

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

HAYANE FERREIRA LEITE LADISLAU

DESENVOLVIMENTO DE “IOGURTE” DE SOJA
SABOR ABACAXI ADICIONADO DE
Lactobacillus rhamnosus **COM E SEM INULINA**
ENCAPSULADOS EM MATRIZ ALGINATO/QUITOSANA

RECIFE-PE

2017

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

HAYANE FERREIRA LEITE LADISLAU

DESENVOLVIMENTO DE “IOGURTE” DE SOJA
SABOR ABACAXI ADICIONADO DE
***Lactobacillus rhamnosus* COM E SEM INULINA**
ENCAPSULADOS EM MATRIZ ALGINATO/QUITOSANA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, do Centro de Ciências de Saúde, da Universidade Federal de Pernambuco, para obtenção do título de Mestre em Nutrição.

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

L155d Ladislau, Hayane Ferreira Leite.
Desenvolvimento de "iogurte" de soja sabor abacaxi adicionado de
lactobacillus rhamnosus com e sem inulina encapsulados em matriz
alginato/quitosana / Hayane Ferreira Leite Ladislau. – 2017.
86 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lúcia 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. Prebióticos. 4.
Desenvolvimento tecnológico. I. Stamford, Tânia Lúcia Montenegro
(Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)

UFPE (CCS2017-102)

Hayane Ferreira Leite Ladislau

**DESENVOLVIMENTO DE “IOGURTE” DE SOJA SABOR ABACAXI ADICIONADO
DE *Lactobacillus rhamnosus* COM E SEM INULINA ENCAPSULADOS EM
MATRIZ ALGINATO/QUITOSANA**

Data: 23/02/2017

Banca examinadora:

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Profa. Dra. Celiane Gomes Maia da Silva

Profa. Dra. Margarida Angélica da Silva Vasconcelos

Recife

2017

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus, por mais um dia de vida, pela oportunidade de buscar pelos meus sonhos e de ser capaz de realizar este trabalho. Agradeço pela possibilidade de aprender e evoluir a cada dia.

Aos meus pais, por todo amor e conselhos, por acreditarem em mim e batalharem tanto para me proporcionar uma educação de qualidade. Toda gratidão do mundo aos meus heróis que muitas vezes sacrificaram seus sonhos pelos meus. Obrigada por me darem a oportunidade de estar onde estou hoje.

A Andressa, minha irmã-mãe e inspiração. Obrigada por cada conselho e puxão de orelha. Você faz parte do que sou e sei que sempre estará ao meu lado me dando forças e me mostrando o caminho.

Ao meu namorado, Fábio, que me apoiou nos momentos que mais precisei. Obrigada pela amizade e por sempre acreditar em mim. Obrigada por entender minha ausência nos finais de semana e aceitar meu mau humor nessa reta final.

A minha orientadora Tânia Stamford, por todo apoio e confiança. Serei eternamente grata pela oportunidade, por todo conhecimento e paciência a mim dedicados.

A minha Co-orientadora Thatiana Stamford Arnaud, por todo carinho, por ser uma pessoa tão generosa com seus conhecimentos. Uma das pessoas mais inteligentes que já conheci. Obrigada pela paciência e suas palavras de conforto.

A professora Thayza Stamford por toda dedicação à pesquisa, carinho e apoio.

A Thaísa Farias, minha amiga do laboratório. Você teve uma participação imensurável na realização desse trabalho. Obrigada pela enorme paciência e por toda a ajuda e seringas de 20 mL emprestadas. Te desejo todo sucesso do mundo, sei que você vai longe com toda sua dedicação e compromisso. Uma menina de ouro.

As amigas e companheiras do mestrado, Fábila, Raissa, Darlley, Anne e Juliana pelo apoio e ajuda para a finalização e formatação desse trabalho. Assim como Fábila, também acredito que esse grupo vai longe.

Aos técnicos e funcionários do LEAAL, por toda disponibilidade e ajuda nas análises necessárias para a conclusão deste trabalho. Em especial Camilo e Vivaldo, pela dedicação e paciência.

Ao CNPQ pela bolsa do mestrado, a qual foi muito importante para a viabilidade desta pesquisa.

RESUMO

Os inúmeros benefícios atribuídos ao consumo de probióticos têm gerado grande interesse da indústria alimentícia para o desenvolvimento de novos produtos. O “iogurte” de soja é uma excelente alternativa para a veiculação de células probióticas, devido ao seu alto valor nutricional e funcional. Entretanto, ainda existem problemas para a manutenção da viabilidade desses microrganismos nos alimentos. A encapsulação tem se mostrado uma técnica promissora para a proteção de probióticos e a adição de prebióticos, parece intensificar essa proteção. Desta forma, o objetivo do estudo foi desenvolver um “iogurte” de soja sabor abacaxi com adição de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulados com e sem inulina em matriz alginato quitosana. As cápsulas foram produzidas pelo método de extrusão, utilizando matriz alginato/quitosana com ou sem inulina e avaliadas quanto à eficiência de encapsulação (EE). O “iogurte” de soja foi elaborado com 39% de extrato hidrossolúvel de soja e 30% de geleia de abacaxi e teve sua composição nutricional detalhada. Os experimentos foram divididos em três grupos: iogurte com *L. rhamnosus* livres (Grupo L), com *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina (Grupo S) e com *L. rhamnosus* encapsulados com inulina (Grupo C). As amostras foram armazenadas a 4°C e analisadas semanalmente durante 28 dias através de avaliações físico-químicas: pH e acidez titulável (AOAC) e microbiológicas (enumeração de *L. rhamnosus* por diluição seriada). Foi realizada simulação gastrointestinal *in vitro*, a fim de avaliar a sobrevivência do probiótico. Após a encapsulação, foi verificada uma menor EE nas bactérias com inulina, apresentando um rendimento de 57,39%, enquanto que as bactérias sem inulina apresentaram um rendimento de 80,92% ($p < 0,05$). A composição centesimal do “iogurte” de soja foi de 24,9% para carboidratos, 5,31% para proteínas, 5,40% para lipídios, 1,54% para cinzas e 62,85% para umidade. As amostras de “iogurte” com adição de células encapsuladas com inulina apresentaram um menor decréscimo de pH e paralelamente uma menor concentração de ácido láctico ($p < 0,05$) no último dia de estocagem. No 28º dia de armazenamento, a contagem de *L. rhamnosus* experimentou um decréscimo de 3,42 e 1,99 ciclos logarítmicos nas amostras com células livres e encapsuladas sem inulina, respectivamente, enquanto que o microrganismo encapsulados com inulina apresentou um aumento de 1,26 ciclos logarítmicos ($p < 0,05$). Durante a simulação gastrointestinal, os três grupos reduziram significativamente a contagem de células e ao final do experimento apresentaram uma redução de 0,78, 1,55, e 1,95 ciclos logarítmicos, para as células encapsuladas sem inulina, livres e encapsuladas com inulina, respectivamente. Esses resultados sugerem que a matriz alginato/quitosana pode ser considerada adequada para a encapsulação de *L. rhamnosus*, assegurando a propriedade funcional do “iogurte” durante sua vida de prateleira, mas a presença de inulina não conferiu vantagens a cepa durante exposição ao trato gastrointestinal simulado.

Palavras-chave: Alimento Funcional. Probióticos. Prebióticos. Desenvolvimento tecnológico.

Abstract

The numerous benefits attributed to probiotics consumption have generated great interest of the food industry for development of new products. Soy yoghurt is an excellent alternative for delivery of probiotic cells because of its high nutritional and functional value. However, there are still problems to maintain the viability of these microorganisms in food. The encapsulation has shown to be a promising technique for probiotics protection and the addition of prebiotics, seems to intensify this effect. In this way, the objective of the study was to develop a yogurt of soybean pineapple flavored with addition of *Lactobacillus rhamnosus* encapsulated with and without inulin in matrix alginate chitosan. The capsules were produced by extrusion method using alginate/chitosan matrix with or without inulin and evaluated for encapsulation efficiency (EE). The soy yogurt was made with 39% soy water soluble extract and 30% pineapple jelly and had its nutritional composition detailed. The experiments were divided into three groups: yoghurt with free *L. rhamnosus* (Group L), with *L. rhamnosus* encapsulated without inulin (Group S) and with *L. rhamnosus* encapsulated with inulin (Group C). Samples were stored at 4 °C and analyzed weekly for 28 days by physico-chemical evaluations: pH and titratable acidity (AOAC) and microbiological (enumeration of *L. rhamnosus* by serial dilution). Gastrointestinal simulation was performed in vitro in order to evaluate the survival of the probiotic. After encapsulation, a lower EE was observed in the bacteria with inulin, presenting a yield of 57.39%, whereas the bacteria without inulin presented a yield of 80.92% ($p < 0.05$). Centesimal composition of soy yogurt was 24.9% for carbohydrates, 5.31% for proteins and 5.40% for lipids, 1.54% for ashes and 62.85% for humidity. Yoghurt samples with addition of encapsulated cells with inulin showed a lower pH decrease and a lower concentration of lactic acid ($p < 0.05$) on the last day of storage. At 28th day of storage, the *L. rhamnosus* count experienced a decrease of 3.42 and 1.99 log cycles in samples with free cells and encapsulated microorganisms without inulin, respectively, whereas the probiotic encapsulated with inulin showed an increase of 1.26 logarithmic cycles ($p < 0.05$). During the gastrointestinal simulation, all three groups significantly reduced cell counts and at the end of the experiment showed a reduction of 0.78, 1.55, and 1.95 log cycles for free, encapsulated and inulin-encapsulated cells, respectively. These results suggest that alginate/chitosan matrix may be considered adequate for the encapsulation of *L. rhamnosus*, ensuring the functional property of the yoghurt throughout its shelf life, but the presence of inulin did not confer advantages to the strain during exposure to the gastrointestinal simulation.

Keywords: Functional Foods. Probiotics. Prebiotics. Technological Development.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Página
Figura 1. Estrutura molecular da inulina	19
Figura 2. Estrutura molecular da quitosana	26
Figura 3. Fluxograma de produção de “iogurte” de soja	32
Tabela 1. Metodologias usadas nas análises físico-químicas para determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja	37
Tabela 2. Contagem de células viáveis (Média \pm Desvio padrão) antes e depois da encapsulação de <i>L. rhamnosus</i> sem e com inulina	42
Tabela 3. Composição centesimal de “iogurte” de soja	43
Tabela 4. Resultados dos parâmetros físico-químicos (Média \pm Desvio padrão) nos “iogurtes” contendo <i>L. rhamnosus</i> livres, encapsulados sem inulina e encapsulados com inulina durante armazenamento a 4°C	45
Tabela 5. Contagem de células viáveis (Média \pm Desvio padrão) e taxa de sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> livres, encapsulado sem inulina e encapsulados com inulina durante armazenamento refrigerado dos “iogurtes”	47
Tabela 6. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do <i>L. rhamnosus</i> livres, encapsulado sem inulina e encapsulados com inulina durante simulação gastrointestinal	49
Tabela 7. Médias das notas referentes à avaliação sensorial (numa hedônica de 1-9) e índice de aceitabilidade (em %) dos atributos avaliados no “iogurte” de soja com <i>L. rhamnosus</i> encapsulados sem inulina	50

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária

EE – Eficiência da Encapsulação

IA – Índice de aceitabilidade

IAL – Instituto Adolfo Lutz

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

SGS – Suco gástrico simulado

SIS – Suco intestinal simulado

AOAC - Official Methods of Analysis

UFC – Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1 APRESENTAÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1 Alimentos funcionais.....	15
2.1.1 Soja.....	15
2.1.2 Prebióticos	17
2.1.2.1 Inulina	18
2.1.3 Probióticos	20
2.2 Encapsulação	22
2.2.1 Alginato	25
2.2.2 Quitosana.....	26
2.3 Encapsulação com prebiótico	27
3 HIPÓTESE	30
4 OBJETIVOS	31
4.1 Objetivo geral	31
4.2 Objetivos específicos	31
5 MÉTODOS.....	32
5.1 Local e período do estudo	32
5.2 Materias	32
5.3 Produção do “iogurte” de soja sabor abacaxi.....	32
5.3.1 Elaboração da geleia de abacaxi.....	33
5.4 Cultivo e enumeração do <i>L. rhamnosus</i>.....	34
5.4.1 Preparo da cultura de <i>L. rhamnosus</i>.....	34
5.4.2 Enumeração do <i>L. rhamnosus</i>.....	34
5.5 Produção de cápsulas.....	34
5.5.1 Preparo da cultura de <i>L. rhmanosus</i> para encapsulação.....	34
5.5.2 Procedimento de encapsulação do <i>Lactobacilus rhamnosus</i>.....	35
5.5.2.1 Encapsulação de <i>Lactobacilus rhamnosus</i> com inulina.....	35
5.5.2.2 Encapsulação de <i>Lactobacilus rhamnosus</i> sem inulina.....	35
5.5.3 Revestimento das cápsulas de alginato com e sem inulina com quitosana.....	35
5.5.4 Enumeração das bactérias encapsuladas (EE).....	36
5.6 Adição de <i>L. rhamnosus</i> livres e encapsulados com e sem inulina no “iogurte” de soja sabor abacaxi.....	36

