteers, sensory analysis indicated acceptability of 7.58 ± 0.55 , corresponding to "like very much" and "like moderately". Regarding purchase intent, the tasters attributed an average of 3.94 ± 1.00 , which means "probably would buy" and "might buy" on the scale. The results obtained demonstrated that microcapsules optimize the cell viability in the frozen storage and in the simulated gastrointestinal conditions. Addition of 10% capsules does not interfere sensorially in the probiotic ice cream.

Keywords: Functional Foods. Probiotics. Ice-cold Foods. Chitosan. Calcium Alginate.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Representação da gelificação do alginato na presença de cálcio – modelo caixa de ovo	26
Figura 2. Estrutura molecular da quitosana	27
Figura 3. Esquema representativo da encapsulação por extrusão, seguida de revestimento em quitosana	32
Figura 4. Cápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana	32
Figura 5. Simulação das condições gastrintestinais com as células na forma livre	36
Figura 6. Simulação das condições gastrintestinais com os probióticos encapsulados	37
Figura 7. Atributos de Aceitabilidade do sorvete de cajá com probióticos encapsulados	45

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Contagem de células viáveis do <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. casei</i> livres e encapsulados durante armazenamento de 150 dias.	39
Tabela 2. Resultados de pH e acidez titulável dos sorvetes de cajá contendo <i>Lactobacillus rhamnosus</i> ASCC 290.	41
Tabela 3. Resultados de pH e acidez titulável dos sorvetes de cajá contendo <i>Lactobacillus casei</i> ATCC 334.	42
Tabela 4. Contagem de células viáveis (média $\pm$ desvio padrão) antes e depois da encapsulação.	43
Tabela 5. Viabilidade de células livres e encapsuladas de <i>L. rhamnosus</i> e <i>L. casei</i> aos sucos gástrico e intestinal simulados.	44

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ABIA – Associação Brasileira das Indústrias da Alimentação

ABIS – Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

ASCC – Australian Starter Culture Collection

ATCC – American Type Culture Collection

CCS – Centro de Ciências da Saúde (UFPE)

EE – Eficiência da Encapsulação

FAO/OMS – Food and Agriculture Organization (Organização das Nações Unidas para Alimentação e Agricultura)/Organização Mundial de Saúde

IAL – Instituto Adolfo Lutz

SGS – Suco gástrico simulado

SIS – Suco intestinal simulado

TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UFC – Unidades formadoras de colônia

UFPE – Universidade Federal de Pernambuco

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	18
2.2 PROBIÓTICOS	18
2.2.3 LACTOBACILOS	20
2.3 CAJÁ	21
2.4 SORVETE COMO FONTE DE PROBIÓTICOS	22
2.5 MICROENCAPSULAÇÃO	24
2.6 ALGINATO	25
2.6.1 <i>EXTRUSÃO COM ALGINATO DE CÁLCIO</i>	25
2.7 QUITOSANA	26
3 HIPÓTESE	28
4 OBJETIVOS	29
4.1 OBJETIVO GERAL	29
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	29
5 MÉTODOS.....	30
5.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO	30
5.2 CULTURA DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS	30
5.2.1 <i>ATIVAÇÃO DA CEPA LIOFILIZADA</i>	30
5.2.2 <i>ATIVAÇÃO DA CULTURA ESTOQUE</i>	30
5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS	30
5.4 PROCEDIMENTO DE MICROENCAPSULAÇÃO	31
5.5 REVESTIMENTO COM QUITOSANA	31
5.6 PROCEDIMENTO DE QUEBRA DAS CÁPSULAS	32
5.7 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO	33
5.8 SORVETE FUNCIONAL	33
5.8.1 <i>SORVETE CONTENDO CÉLULAS LIVRES</i>	33
5.8.2 <i>ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS LIVRES VIÁVEIS AO LONGO DA VIDA DE PRATELEIRA DO SORVETE</i>	34

5.8.3 SORVETE ADICIONADO DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS	34
5.8.4 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS VIÁVEIS AO LONGO DA VIDA DE PRATELEIRA DO SORVETE	34
5.8.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS	34
5.9 SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS <i>in vitro</i>	35
5.9.1 SIMULAÇÃO COM CÉLULAS LIVRES	35
5.9.2 SIMULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENCAPSULADAS	36
5.10 ANÁLISE SENSORIAL	37
5.11 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO	38
6 RESULTADOS	39
6.1 VIABILIDADE DE <i>L. rhamnosus</i> E <i>L. casei</i> DURANTE ARMAZENAMENTO DO SORVETE DE CAJÁ	39
6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORVETE DE CAJÁ DURANTE ARMAZENAMENTO DE 150 DIAS	40
6.3 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO	42
6.4 CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	43
6.5 ANÁLISE SENSORIAL DO SORVETE DE CAJÁ	44
7 DISCUSSÃO	46
7.1 EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS PROBIÓTICAS	46
7.2 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO POR EXTRUSÃO	48
7.3 SIMULAÇÃO GÁSTRICA E INTESTINAL	49
7.4 ACEITABILIDADE DO SORVETE DE CAJÁ COM CÁPSULAS	50
8 CONCLUSÕES	51
REFERÊNCIAS	52
APÊNDICES	65
APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	66
APÊNDICE B – Formulário de Análise Sensorial	68
ANEXOS	69

ANEXO A – Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética do CCS/UFPE	70
--	----

1 INTRODUÇÃO

Desde a antiguidade já se considerava o alimento como fornecedor dos elementos essenciais e indispensáveis à qualidade de vida e desenvolvimento individual. Porém, os estudos sobre os componentes dos alimentos têm mudado a compreensão do papel da alimentação sobre a saúde (GOETZKE; NITZKO; SPILLER, 2014).

Da mesma forma, o perfil do consumidor vem se alterando ao longo do tempo. Recentemente, observa-se o crescimento do interesse por alimentos nutritivos e agradáveis ao paladar, mas que ao mesmo tempo promovam benefícios à saúde, de forma terapêutica e preventiva (TRIPATHI; GIRI, 2014). Neste contexto surgem os alimentos funcionais, definidos pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) como alimentos ou ingredientes com alegações de propriedades funcionais ou de saúde que podem gerar efeitos metabólicos e/ou fisiológicos, e/ou efeitos benéficos à saúde, além das funções nutricionais básicas, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

O trato gastrointestinal é o local com maior concentração de microrganismos no corpo humano. De acordo com Costa e Miglioranza (2012), o sistema é habitado por centenas de espécies microbianas, como estreptococos, bacteroides, lactobacilos e leveduras. Diversas pesquisas têm interesse em desvendar a ligação entre a alteração da microbiota intestinal e o desenvolvimento de obesidade e outras doenças crônicas não transmissíveis (DELZENNE et al., 2011; BARRETT et al., 2014; MORAES et al., 2014; ISOLAURI et al., 2015).

Pesquisas apontam os efeitos benéficos dos probióticos sobre diarreias (WANG et al., 2013; FOX et al., 2015), constipações (AOKI et al., 2014), hepatopatias (MA et al., 2013), colonizações por *Helicobacter pylori* associada a gastrites (ZHANG et al., 2014), modulação de reações alérgicas (LEE et al., 2014), níveis de lipídios plasmáticos (GUO et al., 2011) e digestão da lactose (PAKDAMAN et al., 2016). Ainda há relatos de estudos com estes microrganismos inseridos na dieta de voluntários, resultando em alterações na expressão de genes envolvidos na imunidade e outras funções da mucosa intestinal (MORAES et al., 2014).

De acordo com a ANVISA (2008), a quantidade mínima de microrganismos probióticos ingeridos na porção diária do produto deve estar situada na faixa de 10^8 ou 10^9 , para que exerçam suas funções biológicas de maneira efetiva. O sorvete, por

ser uma sobremesa popular e bem apreciada, pode ser uma ferramenta para a inserção dos probióticos na dieta. Entretanto, de acordo com Homayouni et al. (2008), as baixas temperaturas de armazenamento e o alto teor de oxigênio contido em sua formulação podem despontar como condições desfavoráveis à sobrevivência dos microrganismos.

As frutas tropicais são possuidoras de sabores marcantes e bem apreciados, além de terem seu valor nutricional já bem estabelecido. O cajá é um fruto bastante saboroso e aromático, rico em compostos fenólicos e antioxidantes. Há diversas aplicações na indústria alimentícia, como polpas, sucos e sorvetes (LAGO; MAIA; MATTA, 2016).

Portanto, este estudo propôs-se a avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei*, livres e encapsulados com alginato de cálcio e quitosana, em sorvete de cajá, visando atuar na melhoria da qualidade de vida da população e na promoção da saúde através de um alimento funcional.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

Nos últimos anos tem crescido o interesse do consumidor por alimentos que supram suas necessidades de saúde e que ao mesmo tempo sejam atrativos e saborosos, abrindo espaço para a indústria desenvolver produtos inovadores, mais saudáveis e com boa aceitação no mercado. Neste contexto surgem os “alimentos funcionais”, que podem ser definidos como produtos que além de promover a nutrição básica são capazes de fornecer benefícios fisiológicos e metabólicos e prevenir ou auxiliar no tratamento de doenças (COMAN et al., 2012). O termo foi descrito pela primeira vez no Japão, referindo-se a um alimento com ingredientes específicos e satisfação sensorial, nutrição e modulação dos sistemas biológicos (BIGLIARDI; GALATI, 2013).

Apesar de se tratar de um campo de estudo relativamente novo, a crença do alimento como “remédio” e cura para doenças remonta a era medieval, onde profissionais de saúde persas escreveram tratados sobre nutrição, saúde e dietas (NIKAEIN; ZARGARAN; MEHDIZADEH, 2012). No presente século a literatura científica reporta os alimentos funcionais como aliados no tratamento da obesidade (BABOOTA et al., 2013), prevenção de doenças cardiovasculares (RYAN et al., 2015), balanço de colesterol plasmático (TENORE et al., 2016) e prevenção de câncer (GU et al., 2014).

Dentre os alimentos funcionais a literatura relata os prebióticos (adicionados de fibras não digestíveis), fortificados (com vitaminas, ômega-3), alterados (removendo componentes nocivos) e os probióticos (BIGLIARD; GALATI, 2013).

2.2 PROBIÓTICOS

Os probióticos são um grupo de bactérias ácido-láticas e leveduras que exercem efeito positivo sobre a saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2002). Agindo a nível intestinal, sua primeira ação no corpo é restaurar a microbiota (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012) e promover o crescimento de outros microrganismos benéficos presentes no local (BUTEL, 2014). Os probióticos são capazes de estimular uma resposta imunológica no seu hospedeiro, atuando na prevenção e tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (LEE et al., 2014). Possuem propriedades anticarcinogênicas (NAGPAL et al., 2012), antialérgicas (LEE et al.,

2014), anti-hipertensivas (LOLLO et al., 2015), auxiliam na digestão da lactose através da enzima bacteriana lactase (PAKDAMAN et al., 2016), no tratamento de diarreias (SOHAIL et al., 2012; WANG et al., 2013; FOX et al., 2015; LEE et al., 2015) e outras doenças, como hepatopatias (MA et al., 2013) e cânceres gástricos e intestinais (NAGPAL et al., 2012).

Sobre os mecanismos de ação no intestino, sítio-alvo dos probióticos, Szymáński et al. (2006) relatam: produção de substâncias antimicrobianas, competição pela adesão na parede intestinal, competição por nutrientes, acidificação do local, aumento da secreção de mucina, entre outros.

É importante salientar que para um microrganismo ser considerado probiótico é necessário que o mesmo seja capaz de permanecer metabolicamente ativo no intestino, resistindo antes ao ambiente ácido do estômago e às enzimas digestivas (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012). Pithva et al. (2008) adicionam outros critérios para a seleção de bactérias probióticas, como origem (que deve ser humana), capacidade de se aderir à mucosa intestinal e colonizar o trato gastrintestinal produzindo compostos antimicrobianos.

São vários os fatores que devem ser levados em conta quando se trata da produção de um alimento com microrganismos em doses capazes de assegurar as características funcionais. Os pontos mais críticos são a concentração do inóculo, as técnicas de processamento, o transporte e a temperatura de armazenamento (COMAN et al., 2012). Além disso, é necessário considerar as características do produto, como seu conteúdo de proteína, gorduras, açúcares, aditivos alimentares (espessantes, flavorizantes, estabilizantes etc.), pH, acidez titulável, concentração de oxigênio dissolvido e presença de peróxido de hidrogênio (BURGAIN et al., 2011; COMAN et al., 2012; MENEZES et al., 2013). Ainda nos critérios necessários para considerar uma bactéria como probiótica, é preciso que ela seja resistente ao processamento e não ser patogênica (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

Os principais microrganismos intitulados probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Streptococcus* e *Lactococcus* (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Destes, porém, as espécies bacterianas aprovadas pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008) são: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* variedades *shirota*, *ramnosus* e *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*.

2.2.3 LACTOBACILOS

Os lactobacilos são bastonetes gram-positivos, não esporulados, imóveis, anaeróbios ou anaeróbios facultativos (SLOVER; DANZIGER, 2008). O gênero *Lactobacillus* empregado na produção alimentar faz parte do grupo das bactérias ácido-láticas, cujo principal produto metabólico é o ácido láctico através da fermentação de carboidratos (BURITI; SAAD, 2007). Essas bactérias podem ser encontradas em diferentes nichos ecológicos, tais quais plantas (cereais, frutas e vegetais), silagem, alimentos fermentados e no próprio corpo humano, nas mucosas oral, intestinal e vaginal (PITHVA et al., 2012).

Lactobacillus é um gênero altamente heterogêneo, compreendendo mais de 50 espécies, e que recentemente tem sido utilizado para oferecer benefícios à saúde de quem os consome por meio das cepas probióticas (BERNADEAU et al., 2008; RAIZEL et al., 2011).

Este grupo bacteriano tem sua sobrevivência afetada por fatores ambientais de pH, interações com outros microrganismos e teor de oxigênio (RAIZEL et al., 2011). Algumas espécies são capazes de estimular o espessamento da barreira intestinal pela produção de mucina, contribuindo na proteção a infecções e alergias (NOGUEIRA; GONÇALVES, 2011).