5.7 Determinação da composição centesimal do “iogurte” de soja sabor abacaxi.....	37
5.8 Caracterização físico-química e microbiológica do “iogurte” de soja durante armazenamento	38
5.8.1 Parâmetros físico-químicos.....	38
5.8.1.1 pH.....	38
5.8.1.2 Acidez titulável.....	38
5.8.2 Parâmetros microbiológicos.....	38
5.8.2.1 Análise do padrão microbiológico sanitário de “iogurte” de soja.....	38
5.8.2.2 Enumeração seletiva de <i>L. rhamnosus</i> livres ao longo da vida de prateleira de “iogurte” de soja.....	39
5.8.2.3 Enumeração seletiva de <i>L.rhamnosus</i> encapsulados ao longo da vida de prateleira de “iogurte” de soja.....	39
5.8.2.4 Avaliação da sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas durante vida de prateleira do “iogurte”.....	39
5.9 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	40
5.9.1 Fase gástrica	40
5.9.2 Fase intestinal	40
5.9.3 Avaliação da sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas após simulação gastrointestinal.....	41
5.10 Análise sensorial de “iogurte” de soja.....	41
5.11 Processamento estatístico	41
6 RESULTADOS	42
6.1 Eficiência de encapsulação (EE)	42
6.2 Determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja.....	43
6.3 Caracterização físico-química e microbiológica dos “iogurtes” de soja sabor abacaxi.....	44
6.3.1 Parâmetros físico-químicos.....	44
6.3.2 Parâmetros microbiológicos	46
6.4 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	48
6.5 Análise sensorial.....	50
7 DISCUSSÃO	51
7.1 Eficiência de encapsulação (EE).....	51
7.2 Determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja.....	52
7.3 Caracterização físico-química e microbiológica dos “iogurtes” de soja sabor abacaxi.....	53
7.3.1 Parâmetros físico-químicos.....	53
7.3.2 Parâmetros microbiológicos.....	55
7.4 Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	58

7.5 Análise sensorial.....	62
8 CONCLUSÃO	64
REFERÊNCIAS.....	65
APÊNDICES.....	79
Apêndice A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE).....	80
Apêndice B - Ficha da Análise Sensorial.....	81
ANEXOS.....	82
Anexo A - Aprovação da Pesquisa pelo Comitê de Ética do CCS/UFPE.....	83

1 APRESENTAÇÃO

Com o aumento na expectativa de vida, aliado ao acometimento crescente de doenças crônicas na população, o consumidor tem buscado cada vez mais produtos que além de propriedades nutricionais básicas ofereçam benefícios à sua saúde, fato que tem ocasionado um aumento no mercado de alimentos funcionais (KOLLING et al., 2014; TEIXEIRA, 2013).

O conceito de alimentos funcionais baseia-se em ingredientes que possuem componentes ativos que atuam controlando e/ou modulando funções metabólicas e fisiológicas no organismo, produzindo benefícios à saúde do consumidor (BRASIL, 1999). Nos últimos anos, esse conceito passou a concentrar-se de maneira mais intensiva nos probióticos e prebióticos (RIBEIRO, 2011).

Devido aos inúmeros benefícios à saúde, a indústria de alimentos tem despertado um interesse crescente no desenvolvimento de novos produtos com adição de probióticos. Entretanto, o emprego dessas bactérias ainda traduz um desafio tecnológico a ser contornado. Características inerentes aos produtos como acidez, oxigênio dissolvido, interações entre espécies, práticas de inoculação e condições de estocagem podem influenciar na sobrevivência dessas células nos alimentos (MENEZES et al., 2013). Além disso, sabe-se que para garantir a funcionalidade desses microrganismos, os mesmos devem ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e atingir áreas específicas no intestino do hospedeiro (BETORET et al., 2011).

Diante desse contexto, a encapsulação tem se mostrado uma técnica bastante promissora ao oferecer maior proteção às células probióticas durante processamento e estocagem do alimento, bem como durante passagem pelo trato gastrointestinal (KRASAEKOOPT et al, 2004; MANDAL et al, 2006; SHATYABAMA et al, 2014). A técnica consiste no revestimento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas com diâmetro que varia de poucos micrômetros a 1mm (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; MENEZES et al., 2013;PINTO, 2012).

Atualmente, com o objetivo de intensificar essa proteção, tem-se incorporado ingredientes prebióticos durante o processo de encapsulação (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014). Acredita-se que o mecanismo ligado aos benefícios dessa combinação esteja baseado no fornecimento de produtos da fermentação de

prebióticos e que são fontes para o crescimento de bactérias benéficas (SATHYABAMA et al., 2014), favorecendo a colonização de um maior número de cepas no intestino e proporcionando uma maior resistência aos microrganismos durante sua passagem pelo intestino (BADARÓ et al., 2008; RAJAM et al., 2015).

A inulina é um prebiótico que ao longo das últimas décadas tem sido bastante estudada por suas inúmeras aplicações e baixo custo. Quando empregada na encapsulação de probióticos, estudos têm demonstrado melhorar a estabilidade e a viabilidade de células probióticas, bem como a resistência a condições gastrointestinais simuladas (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NAZZARO et al., 2009; SATHYABAMA et al., 2014).

Os alimentos mais comumente elaborados com culturas probióticas são os derivados lácteos fermentados, como o iogurte. No entanto, esses alimentos podem não ser apropriados para nichos da população que apresentam alergias e/ou distúrbios alimentares pela ingestão de leite (KOLLING et al., 2014). Uma alternativa para a veiculação de probióticos é o desenvolvimento de produtos fermentados de origem vegetal. Nesse sentido, a soja destaca-se devido ao seu alto valor nutricional e às suas inúmeras propriedades benéficas à saúde humana. Esse grão de alto teor proteico, também é uma excelente fonte de minerais, vitaminas, ácidos graxos poliinsaturados e compostos bioativos, com destaque para as isoflavonas, conferindo à soja a denominação de alimento funcional (CARVALHO, 2014; PEIXOTO et al., 2011).

Portanto, considerando a tendência mais recente do mercado de alimentos funcionais e o desafio encontrado pela indústria alimentícia em assegurar a viabilidade de cepas probióticas em seus produtos, esse estudo propõe desenvolver um “iogurte” de soja sabor abacaxi com adição de *Lactobacillus rhamnosus* encapsulados com e sem inulina em matriz alginato/quitosana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Alimentos Funcionais

O conceito de alimentos funcionais foi, primeiramente, introduzido, no Japão, em meados dos anos 80 e se refere ao alimento processado ou não, que contém uma ou mais substâncias que auxiliam na saúde do consumidor (GALLINA et al., 2011). Atualmente, os alimentos funcionais representam uma das tendências mais recentes para o mercado de alimentos, pois, fatores ligados à urbanização, aumento da expectativa de vida e a incidência cada vez maior de doenças crônicas levam à maior preocupação do consumidor na escolha de alimentos capazes de desempenhar efeitos biológicos benéficos (KOLLING et al., 2014; TEIXEIRA, 2013).

A alegação de propriedade funcional está condicionada ao papel metabólico ou fisiológico que um nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções do organismo. Isso significa que estes alimentos podem auxiliar, por exemplo, na manutenção de níveis saudáveis de triglicerídeos e colesterol, na proteção contra os radicais livres, no funcionamento do intestino, desde que seu consumo esteja associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis (BRASIL, 1999; JAKSON et al., 2002).

A resolução 18 de 30/04/99 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária relata que “é alimento funcional todo aquele alimento ou ingrediente que, além das funções nutricionais básicas, quando consumido como parte da dieta usual, produza efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e/ou benefícios à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Entre os alimentos funcionais mais investigados, destacam-se os prebióticos, os probióticos, o tomate, a linhaça, a aveia, os óleos de peixe, as crucíferas (brócolis, couve-de-bruxelas, repolho) e a soja (RIBEIRO, 2011).

2.1.1 Soja

O Brasil está entre os principais produtores de soja. Grande parte desta produção destina-se à fabricação de óleo e derivados. Pesquisas vêm buscando a utilização da soja e de seus derivados, com o objetivo de obter alimentos enriquecidos, com alto valor proteico, boas características sensoriais e custos reduzidos, para atender principalmente as necessidades da população mais carente, com acentuada desnutrição proteica (TEXEIRA et al., 2016).

A soja é reconhecida como uma das mais antigas plantas cultivadas do planeta, mas somente nos últimos anos, os ocidentais passaram a considerá-la como alimento funcional (BRASIL, 2003). Esse grão pertence à família das leguminosas e é uma excelente fonte de minerais, como: cobre, ferro, fósforo, magnésio, potássio, manganês e vitaminas do complexo B. Além disso, se destaca por ser rica em proteínas, possui ácidos graxos poliinsaturados e compostos bioativos, como as saponinas, fitatos e isoflavonas (CARVALHO, 2014).

As isoflavonas são consideradas fitohormônios, pois possuem estrutura química semelhante ao estrogênio, e são juntamente com as proteínas, as que conferem à soja a denominação de alimento funcional, sendo as principais responsáveis pelo relevante valor terapêutico atribuído a essa leguminosa (CABRAL, 2009). As isoflavonas demonstram capacidade antiviral, anticarcinogênica, bactericida, antifúngica, antioxidante, anti-hipertensiva, antioxidante e antiinflamatória (KNIGHT & EDEN, 1996). Além disso, apresentam atividade diurética e efeitos protetores na formação de trombos e manutenção da reatividade vascular normal (SILVA, 2009). Segundo Jackson et al. (2002), o calor e alguns fatores como a fermentação podem alterar, significativamente, a distribuição de isoflavonas em alimentos à base de soja.

O sabor característico e acentuado da soja é considerado um dos maiores obstáculos do uso da soja como alimento, limitando sua aceitação pelos consumidores (NUNES et al., 2014). Enzimas lipoxigenases presentes nos grãos atuam sobre os ácidos graxos poliinsaturados contidos nas leguminosas, conferindo à soja e seus derivados sabor de ranço, remetendo ao sabor de feijão cru, causando rejeição pelos consumidores (BEHRENS; SILVA, 2004).

Como alternativa para melhorar a aceitabilidade da soja e seus derivados, a fermentação láctea tem sido considerada, pois durante o processo de fermentação as bactérias utilizam os açúcares típicos do grão da soja, como sacarose, estaquiose e rafinose, produzindo ácido láctico e compostos de aroma, tais como diacetil e acetaldeído, que conferem características sensoriais agradáveis ao produto (CARVALHO, 2014; PEIXOTO et al., 2011).

O processo de fermentação láctea em derivados de soja tem sugerido uma excelente oportunidade de mercado para o desenvolvimento de novos produtos, particularmente o “iogurte” de soja (KOLLING et al., 2014). O “iogurte” a base de extrato hidrossolúvel de soja é elaborado em vários países da Europa e do Oriente,

onde é considerado alimento popular, de grande digestibilidade, com bom aroma e paladar (SALADO; ANDRADE, 1989).

A produção de “iogurte” de soja vem atender aos novos hábitos de consumo da população mundial, visando acompanhar o crescimento do mercado de alimentos funcionais, tornando-se uma alternativa saudável, com um alto valor nutricional e funcional. Por ser um alimento de origem vegetal é isento de colesterol e não contém lactose, podendo ser consumido por pessoas com hipersensibilidade à lactose ou intolerantes à proteína do leite de vaca, vegetarianos e veganos (BRASIL, 2003; NUNES et al., 2014).

Além disso, os iogurtes e outros leites fermentados são considerados importantes veículos para a incorporação de culturas probióticas e ingredientes prebióticos, agregando maior valor nutricional ao alimento e, portanto, proporcionando maiores benefícios à saúde do consumidor.

2.1.2 Prebióticos

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o consumidor, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de bactérias probióticas da microbiota intestinal (GIBSON; ROBERFROID, 1995; GIBSON et al., 2004). Além disso, o prebiótico pode inibir a multiplicação de microrganismos patogênicos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro (SAAD, 2006).

Para um substrato dietético ser considerado prebiótico, ele deve ser enquadrado em alguns critérios como, não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado, deve ser seletivo para bactérias benéficas do cólon e a fermentação do substrato deve produzir efeitos sistêmicos benéficos para o hospedeiro (GIBSON et al., 2004).

Os efeitos positivos relacionados à ingestão de prebióticos devem-se principalmente à liberação de alguns metabólitos durante sua fermentação, em especial os ácidos graxos de cadeia curta (BROWN, 1996) que podem atuar sobre as células intestinais participando do controle da inflamação, carcinogênese e eliminação de compostos nitrogenados (MAESTRI et al., 2014). Podem também ter participação no alívio da constipação e na redução de infecções intestinais e do colesterol sérico (SAAD, 2006), além de potencializar a viabilidade e atividade

metabólica de microrganismos probióticos no trato gastrointestinal (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014).

Os prebióticos mais comumente empregados incluem a inulina, lactulose, isomalto-oligossacarídeos, oligossacarídeos da soja e fruto-oligossacarídeos (FOS). No entanto, a inulina está entre os prebióticos de maior aplicação nos alimentos (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010).

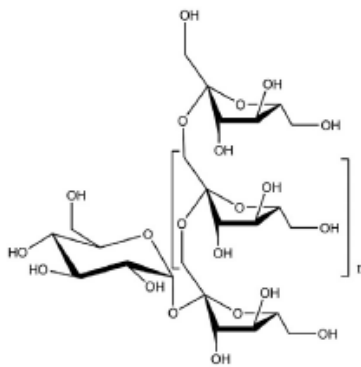
2.1.2.1 Inulina

A inulina é um carboidrato de reserva, solúvel em água que, dependendo do comprimento da cadeia, pode ser classificada como um oligo ou polissacarídeo (APOLINÁRIO et al., 2014). Estruturalmente, trata-se de um carboidrato polidisperso de cadeias lineares de frutose, ligadas entre si por ligações β 2-1, tornando-a indigerível para os seres humano (MAESTRI et al., 2014). Pode ser encontrada extensivamente em cerca de 36.000 espécies de plantas, entre as quais, a raiz de chicória e a alcachofra são as principais fontes (SHOAIB et al., 2016).

A extração de inulina das raízes da chicória consiste basicamente de três etapas: (1) extração de componentes solúveis em água, incluindo inulinas, (2) purificação das raízes de chicória para remover impurezas e opcionalmente inulinas de baixo grau de polimerização e (3) secagem por pulverização. Por vezes, o produto extraído é parcialmente hidrolisado para reduzir o grau de polimerização do produto final (APOLINÁRIO et al., 2014). A insulina extraída da raiz de chicória contém até 10% de açúcares (mono, di e oligossacarídeos pequenos) (COUSSEMENT, 1999).

O grau de polimerização da inulina é dependente da fonte da planta, do tempo de colheita e da duração e condições do armazenamento pós-colheita (RONKART et al., 2006). É importante salientar que a inulina de alto grau de polimerização (>10) fermenta o dobro que a fração de baixo grau de polimerização (<10). A inulina de cadeia mais longa tem o potencial de estimular a atividade metabólica na parte distal do cólon e assegurar a viabilidade dos probióticos dentro do intestino (CABRAL, 2009; PAK, 2006). A Figura 1 fornece uma visão geral da estrutura molecular da inulina.

Figura 1: Estrutura molecular da inulina.



Fonte: DE VOS et al. (2010)

A inulina é um oligo ou polissacarídeo único, porque sua cadeia central não incorpora qualquer anel de açúcar (BARCLAY et al., 2010), como pode ser visto na Fig.1. A cadeia central é essencialmente óxido de polietileno. Isso se traduz em uma maior liberdade de movimento e, portanto, mais flexibilidade da molécula (FLAMM et al., 2001).

Várias revisões foram publicadas sobre inulina, suas características e funcionalidade em alimentos (MADRIGAL & SANGRONIS, 2007; MENSINK et al., 2015; ROBERFROID, 2007; SHOAIB et al., 2016). Nos alimentos, é usada como substituto do açúcar e da gordura devido à viscosidade e capacidade de formação de gel, e como edulcorante, devido ao seu baixo valor calórico (APOLINÁRIO et al., 2014). Em produtos lácteos como queijo, leite, iogurte e sorvete é principalmente utilizada como prebiótico, devido a capacidade que os microrganismos colônicos possuem de quebrar suas ligações moleculares, tornando-a adequada para o ambiente intestinal (SHOAIB et al., 2016). Adicionalmente, a inulina tem mostrado exercer um efeito protetor para as bactérias ácido-láticas pela estimulação de sua sobrevivência e atividade durante estocagem do produto final (DONKOR et al., 2007).

A legislação brasileira confere à inulina a alegação de propriedade funcional pelo fato de contribuir para o equilíbrio da flora intestinal e produzir ação direta no organismo, estando associada com o aumento do tempo de esvaziamento gástrico, modulação de funções fisiológicas e estimulação seletiva da multiplicação de bactérias benéficas (probióticos) no cólon (BRASIL, 2008; SAAD et al., 2013).

2.1.3 Probióticos

Na classe dos alimentos funcionais, os produtos probióticos destacam-se devido ao enorme potencial e efeitos à saúde (CASEMIRO; RAMOS, 2014). Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro, devendo ser seguro para o consumo humano, sem a necessidade de supervisão médica (FAO/WHO, 2001; SANDERS, 2003). Um microrganismo é considerado probiótico se for habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e manter a viabilidade e atividade no intestino (COOK et al., 2012; FAO/WHO, 2002; FAO/WHO, 2006; SAAD, 2006).

Diversos microrganismos podem ser considerados potencialmente probióticos, bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente empregadas em alimentos (CHARTERIS et al., 1998; SAAD, 2006). A principal razão para essa escolha é o fato dessas bactérias serem habitantes predominantes do intestino humano, sendo *Bifidobacterium* do intestino grosso e *Lactobacillus* do intestino delgado (O'SULLIVAN, 2006; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Bactérias do gênero *Lactobacillus* contém grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, capazes de crescer em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C, e pH ótimo entre 5,5 e 6,2 (KANDLER; WEISS, 1986). Além disso, apresentam grande valor comercial, sendo introduzidas a uma vasta diversidade de alimentos, conferindo aroma, sabor, textura e ainda auxiliando na bioconservação dos alimentos pelo processo de fermentação (BURITI et al, 2007; LEE et al., 2015). Nesse gênero, as espécies mais utilizadas para fins de aditivo dietético são *L. acidophilus*, *L. casei* e *L. rhamnosus*.

A espécie *L. rhamnosus* é representada por cepas heterofermentativas, facultativas, que fermentam hexoses como a lactose e a frutose em ácido láctico, e também pentoses em uma mistura de ácido láctico e ácido acético (HAMMES; VOGEL, 1995). Como bactéria ácido-láctica, co-metaboliza o citrato para compostos de quatro carbonos, tal como diacetil, acetoína e butano - 2,3 - diol, que possuem propriedades aromáticas e transmitem o aroma típico para muitos produtos lácteos (HELLAND; WICKLUND; NARVHUS, 2004). Essa espécie pode ser considerada um probiótico, pois atende aos pré-requisitos de segurança para o uso em humanos,

pois não é patogênica, não apresenta toxicidade, resiste a antimicrobianos e sua origem é o trato gastrointestinal de humanos saudáveis (FULLER, 1989).

Os benefícios à saúde atribuídos à ingestão dos probióticos têm sido evidenciados em estudos para sua aplicação em humanos, como regulação do trânsito e peristaltismo intestinal (MATSUMOROTO et al., 2012), estímulo à proliferação de bactérias benéficas e aumento da resistência contra microrganismos patogênicos (CANDELA et al., 2008; MENEZES et al., 2013), favorecendo a regulação da imunidade local e sistêmica (MAZMANIAN et al., 2005).

Além disso, podem atuar ajudando no processo digestivo, na digestão da lactose e na absorção de minerais importantes, como cálcio e o ferro, e na síntese de metabólitos úteis, como as vitaminas (MENEZES et al., 2013). Adicionalmente, podem participar da decomposição de sais biliares e na diminuição das concentrações de colesterol plasmático. Cabe destacar, ainda, que essa microbiota estimula a atividade antitumorogênica pela neutralização de agentes cancerígenos e inibição da mutagenicidade (COOK et al., 2012; FERNANDEZ; BENTO, 2008; HILL et al., 2014; KUMAR et al., 2013; SAAD, 2013).

Os inúmeros benefícios atribuídos aos probióticos têm gerado grande interesse das indústrias alimentícias, uma vez que representam um forte nicho entre os alimentos funcionais, e muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de incorporar estes microrganismos aos alimentos (ALMEIDA, et al., 2016; ARGENTA et al., 2016; NAZZARO et al., 2009; RIBEIRO, 2011; STANTON et al., 2001; PREZZI, 2014).

Para exercerem efeitos positivos, os microrganismos adicionados em produtos alimentares devem atender alguns requisitos, incluindo a sua sobrevivência, atividade e estabilidade durante toda vida de prateleira do produto (HELLER, 2001). É requisito básico que os alimentos com alegação de propriedades funcionais pela adição de probióticos apresentem pelo menos 10^6 a 10^7 UFC de bactérias viáveis por grama de produto pronto para o consumo (FAO/OMS, 2001; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; SAAD, 2006;). No Brasil a legislação regulamenta que a quantidade mínima de células probióticas viáveis deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC por porção diária (100g) do produto (BRASIL, 2008).

No entanto, as cepas probióticas são muito sensíveis às condições ambientais com redução da viabilidade quando adicionadas em alimentos (COOK et al., 2012). A sobrevivência de bactérias probióticas incorporadas em alimentos

depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre eles as cepas utilizadas, interação entre as espécies presentes, condições da cultura, composição química do meio de fermentação, acidez final do produto, disponibilidade de nutrientes, presença de promotores e inibidores de crescimento, oxigênio dissolvido, nível e temperatura de inoculação e temperatura de estocagem (CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997; SHAH, 2007).

Outro fator que pode ocasionar uma perda na viabilidade dos microrganismos probióticos após sua ingestão é o trato gastrointestinal, onde estes devem resistir ao suco gástrico, à bile e à secreção pancreática mantendo-se viáveis para colonizar o intestino e promover seu efeito benéfico (DEL PIANO et al., 2006).

Diante disso, a indústria de alimentos vem investigando novas estratégias para a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas, dentre elas, a seleção de estirpes resistentes, a adição de prebióticos que atuam estimulando seletivamente a atividade de algumas bactérias do cólon e a utilização de tecnologias, como a encapsulação, que tem sido sugerida como uma técnica promissora para a proteção dos probióticos (BABU; NITHYALAKSHMI, 2011; GON, 2014; HOLZAPFEL, 2011; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; RIBEIRO, 2011; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

2.2 Encapsulação

A encapsulação consiste em um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE et al., 2008). Essas cápsulas podem apresentar tamanhos na faixa de microns até vários milímetros, dependendo dos materiais e das técnicas empregadas na sua elaboração (MENEZES et al., 2013). O material externo é denominado agente encapsulante e o ingrediente interno é o material ativo (FRITZEN-FREIRE et al., 2013).

Existe uma gama de aplicações atribuídas à técnica de encapsulação, incluindo possibilidade de fazer um líquido se comportar como sólido, separar materiais reativos, reduzir a toxicidade do material ativo, reduzir volatilidade de líquidos e controlar a liberação do material ativo (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; MIRZAEI et al., 2012).

A liberação do material ativo encapsulado varia de acordo com a natureza do agente encapsulante e pode ocorrer por mecanismos de variação de temperatura e pH, ruptura mecânica, dissolução em solventes, ação de força osmótica, ação de enzimas, difusão e permeabilidade seletiva (GOUIN, 2004).

Na indústria de alimentos, a encapsulação pode ser utilizada para diversas finalidades, como estabilização do material encapsulado, controle de reações oxidativas, para mascarar sabores, cores ou odores indesejáveis, prolongar a vida de prateleira e proteger compostos nutricionais (MENEZES et al., 2013). Além disso, pode ser considerada uma ferramenta ímpar na proteção de bactérias probióticas adicionadas em alimentos (KRASAEKOOPT et al., 2003; SHATYABAMA et al., 2014).

A encapsulação de culturas probióticas têm sido realizada com o objetivo de proteger as células bacterianas contra danos causados pelo ambiente externo (DING; SHAH, 2009), auxiliando na resistência do microrganismo ao processamento do alimento, baixas temperaturas de armazenagem, presença de oxigênio, acidez, tempo de estocagem e condições do trato gastrointestinal. Adicionalmente, a encapsulação de probióticos confere fácil manuseio e estocagem com efeitos limitados nas propriedades sensoriais do alimento, o que é tecnologicamente desejável, além de possibilitar a liberação do microrganismo em seu sítio de ação (BABU; NITHYALAKSHMI; 2011; HOMAYOUNI et al., 2008; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NAZZARO et al., 2009).

Existem diferentes técnicas para a encapsulação de probióticos, sendo que a escolha do método ideal é dependente da aplicação que será dada à cápsula, do tamanho desejado das partículas, do mecanismo de liberação e das propriedades biológicas e físico-químicas, da cultura e do agente encapsulante (COOK et al., 2012; FAVARO-TRINDADE et al., 2008; JAKSON & LEE, 1991).

Entre as técnicas utilizadas para a encapsulação aplicada em bactérias probióticas, estão as técnicas de: Spray-drying (ou atomização) e coacervação (ou técnica de separação de fases) em que geralmente são utilizados polímeros solúveis em água como material de revestimento; o método eletrostático, que utiliza como material encapsulante polímeros e outros compostos com cargas opostas; e a técnica de extrusão, que utiliza como revestimento da cápsula polímeros solúveis e insolúveis em água (SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2009).

Durante o processo de extrusão, os microrganismos são misturados em uma solução hidrocoloidal, sendo esta depois pulverizada na forma de gotículas em uma solução de endurecimento do hidrocolóide, normalmente o cloreto de cálcio. O polímero mais utilizado nesse método é o alginato de sódio, que reage com cloreto de cálcio ocorrendo a formação de alginato de cálcio, substância insolúvel em água (TRINDADE; GROSSO, 2002).

Diversos trabalhos têm evidenciado a aplicação da microencapsulação em culturas probióticas. Ribeiro (2011) avaliou o efeito da microencapsulação de *L. rhamnosus* adicionados em iogurte. As técnicas utilizadas para a microencapsulação do microrganismo foi gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se pectina e proteína de soro como materiais de parede. O *L. rhamnosus* adicionado na forma microencapsulada em iogurte apresentou maior sobrevivência após 35 dias de armazenamento do produto quando comparado com a forma livre. Na forma livre, a população de células viáveis de *L. rhamnosus* reduziu 0,98 ciclos logarítmicos, enquanto na forma encapsulada essa redução foi de 0,20 ciclos logarítmicos.

Gon (2014) verificou que a microencapsulação de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *Streptococcus thermophilus* utilizando-se albumina e colágeno como materiais de parede, conferiu proteção aos microrganismos probióticos mantendo-os viáveis durante todo o armazenamento do produto (frozen yogurt) a -18°C. Verificou-se também que o frozen yogurt adicionados de probióticos microencapsulados possuiu uma contagem de bactérias mais alta que o produto com adição dos microrganismos na forma livre.