O isolamento do *L. rhamnosus* ocorreu na década de 1980. Inicialmente foi certificado pela empresa finlandesa de produtos lácteos Valio® e hoje é encontrado em diversos produtos, sendo comercializado em cerca de 30 países (FAO, 2001).

O *Lactobacillus rhamnosus* é uma bactéria probiótica comumente utilizada no tratamento de diarreia causada por rotavírus e antibióticos em crianças e adultos (SOHAIL et al., 2012; SZAJEWSKA; KOŁODZIEJ, 2015). De acordo com De Keersmaecker et al. (2006), os produtos de ação antimicrobiana produzidos pela espécie *Lactobacillus rhamnosus* em condições *in vitro* são os ácidos acético, piroglutâmico, fórmico e láctico.

Este microrganismo mostrou maior tolerância às condições do sistema gastrointestinal do que outros probióticos, com maior taxa de sobrevivência e capacidade de se aderir à mucosa do intestino, prolongando sua permanência enquanto melhora a atividade imunológica no local (CICHOSKI et al., 2008). Tripathi et al. (2013) reportam que através da ligação do pili bacteriano com a célula intestinal como resposta mecânica, o microrganismo adquire força de resistência para permanecer no local. O *L. rhamnosus* é capaz de produzir substâncias de

baixo peso molecular com um largo espectro de ação antibacteriana, atuando frente a espécies anaeróbias, enterobactérias, *Pseudomonas* spp. *Staphylococcus* spp., estreptococos (SILVA et al., 1987), *Escherichia coli*, *Salmonella typhi*, *Bacillus subtilis*, *B. cereus*, *Helicobacter pylori* e *Listeria monocytogenes* (PITHVA et al., 2012). Além disso, é capaz de eliminar micotoxinas e cianotoxinas (OELSCHLAEGGER, 2010).

O *L. rhamnosus* é uma cepa utilizada na elaboração de produtos probióticos, tais quais iogurtes (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014), sucos (SILVA et al., 2014a), maionese (BIGDELIAN et al., 2014), pães (SILVA et al., 2014a), queijo (AMINE et al., 2014) e néctares (GARCIA-CEJA et al., 2015). Başıyğit et al. (2006) observaram que o *L. rhamnosus* livre obteve uma boa taxa de sobrevivência ao longo da vida de prateleira de sorvetes formulados com sacarose e aspartame, sem comprometimento das características sensoriais do produto.

Os *Lactobacillus casei* compreendem um grupo taxonômico heterogêneo, incluindo as subespécies *L. paracasei*, *L. zae* e *L. rhamnosus*, que possuem padrões bioquímicos e nutricionais muito semelhantes (BURITI; SAAD, 2007).

Dentre os lactobacilos, a espécie *L. casei* é a mais estudada, devido ao seu sucesso de aplicação em alimentos, sobretudo na fermentação (DIMITRELLOU et al., 2016). Esta bactéria tem sido empregada em iogurtes, leites, queijos de diversos tipos, sobremesas aeradas, produtos à base de soja, sorvetes, geleias, bebidas de frutas (BURITI; SAAD, 2007; RANADHEERA et al., 2012; GARCÍA-CEJA et al., 2015; XU et al., 2016). Reale et al. (2015) mostram que este microrganismo tem maior habilidade de sobrevivência após choques térmicos.

Algumas cepas de *L. casei* são capazes de produzir bacteriocinas termoestáveis e biossurfactantes, conferindo a possibilidade de aplicação como biopreservativo na conservação de alimentos (SHARMA; SAHARAN, 2014). Li et al. (2013) aplicaram o *L. casei* AST18 em iogurte, observando a capacidade de controle de crescimento de fungos filamentosos e de aumento de vida de prateleira do produto.

2.3 CAJÁ

Rico em vitaminas B1 e C (AYOKA et al., 2008), o cajá (*Spondias mombin* L.) é um fruto tropical encontrado principalmente na América, África e Ásia. No Brasil, sua localização se concentra nas regiões Norte e Nordeste. Além do termo “cajá”, o

fruto também é conhecido como taperebá, cajá-mirim, cajazinha e cajá-verdadeiro (SACRAMENTO; SOUZA, 2009).

Por seu sabor marcante e elevada acidez, o cajá é bastante consumido através de polpas congeladas, geleias, sucos, picolés e sorvetes (SILVA et al., 2014b). Possui rendimento em torno de 60%, dado que demonstra alto potencial comercial. Contudo, a cajazeira ainda é considerada em domesticação e de exploração extrativa (BRASIL, 2002).

Com cerca de 6 cm de comprimento e formato oblongo, o cajá é um fruto suculento, aromático e abundante em compostos fenólicos e carotenoides, conferindo-lhe uma característica coloração amarelada. É classificado como drupa, apresentando um mesocarpo carnoso e casca fina e lisa, que pode adquirir tonalidade avermelhada após o amadurecimento. Devido ao seu conteúdo de taninos, pode ser uma fonte de antioxidantes naturais (SACRAMENTO; SOUZA, 2009; MATIETTO; LOPES; MENEZES, 2010; CARVALHO et al, 2013; MALDONADO-ASTUDILLO et al., 2014).

Devido ao seu sabor marcante e característico agridoce, o fruto da cajazeira é pouco consumido de forma direta, porém os diversos produtos elaborados à base de sua polpa são bem aceitos e apreciados pela população (SILVA et al, 2013; MOURA NETO et al., 2015; DE MOURA OLIVEIRA et al, 2016).

2.4 SORVETE COMO FONTE DE PROBIÓTICOS

Quando se trata da elaboração de um produto contendo probióticos, um aspecto importante que deve ser levado em consideração é a sua aceitação sensorial. Este fator é destacável, uma vez que estes microrganismos podem produzir naturalmente, como parte de seu metabolismo, compostos de aroma e sabor desagradáveis (*off-flavors*). Um exemplo disso é o ácido acético, que gera sabor avinagrado ao paladar (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012).

As técnicas para mascarar o *off-flavor* em alimentos incluem a encapsulação e a adição de ingredientes de sabores fortes (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012). Desse modo, as frutas tropicais, como o cajá, possuidoras de aromas e sabores marcantes, podem evitar a identificação dos compostos desagradáveis ao paladar pelo consumidor.

Ademais, a adição de probióticos sem uma fermentação anterior ao congelamento provavelmente não afetará as características sensoriais do sorvete,

visto que a atividade metabólica não será tão impactante (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014), sobretudo pela baixa temperatura.

A indústria de laticínios é a principal produtora de alimentos carreadores de probióticos. Os principais produtos são iogurtes e leites fermentados, porém já é possível achar no mercado queijos, sucos, fórmulas infantis, bebidas e manteigas com microrganismos probióticos em sua formulação (NAGPAL et al., 2012; SOCCOL et al., 2014; BARBOSA et al., 2015).

Além de ser um produto bem aceito por todas as faixas etárias (CRUZ et al., 2009), o sorvete apresenta alta digestibilidade, textura macia e gosto doce (ABIS, 2016), tornando-se um alimento de interesse do consumidor.

De acordo com Cruz et al. (2009), as baixas temperaturas de processamento e armazenamento favorecem a longa vida de prateleira do sorvete. Isto atribui ao sorvete a característica de um bom carreador de probióticos.

Apesar de no Brasil o sorvete ser considerado como guloseima devido ao seu teor de açúcar, alguns países o consideram como um alimento de alto valor nutricional (YOUSSEF et al., 2013). Isso se deve tradicionalmente à sua base láctea, fazendo com que o produto adquira as propriedades nutritivas do leite, sobretudo sua reconhecida fonte de cálcio (RENHE; WEISBERG; PEREIRA, 2015).

Segundo a Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes (ABIS), o consumo de sorvete entre os anos de 2003 e 2015 cresceu 67%, registrando uma produção de 794 milhões de litros, com consumo per capita de 5,59 litros em 2015 (ABIS, 2016).

Devido ao seu pH próximo à neutralidade e o alto teor de sólidos totais, o sorvete pode ser um ambiente favorável à veiculação de probióticos (HOMAYOUNI et al., 2012). Por outro lado, a etapa de congelamento no processamento do sorvete tem efeito crucial na redução do número de bactérias viáveis através de danos na parede celular e perda de água intracelular (SOUKOULIS; FISK; BOHN, 2014). Ainda atribui-se a morte bacteriana à toxicidade do oxigênio presente no alimento (HOMAYOUNI et al., 2008a).

A fim de receber proteção contra as condições adversas fornecidas pelo sorvete, os microrganismos probióticos podem ser veiculados dentro de microcápsulas, tornando-se uma possível alternativa para o prolongamento da sua sobrevivência no produto (CRUZ et al., 2009).

2.5 MICROENCAPSULAÇÃO

Um dos desafios para a inserção de probióticos em alimentos é fazer com que as células microbianas resistam às condições oferecidas, tanto em composição quanto em tempo de armazenamento. Além destas circunstâncias, Homayouni et al. (2012) ainda acrescentam que o microrganismo precisa sobreviver ao baixo pH do estômago, à alcalinidade dos sais biliares no intestino, às enzimas digestivas e aos produtos metabólicos gerados durante a digestão.

A microencapsulação é uma tecnologia promissora que consiste no revestimento de partículas, formando cápsulas sólidas e esféricas com tamanho entre 1 e 1000 μm (RATHORE et al., 2013). As microcápsulas estabilizam as células, através da formação de uma parede semipermeável, e são totalmente preenchidas com o probiótico (GBASSI; VANDAMME, 2012).

Para a elaboração das cápsulas são utilizadas matrizes poliméricas biodegradáveis. Estes materiais têm como objetivo liberar o conteúdo de seu interior em condições específicas (MENEZES et al., 2013). Mesmo sob situações adversas, as microcápsulas são capazes de manter boa parte de sua estrutura, dissolvendo-se e liberando o material encapsulado no intestino grosso para exercer a função desejada (SIMEONI et al., 2014).

Estes micro-revestimentos fornecem isolamento, proteção mecânica e ambiental às células microbianas. Ao mesmo tempo, permitem sua sobrevivência por longos períodos, dado à característica de permeabilidade do material, que possibilita a nutrição da bactéria isolada (RATHORE et al., 2013).

Para a aplicação em alimentos é importante que o material encapsulante ofereça proteção contra o ácido estomacal, seja não citotóxico – garantindo segurança à saúde do consumidor –, seja capaz de se desintegrar e disponibilizar os probióticos no intestino (COOK et al., 2012). É necessário ainda que não reaja com o material encapsulado e não comprometa a qualidade sensorial da matriz alimentar onde está presente (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008).

Para a escolha dos materiais utilizados na encapsulação, sejam eles sintéticos ou de origem natural, devem ser levados em conta alguns critérios, como sua morfologia, toxicidade, estabilidade nos fluidos gastrintestinais e facilidade de esterilização (GBASSI; VANDAMME, 2012).

Da mesma forma que os constituintes das microcápsulas não devem interferir no sabor do alimento, o ideal é que não sejam percebidos durante a passagem pela

boca. As características de corpo e textura do sorvete podem auxiliar a mascarar qualquer resíduo sólido perceptível ao paladar.

Vários polímeros são utilizados como encapsulantes, tais quais alginato, agarose, quitosana, carboximetilcelulose, goma arábica, carragena, gelatina, caseína, pectina e amidos (MENEZES et al., 2013; GASPERINI; MANO; REIS, 2014).

2.6 ALGINATO

Extraído de algas marrons, o alginato é um polissacarídeo hidrossolúvel versátil, biocompatível, de baixo custo e não tóxico (SIMEONI et al., 2014). De acordo com Dang, Wang e Du (2006), é composto pelos ácidos β -D-manurônico (M) e α -L-gulurônico (G), ligados por ligações glicosídicas β (1,4).

Graças à facilidade que o polímero possui de formar gel através da interação com íons multivalentes, como o Ca^{2+} (MARTINSEN; SKJAK-BRAEK; SMIDSROD, 1991), a encapsulação utilizando alginato é de fácil e simples realização. Os íons formam ligações cruzadas, ligando os resíduos gulurônicos e induzindo à solidificação. Estas ligações cruzadas criam uma estrutura semelhante a uma caixa de ovo, conferindo característica visco-elástica ao material (LEROUX; GUILAK; SETTON, 1999).

O tamanho e porosidade das cápsulas são diretamente afetados pela viscosidade do gel (LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012), que, por sua vez, é relacionada ao peso molecular do alginato (MARTINSEN; SKJAK-BRAEK; SMIDSROD, 1991).

Para o preparo de cápsulas de alginato são empregadas técnicas simples, como extrusão, com gotejamento em solução solidificante, e emulsão, que utiliza uma fase contendo óleo durante o processo (CAVALHEIROS et al., 2015).

2.6.1 EXTRUSÃO COM ALGINATO DE CÁLCIO

Devido ao seu baixo custo e bons resultados na viabilidade celular do probiótico, a técnica de extrusão é amplamente utilizada na encapsulação desses microrganismos. Trata-se de um método de gotejamento do hidrocoloide sob pressão em uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2), solidificando instantaneamente por gelatinização iônica (SIMEONI et al., 2014).

A solidificação ocorre através da interação entre os íons de cálcio da solução e unidades G do alginato (ácido gulurônico), conforme a Figura 1. Dessa forma, observa-se que o tamanho da partícula é diminuído quando se aumenta o volume da solução, decorrente das ligações cruzadas entre os íons de Ca^{2+} e os blocos G do polímero (SRIAMORNSAKA et al., 2008). Logo, o alginato de sódio, após entrar em contato com a solução de cálcio e dar início ao processo de gelificação iônica, é transformado em alginato de cálcio.

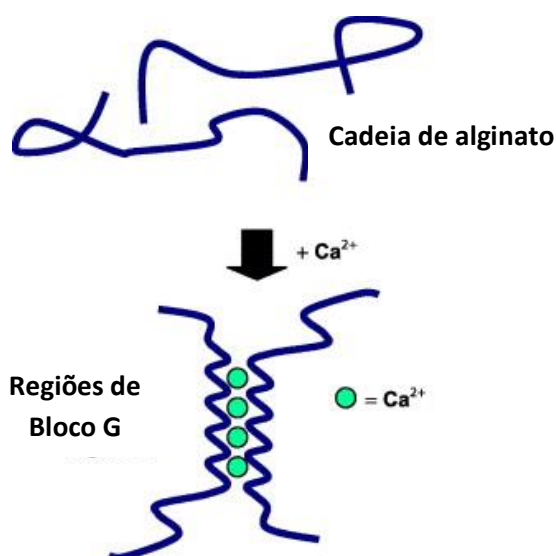


Figura 1. Representação da gelificação do alginato na presença de cálcio – modelo caixa de ovo.
Fonte: SRIAMORNSAKA et al., 2007.