Os resultados desses estudos indicam que a microencapsulação pode proteger os microrganismos probióticos de condições adversas, mantendo maior estabilidade durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (KRASAEKOOPT et al., 2003).

A escolha do agente encapsulante, por sua vez, depende da presença de algumas características desejáveis como, boa capacidade emulsificante, capacidade de formação de filme, baixa higroscopicidade, baixa viscosidade, ser de fácil manipulação durante o processo, não ser reativo com o composto a ser encapsulado, além de boa estabilidade e ausência de sabores desagradáveis (JACKSON; LEE, 1991) e, principalmente, proteger o ativo quanto às condições adversas (luz, pH, oxigênio, calor e outros compostos presentes). Além disso, deve ser capaz de resistir a condições ácidas do estômago, permitindo que os

ingredientes ativos possam atravessar o estômago de maneira intacta (CHAMPAGNE et al., 2011).

Os materiais mais empregados são proteínas animais como, por exemplo, proteínas do leite e gelatina, e os polissacarídeos originados de plantas (amidos e goma-arábica), ou de bactérias (goma xantana) e de algas marinhas (k-carragena e alginato) (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

2.2.1 Alginato

O alginato de cálcio é considerado um dos polímeros com maior potencial para aplicação na encapsulação de probióticos, devido à capacidade de formar uma matriz altamente versátil, biocompatível e isenta de toxicidade (KRASAEKOOPT et al., 2006). A facilidade de solubilização do gel de alginato e de liberação das células aprisionadas no intestino humano são benefícios adicionais (NAZARRO et al., 2009).

Trata-se de um polímero extraído de algas marrons e pertence a uma família de polissacarídeos lineares não ramificados, constituído por duas unidades monoméricas, o ácido β -D-Maurônico e ácido α -L-Gulurônico, ligados de forma linear por ligações glicosídicas $\alpha(1,4)$ (COTRELL; KOVACS, 1980; ETCHEPARE et al., 2014).

O método convencional de encapsulação com o alginato de cálcio é a técnica de extrusão. O processo é instantâneo e acontece quando uma solução de alginato de sódio na presença de cátions multivalentes como o cálcio, precipita, formando alginato de cálcio, com posterior gelificação gradual (KRASAEKOOPT et al, 2003; MENEZES et al., 2013). O tamanho das cápsulas resultantes pode decorrer da viscosidade da solução de alginato, do diâmetro do orifício que injeta o alginato de sódio na solução contendo cálcio e da distância entre a saída da solução de alginato de sódio e a solução geleificante (SOHAIL et al., 2011).

Estudos demonstram que a encapsulação com alginato de cálcio protege de maneira efetiva culturas celulares pelo aumento da sobrevivência dos microrganismos em diferentes condições de estocagem quando comparados às formas não encapsuladas (ABBASZADEH et al., 2014; KRASAEKOOPT et al., 2003; LIMA et al., 2014; SULTANA et al, 2000). Além disso, a matriz alginato já foi previamente testada em melhorar a viabilidade de bactérias probióticas encapsuladas quando expostas as condições gástricas simuladas (DING e SHAH, 2009; KRASAEKOOPT et al., 2003).

No entanto, o gel de alginato de cálcio pode apresentar algumas limitações, como ser susceptível à desintegração na presença de excesso de agentes quelantes de cálcio e ao ambiente químico severo, como o pH muito baixo, além de apresentar tendência em formar cápsulas com muita porosidade, o que permite fácil e rápida difusão de água e outros fluidos dentro e fora da cápsula (SOHAIL et al., 2011).

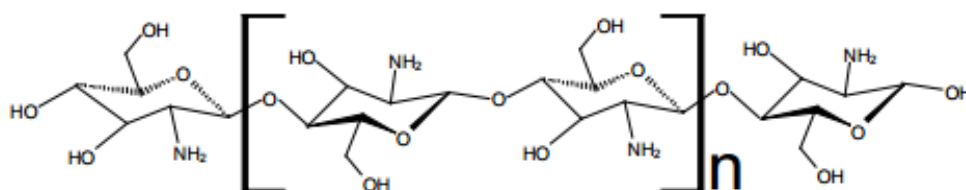
Visando minimizar esses entraves, atualmente estão sendo desenvolvidas tecnologias mais apuradas com sistemas mistos de matrizes poliméricas que permitem um encapsulamento mais eficiente, incluindo o recobrimento de cápsulas com outros polímeros, como a quitosana (ABBASZADEH et al., 2013).

2.2.2 Quitosana

A quitosana é um aminopolissacarídeo natural, biodegradável, atóxico, hidrofóbico e biocompatível. Pode ser encontrada na parede de microrganismos, especialmente nas espécies *Mucor*, mas é proveniente, principalmente, da desacetilação da quitina, um dos polímeros mais abundantes da natureza e disponível em grande quantidade na indústria pesqueira, na forma de resíduos oriundos das cascas de crustáceos (DAMIAN et al., 2005; MATTÉ; ROSA, 2013).

Sua estrutura química é formada por monômeros de D-glicosamina e resíduos de N-acetil-D-glicosamina, ligados por pontes glicosídicas β -(1 \rightarrow 4) (COUTO; HONG; MANO, 2009).

Figura 2. Estrutura molecular da quitosana.



Fonte: WU, LIN e YAO, 2014.

É um biopolímero cujo grau de desacetilação, massa molar e conteúdo de impurezas dependem das fontes naturais da matéria-prima e dos métodos de preparação (MATTÉ; ROSA, 2013). Pode ser facilmente dissolvido em soluções ácidas em função da protonação dos seus grupos amínicos livres, característicos da quitosana *in natura* (LARANJEIRA; FÁVERO, 2009).

O uso da quitosana e seus derivados na indústria agroindustrial e de alimentos envolve o revestimento de sementes, a proteção de alimentos devido à sua característica antimicrobiana, a formação de biofilmes, clarificação de sucos de frutas e, também, como suplemento alimentar para a redução de peso e do colesterol em seres humanos (FILHO et al., 2007). A quitosana também tem se destacado como um excelente agente de revestimento na encapsulação de probióticos (BARBOSA et al., 2015; MATTÉ; ROSA, 2013).

Em cápsulas constituídas por matriz alginato de cálcio, o revestimento com quitosana tem sido aplicado visando melhorar a estabilidade das esferas quando expostas a condições severamente ácidas (CHAVARRI et al, 2010). Acredita-se que esse polímero é capaz de formar um forte complexo com o alginato de cálcio, tornando-o estável na presença de pH baixo e agentes quelantes de cálcio, além de reduzir a porosidade do gel de alginato e a degradação da matriz (SMIDSRØD; SKJAK-BREAK, 1990). Assim, o revestimento com quitosana parece aumentar a estabilidade química e mecânica de cápsulas, aumentando a eficácia da encapsulação (KRASAEKHOOP et al., 2004).

Koo et al. (2001) e Chavarri et al. (2010) reportaram que cepas probióticas microencapsuladas em matriz alginato e quitosana apresentaram maior estabilidade que a forma livre (não encapsulada). Brinques & Ayub (2011) avaliaram a viabilidade de *L. plantarum* BL011 livre e encapsulado durante o armazenamento refrigerado. A técnica de emulsão foi utilizada na microencapsulação do microrganismo aplicando-se diferentes materiais de parede e de recobrimento. Após 38 dias de armazenamento observou-se uma menor perda de viabilidade do microrganismo quando microencapsulado com pectina ou alginato recoberto com quitosana.

2.3 Encapsulação com prebióticos

A incorporação de substratos prebióticos durante o processo de microencapsulação de células probióticas baseia-se na criação de um potencial sinérgico pela combinação dos componentes nas cápsulas, promovendo maior viabilidade as cepas probióticas durante o processamento e armazenamento dos alimentos, bem como durante implantação no trato gastrointestinal (KRASAEKHOOP; WATCHARAPOKA, 2014).

Embora a técnica de encapsulação tenha demonstrado efeitos positivos na sobrevivência de probióticos, há uma série de fatores, como a complexidade do

sistema digestivo e estresse do ambiente de armazenamento do produto que podem reduzir o número de células viáveis no alimento e no intestino grosso (MENEZES et al., 2013). Num esforço para ampliar a proteção às culturas probióticas, tem-se sugerido a adição de ingredientes alimentares não digeríveis conhecidos como prebióticos nas cápsulas (CHÁVARRI et al., 2010).

A combinação de prebióticos e probióticos, conhecida como simbiose (GIBSON; ROBERFROID, 1995; NAZARRO et al., 2010), tem demonstrado melhorar a proliferação das cepas no intestino (LIMA et al., 2014). Um estudo pioneiro conduzido por Sathyabama et al. (2014) demonstrou que cepas de *Staphylococcus succinus* e *Enterococcus fecium* quando encapsuladas com prebióticos extraídos da beterraba e chicória apresentaram maior tolerância ao ambiente ácido e biliar simulados, e melhor sobrevivência durante estocagem refrigerada a 4°C por 35 dias quando comparadas as formas livres.

Acredita-se que o mecanismo ligado aos benefícios da associação de ingredientes probióticos e prebióticos esteja baseado no fornecimento de carbono e nitrogênio, produzidos durante a fermentação dos prebióticos e que são fontes para o crescimento dos microrganismos, favorecendo a colonização de um maior número de bactérias probióticas no intestino, onde estes organismos podem crescer e proporcionar os benefícios à saúde do hospedeiro (BADARÓ et al., 2008; RAJAM et al., 2015). Além disso, as interações que ocorrem entre prebióticos e probióticos podem ser favorecidas devido à adaptação do microrganismo ao substrato, resultando em uma vantagem competitiva para a célula probiótica (YONEKURA et al., 2013).

Chen et al. (2005) estudaram a encapsulação de diferentes probióticos utilizando prebióticos (FOS e isomalto-oligossacarídeos), um peptídeo, e alginato como agentes encapsulantes e verificaram que o emprego de 1% de alginato, 1% de peptídeo e 3% de FOS resultou em uma maior sobrevivência dos microrganismos. Além disso, os resultados demonstraram que a adição de prebióticos às cápsulas de alginato forneceu maior proteção às bactérias durante estocagem.

Fritzen-Freire et al. (2012) avaliaram o efeito da adição de prebióticos (inulina, oligofrutose e inulina enriquecida com oligofrutose) na viabilidade de *Bifidobacterium BB-12* encapsulada pela técnica de *spray drying* em matriz constituída por leite desnatado reconstituído (LDR), durante 180 dias de estocagem. Foi observado que a adição de oligofrutose enriquecida com inulina aumentou a contagem inicial de

bifidobactérias nas microcápsulas e que as microcápsulas produzidas com oligofrutose e inulina enriquecida com oligofrutose ofereceram melhor proteção para as bactérias durante estocagem.

Pinto (2012) produziu amostras de frozen iogurte com adição de microcápsulas de *Bifidobacterium BB-12* e diferentes agentes encapsulantes (LDR e inulina) e avaliou a viabilidade da cultura probiótica durante 90 dias de estocagem do produto. A contagem de bifidobactérias manteve-se praticamente estável nas amostras adicionadas das microcápsulas, enquanto que o frozen iogurte com bactéria livre apresentou um decréscimo em torno de 34% após 90 dias.

Outros estudos também concluíram que a microencapsulação de culturas probióticas com substâncias prebióticas é capaz de promover maior resistência aos microrganismos encapsulados em sistema digestivo simulado, bem como maior sobrevivência durante armazenamento dos produtos, resultando em um maior número de células viáveis quando comparadas as bactérias encapsuladas sem adição de prebiótico (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NAZZARO et al., 2009).

3 HIPÓTESE

A encapsulação de *Lactobacillus rhamnous* com inulina em matriz alginato/quitosana promove maior proteção às bactérias em “iogurte” de soja sabor abacaxi.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo geral

Desenvolver um “iogurte” de soja sabor abacaxi com adição de *Lactobacillus rhamnosus* com e sem inulina encapsulados em matriz alginato/quitosana.

4.2 Objetivos específicos

- Caracterizar o “iogurte” de soja sabor abacaxi com adição de *L. rhamnosus* livres e encapsulados com ou sem inulina quanto às características físico-químicas e microbiológicas;
- Determinar a composição centesimal da formulação de “iogurte” de soja sabor abacaxi que obteve melhores resultados nas análises.;
- Determinar a viabilidade do *L. rhamnosus* livres e encapsulados (com e sem inulina) durante armazenamento refrigerado;
- Avaliar a sobrevivência do *L. rhamnosus* livres e encapsulados (com e sem inulina) simulando condições gastrointestinais in vitro;
- Verificar a aceitação sensorial e a intenção de compra do “iogurte” de soja sabor abacaxi que apresentou melhor desempenho durante a simulação gastrointestinal.

5 MÉTODOS

5.1 Local e período do estudo

O presente estudo foi realizado no Laboratório de Experimentação e Análises de Alimentos (LEAAL) do Departamento de Nutrição da UFPE no período de novembro de 2015 a dezembro de 2016.

Os experimentos foram iniciados somente após a aprovação pelo Comitê de Ética do Centro de Ciências da Saúde (UFPE) sob o registro CAAE: 51473115.7.0000.5208.