2.7 QUITOSANA

A quitosana é um polissacarídeo catiônico linear formado por unidades glucosaminas e N-acetilglucosamina, unidas através de ligações glicosídicas do tipo β (1,4) (WU, LIN; YAO, 2014), conforme a Figura 2. Pode ser encontrada na parede de microrganismos, como o gênero *Mucor*, ou extraída do exoesqueleto de crustáceos aquáticos através de reação de desacetilação da quitina, um polissacarídeo muito abundante na natureza (MATTÉ; DA ROSA; ELSABEE; ABDOL, 2013).

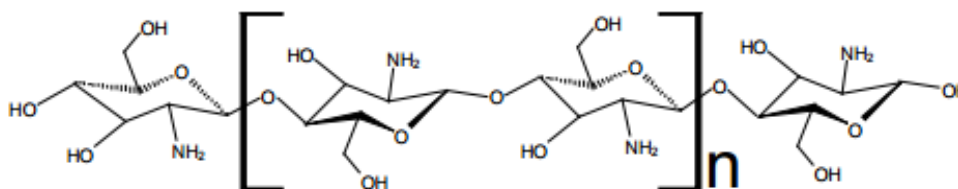


Figura 2. Estrutura molecular da quitosana. Fonte: WU; LIN; YAO, 2014.

Apesar da abundância da fonte, a quitosana de origem animal apresenta pontos negativos importantes, como a possibilidade de os resíduos de proteínas dos crustáceos causarem reações alérgicas e a necessidade de uso de soluções alcalinas poluentes para a reação de desacetilação. Como alternativa, a quitosana obtida do micélio fúngico não apresenta proteínas alergênicas (BERGER; STAMFORD; STAMFORD, 2012).

Graças a sua habilidade de formação de filmes e películas, a quitosana apresenta-se como um revestimento exterior útil para cápsulas de alginato, que é um polímero aniônico (SIMEONI et al., 2014). Krasaekoopt et al. (2003) relatam que a combinação alginato-quitosana forma cápsulas mais resistentes e estáveis, graças à proteção adicional.

3 HIPÓTESE

As bactérias probióticas encapsuladas com alginato de cálcio e quitosana apresentam maior resistência do que as células livres ao longo do tempo de armazenamento do sorvete de cajá e maior sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* encapsulados com alginato de cálcio e quitosana ao longo da vida de prateleira do sorvete de cajá.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Produzir as microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* e avaliar a eficiência da encapsulação nas cepas estudadas;
- Determinar e comparar a viabilidade das bactérias microencapsuladas e livres no sorvete;
- Verificar a capacidade de sobrevivência dos probióticos livres e encapsulados através de simulação de condições do trato gastrintestinal;
- Analisar a aceitação para sorvete de cajá contendo probióticos encapsulados.

5 MÉTODOS

5.1 LOCAL E PERÍODO DO ESTUDO

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos (LEAAL, Departamento de Nutrição, UFPE), no período de novembro de 2015 a janeiro de 2017.

Os experimentos foram iniciados após a aprovação pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (UFPE), sob o número de protocolo 1401798 (Anexo A).

5.2 CULTURA DAS BACTÉRIAS ÁCIDO-LÁTICAS

A cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 foi adquirida comercialmente na forma liofilizada (Roval ®), enquanto que o *Lactobacillus casei* ATCC 334 foi gentilmente concedido pelo cepário do LEAAL do Departamento de Nutrição da UFPE.

5.2.1 ATIVAÇÃO DA CEPA LIOFILIZADA

Para ativação e multiplicação, o *L. rhamnosus* liofilizado foi suspenso em solução salina (NaCl 0,9%) estéril. O volume de 1 mL da suspensão foi adicionado a um tubo com 9 mL de caldo De Man, Rogosa e Sharpe (MRS, Acumedia ®), com incubação a 37 °C/24h em estufa sob anaerobiose.

5.2.2 ATIVAÇÃO DA CULTURA ESTOQUE

A cultura estoque de *L. casei* foi descongelada até aproximadamente 25 °C e 1 mL foi transferido para 9 mL de caldo MRS (Acumedia ®). O tubo foi incubado a 37 °C/24h em estufa sob anaerobiose.

5.3 CONTAGEM DE CÉLULAS VIÁVEIS

O número de células viáveis foi determinado através da contagem de unidades formadoras de colônia. Para tal foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina 0,9% estéril. A inoculação foi baseada no método de *pour-plate* (SILVA et al., 2007), onde 1 mL da diluição foi depositado em uma placa

de Petri, recebendo ágar MRS (Sigma ®), seguido de homogeneização. As placas foram incubadas a 37 °C/48h em condições anaeróbias.

5.4 PROCEDIMENTO DE MICROENCAPSULAÇÃO

Após a etapa descrita no item 5.2, 1 mL de inóculo foi transferido para um Erlenmeyer contendo 140 mL de caldo MRS, sendo incubado em estufa sob as mesmas condições.

O inóculo microbiano foi repassado para tubos estéreis e centrifugado (Fanem ® Modelo Baby I 206 BL) a 3600 rpm por 15 minutos para separação da biomassa. Em seguida, o meio de cultura sobrenadante foi descartado e as células foram lavadas com solução de NaCl 0,9% e novamente centrifugadas. O pellet celular de cada tubo foi suspenso em 5 mL de solução salina para prosseguir à encapsulação proposta por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2006), com modificações pontuais. O volume foi passado para 20 mL de solução de alginato de sódio 4% (Isofar ®) previamente esterilizado em autoclave a 121 °C/15 min. O conteúdo de alginato com probiótico foi transferido para uma seringa acoplada com agulha 0,55 x 20 mm e gotejada em CaCl₂ 0,05 mol/L contendo 0,1 g/100g de Tween 80 (Vetec ®), dando início à formação das cápsulas. Após 30 minutos de gelificação, as cápsulas foram lavadas em água peptonada estéril (0,1g/100g) e filtradas a vácuo.

5.5 REVESTIMENTO COM QUITOSANA

O procedimento de revestimento com quitosana foi realizado segundo o método de Zou et al. (2011). Foi pesado 0,4 g de quitosana (Kiofine ®) de baixo peso molecular e dissolvido em 90 mL de água destilada contendo 0,4 mL de ácido acético glacial, com concentração final de 4 g/L. O pH foi ajustado para 5,7-6,0 através da adição de 1 mol/l NaOH. O volume da solução foi ajustado para 100 mL, sendo em seguida autoclavada a 121 °C por 15 minutos.

Prontamente, as cápsulas produzidas na etapa anterior (5.4) foram imersas na quitosana (Figura 3) sob agitação de 100 rpm durante 40 minutos num agitador orbital, para revestimento. Em seguida, as microcápsulas foram filtradas a vácuo e lavadas com água peptonada (0,1 g/100 g) para realização dos experimentos. O que não foi analisado no mesmo dia permaneceu armazenado em solução peptonada a 4 °C.

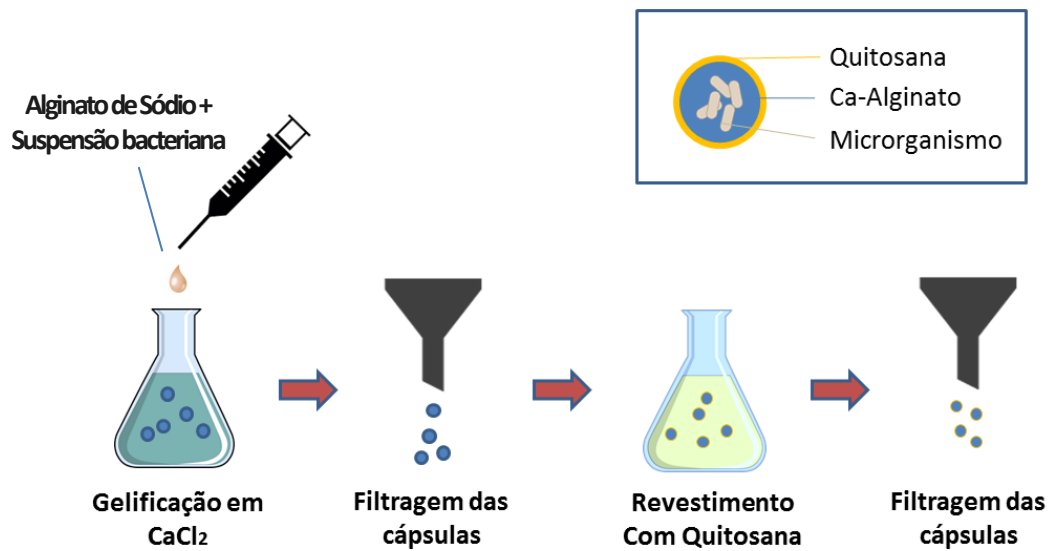


Figura 3. Esquema representativo da encapsulação por extrusão, seguida de revestimento em quitosana. Fonte: Elaborado pela autora.

5.6 PROCEDIMENTO DE QUEBRA DAS CÁPSULAS

Para avaliação da viabilidade dos microrganismos revestidos, o rompimento das cápsulas de alginato-quitossana (Figura 4) foi realizado em homogeneizador Polytron® (Kinematica).



Figura 4. Cápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana. Fonte: A autora.

Foi adicionado 1 g de cápsula a 9 mL de solução peptonada salina (0,1 g/100 g; 0,9%) pré-aquecida a 37 °C e submetido a 10.000 rpm durante 10 s no

equipamento (Zou et al., 2011), triturando todo o polímero e liberando as bactérias no diluente. A suspensão bacteriana obtida foi diluída e semeada conforme item 5.3.

5.7 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO

Para calcular a eficiência de encapsulação (EE) dos probióticos, as células encapsuladas foram liberadas de acordo com o item 5.6. Seguindo o proposto por Zou et al. (2011), a eficiência da encapsulação foi verificada da seguinte forma:

$$EE = \frac{N}{N_0} \times 100\%$$

Na fórmula, N corresponde ao número de bactérias liberadas das cápsulas, enquanto que N_0 é o número inicial do concentrado celular utilizado para o processo de encapsulação.

5.8 SORVETE FUNCIONAL

Para a produção do sorvete de cajá foi adquirida uma formulação comercial liofilizada (Yoki ®). Seguindo as instruções do fabricante, o produto (150 g) foi reconstituído em 400 mL de leite UHT (Elegê ®) e processado por 5 minutos em batedeira (Mondial ® Prática Due) sob condições assépticas.

5.8.1 SORVETE CONTENDO CÉLULAS LIVRES

Para o grupo de bactérias livres, conforme descrito no item 5.2, cada espécie foi inoculada separadamente em caldo MRS por 24h. Em seguida, 1 mL de inóculo foi semeado em superfície (SILVA et al., 2007) em uma placa contendo ágar MRS para crescimento em colônias, incubando-se por a 37 °C/48h em anaerobiose. As colônias foram suspensas em solução de NaCl 0,9% para adição ao sorvete.

A suspensão bacteriana de 50 mL (na concentração de aproximadamente $2,7 \times 10^9$, padronizado pela escala de McFarland, Probac ®) foram adicionados a 450 g de massa de sorvete (10%). O alimento foi cuidadosamente homogeneizado com auxílio de espátula esterilizada e seu peso foi verificado em balança digital semi-analítica (Bel Photonic ®). O procedimento foi idêntico para ambas as espécies microbianas.

O produto foi submetido a congelamento lento (3h no freezer) e armazenamento a -18 °C.

5.8.2 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS LIVRES VIÁVEIS AO LONGO DO ARMAZENAMENTO DE 150 DIAS DO SORVETE

As amostras de sorvete foram analisadas nos tempos 0 (após as 3h de congelamento), 30, 60, 90, 120 e 150 dias.

Amostras de 25 g do sorvete à temperatura ambiente foram transferidas para 225 mL de solução salina 0,9% (SILVA et al., 2007). Após homogeneização, 1 mL foi retirado e diluído seriadamente para posterior semeio em ágar MRS (técnica de pour-plate).

5.8.3 SORVETE ADICIONADO DE PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS

Assim como nas células livres, foi respeitada a proporção de 10%, adicionando-se 50 g de cápsulas em 450 g de sorvete. As concentrações de *L. rhamnosus* ASCC 290 e *L. casei* ATCC 334 foram de $9,65 \pm 0,05$ e $9,54 \pm 0,02$ respectivamente.

Em seguida ocorreu homogeneização para distribuição uniforme, pesagem em balança de precisão semi-analítica e congelamento lento a -18 °C.

5.8.4 ENUMERAÇÃO DE CÉLULAS ENCAPSULADAS VIÁVEIS AO LONGO DO ARMAZENAMENTO DE 150 DIAS DO SORVETE

Da mesma forma que o grupo de bactérias sem revestimento, os probióticos encapsulados foram avaliados em intervalos de 30 dias durante 5 meses.

Igualmente, o alimento foi diluído e submetido à homogeneização (item 5.6) para quebra das cápsulas e posterior contagem dos microrganismos (SILVA et al., 2007).

5.8.5 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS

Da mesma forma os sorvetes foram avaliados em intervalos de 30 dias quanto a pH e acidez titulável, com o intuito de observar se o metabolismo bacteriano poderia interferir nas características físico-químicas do produto, de modo que ocorra a redução da sua validade comercial.

As técnicas foram fundamentadas nos Métodos de Análises Físico-químicas de Alimentos do Instituto Adolfo Lutz (2008). Os procedimentos foram realizados em triplicata.

O pH foi avaliado através de potenciômetro digital (Tecnal, Meter Tec). Foram diluídos 5 g do sorvete em 50 mL de água destilada e analisados no equipamento.

A acidez total foi analisada através de reação titulométrica. Foram pesados 3 g de amostra em Erlenmeyer e diluídos em 50 mL de água destilada. Após adição de 3 gotas de fenolftaleína (solução indicadora) iniciou-se a titulação com NaOH 0,1 M até coloração rósea.

5.9 SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS *in vitro*

O preparo dos sucos gástrico e intestinal simulados seguiram o descrito por Chávarri et al. (2010), com necessárias modificações.

Para o suco gástrico simulado (SGS) foi preparada uma solução contendo 9 g/L de cloreto de sódio contendo 3,0 g/L de pepsina com pH ajustado para 2,1 com HCl. O suco intestinal simulado (SIS) foi preparado dissolvendo os sais biliares em solução de 6,5 g/L NaCl, 0,835 g/L KCl, 0,22 g/L CaCl_2 e 1,386 g/L NaHCO_3 , para concentração de 3,0g/L, obtendo pH final de 7,2. Para a simulação foram utilizados 9 mL de SGS e SIS. As amostras foram analisadas antes do contato com o suco ácido (tempo 0) e com 60, 120 e 240 minutos.

5.9.1 SIMULAÇÃO COM CÉLULAS LIVRES

A simulação das condições gastrintestinais com células livres ocorreu da seguinte forma:

Tubos de caldo MRS foram incubados com o microrganismo a 37 °C/24h sob anaerobiose. Após o cultivo, os tubos foram centrifugados a 3600 rpm por 15 min para obtenção da biomassa celular. Em seguida, o pellet foi suspenso em 10 mL de solução salina 0,9%. Uma alíquota de 1 mL foi retirada e diluída seriadamente, a fim de verificar a viabilidade inicial da cultura. Outra alíquota de 1 mL foi inoculada no SGS (pH 2,1). Os tubos inoculados permaneceram a 37 °C, com homogeneizações periódicas.

Conforme a Figura 5, ao completar 60 e 120 minutos de teste, 1 mL do suco ácido contendo a cepa avaliada foi diluído em série e inoculado por profundidade em MRS.

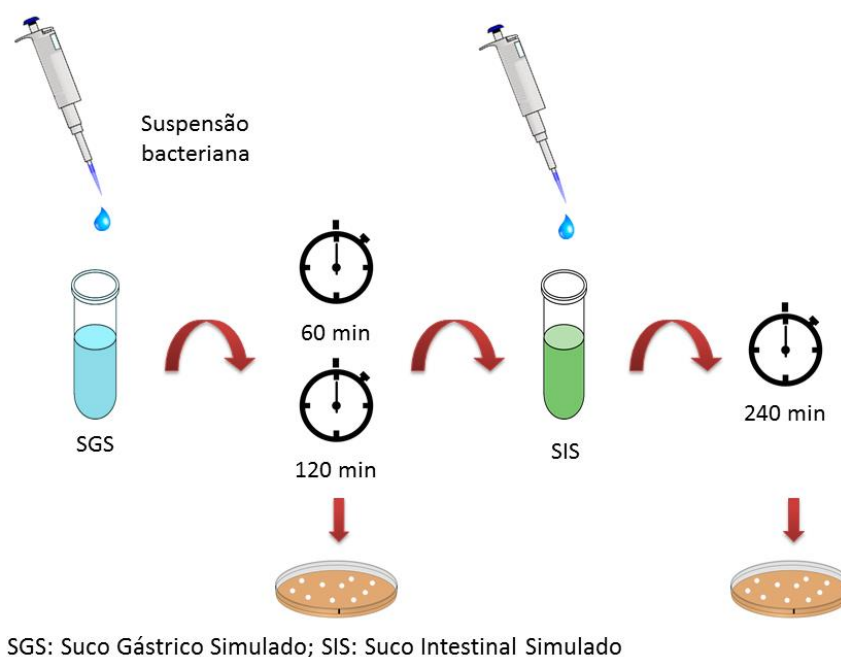


Figura 5. Simulação das condições gastrintestinais com as células na forma livre. Fonte: Elaborado pela autora.

Passados os 120 minutos correspondentes à etapa gástrica, o tubo foi centrifugado (3600 rpm por 15 min) e todo o sobrenadante foi descartado. Em seguida, o suco intestinal foi inserido e o tubo passou por incubação até completar 240 minutos de avaliação, também com homogeneizações periódicas. Para finalizar, 1 mL foi retirado da amostra, diluído e inoculado em ágar para contagem das células viáveis.

As colônias foram contadas após 48h de crescimento em estufa e os resultados expressos em UFC/mL.

5.9.2 SIMULAÇÃO COM BACTÉRIAS ENCAPSULADAS

Para os microrganismos encapsulados, as condições de incubação foram as mesmas utilizadas nas células livres, utilizando, neste caso, 1 g de cápsulas de alginato-quitosana. Nesta etapa, porém, as cápsulas foram inoculadas em tubos separados para cada tempo, conforme Figura 6: 1 tubo para 60 min, 2 tubos para 120 min (um para avaliar esse tempo e outro para transferir ao suco intestinal) e 1 tubo para 240 min. A separação dos tubos é necessária para a quebra das cápsulas a cada tempo avaliado.

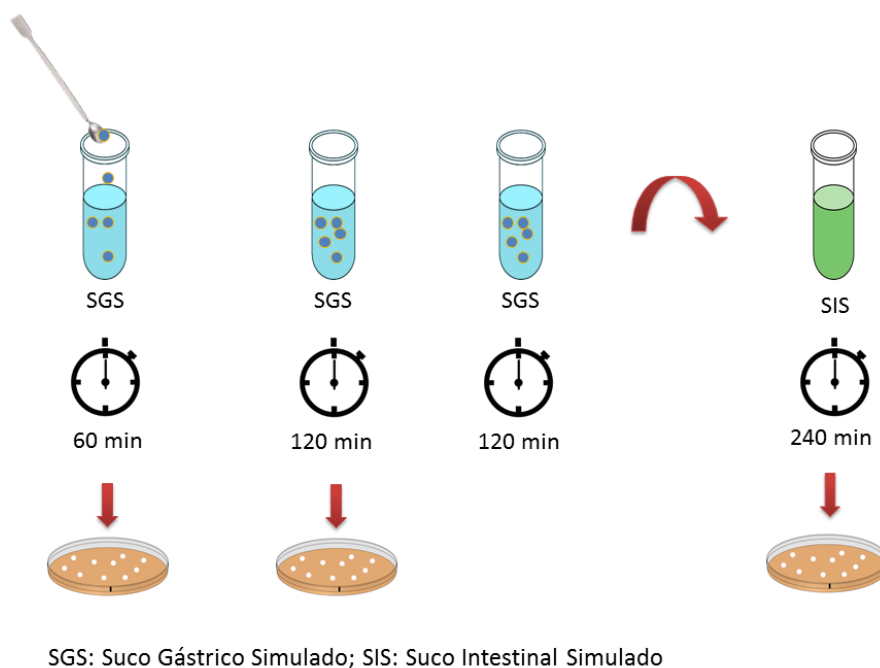


Figura 6. Simulação das condições gastrintestinais com os probióticos encapsulados. Fonte: Elaborado pela autora.

Ao final dos 60 min as cápsulas foram filtradas em peneira de malha de aço, transferidas para solução de peptona salina (0,1/100g; 0,9%) e quebradas em homogeneizador Polytron® a 10.000 rpm durante 10 s. O mesmo processo seguiu-se a um tubo ao findar dos 120 minutos.

Aos 240 min, etapa final da simulação, as cápsulas foram rompidas dentro do próprio tubo de SIS.

5.10 ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE/CCS (Anexo A) e todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), que consta no Apêndice A.

Baseado nos resultados mais satisfatórios foi selecionado para a análise sensorial o sorvete contendo *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 encapsulados. Apenas foram oferecidas neste teste as amostras cuja análise microbiológica demonstrou resultados em conformidade com a legislação pertinente (ANVISA, 2001). De acordo com o Instituto Adolfo Lutz (2008), o teste de aceitabilidade foi

realizado utilizando a escala hedônica de nove pontos, onde 9 significa “gostei extremamente (adorei)” e 1 corresponde a “desgostei extremamente (detestei)”. Foram avaliados aparência, aroma, sabor, textura e impressão global do produto (Apêndice B). Também foi verificada a intenção de compra, através da escala de hedônica de cinco pontos, com 5 correspondendo a “certamente compraria” e 1 a “certamente não compraria”.

Foram selecionados 118 provadores voluntários não treinados, entre estudantes e servidores da Universidade Federal de Pernambuco, com idades entre 18 e 46 anos, que referiram interesse e/ou hábito de consumir sorvete de cajá. Os sorvetes foram retirados do freezer (-18 °C) e deixados em congelador (0 °C) antes de serem servidos. Aproximadamente 15 g de amostras foram oferecidos em copos plásticos brancos.

5.11 PROCESSAMENTO ESTATÍSTICO

Para a estatística descritiva (média e desvio padrão), os resultados obtidos foram avaliados em Excel ® 2010 (Microsoft ®). Os dados, que possuem distribuição normal, foram analisados por ANOVA one-way no software Past ®, a fim de verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, adotando o nível de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

6.1 VIABILIDADE De *L. rhamnosus* E *L. casei* DURANTE ARMAZENAMENTO DO SORVETE DE CAJÁ

As contagens de células viáveis de *L. rhamnosus* ASCC 290 e *L. casei* ATCC 334, livres ou encapsulados, no sorvete de cajá durante 150 dias a -18 °C é apresentada na Tabela 1.

Tabela 1. Contagem de células viáveis do *L. rhamnosus* e *L. casei* livres e encapsulados durante armazenamento de 150 dias.

Espécie Probiótica	Tempo de armazenamento (dias)	Células Livres	Células Encapsuladas
		log UFC/g	
<i>L. rhamnosus</i> ASCC 290	Contagem Inicial	9,43 ± 0,01 AAa	9,62 ± 0,04 AAb
	0 (pós-congelamento)	7,66 ± 0,03 BAa	9,62 ± 0,08 ABb
	30	7,71 ± 0,04 BBa	8,84 ± 0,03 BCb
	60	7,57 ± 0,03 CCa	8,38 ± 0,04 CDb
	90	7,52 ± 0,02 CDa	8,71 ± 0,02 DEb
	120	7,50 ± 0,01 CEa	8,80 ± 0,01 EFb
	150	5,95 ± 0,04 DFa	8,57 ± 0,06 FGb
<i>L. casei</i> ATCC 334	Contagem Inicial	9,43 ± 0,01 AAa	9,54 ± 0,02 ABb
	0 (pós-congelamento)	7,80 ± 0,01 BBa	8,37 ± 0,11 BCb
	30	7,23 ± 0,15 CCa	8,63 ± 0,02 CDb
	60	7,28 ± 0,02 CDa	8,10 ± 0,18 DEb
	90	7,86 ± 0,05 DEa	8,05 ± 0,05 DFb
	120	7,78 ± 0,07 DFa	8,24 ± 0,01 DGb
	150	7,35 ± 0,50 EGa	8,05 ± 0,06 DHb

Valores (médias ± desvio padrão) com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5%. A primeira letra maiúscula compara a coluna da mesma espécie em diferentes tempos. A segunda letra maiúscula compara o mesmo tempo para as diferentes espécies probióticas. Valores seguidos por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

Com relação às células livres, a espécie *L. rhamnosus*, logo após o congelamento apresentou uma redução significativa ($p < 0,05$) da concentração inicial do inóculo adicionado, passando de 9,43 para 7,66 log UFC/g, representando uma perda de 1,77 log UFC/g de sorvete. Nos meses subsequentes, nota-se uma queda gradativa da viabilidade das bactérias que não receberam proteção encapsulante, de modo que ao fim do experimento contabiliza-se uma redução significativa ($p < 0,05$) de 3,48 log UFC/g em relação à contagem inicial. Foi observada uma taxa de sobrevivência de 64% das bactérias deste grupo.

O *L. rhamnosus* encapsulado com alginato e quitosana, por sua vez, não apresentou perda significativa ($p > 0,05$) entre o concentrado inicial e o avaliado após o congelamento a -18°C . Estatisticamente só houve diferença significativa após 30 dias de armazenamento (perda de 0,78 log UFC/g). Apesar de ter sido observada diferença estatística entre os cinco meses avaliados, a espécie sofreu redução de apenas 1,05 log UFC/g. A taxa de viabilidade entre o primeiro e o último dia de estudo foi de 89,1%.

Embora tenha apresentado uma diminuição mais discreta, o *L. casei* na sua forma livre também sofreu redução significativa ($p < 0,05$) de 1,63 log UFC/g logo em seguida ao congelamento lento a -18°C . A contagem da espécie manteve-se na escala de 10^7 até o dia 150 de estocagem, mantendo viáveis 77,9% dos probióticos inoculados.

Da mesma forma, células encapsuladas do *L. casei* sofreram queda estatisticamente significativa na viabilidade após o congelamento, com perda de 1,17 log UFC/g. Semelhantemente, o tratamento estatístico evidenciou diferença significativa ($p < 0,05$) entre o primeiro e o último dia de contagem microbiana, com redução de 1,49 log UFC/g e sobrevivência de 84,5% das células.

Fazendo comparativo entre as espécies, na forma livre – que iniciou com a mesma concentração de inóculo bacteriano –, foi observada uma diferença significativa a partir do processo de congelamento. O *L. rhamnosus* e o *L. casei* que passaram por encapsulação diferiram entre si em todos os tempos estudados.

6.2 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORVETE DE CAJÁ DURANTE ARMAZENAMENTO DE 150 DIAS

As Tabelas 2 e 3 apresentam, respectivamente, os valores referentes às alterações dos parâmetros físico-químicos nos sorvetes adicionados de células livres

e encapsuladas de *L. rhamnosus* ASCC 290 e *L. casei* ATCC 334 durante 150 dias de estocagem a -18 °C.

Com relação ao sorvete adicionado de *L. rhamnosus*, o pH inicial da porção que recebeu células livres foi de $5,96 \pm 0,05$, enquanto o que continha o probiótico microencapsulado iniciou com pH $6,00 \pm 0,02$, sem diferir estatisticamente entre si ($p > 0,05$). As médias de pH de ambos os sorvetes contendo *L. rhamnosus* foram de 6,03 (com desvio padrão de $\pm 0,05$ para o grupo sem tratamento e $\pm 0,03$ para o encapsulado) durante todo o estoque.