5.2 Materiais

A cultura probiótica liofilizada de *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 foi obtida da Roval (Recife, PE, Brasil). Alginato de sódio proveniente de algas marrons, de média viscosidade foi adquirido da Isofar. Quitosana de origem fúngica (*Aspergillus niger*) e baixo peso molecular foi gentilmente cedida pela Kitozyme S. A. (Herstal, Belgium). A inulina, o fermento lácteo (Bio Rich) composto pelos microrganismos *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus* LA-5 e *Bifidobacterium* BB-12 e o extrato hidrossolúvel de soja (SupraSoy) foram obtidos em comércio local.

5.3 Produção do “iogurte” de soja sabor abacaxi

O extrato hidrossolúvel de soja em pó (marca SupraSoy) foi homogeneizado com água previamente esterilizada a 121°C por 15 minutos na concentração de 39% (m/v), em liquidificador, durante 5 minutos. O homogeneizado foi transferido para um recipiente de vidro estéril tampado e colocado em autoclave, sob vapor fluente, durante 20 minutos.

A mistura foi resfriada até temperatura de 42°C, em seguida foi adicionado o fermento lácteo em 1000 mL de solução de extrato hidrossolúvel de soja na concentração de 40% (400mg/1000ml).

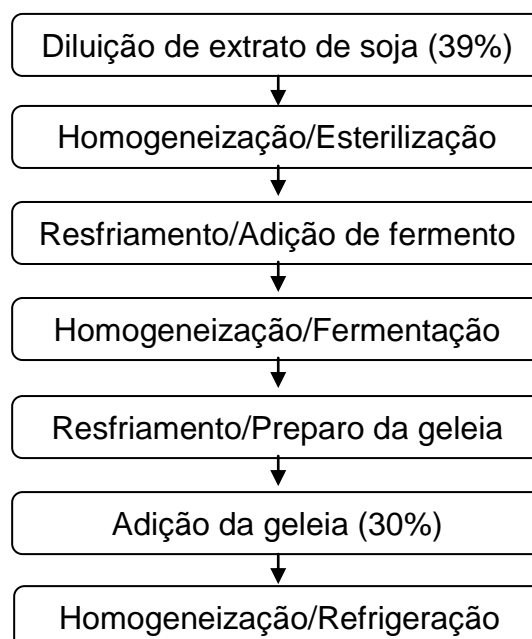
A mistura foi homogeneizada e submetida à fermentação a 42°C por em média 6 horas até atingir pH de 4,5 a 4,7. Após a fermentação, a massa obtida foi resfriada e mantida a 4°C até o momento da saborização do produto.

5.3.1 Elaboração da geleia de abacaxi

Para conferir sabor e caracterizar o produto de forma comercial foi produzida uma geleia de fruta com abacaxi. Para o preparo da geleia, a fruta foi previamente higienizada, sanitizada em solução clorada a 150 ppm durante 15 minutos e descascada para a obtenção da polpa. O preparo da geleia utilizou 33% de polpa de abacaxi e 66 % de açúcar refinado. A mistura foi aquecida até a fervura, sendo mantida até a redução do volume total a 40% do volume inicial, verificado por pesagem da mistura. Após resfriamento, a mistura foi triturada em liquidificador para a obtenção de uma geleia homogênea. A proporção da geleia foi de 30% na formulação do “iogurte” de soja. Em seguida, o “iogurte” foi homogeneizado e armazenado sob refrigeração a temperatura em torno de 4°C até a etapa de adição de células de *L. rhamnosus* livres ou encapsulados com ou sem inulina.

As etapas de produção do “iogurte” de soja sabor abacaxi estão representadas na Fig. 3. Foram adotadas as boas práticas de fabricação, para a segurança necessária para o produto final, evitando-se contaminações físicas, químicas e microbiológicas. O “iogurte” foi desenvolvido e avaliado sensorialmente no laboratório de Técnica Dietética da UFPE.

Figura 3 - Fluxograma de produção de “iogurte” de soja



Fonte: A autora.

5.4 Cultivo e enumeração do *L. rhamnosus*

5.4.1 Preparo da cultura de *L. rhamnosus*

Uma solução estoque contendo aproximadamente 10 Log UFC/mL foi obtida pela solubilização de cultura pura e liofilizada de *L. rhamnosus* ASCC 290 em 30 ml de água estéril e mantida a temperatura de $-18 \pm 2^{\circ}\text{C}$ em glicerol 50% e MRS caldo 50% (Agar De Man Rogoso e Sharpe) até a etapa de ativação da cultura.

Para ativação da cultura, uma alíquota de 1 mL foi retirada da solução estoque e inoculada em 10 mL de MRS caldo e incubada a 37°C durante 24 h, sob condições anaeróbias. A cultura ativa foi transferida para 95 mL de MRS caldo e incubada sob as mesmas condições anteriores, a fim de se obter a concentração final de células de pelo menos 10^{10} UFC/ml. As células foram colhidas por centrifugação a 1500 rpm durante 15 min a 25°C e lavadas duas vezes com solução estéril de peptona 0,1% (0,1g/100g). Depois de lavadas as células foram suspensas em solução peptonada estéril para completar o volume de 6 mL. Essa metodologia foi realizada para a obtenção da biomassa de *L. rhamnosus* a ser adicionada ao “iogurte” a base de soja na forma de células livres.

5.4.2 Enumeração do *L. rhamnosus*

O número de células viáveis foi determinado através da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC). Uma alíquota de 1 mL da suspensão de células foi submetida a diluições decimais seriadas em solução salina 0,9% estéril para alcançar um número de células contáveis de *L. rhamnosus*. Em seguida, foram inoculadas pela técnica de semeadura por profundidade - *Pour-plate* (SILVA et al., 2007), onde 1 ml da diluição foi depositado em uma placa de Petri, recebendo ágar MRS (Sigma ®). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em condições anaeróbias e as bactérias enumeradas como UFC/mL.

5.5 Produção de cápsulas

5.5.1 Preparo da cultura de *L. rhamnosus* para encapsulação

A ativação e o cultivo do *L. rhamnosus* seguiu a mesma metodologia descrita no item 5.3.1. Após ativação, a biomassa de *L. rhamnosus* foi colhida por centrifugação a 1500 rpm durante 15 min a 25°C e lavadas duas vezes com solução

estéril de peptona 0,1% (0,1g/100g). Depois de lavadas as células foram suspensas em solução peptonada estéril para completar o volume de 11 mL. Em seguida, foi retirada uma alíquota de 1 mL da suspensão celular para enumeração das células como descrito no item 5.3.2. Essa metodologia foi adotada para a obtenção da biomassa celular destinada à produção de cápsulas para, posterior adição ao “iogurte” à base de soja.

5.5.2 Procedimento de encapsulação do *Lactobacillus rhamnosus*

As cápsulas foram preparadas pelo método de extrusão (KRASAEKOOPT et al., 2003). A suspensão celular foi dividida em duas frações com volumes iguais: uma fração (5mL) foi utilizada para a encapsulação do *L. rhamnosus* com inulina e a segunda fração para encapsulação do *L. rhamnosus* sem inulina.

5.5.2.1 Encapsulação de *L. rhamnosus* com inulina

A primeira fração da suspensão de células foi misturada com 5 ml de solução estéril de inulina 1,5% (1,5g/100ml) e em seguida, com 20 ml de solução de alginato de sódio 4% (40g/L), previamente esterilizadas a 121°C por 15 minutos. A suspensão final foi injetada através de uma agulha estéril de 0,11 milímetros em 100 mL de uma solução de CaCl_2 0,05 mol/L com 0,02 mL/100mL de Tween 80. As esferas foram deixadas em repouso durante 30 minutos para a gelificação, e em seguida, lavadas e mantidas em solução estéril peptonada 0,1% a 4°C.

5.5.2.2 Encapsulação de *L. rhamnosus* sem inulina

A segunda fração da suspensão celular foi apenas misturada com 20 mL de solução estéril de alginato de sódio 4% (40g/L). Em seguida, a suspensão resultante foi injetada em 100 mL de solução de CaCl_2 0,05 mol/L com 0,02 mL/100mL de Tween 80 e deixada em repouso para gelificação, como descrito no item 5.4.2.1.

5.5.3 Revestimento das cápsulas de alginato (com ou sem inulina) com quitosana

O revestimento com quitosana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Krasaekoopt et al. (2004). A quitosana de baixa massa molecular (0,4g) foi dissolvida em 90 mL de água destilada, em seguida, a solução foi acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial. O pH foi ajustado entre 5,7-6,0 pela adição de 1

mol/L NaOH. A mistura foi filtrada em papel de filtro Whatman #4 e o volume foi ajustado para 100 mL antes de ser autoclavado a 121°C por 15 minutos, obtendo concentração final de 1% (4 g/L).

Em seguida, 15g de cápsulas lavadas de cada tratamento foram imersas, separadamente, em 100 mL de solução de quitosana com agitação suave a 100 rpm durante 40 minutos num agitador orbital. Após o revestimento, as cápsulas foram lavadas e mantidas em recipientes de vidro com solução de peptona 0,1% a 4°C.

5.5.4 Enumeração das bactérias encapsuladas (Eficiência da Encapsulação)

A eficiência de encapsulação (EE) é uma medida que avalia a taxa de sobrevivência de bactérias após o processo de encapsulação. Para calcular essa variável foi adotado o procedimento descrito por Zou et al. (2011). Cápsulas filtradas (1g) foram adicionadas a 9 mL de solução salina (9g/L NaCl) pré-aquecida a 37°C. Para a quebra das esferas e liberação das células de *L. rhamnosus* aprisionadas, a suspensão bacteriana foi homogeneizada, em homogeneizador Polytron® (Kinematica) a 10.000 RPM por 10 segundos, triturando todo o polímero e liberando as bactérias no diluente, para posteriormente, ser submetida ao processo de plaqueamento e enumeração das células, como descrito no item 5.3.2. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada por meio da seguinte fórmula:

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

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.

5.6 Adição de *L. rhamnosus* livres e encapsulados com e sem inulina no “iogurte” de soja sabor abacaxi

Os “iogurtes” adicionados de *L. rhamnosus* na forma livre foram preparados com a adição de 10% (v/v) de suspensão de células. As esferas foram incorporadas separadamente aos “iogurtes” na proporção de cápsulas: iogurte de 10% (m/v). Os “iogurtes” foram homogeneizados, embalados em copos de plástico de material

polipropeno, estéreis, com tampa e capacidade para 50 ml. Em seguida, foram mantidas em câmara fria a 4°C durante 28 dias.

5.7 Determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja sabor abacaxi

A formulação de “iogurte” de soja que obteve melhor desempenho na viabilidade da cepa de *L. rhamnous* durante vida de prateleira do produto e simulação gastrointestinal foi submetida às determinações de umidade, cinzas, proteína, lipídio e carboidratos totais, segundo o AOAC International (2002).

. Os resultados referentes à composição centesimal do produto foram expressos em g/100g (AOAC, 2002). A descrição das análises pode ser visualizada na Tabela 1. O valor energético total (VET) foi calculado pelo somatório das calorias fornecidas pelos macronutrientes, isto é, 9 Kcal/g para lipídios (LIP) e 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN). Conforme a seguinte equação:

$$\text{VET} = (\text{CHO} \times 4) + (\text{PTN} \times 4) + (\text{LIP} \times 9)$$

Tabela 1. Metodologias usadas nas análises físico-químicas para determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja.

Análise	Princípio	Referência
Umidade (U)	Perda por dessecação a partir da secagem direta em estufa a 105°C	IAL, 2008
Cinzas (CZ)	Resíduos por incineração em Mufla à 550°C	IAL, 2008
Proteínas	Determinação do nitrogênio pelo método clássico de digestão Kjeldahl e conversão para proteína por meio do fator 6,25	IAL, 2008
Lipídio	Extração direta em Soxhlet	IAL, 2008
Carboidratos totais*	Estimado por diferença	IAL, 2008

AOAC International (2002)

Calculado por diferença (Carboidratos = 100 – umidade – cinzas – proteínas - lipídios)

5.8 Avaliação físico-química e microbiológica do “iogurte” de soja durante armazenamento

A vida de prateleira do “iogurte” de soja foi avaliada a partir da análise dos parâmetros físico-químicos e microbiológicos realizadas no primeiro dia de produção (Tempo 1) dos “iogurtes” de soja e após 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento sob refrigeração. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

5.8.1 Parâmetros físico-químicos

5.8.1.1 pH

A determinação de pH foi realizada por meio do método potenciométrico seguindo as normas analíticas da AOAC (2002). Foi utilizando um potenciômetro digital da marca Tecnal modelo pHMeter Tec previamente calibrado, operando-o de acordo com as instruções do manual do fabricante.

5.8.1.2 Acidez titulável

Os teores de acidez em ácido láctico foram determinados por meio da diluição da amostra homogeneizada em água destilada e posterior titulação com solução de NaOH 0,1N. A determinação se deu após viragem para coloração rosa com utilização do indicador de fenolftaleína (AOAC, 2002).

5.8.2 Parâmetros microbiológicos

5.8.2.1 Análise do padrão microbiológico sanitário de “iogurte” de soja

A análise do padrão microbiológico sanitário do produto foi realizado no primeiro dia da elaboração dos “iogurtes” conforme preconiza o Regulamento Técnico sobre Padrões Microbiológicos para Alimentos - Resolução RDC nº 12 (BRASIL, 2001) para bebidas a base de extrato de soja, aromatizada ou não, desengordurada ou não, refrigeradas e similares. Os microrganismos pesquisados foram os coliformes a 45°C/mL, *Bacillus Cereus*/mL e *Salmonella* sp/25mL, conforme normas analíticas da AOAC International (2002) e metodologia descrita por Silva et al. (2007). As análises foram realizadas em triplicata.