Nem o *L. rhamnosus* na sua forma livre nem encapsulado causou alteração significativa ($p > 0,05$) no pH entre o primeiro e o último dia de experimento.

Da mesma forma, a acidez total titulável não apresentou diferenças significativas entre o primeiro e último dia de análise, tanto referente às células livres quanto às que passaram por processo de encapsulação.

Tabela 2. Resultados de pH e acidez titulável dos sorvetes de cajá contendo *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290.

Parâmetro	Tempo de armazenamento (dias)	Células Livres	Células Encapsuladas
		log UFC/g	
pH	0	$5,96 \pm 0,05$ a	$5,99 \pm 0,01$ a
	30	$6,03 \pm 0,04$ a	$6,17 \pm 0,03$ b
	60	$6,03 \pm 0,01$ a	$6,05 \pm 0,01$ b
	90	$6,05 \pm 0,01$ a	$6,00 \pm 0,01$ b
	120	$6,04 \pm 0,01$ a	$6,01 \pm 0,09$ a
	150	$6,09 \pm 0,13$ a	$5,93 \pm 0,01$ a
Acidez total titulável (g. ác. láctico/100g)	0	$2,71 \pm 0,17$ a	$2,66 \pm 0,01$ a
	30	$2,63 \pm 0,05$ a	$2,60 \pm 0,1$ a
	60	$2,73 \pm 0,01$ a	$2,51 \pm 0,26$ a
	90	$2,70 \pm 0,17$ a	$2,74 \pm 0,13$ a
	120	$2,33 \pm 0,21$ a	$2,99 \pm 0,01$ b
	150	$2,49 \pm 0,17$ a	$2,52 \pm 0,17$ a

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

O sorvete adicionado de *L. casei*, teve como pH inicial $5,96 \pm 0,05$ para probióticos livres e $6,00 \pm 0,02$ para células encapsuladas, sem diferir estatisticamente entre si ($p > 0,05$). As médias totais de pH para todo o período estudado foi de $6,04 \pm 0,03$ e $6,09 \pm 0,7$, também sem diferenças estatísticas. Semelhantemente, tanto no tempo 0 (após o congelamento lento) quanto no tempo 150 não foram observadas diferenças significativas para as bactérias inoculadas diretamente e aquelas encapsuladas.

Da mesma forma, a acidez total titulável não apresentou diferenças significativas entre o primeiro e último dia de análises, tanto referente às células livres quanto às que passaram por processo de encapsulação.

Tabela 3. Resultados de pH e acidez dos sorvetes de cajá contendo *Lactobacillus casei* ATCC 334.

Parâmetro	Tempo de armazenamento (dias)	Células Livres	Células Encapsuladas
pH	0	$6,01 \pm 0,03$ a	$6,02 \pm 0,01$ a
	30	$6,03 \pm 0,03$ a	$6,13 \pm 0,05$ b
	60	$6,04 \pm 0,01$ a	$6,04 \pm 0,02$ a
	90	$6,05 \pm 0,01$ a	$6,21 \pm 0,10$ a
	120	$6,07 \pm 0,12$ a	$6,03 \pm 0,07$ a
	150	$6,0 \pm 0,06$ a	$6,07 \pm 0,10$ a
Acidez total titulável (g. ác. láctico/100g)	0	$2,6 \pm 0,05$ a	$2,66 \pm 0,01$ a
	30	$2,65 \pm 0,08$ a	$2,66 \pm 0,01$ a
	60	$2,66 \pm 0,01$ a	$2,33 \pm 0,14$ b
	90	$2,28 \pm 0,06$ a	$2,49 \pm 0,01$ b
	120	$2,49 \pm 0,17$ a	$2,59 \pm 0,17$ a
	150	$2,49 \pm 0,17$ a	$2,66 \pm 0,01$ a

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

6.3 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO

A eficiência da encapsulação (EE) tem por objetivo avaliar a taxa de sobrevivência após a submissão das bactérias probióticas ao processo de

microencapsulação. O resultado do experimento é obtido pelo cálculo da razão das células viáveis pós-encapsuladas pelo número inicial de microrganismos antes do revestimento. A variável é expressa em porcentagem (CHÁVARRI et al., 2010).

Conforme a Tabela 4, o *L. rhamnosus* apresentou uma redução de 2,84 log UFC/g após a encapsulação, correspondendo a uma EE de 73,8%. Semelhante taxa de aproveitamento foi encontrada para *L. casei*: 79,5%. Esta espécie apresentou uma redução de 2,43 log UFC/g.

Tabela 4. Contagem de células viáveis (média $\pm$ desvio padrão) antes e depois da encapsulação.

Espécie	Número de células (log UFC/g)		EE (%)
	Antes	Depois	
<i>L. rhamnosus</i> ASCC 290	12,47 $\pm$ 0,71	9,63 $\pm$ 0,04	73,8%
<i>L. casei</i> ATCC 334	11,97 $\pm$ 0,01	9,54 $\pm$ 0,02	79,5%

EE: eficiência da encapsulação

6.4 CONDIÇÕES GASTRINTESTINAIS SIMULADAS

Os resultados da avaliação da sobrevivência de *L. rhamnosus* ASCC 290 e *L. casei* ATCC 334 após exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados estão elencados na Tabela 5.

Aos 120 minutos de experimento, observou-se significativa redução na viabilidade de células livres de *L. rhamnosus*. As células probióticas apresentaram maior estabilidade em cápsulas de alginato-quitosana, com um percentual de sobrevivência de 84% ao final da etapa intestinal ($p < 0,05$). Tanto as bactérias livres quanto as encapsuladas apresentaram decréscimo significativo entre a contagem inicial e o tempo de 240 min, apesar de que as revestidas permaneceram acima de 8 log UFC/g.

Durante a fase gástrica, observa-se que o *L. casei* livre apresentou queda de cerca de mais de 1 log a cada etapa. Ainda na forma livre, houve redução significativa ($p < 0,05$) de 4,61 log UFC/g entre o início e o término do teste, obtendo uma taxa de sobrevivência de apenas 57,8%. Similarmente, a diferença de 1,91 log UFC/g representou diferença estatística para os probióticos encapsulados. Este

grupo com revestimento polimérico, porém, obteve uma taxa de 86,2% de viabilidade após a etapa intestinal simulada.

Tabela 5. Viabilidade de células livres e encapsuladas de *L. rhamnosus* e *L. casei* aos sucos gástrico e intestinal simulados.

Espécie Probiótica	Tempo de armazenamento (dias)	Células Livres	Células Encapsuladas
		log UFC/g	
<i>L. rhamnosus</i> ASCC 290	Contagem Inicial	9,19 ± 0,16 AAa	9,65 ± 0,05 AAb
	60 min (SGS)	9,38 ± 0,18 ABa	9,38 ± 0,11 BBa
	120 (SGS)	7,15 ± 0,21 BCa	9,73 ± 0,08 CCb
	240 (SIS)	7,68 ± 0,31 BDa	8,11 ± 0,03 DDb
<i>L. casei</i> ATCC 334	Contagem Inicial	10,92 ± 0,03 ABa	9,54 ± 0,02 ABb
	60 min (SGS)	9,52 ± 0,03 BCa	9,54 ± 0,15 ACa
	120 (SGS)	8,38 ± 0,03 CDa	8,75 ± 0,11 BDa
	240 (SIS)	6,31 ± 0,21 DEa	8,22 ± 0,08 CEb

Valores (médias ± desvio padrão) com letras maiúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente ao nível de 5%. A primeira letra maiúscula compara a coluna da mesma espécie em diferentes tempos. A segunda letra maiúscula compara o mesmo tempo para as diferentes espécies probióticas. Valores seguidos por letra minúscula iguais na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

Comparando as espécies estudadas, observa-se diferença estatisticamente significativa entre o *L. rhamnosus* ASCC 290 e o *L. casei* ATCC 334, tanto na forma livre, quanto nas células encapsuladas, no que se refere à fase gástrica e à fase intestinal.

6.5 ANÁLISE SENSORIAL DO SORVETE DE CAJÁ

A aceitação dos provadores quanto ao sorvete de cajá contendo probióticos encapsulados com alginato de cálcio e quitosana, quanto aos atributos de aparência, aroma, sabor, textura e impressão global, encontra-se na Figura 7.

Dos 118 voluntários selecionados para a análise sensorial, 76% (90) eram mulheres e 24% (28), homens. A média de idade foi de 23 anos, variando de 18 a 46 anos.

As amostras foram bem aceitas pelos provadores, visto que as atribuições médias variaram de “gostei moderadamente” a “gostei muito” ($7,58 \pm 0,55$). O atributo aroma obteve a menor pontuação ($6,91 \pm 1,54$), com relatos de que o cheiro de cajá da formulação comercial não era tão evidente quanto o esperado para produtos deste fruto. As cápsulas obtidas pelo método de extrusão não interferiram na palatabilidade do sorvete, uma vez que a média de aceitação do atributo “textura” obteve pontuação média de $7,96 \pm 1,06$.

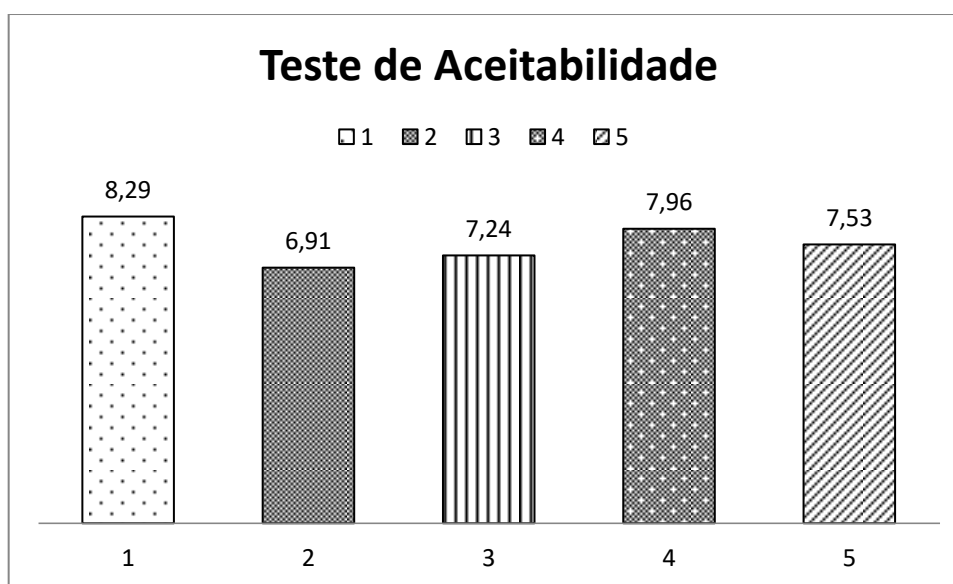


Figura 7. Atributos de Aceitabilidade do sorvete de cajá com probióticos encapsulados (1: Aparência; 2: Aroma; 3: Sabor; 4: Textura; 5: Impressão Global).

Os resultados obtidos no teste de intenção de compra indicam que o consumidor provavelmente compraria ($3,94 \pm 1,00$) o sorvete de cajá contendo probióticos na forma encapsulada. Alguns voluntários reafirmaram interesse ao saber do valor funcional do produto e seus efeitos na saúde. Dessa forma, o estudo aponta para a possibilidade de existência de um mercado em potencial para sobremesas congeladas de frutas tropicais contendo probióticos.

7 DISCUSSÃO

7.1 EFEITO DO CONGELAMENTO SOBRE A VIABILIDADE DAS CEPAS PROBIÓTICAS

O sorvete, por ser um alimento bem apreciado por todas as faixas etárias e bastante consumido e aceito mundialmente, tem chamado a atenção da indústria alimentícia e de instituições de pesquisa. De acordo com Soukoulis, Fisk e Bohn (2014), essa sobremesa tornou-se veículo de incorporação de ingredientes benéficos à saúde, tais como probióticos, prebióticos e antioxidantes.

A temperatura utilizada no estudo (-18 °C) reduziu a atividade metabólica das bactérias, de modo que a produção natural de ácidos orgânicos (SONG; IBRAHIM; HAYEK, 2012) por parte dos microrganismos adicionados não foi significativa a ponto de alterar a validade comercial do alimento através das características físico-químicas.

Por outro lado, o processo de congelamento promoveu uma redução da viabilidade das espécies selecionadas. Isso se deve ao estresse mecânico e à cristalização das estruturas celulares dos probióticos, de forma que quanto maior o tempo de exposição às baixas temperaturas, menor a atividade celular (TRIPATHI; GIRI, 2014). Além disso, o alto conteúdo de oxigênio presente no sorvete desfavorece a sobrevivência dessas bactérias ácido-láticas, conhecidas por ter afinidade por ambientes anaeróbios (HOMAYOUNI et al., 2012).

Este efeito foi observado mais nitidamente na população de células não encapsuladas, uma vez que estão em contato direto com o alimento e sem nenhum tipo de proteção, com perdas de 3,48 e 2,08 log UFC/g para *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 e *Lactobacillus casei* ATCC 334, respectivamente, ao longo dos 150 dias de experimento. Comparando três espécies probióticas, Reale et al. (2015) observaram que o *L. casei* apresenta maior tolerância a fortes mudanças de temperatura.

A aplicação da cultura fresca hidratada no sorvete antes do congelamento tem melhor influência na sobrevivência do que a adição direta de células liofilizadas (CHAMPAGNE et al., 2015). Champagne et al. (2015) mostraram que o *L. rhamnosus* microencapsulado com chocolate apresentaram saldo positivo em relação às células liofilizadas e também quando comparadas com a espécie *Bifidobacterium longum*.

Alamprese et al. (2005) relatam uma redução de apenas 0,2-0,3 log UFC/g no dia 0, ou seja, logo após o congelamento (-28 °C) do sorvete contendo *L. rhamnosus* GG. No presente estudo, também houve diferença estatisticamente significativa entre a contagem inicial das células na forma livre e imediatamente após o congelamento.

Em 12 semanas de sorvete estocado a -19 °C (ABGHARI et al., 2011), a espécie *L. rhamnosus* apresentou viabilidade superior a 10^7 UFC/g, semelhantemente ao encontrado neste trabalho ($7,57 \pm 0,03$ log UFC/g). Outro estudo (SONGTUMMIN; LEENANON, 2016) mostrou uma quantidade média de 7,51 log UFC/g desta espécie probiótica ao findar de dois meses. Porém, de acordo com os resultados aqui descritos e com o relatado na literatura, sugere-se que a tendência deste número é decrescer enquanto o tempo de armazenamento aumenta.

Em estudo com sorvetes adicionados de antioxidantes naturais, Sagdic et al. (2010) inocularam *L. casei* (variedade *shirota*) em concentração de aproximadamente 10^8 . Durante os 60 dias de experimento, relatou-se uma contagem de 7,21 log UFC/mL, de forma que supõe-se que os antioxidantes foram capazes de proteger as células das injúrias do alimento congelado.

A queda da população de células viáveis em curto período de tempo também é observada em outras pesquisas envolvendo a espécie *L. casei*. Conforme resultados publicados por Souza et al. (2009), a concentração probiótica alcançada no 28º dia de contagem/experimento girou em torno de 6,32 log UFC/g de sorvete caseiro. Valores maiores são encontrados em condições simuladas de um sorvete, onde, comparando-se três espécies probióticas, o *Lactobacillus casei* apresentou uma maior taxa de sobrevivência (em média 10^8) ao longo de três meses (HOMAYOUNI et al., 2008b).

Diversos trabalhos (HOMAYOUNI et al.; COOK et al., 2012; RATHORE et al.; MENEZES et al., 2013; GASPERINI; MANO; REIS, 2014) relatam a tecnologia de microencapsulação como uma alternativa eficaz na proteção e prolongamento da viabilidade dos microrganismos probióticos aplicados em produtos alimentícios.

Como observado nos resultados, o presente estudo obteve uma taxa de aproveitamento de 2,62 log UFC/g das células encapsuladas de *L. rhamnosus* em relação às bactérias livres. Apesar do valor inferior (0,7 log UFC/g de sorvete), a viabilidade do *L. casei* ao longo dos 150 dias de armazenamento também foi significativamente maior na forma encapsulada do que nas células livres ($p < 0,05$).

Simulando as condições de armazenamento congelado (-15 °C), Xu et al. (2016) encontraram 66.9% de viabilidade do *L. casei* ATCC 393 encapsulado, valor significativamente mais expressivo do que o observado na população de bactérias livres.

Da mesma maneira, comparando às células livres, Songtummin e Leenanon (2016) obtiveram aproveitamento de 0,6 log UFC/g para o *L. casei* encapsulado com alginato a 1%, permitindo chegar à oitava semana de refrigeração acima de 8 log, similar ao presente trabalho ($8,10 \pm 0,18$ aos 60 dias).

Apesar de até o momento não haver descrições na literatura de *L. rhamnosus* encapsulados para aplicação em sorvete, outros trabalhos estabelecem bem que a técnica de microencapsulação com biopolímeros favorece a viabilidade celular ao longo do tempo em diversos produtos alimentares, como iogurtes (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014), sucos (SILVA et al., 2014a), carnes (CORBO et al., 2016), maionese (BIGDELIAN et al., 2014), pães (SILVA et al., 2014a), queijo (AMINE et al., 2014), geleia e néctares (GARCIA-CEJA et al., 2015).

Um produto de elevada acidez pode comprometer a viabilidade do microrganismo (FRAGOSO et al., 2016). A inoculação dos probióticos na fase final da mistura do sorvete, antecedendo apenas o resfriamento, evita a fermentação do produto e mantém o pH em torno de 6,0 (SAGDIC et al., 2010; ABGHARI et al., 2011; KUMAR; DAVID, 2016). Portanto, este fator somado ao congelamento de -18 °C contribuiu para que não houvesse diferenças significativas ($p < 0,05$) de pH e acidez total titulável entre as células livres e encapsuladas de *L. rhamnosus* e *L. casei* no dia 150.

7.2 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO POR EXTRUSÃO

Com relação à análise de eficiência da encapsulação (EE), os altos valores obtidos (73,8% para *L. rhamnosus* e 79,5% para *L. casei*) indicam compatibilidade do método de extrusão de alginato de sódio em CaCl_2 e posterior revestimento com quitosana com os probióticos selecionados (Xu et al, 2016). A encapsulação de *L. rhamnosus* apresentou queda de mais de 3 ciclos logarítmicos na sua viabilidade, comparando à concentração celular que iniciou o processo. O *L. casei* demonstrou melhor eficiência, com subtração de 2,46 log da contagem inicial, sugerindo-se que esta espécie possua maior capacidade de ligação com o polímero.

Comparado ao método de emulsão, amplamente empregado para produção de cápsulas contendo probióticos, os resultados deste estudo foram satisfatórios, tendo em vista artigos reportando taxas de EE variando de 22 a 50% (CHÁVARRI et al., 2010; ZOU et al., 2011; CAI et al., 2014).

Além de a extrusão ser uma técnica simples, acessível e de baixo custo (LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012), alguns autores reportam eficiência de encapsulação de 89-98% (NAG; HAN; SINGH, 2011; LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012; SHINDE; SUN-WATERHOUSE; BROOKS, 2013; TEE et al., 2014).

7.3 SIMULAÇÃO GÁSTRICA E INTESTINAL

Conforme descrito por Xu et al. (2016), as células livres de *L. casei* ATCC 393 apresentaram queda substancial (5,22 log) após 2h de simulação gástrica, ao contrário das encapsuladas com alginato-proteína de ervilha (0,03 log). Padrão semelhante foi observado no presente estudo, porém a cepa utilizada – *L. casei* ATCC 334 – reduziu 2,54 log UFC/mL até o final da fase gástrica (120 min) no formato livre, quase metade em relação ao trabalho citado. O grupo encapsulado sofreu perda de apenas 0,79 log UFC/mL.

Cápsulas de alginato/quitosana/carboximetil-quitosana também foram capazes de auxiliar as células de *L. casei* ATCC 393 a terminarem a simulação das condições gastrintestinais em 7,42 log UFC/g (LI et al., 2011). Além disso, as matrizes contribuíram no prolongamento a vida de útil celular após quatro semanas em refrigeração a 4°C.

Em estudo com *L. rhamnosus* microencapsulados com alginato e goma de alfarroba, os autores Cheow, Kiew e Hadinoto (2014) constataram viabilidade de quase 95% das células após submissão aos fluidos gástricos e intestinais simulados. A pesquisa ainda aponta sobrevivência de menos de 20% das bactérias encapsuladas apenas com alginato, indicando que o polímero isoladamente apresenta limitações no transporte adequado dos probióticos ao intestino (LOTFIPOUR; MIRZAEI; MAGHSOODI, 2012).

Utilizando cápsulas de alginato-quitosana, Abbaszadeh et al. (2014) observaram viabilidade 87 vezes maior em *L. rhamnosus*, em detrimento às suas células na forma livre. A literatura científica ainda relata a co-encapsulação de alginato-quitosana com inulina, trazendo taxa de sucesso de até 27,7% de *L.*

rhamnosus GG em simulação da transição gastrointestinal (GANDOMI et al., 2016). O alginato de cálcio associado ao amido resistente também permite contagens significativamente superiores às células não encapsuladas, permanecendo dentro dos valores estipulados para alimentos probióticos (ZIAR; GERAR; RIAZI, 2012).

Comparando as células livres às microencapsuladas, os resultados desta pesquisa apresentaram um saldo positivo, sobretudo na espécie *L. casei* ATCC 334, uma vez que após os 240 minutos de teste, as bactérias que receberam proteção de alginato e quitosana foram contabilizadas a $8,22 \pm 0,08$ log UFC/mL, com quase 2 ciclos logarítmicos a mais que as células livres. Desde a contagem inicial (pré-teste) até a etapa final de simulação com suco intestinal, foi perdido um total médio de 4,61 logs de *L. casei* livres.

Zanjani et al. (2014) afirmam que a quitosana desempenha papel essencial no aumento da viabilidade de células probióticas. Em seu trabalho com *L. casei* ATCC 39392 e *Bifidobacterium bifidum* ATCC 29521, foi constatada diferença significativa entre os grupos livres e os encapsulados com alginato-amido-quitosana ao fim de 120 min de simulação gástrica e intestinal. O mesmo acontece com cápsulas de alginato-quitosana pelo método de *spray-drying*, que após 6h de simulação do trato gastrointestinal humano permaneceram em $8,04 \pm 0,03$ log, enquanto que as livres decresceram de $8,12 \pm 0,2$ para $6,66 \pm 0,13$ (IVANOVSKA et al., 2012).

7.4 ACEITABILIDADE DO SORVETE DE CAJÁ COM CÁPSULAS

A adição de 10% de cápsulas no sorvete de cajá não prejudicou sensorialmente a textura do sorvete, de modo que alguns provadores voluntários relataram não ter sentido a sua presença. Sorvetes de diferentes sabores e formulações, igualmente adicionados de microrganismos probióticos envoltos por cápsulas, também apresentaram boa aceitabilidade por parte dos consumidores (KRASAEKOOPT et al, 2008; KARTHIKEYAN et al., 2014; SONGTUMMIN; LEENANON, 2016), o que leva à conclusão de que a encapsulação não tem efeito negativo sobre a aceitabilidade do produto.

8 CONCLUSÕES

- A microencapsulação utilizando alginato-quitosana é eficiente e apresenta taxa de viabilidade das cepas probióticas escolhidas no estudo superior às livres, sobretudo de *L. casei*;
- As células de ambas as espécies foram eficientemente preservadas dentro das cápsulas, portanto, os sorvetes contendo as bactérias com esta proteção podem ser considerados alimentos com alegações funcionais;
- As cápsulas de alginato de cálcio revestidas de quitosana fornecem proteção contra as condições adversas do trato gastrointestinal;
- O sorvete de cajá contendo probióticos encapsulados com alginato de cálcio e quitosana tem boa aceitação pelos provadores, com probabilidade de compra entre a população estudada.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S. et al. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2210-2216, 2014.
- ABGHARI, A.; SHEIKH-ZEINODDIN, M; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 1, p. 84-92, 2011
- ABIS. Associação Brasileira das Indústrias e do Setor de Sorvetes. Produção e Consumo de Sorvetes no Brasil: Estatística. Disponível em: <http://www.abis.com.br/estatistica_producaoconsumodesorvetesnobrasil.html>. Consulta em: 05 outubro 2016.
- ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; CORTI, S. Effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG addition in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 58, n. 4. nov. 2005.
- AMINE, K.M. et al. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. **Food Control**, v. 37, p. 193-199. 2014.
- ANVISA. (Brasil). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho/2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 outubro 2016.
- AOKI, T. et al. Effects of the continuous intake of a milk drink containing *Lactobacillus casei* strain Shirota on abdominal symptoms, fecal microbiota, and metabolites in gastrectomized subjects. **Scandinavian Journal of Gastroenterology**, v. 49, p. 552–563. 2014.
- AYOKA, A.O.; AKOMOLAFE, R.O.; AKINSOMISOYE, O.S.; UKPONMWAN, O.E. Medicinal and Economic Value of *Spondias mombin*. **African Journal of Biomedical Research**, v. 11, p. 129-136. 2008.

BABOOTA, R.K. et al. Functional food ingredients for the management of obesity and associated co-morbidities – A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 997-1012. 2013.

BADARÓ, A. et al. Alimentos Probióticos: Aplicações Como Promotores da Saúde Humana. **Revista Digital de Nutrição**, v. 2, n. 3, ago/dez. 2008.

BARBOSA, I.C. et al. Potential of chitosan as an Acerola (*Malpighia glabra* L.) juice natural preservative. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v.4, n.8, p.929-942. 2015.

BARRETT, H. et al. Probiotics for preventing gestational diabetes. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 2. 2014.

BAŞYIĞIT, G. et al. Viability of human-derived probiotic lactobacilli in ice cream produced with sucrose and aspartame. **Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology**, v. 33, n. 9, p.796-800. 2006.

BERGER, L.R.R.; STAMFORD, T.C.M.; STAMFORD, N.P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Íbero-Americana de Polímeros**, v.12, n.4, p.195-215. 2012.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J.P.; HENRI-DUBERNET, S; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, p. 278-285. 2008.

BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science & Technology**, v.31, n.2, p.118-129. 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. **Alimentos regionais brasileiros**, Secretaria de Atenção à Saúde, Departamento de Atenção Básica. – 2. ed. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v.104, n. 4, p. 467–483. 2011.

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

BUTEL, M.J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n.1, p. 1-8. 2014.

CAI, S. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 295-300. 2014.

CARVALHO, J.M.; MAIA, G.A.; FONSECA, A.V.V.; SOUSA, P.H.M.; RODRIGUES, S. Effect of processing on physicochemical composition, bioactive compounds and enzymatic activity of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) tropical juice. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n.2, p. 1182–1187. 2013.

CAVALHEIRO, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; MENEZES, M.F.S.C.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 65-74. 2015.

CHAMPAGNE, C.P.; RAYMOND, Y.; GUERTIN, N.; BÉLANGER, G. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 109–117. 2015.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189. 2010.

CHEOW, W.S; KIEW, T.Y.; HADINOTO, K. Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 587–595. 2014.

CICHOSKI, A.J. et al. Efeito da adição de probióticos sobre as características de queijo prato com reduzido teor de gordura fabricado com fibras e lactato de potássio. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n.1, p. 214-219, jan.-mar. 2008.

COMAN, M.M. et al. Functional foods as carriers for SYN BIO®, a probiotic bacteria combination. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 3, p. 346-53. 2012.

COOK, M.T.; TZORTZIS, G., CHARALAMPOPOULOS D.; KHUTORYANSKIY, V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Control Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67. 2012.

CORBO, M.R. et al. Use of alginate beads as carriers for lactic acid bacteria in a structured system and preliminary validation in a meat product. **Meat Science**, v. 111, p. 198–203, 2016.

COSTA, G.N.; MIGLIORANZA, L.H.S. Probiotics: The Effects on Human Health and Current Prospects. In: RIGOBELLO, E.C. (Org.). **Probiotics**. InTech. 2012. cap.15.