5.8.2.2 Enumeração seletiva de *L. rhamnosus* livres durante armazenamento de “iogurte” de soja

As amostras de “iogurte” foram analisadas nos tempos 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado dos produtos. Para diferenciação e enumeração seletiva de *L. rhamnosus*, excluindo-se as culturas lácteas (*Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium* BB12 e *Streptococcus thermophilus*), empregadas para a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja, foi utilizado um meio seletivo para *L. rhamnosus* constituído de MRS agar suplementado com vancomicina na proporção 125 µl: 250 ml de meio MRS agar, conforme metodologia descrita por Ashraf & Shah (2011). Amostras do “iogurte” (25 g) à temperatura ambiente foram transferidas para 225 ml de salina 0,9% (SILVA et al., 2007). Após homogeneização, 1 mL foi retirado e diluído seriadamente para posterior inoculação em meio seletivo (técnica de *pour-plate*), sendo submetido as mesmas condições descritas no item 5.3.2. As bactérias foram enumeradas como UFC/mL.

5.8.2.3 Enumeração seletiva de *L. rhamnosus* livres e encapsulados durante armazenamento de “iogurte” de soja sabor abacaxi

Os “iogurtes” adicionados de *L. rhamnosus* livres e encapsulados com e sem inulina foram, separadamente, diluídos e submetidos à homogeneização para quebra das cápsulas, conforme o item 5.6 para posterior enumeração seletiva de *L. rhamnosus* como descrito no item 5.8.2.2 (ASHRAF; SHAH, 2011). As bactérias foram enumeradas como UFC/mL.

5.8.2.4 Avaliação da sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas durante vida de prateleira de “iogurte”

Foi verificada a taxa de sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas em 1, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento refrigerado do “iogurte” utilizando a seguinte equação:

$$\% \text{ Taxa de sobrevivência} = (N/N_0) \times 100$$

Onde, N é o número de células viáveis em cada tempo de armazenamento e N₀ é o número inicial de células viáveis adicionadas ao iogurte na forma livre ou encapsulada

5.9 Simulação gastrointestinal *in vitro*

As células de *L. rhamnosus*, na forma livre e em cápsulas, foram submetidas a condições gastrointestinais simuladas, a fim de evidenciar a taxa de sobrevivência dessa bactéria. 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 9g/L de cloreto de sódio contendo 3.0g/L de pepsina com pH ajustado para 2,0 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 CaCl₂ e 1.386 g/L NaHCO₃, para concentração de 3.0g/L, obtendo pH final de pH 7,0. 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 minutos e em contato com o suco intestinal por 120 minutos, totalizando 240 minutos de simulação gastrointestinal.

5.9.1 Fase gástrica

Cápsulas recentemente preparadas (1g) de cada tratamento e uma alíquota (1 mL) da suspensão de células livres, foram adicionadas, separadamente, em tubos estéreis com 9 ml de suco gástrico simulado (SGS) estéril e incubadas a 37°C durante 60 e 120 minutos, totalizando 6 tubos. Após a incubação, as esferas foram colhidas por filtração e as células livres por centrifugação a 1500 rpm durante 15 minutos a 25°C. Foram realizados os procedimentos para enumeração das células de *L. rhamnosus* aprisionadas e livres, como descritos nos itens 5.3.2 e 5.6.

5.9.2 Fase intestinal

Após 120 minutos em SGS, separadamente, 1g de esferas de cada tratamento ou uma alíquota de 1 mL da suspensão de células livres foram transferidas para tubos estéreis com 9 ml de suco intestinal simulado (SIS) estéril e incubadas a 37°C por mais 120 minutos, totalizando 240 minutos de simulação gastrointestinal. Após a incubação, alíquotas (1 mL) de cápsulas dissolvidas de cada tratamento (com e sem inulina) e da suspensão de células livres em SIS foram, separadamente, diluídas seriadamente para alcançar um número de células contáveis. Em seguida, foram inoculadas e incubadas sob mesmas condições descritas para enumeração das células em UFC/ml.

5.9.3 Avaliação da sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas após simulação gastrointestinal

A taxa de sobrevivência das bactérias livres e encapsuladas também foi verificada após exposição às condições gastrointestinais simuladas utilizando a equação descrita no item 5.9.2.4 com modificações, conforme demonstrado abaixo:

$$\% \text{ Taxa de sobrevivência} = (N/N_0) \times 100$$

Onde, N é o número de células viáveis após exposição às condições gastrointestinais simuladas e N₀ é o número inicial de células viáveis antes da exposição.

5.10 Análise sensorial de “iogurte” de soja

A formulação de “iogurte” que apresentou melhor desempenho durante a simulação gastrointestinal foi submetida aos testes de aceitação e intenção de compra.

O painel sensorial foi composto por 119 provadores (18-50 anos) não treinados de ambos os sexos, recrutados aleatoriamente entre os alunos, professores e funcionários da UFPE. Somente participaram do experimento os provadores que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 1), aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE/CCS, sob o registro CAAE: 51473115.7.0000.5208.

Os testes foram realizados no Laboratório de Técnica Dietética da UFPE, Recife, PE, em cabines individuais utilizando-se luz branca, de 8h às 11h. As amostras foram dispostas em copos descartáveis de 50 mL com porções padronizadas (15 gramas) e servidas à temperatura de 8°C. Junto com as amostras foi servida água mineral à temperatura ambiente para limpeza do palato. Foram submetidos aos testes apenas os iogurtes cuja análise microbiológica atendeu aos padrões recomendados pela legislação específica (BRASIL, 2001).

Foi realizado, segundo metodologia do Instituto Adolfo Lutz (2008), o teste de aceitação, para isso foi entregue uma ficha contendo uma escala hedônica de nove pontos (1 = desgostei extremamente; 5 = nem gostei/nem desgostei; 9 = gostei extremamente) sendo avaliados os atributos aparência, textura, impressão global, sabor e aroma. Paralelamente também foi avaliada a intenção de compra. Para tanto, foi empregada a escala hedônica de cinco pontos (1 = certamente não

compraria; 3 = talvez compraria/talvez não compraria; 5 = certamente compraria), conforme o apêndice B.

Para o cálculo de Índice de Aceitabilidade (IA) do produto, foi adotada a expressão $IA (\%) = A \times 100/B$, em que, A = nota média obtida para o produto e B = nota máxima dada ao produto (KOLLING et al., 2014). O IA com boa aceitação tem sido considerado $> 70\%$ (DUTCOSKY, 2009).

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® (Hamer & Harper), a fim de verificar diferenças significativas entre os grupos estudados, adotando o nível de confiança de 95%.

6 RESULTADOS

6.1 Eficiência de Encapsulação (EE)

Conforme verificado na Tabela 2, a contagem inicial de *L. rhamnosus* antes da encapsulação foi 12,58 log UFC mL para ambos os grupos. Houve uma diferença significativa ($p < 0,05$) na eficiência de encapsulação entre os grupos. O grupo encapsulado sem inulina apresentou uma redução de 1,78 ciclos logarítmicos em relação ao número inicial de células. Enquanto que o grupo com inulina demonstrou uma redução maior (5,36 ciclos logarítmicos) na população de bactérias. Esses resultados representam uma menor eficácia na encapsulação de *L. rhamnosus* na presença de inulina.

Tabela 2. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) antes e depois da encapsulação de *L. rhamnosus* sem e com inulina

<i>L. Rhamnosus</i> encapsulados	Número de células (LOG UFC mL)		EE (%)
	Antes	Depois	
S	12,58 \pm 0,026 ^{Aa}	10,18 \pm 0,360 ^{Ab}	80,92%
C	12,58 \pm 0,026 ^{Aa}	7,22 \pm 0,129 ^{Bb}	57,39%

^{A,B,C} Médias com letras iguais na mesma coluna para o mesmo grupo não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

^{a, b} Médias com letras iguais na mesma linha para grupos diferentes não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

S = cápsulas contendo *L. rhamnosus* sem inulina; C = cápsulas contendo *L. rhamnosus* com inulina.

Calculado por ANOVA one-way.

6.2 Determinação da composição centesimal de “iogurte” de soja sabor abacaxi

Os resultados da composição centesimal do “iogurte” de soja com adição de *L.rhamnosus* encapsulados sem inulina, expressos em gramas por 100 gramas de produto, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Composição centesimal do “iogurte” de soja sabor abacaxi adicionado de *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina.

Composição centesimal	g/100g
Umidade	62,85
Cinzas	1,54
Proteínas	5,31
Lipídio	5,40
Carboidratos totais*	24,9
VCT**	165,84 kcal

*Calculado por diferença (Carboidratos = 100 – umidade – cinzas – proteínas - lipídios)

**VCT = valor calórico total, calculado pelo somatório das calorias fornecidas pelos macronutrientes, isto é, 9 Kcal/g para lipídios (LIP) e 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN)

6.3 Caracterização físico-química e microbiológica de “iogurte” de soja

6.3.1 Parâmetros físico-químicos

A Tabela 4 apresenta os valores referentes às mudanças nos parâmetros físico-químicos nas amostras de “iogurtes” de soja adicionados de células livres, encapsuladas sem e com inulina durante 28 dias de estocagem a $4 \pm 1^\circ\text{C}$.

O pH inicial das amostras de “iogurte” com adição de *L. rhamnosus* livres, encapsulados sem inulina e encapsulados com inulina foi de $4,59 \pm 0,01$; $4,55 \pm 0,005$ e $4,79 \pm 0,002$, respectivamente ($p < 0,05$). O pH variou significativamente nas três formulações de “iogurte” durante todo o período de armazenamento refrigerado, sendo verificado um decréscimo mais acentuado no pH dos produtos com células livres e com células encapsuladas sem inulina ($p < 0,05$). Após 28 dias de estocagem, o pH final das formulações de “iogurte” foi $4,24 \pm 0,01$; $4,32 \pm 0,01$ e $4,64 \pm 0,006$ para as amostras contendo células livres, encapsuladas sem inulina e encapsuladas com inulina, respectivamente ($p < 0,05$).

A acidez titulável (em % de ácido láctico) variou consideravelmente ($p < 0,05$) nos três grupos, apresentando valores que variaram de $0,91 \pm 0,01$ a $1,34 \pm 0,00$; $1,08 \pm 0,04$ a $1,13 \pm 0,02$ e $0,99 \pm 0,01$ a $1,05 \pm 0,01$ nos iogurtes contendo microrganismos livres, encapsulados sem inulina e encapsulados com inulina, respectivamente. Ao final da vida de prateleira dos “iogurtes”, as amostras com adição de cápsulas (com e sem inulina) apresentaram um menor incremento na concentração de ácido láctico ($p < 0,05$) quando comparadas as amostras com células livres.

TABELA 4. Resultados dos parâmetros físico-químicos (Média e Desvio padrão) nos “iogurtes” contendo *L. rhamnosus* livres, encapsulados e encapsulados com inulina durante armazenamento a 4°C

Parâmetro	Tempo (dias)	L	S	C
pH	1	4,59 ± 0,01 ^{Aa}	4,55 ± 0,005 ^{Ab}	4,79 ± 0,002 ^{Ac}
	7	4,59 ± 0,01 ^{Aa}	4,66 ± 0,001 ^{Bb}	4,76 ± 0,026 ^{Ac}
	14	4,47 ± 0,01 ^{Ba}	4,59 ± 0,010 ^{Cb}	4,63 ± 0,002 ^{Ac}
	21	4,29 ± 0,01 ^{Ca}	4,51 ± 0,006 ^{Ab}	4,62 ± 0,006 ^{Ac}
	28	4,24 ± 0,01 ^{Da}	4,32 ± 0,010 ^{Db}	4,64 ± 0,006 ^{Ac}
Acidez (g de ác. lático/100g)	1	0,91 ± 0,01 ^{Aa}	1,08 ± 0,04 ^{Ab}	0,99 ± 0,01 ^{Ac}
	7	0,86 ± 0,03 ^{Ba}	0,94 ± 0,06 ^{Ba}	1,05 ± 0,01 ^{Bb}
	14	1,03 ± 0,01 ^{Ca}	0,91 ± 0,08 ^{Ba}	1,05 ± 0,02 ^{Bb}
	21	1,15 ± 0,01 ^{Da}	1,09 ± 0,01 ^{Ab}	0,98 ± 0,03 ^{Ac}
	28	1,34 ± 0,00 ^{Ea}	1,13 ± 0,02 ^{Cb}	1,05 ± 0,01 ^{Bc}

^{A,B,C} Médias com letras iguais na mesma coluna para o mesmo grupo não apresentam diferença significativa (p>0,05);

^{a, b} Médias com letras iguais na mesma linha para grupos diferentes não apresentam diferença significativa (p>0,05);

L = iogurte contendo *L. rhamnosus* livres; S = iogurte contendo *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina; C = iogurte contendo *L. rhamnosus* encapsulados com inulina.

Calculado por ANOVA one-way.

6.3.2 Parâmetros microbiológicos

O controle dos padrões microbiológicos para Coliformes, *Bacillus cereus* e *Salmonella* é obrigatório pela legislação brasileira em se tratando de produtos alimentares a base de extrato de soja (BRASIL, 2001). A avaliação microbiológica mostrou boa qualidade higiênico-sanitária nas amostras com adição de células livres e encapsuladas com ou sem inulina logo após a produção dos “iogurtes”.

A concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* livres e encapsulados com e sem inulina em “iogurte” de soja durante 28 dias de armazenamento a 4°C é mostrada na Tabela 5. Observa-se que nos três grupos estudados, as taxas de sobrevivência das células de *L. rhamnosus* variaram significativamente ($p < 0,05$) durante a estocagem dos produtos.

Verificou-se que durante todo período de armazenamento, as células de *L. rhamnosus* encapsuladas com e sem inulina apresentaram maior taxa de sobrevivência quando comparadas as bactérias na sua forma livre ($p < 0,05$). Além disso, nesse mesmo período, as cápsulas com adição de inulina (Grupo C) demonstraram maior taxa de sobrevivência quando comparadas as cápsulas sem inulina (Grupo S) ($p < 0,05$). No último dia de vida de prateleira dos produtos (28º dia), a contagem de células viáveis no grupo de bactérias encapsuladas com inulina alcançou 117,4% de sobrevivência, enquanto que o grupo de bactérias encapsuladas sem inulina atingiu uma taxa de 80,4% de sobrevivência ($p < 0,05$).

Tabela 5. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do *L. rhamnosus* livres, encapsulados e encapsulados com inulina durante armazenamento refrigerado dos “iogurtes”.

T	L		S		C	
	Log UFC/mL	Sobrevivência ¹ (%)	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)
1	12,07 \pm 0,06 ^{Aa}	100	10,18 \pm 0,36 ^{Ab}	100	7,22 \pm 0,13 ^{Ac}	100%
7	9,25 \pm 0,05 ^{Ba}	76,6	10,73 \pm 0,02 ^{Ab}	105,4	8,04 \pm 0,40 ^{Bc}	111,4
14	7,94 \pm 0,1 ^{Ca}	65,78	7,35 \pm 0,13 ^{Bb}	72,2	6,90 \pm 0,03 ^{Cc}	95,6
21	8,29 \pm 0,09 ^{Da}	68,68	7,75 \pm 0,04 ^{Cb}	76,3	7,65 \pm 0,05 ^{Bc}	105,9
28	8,65 \pm 0,03 ^{Ea}	71,66	8,19 \pm 0,1 ^{Db}	80,4	8,48 \pm 0,0 ^{Cc}	117,4

¹Calculado pela divisão entre o número de células viáveis em cada tempo de estocagem pelo número inicial de células, multiplicado por 100;

A,B,C,D,E Médias com letras iguais na mesma coluna para o mesmo grupo não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

a,b Médias com letras iguais na mesma linha para grupos diferentes não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

T = tempo de estocagem

L = iogurte contendo *L. rhamnosus* livres; S = iogurte contendo *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina; C = iogurte contendo *L. rhamnosus* encapsulados com inulina;

Calculado por ANOVA one-way.

6.4 Simulação gastrointestinal *in vitro*

Os resultados da sobrevivência de *L. rhamnosus* após exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados encontram-se na tabela 6. Houve significativa redução na viabilidade de células de *L. rhamnosus* nos três grupos estudados ($p < 0,05$) durante exposição ao suco gástrico simulado (SGS), seguido por suco intestinal simulado (SIS).

Na fase gástrica, após 60 minutos em SGS, as bactérias na forma livre (não encapsulada) apresentaram significativa redução na contagem de células viáveis, apresentando um decréscimo de 0,76 ciclo logarítmico na sua população ($P < 0,05$). Enquanto que o grupo com bactérias encapsuladas com adição de inulina experimentaram um decréscimo menos expressivo de 0,42 ciclo logarítmico ($p < 0,05$). Já as bactérias encapsuladas sem inulina não apresentaram variação significativa ($p > 0,05$) na contagem de células, nesse mesmo período.

Em contrapartida, ao final da fase gástrica (120 minutos em SGS) houve acentuada redução na taxa de sobrevivência das células encapsuladas sem inulina e encapsuladas com inulina ($p < 0,05$), apresentando reduções de 1,0 e 1,74 ciclos logarítmicos, respectivamente. Já o grupo com células livres não experimentou redução significativa ($P > 0,05$).

Após subsequente exposição ao SIS, o probiótico livre experimentou um declínio significativamente maior na viabilidade de suas células quando comparado às bactérias encapsuladas sem inulina. O grupo de células livres apresentou redução de 1,55 ciclos logarítmicos, enquanto que o grupo de células encapsuladas sem inulina verificou decréscimo menos acentuado de 0,78 ciclo logarítmico. A presença de inulina nas cápsulas de alginato/quitosana não demonstrou vantagens sobre a viabilidade das bactérias, apresentando redução de 1,95 ciclos logarítmicos na população de células.

Tabela 6. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do *L. rhamnosus* livres, encapsulados sem inulina e encapsulados com inulina durante simulação gastrointestinal.

Tempo de incubação (min)	L		S		C	
	Log UFC/mL	Sobrevivência (%) ¹	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)
SGS						
0	9,90 \pm 0,01 ^{Aa}	100%	8,54 \pm 0,1 ^{Ab}	100%	8,31 \pm 0,03 ^{Ac}	100%
60	9,14 \pm 0,023 ^{Ba}	92,32%	8,89 \pm 0,09 ^{Ab}	104,01%	7,89 \pm 0,11 ^{Bc}	94,95%
120	9,62 \pm 0,06 ^{Aa}	97,17%	7,54 \pm 0,06 ^{Bb}	88,3%	6,57 \pm 0,2 ^{Cc}	79,06%
SIS						
240	8,35 \pm 0,17 ^{Ca}	84,34%	7,76 \pm 0,05 ^{Cb}	90,86%	6,36 \pm 0,10 ^{Cc}	76,53%

¹Calculado pela divisão entre o número de células viáveis em cada tempo de incubação pelo número inicial de células, multiplicado por 100;

^{A,B,C} Médias com letras iguais na mesma coluna para o mesmo grupo não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

^{a, b} Médias com letras iguais na mesma linha para grupos diferentes não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$);

L = *L. rhamnosus* livres; S = *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina; C = *L. rhamnosus* encapsulados com inulina; SGS = suco gástrico simulado; SIS = suco intestinal simulado.

Calculado por ANOVA one-way.

6.5 Análise sensorial

O “iogurte” de soja com adição de *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina foi o escolhido para a análise sensorial, pois apresentou melhor desempenho durante a simulação gastrointestinal, como foi demonstrado na página anterior e será discutido adiante. A tabela 7 apresenta as médias das notas dos provadores e o índice de aceitabilidade (em %) em relação aos atributos cor, textura, sabor, aparência e impressão global das amostras de “iogurte” de soja com adição de *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina.

Tabela 7. Médias das notas referentes à avaliação sensorial (numa escala hedônica de 1-9) e Índice de Aceitabilidade (em %) dos atributos avaliados no “iogurte” de soja com *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina.

Notas	Atributos				
	Cor	Textura	Sabor	Aparência	Impressão global
Média/Desvio padrão	6,94 ± 1,47	6,60 ± 1,75	6,56 ± 1,96	7 ± 1,68	6,77 ± 1,83
IA (%)²	77,11	73,33	72,88	77,77	75,22

Resultados correspondem a média ± desvio padrão de 119 provadores;

² IA (%) = Índice de Aceitabilidade (%) = $A \times 100/B$, em que, A = nota média obtida para o produto e B = nota máxima dada ao produto.

Os resultados mostram que as médias para a impressão global das amostras foram semelhantes às médias dos parâmetros cor, textura e sabor, com valores situados acima de 6,0, numa escala hedônica de 1,0 – 9,0. Os valores atribuídos próximos de 6 correspondem a “gostei ligeiramente”. A média apresentada para o parâmetro aparência teve o maior valor em termo absoluto (7,0), a qual corresponde a “gostei moderadamente”. Os índices de aceitabilidade apresentaram-se acima de 70% para todos os atributos avaliados. Em relação à intenção de compra do produto avaliado (resultado não expressado na tabela), a média encontrada foi de $3,64 \pm 1,05$, numa escala hedônica de 1,0 – 5,0, onde 3,0 representa a expressão “tenho dúvidas se compraria”. Vale ressaltar que as amostras foram analisadas previamente quanto à presença de microrganismos contaminantes, segundo a

determinação de BRASIL (2001), apresentando-se aptas a serem avaliadas sensorialmente.

7. DISCUSSÃO

7.1 Eficiência de Encapsulação (EE)

Os benefícios proporcionados pela associação de um ingrediente prebiótico e um microrganismo probiótico estimulou o estudo da eficiência de encapsulação de *L. rhamnosus* em matriz alginato/quitosana na presença de inulina.

Os resultados do presente estudo permitem observar que a encapsulação de *L. rhamnosus* com adição de inulina apresentou um rendimento 23% inferior a encapsulação sem inulina ($p < 0,05$). Esses resultados foram inesperados e implicam que a incorporação de um substrato prebiótico em cápsulas de alginato promoveu um efeito negativo na eficiência de encapsulação (EE) do probiótico.

Resultados semelhantes foram reportados por Chavarri et al. (2010), os autores observaram que a adição de prebiótico (quercetina) durante a microencapsulação de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri* promoveu um aumento de 50% no tamanho das cápsulas. Paralelamente, verificaram redução no rendimento da encapsulação dos microrganismos na presença do prebiótico.

Krasaekoopt e Watcharapoka (2014) verificaram variações na EE de *L. acidophilus* e *L. casei* microencapsulados em matriz polimérica constituída de alginato/quitosana com inulina e galactossacarídeos e atribuíram esses resultados ao aumento verificado no tamanho das cápsulas. Por outro lado, os autores defendem que o tipo e a concentração dos prebióticos não tiveram efeito no tamanho das esferas. Gandomi et al. (2016) também estudaram a encapsulação de *L. rhamnosus* com inulina em cápsulas de alginato/quitosana e verificaram que a EE também foi significativamente menor quando comparada a EE do microrganismo sem prebiótico.

Esses resultados sugerem que a adição de prebiótico parece promover um aumento na massa das cápsulas, resultando em uma menor capacidade de aprisionamento das células probióticas (KRASAEKOOPT e WATCHARAPOKA, 2014).

Em oposição, Sultama et al. (2000) durante a produção de cápsulas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*, pela técnica de emulsificação, em matriz polimérica de alginato e amido resistente, encontraram EE 25% superior a encapsulação sem prebiótico. Segundo os autores, a eficácia do encapsulamento na presença de prebiótico pode estar relacionada à interação sinérgica entre o microrganismo probiótico e o ingrediente prebiótico, conferindo proteção à cepa durante a encapsulação.

Souza (2015) estudou a encapsulação de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em diferentes matrizes poliméricas e concluiu que o alginato como material encapsulante pode formar complexos com a inulina, melhorando a estabilidade química de cápsulas e consequentemente a eficácia da encapsulação do probiótico, característica que não foi evidenciada no presente trabalho.

7.2 Determinação da composição centesimal do “iogurte” de soja sabor abacaxi

Em relação à composição centesimal do “iogurte” de soja produzido com adição de *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina, o valor encontrado para carboidratos foi de 24,9%, sendo superior ao relatado na literatura, pois Hauly et al. (2005), ao trabalharem com “iogurte” de soja encontraram um valor médio de 16,20% de carboidrato. Pelo fato desse estudo não utilizar geleia, polpa de fruta ou açúcar durante a produção de “iogurte”, supõe-se por esse motivo ter apresentado um menor percentual de carboidratos, já que as amostras estudadas foram elaboradas com a adição de geleia de abacaxi.

Martins et al. (2013) elaboraram um “iogurte” a base de extrato hidrossolúvel de soja e inulina e encontraram um teor de carboidratos de 2,8%, sendo também inferior ao encontrado no presente estudo. Essa diferença pode se dar pela presença de açúcar na composição do iogurte em estudo, já que o estudo de Martins et al. (2013) utilizou adoçante na composição do “iogurte”.

Miguel et al. (2010), por sua vez, produziram um “iogurte” de soja com 5,25% de extrato desengordurado de soja, 4,25% de maltodextrina (carboidrato) e 6% de polpa de morango, e encontraram um teor de 66,90% de carboidratos no produto final, percentual superior ao encontrado neste trabalho.

Em relação aos lipídios e proteínas, os valores médios encontrados foram 5,40% e 5,31%, respectivamente, sendo também superior ao mesmo estudo de

Haully et al. (2005), que encontraram 2,01% e 3,54% de lipídios e proteínas, respectivamente, tal fato pode se justificar pela maior proporção de extrato hidrossolúvel de soja (39%) na composição do “iogurte” do presente estudo, já que Haully et al. (2005) utilizou uma proporção menor de extrato hidrossolúvel de soja (10%).

Kolling et al. (2014), ao elaborarem “iogurte” de soja com adição de diferentes fontes de prebióticos, verificaram teor médio de 9,4% de carboidratos, 1,3% de lipídios e 3,0% de proteínas. Sugere-se que pelo fato desses autores terem utilizado leite de soja pronto como matéria prima, o produto tenha apresentado menores percentuais de macronutrientes, já que as amostras estudadas foram elaboradas com extrato hidrossolúvel de soja.

Quanto ao teor de cinzas, as amostras apresentaram um teor de 1,54%, sendo superior ao estudo de Martins et al. (2013), onde foi encontrado 0,5% de cinzas. As cinzas podem ser consideradas como uma medida geral de qualidade de alimentos (SILVA et al., 2009).

Esses resultados permitem concluir que a composição de “iogurte” de soja varia de acordo com o método de elaboração do produto, % de geléia ou polpa de fruta e açúcar (MARTINS et al., 2013), o que dificulta a comparação dos dados com os disponíveis na literatura.