CRUZ, A.G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 32, p. 1233–1239. 2009

DANG, Z.; WANG, Q.; DU, Y. Alginate/gelatin blend films and their properties for drug controlled release. **Journal of Membrane Science**, v.280, n. 1-2, p. 37-44. 2006.

DE KEERSMAECKER, S.C. et al. Strong antimicrobial activity of *Lactobacillus rhamnosus* GG against *Salmonella typhimurium* is due to accumulation of lactic acid. **Microbiology Letters**, p. 89-96. 2006.

DE MOURA OLIVEIRA, K.A.; SILVA, L.R; VIEIRA, O.G.; TEIXEIRA, R.V.M.C. Goat Milk Frozen Yogurt Cajá (*Spondias mombin* L.) Flavor: Development and Sensory Acceptance of an Exotic Food. **Current Nutrition & Food Science**, v. 12, n. 2, p. 105-112. 2016.

DELZENNE, N. et al. Targeting gut microbiota in obesity: effects of prebiotics and probiotics. **Nature Reviews Endocrinology**, v.7, p. 639-646. 2011.

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, set. 2016.

ELSABEE, M.Z.; ABDOL, E.S. Chitosan based edible films and coatings: A review. **Materials Science and Engineering**, n. 33, p. 1819–1841. 2013.

FAO/OMS. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk and live lactic acid bacteria. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. Expert Consultation Report. <<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/Probio.htm>>. 2001.

FAO/OMS. In guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization. Working Group Meeting Report, London, Canada. 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C.S. et al. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FOX, M.J.; AHUJA, K.DK.; ROBERTSON, I.K., BALL, M.J.; ERI, R.D. Can probiotic yogurt prevent diarrhoea in children on antibiotics? A double-blind, randomised, placebo-controlled study. **BMJ Open**, v. 5, n. 1. 2015.

FRAGOSO, M. et al. Sensory, melting and textural properties of fat-reduced ice cream inoculated with thermotolerant lactic acid bacteria. **Carpathian Journal Of Food Science And Technology**, v. 8, n. 2, p.11-21. 2016.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 365-371. 2016.

GARCÍA-CEJA, A.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 482-489, set. 2015.

GASPERINI, L. MANO, J.F, REIS, R.L. Natural polymers for the microencapsulation of cells. **Journal of Royal Society Interface**, v.11. 2014.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 149-163. 2012.

GOETZKE, B.; NITZKO, S.; SPILLER, A. Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health?. **Appetite**, v. 77, n. 1, p.96-105. 2014.

GONZÁLEZ-VÁZQUEZ, R.; AZAOLA-ESPINOSA, A.; MAYORGA-REYES, L. SHAH, N.P.; RIVERA-ESPINOZA, Y. **Probiotics & Antimicrobials Proteins**, v. 7, n. 4, p.242-248. 2015.

GU, J.; AHN-JARVIS, J.H.; RIEDL, K.M.; SCHWARTZ, S.J.; CLINTON, S.K.; VODOVOTZ, Y. Characterization of Black Raspberry Functional Food Products for Cancer Prevention Human Clinical Trials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 8, p. 3997–4006. 2014.

GUO, Z. et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 11, 844–850. 2011.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, n. 111, p. 50–55. 2008a.

HOMAYOUNI, A. et al. Factors influencing Probiotic survival in Ice Cream: a Review. **International Journal of Dairy Science**, v.7, p.1-10. 2012.

HOMAYOUNI, A. et al. Growth and survival of some probiotic strains in simulated ice cream conditions. **Journal of Applied Sciences**, v. 8, n. 2, p. 379-382. 2008b.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (IAL). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**, 1ª ed. Imprensa. São Paulo, 2008.

ISOLAURI, E. et al. Role of probiotics in reducing the risk of gestational diabetes. **Diabetes, Obesity and Metabolism**, v.17, n.8, p. 713–719. 2015.

IVANOVSKA, T.P. et al. Microencapsulation of Lactobacillus casei in chitosan-ca-alginate microparticles using spray-drying method. **Macedonian Journal of Chemistry and Chemical Engineering**, v. 21, n. 1, p. 115–123. 2012.

KARTHIKEYAN, N. ELANGO, A. GOPALAKRISHNAMURTY, T.R.; RAGHUNATH, B.V. Enhancement of probiotic viability in ice cream by microencapsulation. **International Journal of Science, Environment and Technology**, v. 3, n. 1, p. 339-347. 2014.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI B.; DEETH, H.C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, mar. 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v.13, n. 1, p. 3-13. 2003.

KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 761–766, jul. 2014.

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

KUMAR, R.; DAVID, J. Effect of Different Cultures on Quality of Probiotic Ice Cream. **The Allahabad Farmer**, v. 71, n. 2., p. 5-7. 2016.

LAGO, R.C.A; MAIA, M.L.L.; MATTA, V.M. O sabor das frutas tropicais no Brasil. Brasília, DF : Embrapa, 2016. 49 p.

LEE, K. et al. Probiotic bacteria, *B. longum* and *L. acidophilus* inhibit infection by rotavirus *in vitro* and decrease the duration of diarrhea in pediatric patients. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 39, n.2, p. 237-244. 2015.

LEE, N.K.; KIM, S.Y.; HAN, K.J.; EOM, S.J.; PAIK, H.D. Probiotic potential of *Lactobacillus* strains with anti-allergic effects from kimchi for yogurt starters. **LWT – Food and Technology**, v. 58, n.1. 2014.

LEROUX, M.A.; GUILAK, F.; SETTON, L.A. Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. **Journal of Biomedical Materials Research**, v. 47, n. 1. 1999.

LI, X.Y.; CHEN, X.G.; SUN, Z.W.; PARK, H.J.; CHA, D.S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, n. 4, p. 1479–1485. 2011.

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

LOLLO, P.C.B. et al. Hypertension parameters are attenuated by the continuous consumption of probiotic Minas cheese. **Food Research International**, v.76, n. 3, p.611-617. 2015.

LOTFIPOUR, F.; MIRZAEI, S.; MAGHSOODI, M. Evaluation of the effect of CaCl_2 and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of *Lactobacillus acidophilus* loaded alginate beads using response surface analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin**, v. 2, n.1, p. 71-78. 2012.

MA, Y.Y. et al, 2013. Effects of probiotics on nonalcoholic fatty liver disease: A meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology**, v.19, n.40, p. 6911–6918. 2013.

MALDONADO-ASTUDILLO, Y.I. et al. Postharvest physiology and technology of *Spondias purpurea* L. and *S. mombin* L. **Scientia Horticulturae**, v. 174, p. 193-206. 2014.

MARTINSEN, A.; SKJAK-BRAEK, G.; SMIDSRØD, O. Comparison of Different Methods for Determination of Molecular Weight and Molecular Weight Distribution of Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, p. 171-193. 1991.

MATIETTO, R.A.; LOPES, A.S.; MENEZES, H.C. Caracterização física e físico-química dos frutos da cajazeira (*Spondias mombin* L.) e de suas polpas obtidas por dois tipos de extrator. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 13, n. 3, p. 156-164, jul./set. 2010.

MATTÉ, G.M.; ROSA, S. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 5, p. 206-218. 2013.

MENEZES, C.R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309-1316. 2013.

MORAES, A.C.F. et al. Microbiota intestinal e risco cardiometabólico: mecanismos e modulação dietética. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, v.58, n. 4, jun. 2014.

MOURA NETO, L.G.; ROCHA, E.M.F.F.; RODRIGUES, S.; COSTA, J.M.C. physicochemical and sensory evaluation of yellow mombin (*Spondias mombin* L.) atomized powder. **Revista Caatinga**, v. 28, n. 4, dez. 2015.

NAG, A.; HAN, K.S.; SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 247-253. 2011

NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: a review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n.1, p. 1-15. 2012.

NIKAEIN, F.; ZARGARAN, A.; MEHDIZADEH, A. Rhazes' concepts and manuscripts on nutrition in treatment and health care. **Ancient Science of Life**, v. 31, n. 4, p. 160-163. 2012.

NOGUEIRA, J.C.R.; GONÇALVES, M.C.R. Probióticos – Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492. 2011.

OELSCHLAEGGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, n. 1, p. 57–62. 2010.

PAKDAMAN, M.N; UDANI, J.K.; MOLINA, J.P.; SHAHANI, M. The effects of the DDS-1 strain of *Lactobacillus* on symptomatic relief for lactose intolerance - a randomized, double-blind, placebo-controlled, crossover clinical trial. **Nutrition Journal**, v. 15, n. 56. 2016.

PITHVA, Sheetal et al. **Potential of probiotic *Lactobacillus* strains as food additives**. INTECH Open Access Publisher, 2012.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A.M.; REIS FILHO, A.D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RANADHEERA, C. et al. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food research international**, v. 49, n. 2, p. 619-625. 2012.

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381. 2013.

REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, 721-728. 2015.

RENHE, I.R.T.; WEISBERG, E.; PEREIRA D.B.C. Indústria de gelados comestíveis no Brasil. **Informe Agropecuário**, Belo Horizonte, v.36, n.284, p.81-86. 2015.

RYAN, P.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; CAPLICE, N.M.; STANTON, C. Functional food addressing heart health: do we have to target the gut microbiota? **Clinical Nutrition and Metabolic Care**, v. 18, n. 6, p. 566–571. 2015.

SACRAMENTO, C.K.; SOUZA, F.X. Cajá. In: SANTOS-CEREJO, J.A; DANTAS, J.L.; SAMPAIO, C.V.; COELHO, Y.S. Fruticultura tropical: espécies regionais e exóticas. 1ª ed. Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2009. 105 p.

SAGDIC, O.; OZTURK, I.; CANKURT, H.; TORNUK, F. Interaction Between Some Phenolic Compounds and Probiotic Bacterium in Functional Ice Cream Production. **Food Bioprocess Technology**, v. 5, p. 2964–2971. 2010.

SHARMA, D.; SAHARAN, B.S. Simultaneous Production of Biosurfactants and Bacteriocins by Probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014. 2014.

SHINDE, T.; SUN-WATERHOUSE, D.; BROOKS, J. Co-extrusion encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* alone or together with apple skin polyphenols: an aqueous and value-added delivery system using alginate. **Food and bioprocess technology**, v. 7, n. 6, p. 1581-1596. 2014.

SIDIRA, M. et al. Evaluation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 protective effect against spoilage of probiotic dry-fermented sausages. **Food Control**, v. 42, p. 315–320, ago. 2014.

SILVA, M. et al. Antimicrobial Substance from a Human *Lactobacillus* Strain. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 31, n.8, p. 1231-1233. 1987.

SILVA, N. et al. **Manual de Métodos de Análise Microbiológica de Alimentos**. 3. ed. São Paulo: Varela, 2007.

SILVA, M.J.S.; MOREIRA, I.S.; SULINO, R.; OLIVEIRA, M.N.; AUGUSTO, R.F. Elaboração e avaliação da qualidade sensorial e físico-química de geleia de cajá. **Revista Verde de Agroecologia e Desenvolvimento Sustentável**, v. 8, n. 3, p. 27-31, 2013.

SILVA, P.T et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**, v. 44, n. 7, jul. 2014a.

SILVA, G.A.; BRITO, N.J.N; SANTOS, E.C.G; LÓPEZ, J.A.; ALMEIDA, M.G. Gênero Spondias: aspectos botânicos, composição química e potencial farmacológico. **Journal of Biology & Pharmacy and Agricultural Management**, v.10, n. 1. 2014b.

SIMEONI, C.P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **REGET**, v. 18, p. 66-75. 2014. Edição Especial.

SLOVER, C.M.; DANZIGER, L. *Lactobacillus*: a Review. **Clinical Microbiology Newsletter**, v. 30, n. 4, p. 23-27. 2008.

SOCCOL, C.R. et al. Current Developments in Probiotics. **Microbial & Biochemical Technology**, v.7, n.1., p.11-20. 2014.

SOHAIL, A. et al. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.2, p.162-166. 2012.

SONG, D.; IBRAHIM, S.; HAYEK, S. Recent Application of Probiotics in Food and Agricultural Science. In: RIGOBELLO, Everlon Cid. (Org.). **Probiotics**: InTech. 2012. cap. 1.

SONGTUMMIN, S.; LEENANON, B. Survival of *Lactobacillus acidophilus* TISTR1338 and *Lactobacillus casei* TISTR390 in probiotic Gac ice cream. **International Food Research Journal**, v. 23, n. 2, p. 790-796. 2016.

SOUKOULIS, C.; FISK, I.D.; BOHN, T. Ice Cream as a Vehicle for Incorporating Health-Promoting Ingredients: Conceptualization and Overview of Quality and Storage Stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13. 2014.

SOUZA, B.G.; RAGUSA, C.; RENSIS, C.M.V.B.; COSTA, M.R.; SIVIERI, K. Viabilidade do *Lactobacillus casei* em sorvete caseiro. **Revista do Instituto de Laticínios “Cândido Tostes”**, v. 64, n. 370, pág. 35-38, set/out. 2009.

SRIAMORNSAKA, P.; NUNTHANIDA, J.; LUANGTANA-ANANA, M.; PUTTIPIATKHACHORNC, S. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: A preliminary study on the effect of additive in granulating liquid. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 67, n.1. 2007.

SRIAMORNSAKA, P.; NUNTHANIDA, J.; LUANGTANA-ANANA, M.; WEERAPOL, Y.; PUTTIPIATKHACHORNC, S. Alginate-based pellets prepared by extrusion/spheronization: Effect of the amount and type of sodium alginate and calcium salts. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n.1, p 227–235. 2008.

SZAJEWSKA, H.; KOŁODZIEJ, M. Systematic review with meta-analysis: *Lactobacillus rhamnosus* GG in the prevention of antibiotic-associated diarrhoea in children and adults. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.42, p. 1149–1157. 2015.

SZYMAŃSKI, H. et al. Colonisation of the gastrointestinal tract by probiotic *L. rhamnosus* strains in acute diarrhoea in children. **Digestive and Liver Disease**, v.38, n.2, p.274-176. 2006.

TEE, W. F. et al. Effects of encapsulation on the viability of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* exposed to high acidity condition and presence of bile salts. **Food Science and Technology International**, v. 20, n. 6, p. 399-404. 2014.

TENORE, G.C. et al. Annurca (*Malus pumila* Miller cv. Annurca) apple as a functional food for the contribution to a healthy balance of plasma cholesterol levels: results of a randomized clinical trial. **Journal of the Science of Food and Agriculture**. 2016.

TRIPATHI et al. Adhesion and Nanomechanics of Pili from the Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG. **ACS Nano**, v. 7, n. 4, p. 3685–3697. 2013.

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

VANDENPLAS, Y. et al. Probióticos e prebióticos na prevenção e no tratamento de doenças em lactentes e crianças. **Jornal de Pediatria**, v. 87, n.4. 2011.

WANG, Z.H. et al. Meta-Analysis of the Efficacy and Safety of *Lactobacillus*-containing and *Bifidobacterium*-containing Probiotic Compound Preparation in *Helicobacter pylori* Eradication Therapy. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 47, n. 1. 2013.

XU, M.; GAGNÉ-BOURQUE, F.; DUMONT, M.J.; JABAJI, S. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, v.168, p. 52–59. 2016.

YOUSSEF, K.M. et al. Rheological behavior and some quality parameters of date ice cream. **Journal of Agricultural and Veterinary Sciences**, v.6, n.2, p.149-160. 2013.

ZANJANI, M.A.K.; TARZI, B.G.; SHARIFAN, A.; MOHAMMADI, N. Microencapsulation of Probiotics by Calcium Alginate-gelatinized Starch with Chitosan Coating and Evaluation of Survival in Simulated Human Gastro-intestinal Condition. **Iranian Journal of Pharmaceutical Research**, v. 13, n. 3. 843–852. 2014.

ZHANG, M.M. et al. Meta-analysis of the efficacy of probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy. **World Journal of Gastroenterology**, v. 20, n. 47, p. 18013–18021. 2014.

ZIAR, H.; GÉRARD, P.; RIAZI, A. Calcium alginate-resistant starch mixed gel improved the survival of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis* Bb12 and *Lactobacillus rhamnosus* LBRE-LSAS in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 7, jul. 2012.

ZOU, Q. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, p. 1672-1678, 2011.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(PARA MAIORES DE 18 ANOS OU EMANCIPADOS - Resolução 466/12)

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar como voluntário(a) da pesquisa **VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* ENCAPSULADOS EM SORVETE DE CAJÁ**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Thaísa Gabriela Silva de Farias (Rua Prof. Antônio Coelho 190, Várzea, Recife; 81 99946-6224; thaisasfarias@gmail.com). A pesquisa está sob a orientação da Prof. Dra. Tânia Lucia Montenegro Stamford (tlmstamford@yahoo.com.br) e co-orientação da Prof. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud (thatianaarnaud@hotmail.com).

Após ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar a fazer parte do estudo, rubriche as folhas e assine ao final deste documento, que está em duas vias. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de recusa o (a) Sr. (a) não será penalizado (a) de forma alguma. O (a) Senhor (a) tem o direito de retirar o consentimento a qualquer tempo, sem qualquer penalidade.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA:

- Esta pesquisa consiste na adição dos probióticos (bactérias benéficas à saúde) *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* ao sorvete. O objetivo é verificar se a bactéria revestida com um material comestível (encapsulada) possui maior sobrevivência do que sem o revestimento. Através da análise sensorial poderá ser avaliada a aceitação e a intenção de compra deste novo produto.
- O participante será convidado a provar uma amostra de sorvete contendo os probióticos. Será necessária apenas uma única participação do voluntário no laboratório, em data e horário pré-estabelecido e em comum acordo entre este e os condutores da pesquisa.
- **Riscos:** O principal risco consiste em alergias que o participante possua a algum dos componentes da amostra. Por este motivo, indivíduos alérgicos a crustáceos (caranguejo, camarão ou lagosta) não devem participar da análise. Este risco será amenizado através de esclarecimento sobre as substâncias constituintes do sorvete e das cápsulas.
- **Benefícios:** Os participantes contribuirão para o desenvolvimento da pesquisa na área de probióticos e alimentos funcionais, sendo parte essencial para finalização deste trabalho, uma vez que sua opinião a respeito do produto refletirá a aceitação deste por um público maior. Além disso, o provador será beneficiado através do consumo de um alimento com efeitos positivos na sua saúde.
- Todas as informações desta pesquisa serão confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, não havendo identificação dos voluntários, a não ser entre os responsáveis pelo estudo, sendo assegurado o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa (formulários) ficarão armazenados em pastas de arquivos e no computador pessoal da pesquisadora responsável, pelo período mínimo de 5 anos.
- Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da

UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE). Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO VOLUNTÁRIO(A)

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura (ou a escuta da leitura) deste documento e de ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus casei* ENCAPSULADOS EM SORVETE DE CAJÁ**, como voluntário(a). Fui devidamente informado(a) e esclarecido(a) pelo(a) pesquisador(a) sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar o meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Recife, ____/ 01 / 2017

Assinatura do participante: _____

Presenciamos a solicitação de consentimento, esclarecimentos sobre a pesquisa e o aceite do voluntário em participar. (02 testemunhas não ligadas à equipe de pesquisadores)

Nome:	Nome:
Assinatura:	Assinatura:

APÊNDICE B – Formulário de Análise Sensorial

NOME: _____ **SEXO:** _____

IDADE: _____ **AMOSTRA:** _____ **DATA:** ____/01/2017

1. TESTE DE ACEITABILIDADE

Você está recebendo uma amostra de sorvete de cajá. Por favor, prove a amostra e avalie quanto a aparência, aroma, sabor, textura e a impressão geral/global, o quanto você gostou ou desgostou do produto:

- 9 gostei extremamente (adorei)
- 8 gostei muito
- 7 gostei moderadamente
- 6 gostei ligeiramente
- 5 nem gostei/nem desgostei
- 4 desgostei ligeiramente
- 3 desgostei moderadamente
- 2 desgostei muito
- 1 desgostei extremamente (detestei)

Aparência	()
Aroma	()
Sabor	()
Textura	()
Impressão global	()

2. TESTE DE INTENÇÃO DE COMPRA

Você recebeu uma amostra de sorvete. Por favor, avalie também a sua intenção de compra caso você encontrasse este produto à venda:

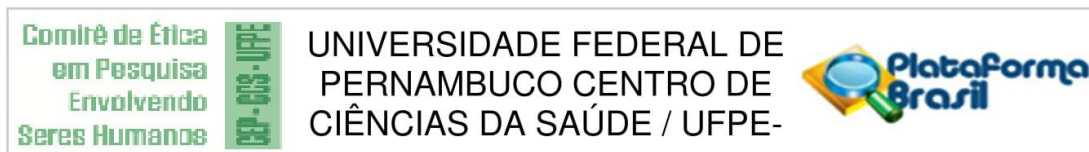
- 5 certamente compraria
- 4 provavelmente compraria
- 3 tenho dúvidas se compraria
- 2 provavelmente não compraria
- 1 certamente não compraria

Nota da Amostra	()
------------------------	--------

Comentários:

ANEXOS

ANEXO A – Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética do CCS/UFPE



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EFEITO DO ENCAPSULAMENTO NA VIABILIDADE DE *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* EM SORVETE

Pesquisador: THAÍSA GABRIELA SILVA DE FARIAS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51469315.0.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.401.798

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pesquisa do mestrado em alimentos da Pós-Graduação em Nutrição/UFPE, orientado pela Profª Tânia Lúcia Montenegro Stamford. O interesse crescente por uma vida mais saudável tem proporcionado o desenvolvimento da pesquisa e produção de alimentos que forneçam benefícios à saúde. Desta forma, os alimentos funcionais têm ganhado a atenção e a preferência do consumidor. Dentre os alimentos funcionais, existem os adicionados de probióticos, que são microrganismos vivos benéficos, que além de aumentarem o valor nutricional do alimento, proporcionam ao seu hospedeiro efeitos positivos na saúde, como redução do colesterol, melhora do trânsito intestinal e facilidade na digestão da lactose. O sorvete é uma sobremesa bem apreciada e aceita por todas as faixas etárias, tornando-se uma opção de inserção desses microrganismos na dieta. Todavia, o sorvete apresenta alto teor de oxigênio dissolvido, além da baixa temperatura de armazenamento, que podem comprometer a viabilidade dos probióticos nesse alimento. A técnica de microencapsulação oferece às células bacterianas proteção e isolamento das condições adversas do produto, além de aumentar sua sobrevivência em ambientes de condições extremas, como o trato gastrointestinal, que conta com enzimas digestivas e pH ora ácido, ora alcalino. P

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

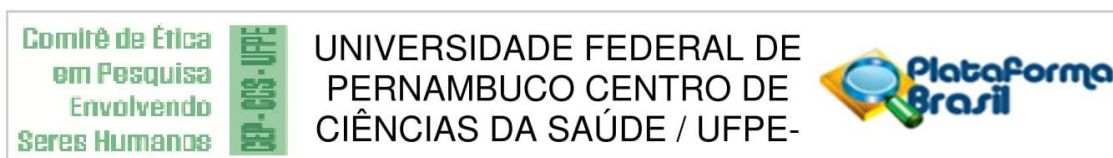
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.401.798

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Investigar o efeito da encapsulação com quitosana e alginato de cálcio na viabilidade do *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* ao longo da vida de prateleira do sorvete.

Objetivo Secundário:

Produzir e caracterizar as microcápsulas de quitosana e alginato de cálcio contendo *Lactobacillus rhamnosus* e *Bifidobacterium longum*; • Determinar e comparar a viabilidade das bactérias microencapsuladas e livres no sorvete; • Determinar e comparar qual espécie probiótica obteve melhor desempenho ao longo da vida de prateleira; • Verificar a capacidade de sobrevivência dos probióticos através de simulação de condições do trato gastrointestinal; • Analisar sensorialmente os atributos de qualidade para sorvetes durante o período de armazenamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Bem delineados no projeto e TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Aplicando a metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), será utilizada uma escala hedônica de nove pontos para o teste de aceitabilidade. Os voluntários julgarão os atributos de preferência global, aparência, aroma, sabor e textura através de uma pontuação (1 = desgostei extremamente; 9 = gostei extremamente). Também serão avaliados quão ideal está o teor de acidez e doçura dos sorvetes através de escala de 7 pontos (+3 = muito + ácida/doce que o ideal; -3 = muito - ácida/doce que o ideal).

Ainda será avaliada a intenção de compra, seguindo o protocolo da mesma instituição. Nesta etapa, será empregada a escala hedônica de cinco pontos (1 = certamente não compraria; 3 = talvez comprasse/talvez não comprasse; 5 = certamente compraria). Para esta análise será utilizado um painel de 120 provadores voluntários, estudantes e servidores ligados ao departamento de Nutrição da UFPE (Recife), acima de 18 anos de idade e saudáveis.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados em quantidade e qualidade, de acordo com as normas do CEP.

Recomendações:

Nenhuma.

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

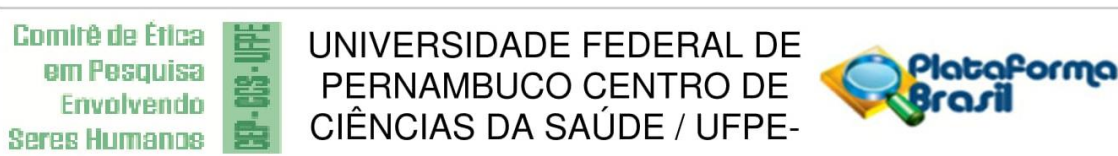
CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



Continuação do Parecer: 1.401.798

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Protocolo foi avaliado na reunião do CEP e está APROVADO para iniciar a coleta de dados. Informamos que a APROVAÇÃO DEFINITIVA do projeto só será dada após o envio do Relatório Final da pesquisa. O pesquisador deverá fazer o download do modelo de Relatório Final para enviá-lo via "Notificação", pela Plataforma Brasil. Siga as instruções do link "Para enviar Relatório Final", disponível no site do CEP/CCS/UFPE. Após apreciação desse relatório, o CEP emitirá novo Parecer Consubstanciado definitivo pelo sistema Plataforma Brasil.

Informamos, ainda, que o (a) pesquisador (a) deve desenvolver a pesquisa conforme delineada neste protocolo aprovado, exceto quando perceber risco ou dano não previsto ao voluntário participante (item V.3., da Resolução CNS/MS Nº 466/12).

Eventuais modificações nesta pesquisa devem ser solicitadas através de EMENDA ao projeto, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

Para projetos com mais de um ano de execução, é obrigatório que o pesquisador responsável pelo Protocolo de Pesquisa apresente a este Comitê de Ética relatórios parciais das atividades desenvolvidas no período de 12 meses a contar da data de sua aprovação (item X.1.3.b., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). O CEP/CCS/UFPE deve ser informado de todos os efeitos adversos ou fatos relevantes que alterem o curso normal do estudo (item V.5., da Resolução CNS/MS Nº 466/12). É papel do/a pesquisador/a assegurar todas as medidas imediatas e adequadas frente a evento adverso grave ocorrido (mesmo que tenha sido em outro centro) e ainda, enviar notificação à ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária, junto com seu posicionamento.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_609645.pdf	01/12/2015 11:28:11		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	EFEITO_DO_ENCAPSULAMENTO_NA_VIABILIDADE_DE_Lactobacillus_rhamnosus_e_Bifidobacterium_longum_EM_SORVETE.docx	01/12/2015 11:23:18	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DE
PERNAMBUCO CENTRO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-



Continuação do Parecer: 1.401.798

TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.docx	01/12/2015 11:18:26	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito
Outros	Lattes_Thaiza_Gabriela_Silva_de_Farias.docx	24/11/2015 12:29:49	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito
Outros	Lattes_Tania_Stamford.docx	24/11/2015 12:29:27	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito
Outros	Lattes_Thatiana_Montenegro_Stamford_Arnaud.docx	24/11/2015 12:28:47	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_Thaiza_Farias.pdf	24/11/2015 12:27:31	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_Thaiza_Farias.pdf	24/11/2015 12:25:33	THAISA GABRIELA SILVA DE FARIAS	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 03 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)

Endereço: Av. da Engenharia s/nº - 1º andar, sala 4, Prédio do CCS

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 50.740-600

UF: PE

Município: RECIFE

Telefone: (81)2126-8588

E-mail: cepccs@ufpe.br