7.3 Caracaterização físico-química e microbiológica do “iogurte” de soja sabor abacaxi

7.3.1 Parâmetros físico-químicos

Durante a produção do “iogurte”, a fermentação do extrato hidrossolúvel de soja por 6 horas proporcionou produtos com diferentes valores iniciais de pH, que variaram entre 4,55 a 4,79 ($p < 0,05$). O pH considerado ótimo para a formação de gel no extrato de soja para a produção de “iogurte” é de 4,5 - 4,6 (CHUMCHUERE et al, 1999).

É possível observar, que os valores iniciais de pH verificados nas amostras de “iogurte” (Tabela 4) se aproximaram favoravelmente ao pH considerado ideal para a formação de gel, mas já atinge uma faixa que não é considerada a melhor para o crescimento de *Lactobacillus*, porém, ainda não representam uma condição de risco extremo para a sobrevivência das mesmas. Segundo, Kandler & Weiss (1986), a

faixa ótima de sobrevivência de espécies de *Lactobacillus* situa-se entre o pH 5,5 – 6,2.

Durante o decorrer da vida de prateleira dos produtos, o pH das formulações de “iogurte” com adição de células livres e encapsuladas sem inulina variaram significativamente ($p < 0,05$) e essa queda é maior nas amostras com *L. rhamnosus* adicionados na forma livre, atingindo um pH final de $4,24 \pm 0,01$ no último dia de armazenamento ($p < 0,05$). Enquanto que o pH das amostras com células encapsuladas com inulina não experimentou variação significativa ($p < 0,05$) durante esse mesmo período.

Segundo Beal (1999), a redução de pH de iogurtes em armazenamento refrigerado a $\pm 4^{\circ}\text{C}$ está relacionada à pós-acidificação do meio pelo consumo de carboidratos e produção de ácido láctico pelas bactérias lácteas. Por outro lado, é esperado uma menor variação de pH em alimentos com adição de células probióticas encapsuladas, uma vez que membrana da cápsula provavelmente limita a difusão de açúcares, dificultando a atividade fermentativa dessas bactérias (RODRIGUES et al., 2011).

Como esperado, as variações de pH nas amostras de “iogurte” foram acompanhadas por variações na concentração de ácido láctico, o qual aumentou com o tempo de armazenamento, sendo significativa a diferença existente entre o primeiro e o último dia de armazenamento refrigerado (28º dia) nas três formulações de “iogurte” ($p < 0,05$).

Deduz-se, dessa forma, que o aumento na acidez, deve-se, provavelmente, ao consumo de ingredientes que compõem o iogurte, como o extrato de soja (rafinose e estaquiose) e a geleia de abacaxi (sacarose), pelas bactérias lácteas e pela cepa probiótica (*L. rhamnosus*), produzindo ácidos orgânicos, especialmente o láctico, por meio da fermentação láctica bacteriana.

Entretanto, no último dia de armazenamento, foi verificado que o aumento na concentração de ácido láctico se revelou menos expressivo nas amostras de “iogurte” com adição de *L. rhamnosus* encapsulados sem e com inulina ($p < 0,05$), apresentando valores de $1,13 \pm 0,02$ e $1,05 \pm 0,01$, respectivamente, quando comparados à concentração de $1,34 \pm 0,0$ encontrada no “iogurte” com probiótico na forma livre ($p < 0,05$).

Em geral, a acidez de produtos fermentados com bactérias lácteas encapsuladas é mais suave do que em produtos com células não encapsuladas, devido à menor produção de ácido e queda de pH (ABBSZADEH et al., 2013).

Já ao comparar a acidez nas amostras de “iogurte” com bactérias encapsuladas sem e com inulina, no último dia de estocagem, verifica-se menor concentração de ácido láctico nas amostras com adição de cápsulas com prebiótico (inulina). Esse resultado indica menor atividade metabólica da bactéria probiótica (*L. rhamnosus*) quando na presença de inulina, sugerindo que o prebiótico favorece o aprisionamento do microrganismo na matriz encapsulante.

Korbekandi et al. (2011) defendem que a presença de inulina é capaz de retardar a pós-acidificação em produtos fermentados, o que é desejável, visto que a pós-acidificação de alimentos probióticos durante armazenamento pode afetar a viabilidade e o crescimento dos microrganismos probióticos, e consequentemente a vida de prateleira do produto.

7.3.2 Parâmetros microbiológicos

As análises microbiológicas dos “iogurtes” demonstraram que não houve contaminação por *Salmonella*, *Coliformes a 45°* e *Bacillus cereus* em nenhuma das amostras analisadas indicando que estão de acordo com os padrões microbiológicos legais vigentes (BRASIL, 2001).

A viabilidade celular de células probióticas é um parâmetro de grande importância durante a vida de prateleira de alimentos probióticos e pode ser afetada por características intrínsecas do alimento ao qual estão incorporadas (SONG et al., 2012). Algumas características do iogurte contribuem para a perda da viabilidade de probióticos, como o acúmulo de ácidos orgânicos resultante do crescimento e fermentação dos microrganismos e o decréscimo do pH durante o armazenamento do produto (pós-acidificação) (SHAH, 2000).

Na primeira semana de armazenamento refrigerado dos “iogurtes”, a contagem de bactérias viáveis de *L. rhamnosus* livres experimentou um decréscimo ($p < 0,05$) de 2,82 ciclos logarítmicos (sobrevivência 76,6%), enquanto que o mesmo não aconteceu nos grupos com bactérias encapsuladas sem e com inulina, os quais experimentaram um aumento na contagem de células de 0,55 ciclo logarítmico (sobrevivência 105,4%) ($p > 0,05$) e 0,82 ciclo logarítmico (sobrevivência 111,4%) ($p < 0,05$), respectivamente.

Além disso, durante todo o período de armazenamento, o grupo de bactérias probióticas livres apresentou uma menor taxa de sobrevivência quando comparado aos grupos com bactérias encapsuladas (sem e com inulina). No 28º dia de estocagem, a taxa de sobrevivência do *L. rhamnosus* livre alcançou 71,66%, enquanto que as bactérias encapsuladas sem e com inulina, verificaram taxas de sobrevivência de 80,4% e 117,4%, respectivamente.

Os resultados do presente estudo corroboram com outros trabalhos. Gon (2014) desenvolveu duas formulações de frozen iogurte a base de soja, uma com adição de *L. acidophilus*, *Bifidobacterium* e *S. thermophilus* livres e a outra com as bactérias encapsuladas, e verificou que a encapsulação foi eficiente em promover maior proteção às cepas probióticas, mantendo-as viáveis durante 6 semanas de armazenamento -18 °C.

Rodrigues et al. (2011), observaram ótima viabilidade de células de *L. paracasei* encapsuladas em matriz alginato/quitosana, pelo método de extrusão, quando adicionadas em suco de laranja e pêssgo. Esses autores não observaram reduções na viabilidade após 50 dias de estocagem das bebidas, além de identificaram aumento da viabilidade dos microrganismos encapsulados.

Estudos têm demonstrado que a encapsulação é capaz de manter a viabilidade de microrganismos probióticos adicionados em iogurte (SULTANA et al., 2000; PINTO, 2012). A microencapsulação pode promover um ambiente mais anaeróbico, favorecendo a sobrevivência e multiplicação das bactérias dentro das esferas, além disso, a encapsulação e o revestimento servem como barreira física contra condições adversas, como o baixo pH do iogurte (LELORSPOEN et al., 2014; DE PRISCO et al., 2015).

No presente estudo, ao avaliar a influência da inulina em cápsulas de alginato/quitosana contendo *L. rhamnosus* é possível verificar efeito positivo adicional na viabilidade do microrganismo durante 28 dias de armazenamento refrigerado de “iogurte” de soja.

Durante todo o período de armazenamento, as amostras com células probióticas encapsuladas com inulina (Grupo C) apresentaram maiores taxas de sobrevivência quando comparadas as células encapsuladas sem prebiótico (Grupo S) ($p < 0,05$). E no último dia de estocagem, a contagem de células de *L. rhamnosus* encapsulados com inulina experimentou um aumento de 1,26 ciclos logarítmicos,

enquanto que as bactérias encapsuladas sem inulina apresentaram um decréscimo de 1,99 ciclos logarítmicos.

Esses dados sugerem que além de um efeito na manutenção da viabilidade de *L. rhamnosus*, a encapsulação com inulina também promove o crescimento deste microrganismo quando adicionado em “iogurte” de soja.

Esses resultados encontram-se em paralelo com um estudo de Krasaekoopt & Watcharapoka (2014), os autores também reconheceram que a presença de prebiótico (galactooligossacarídeos) em microcápsulas com *L. acidophilus* é capaz de aumentar a sobrevivência e promoveu um maior crescimento do microrganismo.

Sultana et al. (2000) verificaram que a incorporação de substratos prebióticos em matriz alginato aumentou a viabilidade de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium*. Chen et al. (2005) reportaram uma maior taxa de sobrevivência de probióticos imobilizados com FOS (frutooligossacarídeos) ou isomalto-oligossacarídeos, um promotor de crescimento e alginato de sódio quando comparados as células livres. A presença de prebióticos isolados da beterraba e chicória promoveu uma maior taxa de sobrevivência de células probióticas (*Staphylococcus succinus* e *Enterococcus fecium*) encapsuladas com matriz alginato (SATHYABAMA et al., 2014).

A adição de inulina também aumentou a capacidade de sobrevivência de *L. casei* microencapsulado em matriz alginato/amido utilizando a técnica de emulsão durante 60 dias de armazenamento à temperatura ambiente (BABU et al., 2011). Fritzen-Freire et al. (2011) conduziram a microencapsulação de *Bifidobacterium BB-12* utilizando secagem por pulverização com leite desnatado reconstituído como material de parede e alguns prebióticos, tais como inulina enriquecida com oligofrutose e verificaram maior taxa de sobrevivência deste organismo durante o armazenamento a 4 ° C.

Por outro lado, Corcoran et al. (2005) relataram que a adição de inulina não aumentou a sobrevivência de probióticos durante a secagem por pulverização. Chavarri et al. (2010) verificaram que bactérias probióticas, *L. gasseri* e *B. bifidum*, microencapsuladas com quercetina não são capazes de sobreviver durante 4 semanas de armazenamento a 4 ° C.

Acredita-se que variações na composição de prebióticos podem provocar efeitos diferentes no crescimento de bactérias probióticas (SATHYABAMA et al., 2014). A taxa em que os oligossacarídeos são fermentados pelas bactérias depende do grau de polimerização e ramificação da cadeia do prebiótico, da sinergia entre a

bactéria, da relação entre a bactéria e os produtos da fermentação e da natureza da fermentação (VORAGEN, 1998). A inulina é um oligossacarídeo de baixo grau de polimerização, portanto é mais bem aceita pelas bactérias para fermentação, favorecendo o crescimento de células probióticas.

É importante destacar que durante todo o armazenamento refrigerado dos “iogurtes” as contagens celulares de *L. rhamnosus* livres e encapsulados sem e com inulina permaneceram acima que 6 log UFC/g (equivale a 10^6 UFC) e portanto, atendendo ao preconizado pela legislação internacional que exige uma concentração mínima de bactérias probióticas de 10^6 - 10^7 UFC/g no produto para que o alimento possa proporcionar benefícios ao hospedeiro (FAO/OMS, 2001). Além disso, considerando um porção de 100 gramas, referente à média comercial para iogurtes, nos resultados também atendem a legislação nacional, que regulamenta que a quantidade mínima de células probióticas viáveis deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC por porção diária (100g) do produto (BRASIL, 2008).

Portanto, quanto aos resultados referentes à viabilidade de *L. rhamnosus* em “iogurte” de soja, verifica-se que as bactérias encapsuladas (sem e com inulina) experimentaram maiores taxas de sobrevivência quando comparadas às células livres. E a presença de inulina promoveu um efeito positivo adicional sobre a viabilidade do probiótico, proporcionando além de proteção, crescimento da cepa.

7.4 Simulação gastrointestinal *in vitro*

Sabe-se que uma elevada população de células probióticas viáveis em produtos alimentícios no momento do consumo não garante a mesma sobrevivência depois da sua chegada no intestino (MARTEAU et al., 1997). O baixo pH do estômago, juntamente com a presença de sais biliares no intestino delgado, são as principais razões para um declínio drástico na viabilidade das células (MORTAZAVIAN et al., 2006).

Além disso, para se observar os efeitos benéficos no hospedeiro, a cepa probiótica deve ser capaz de sobreviver à exposição aos fluidos gástricos e intestinais dos seres humanos e atingir o intestino grosso em quantidades suficientes para que ocorra sua colonização e proliferação (LI et al., 2011).

Neste contexto, a técnica de encapsulação parece ser capaz de oferecer proteção contra as condições adversas encontradas no trato gastrointestinal por meio da criação de um microambiente para as células probióticas em uma matriz

polimérica (HEIDEBACH et al., 2009). Adicionalmente, a presença de um substrato prebiótico na microcápsula parece intensificar essa proteção ao estimular o crescimento bacteriano.

Para determinar o efeito do pH ácido do estômago e do suco intestinal na sobrevivência da cepa probiótica, utilizou-se um sistema *in vitro*. Os resultados mostraram que houve significativa redução na viabilidade das células de *L. rhamnosus* nos três grupos estudados ($p < 0,05$) durante todo o experimento. O microrganismo na sua forma livre apresentou melhor tolerância às condições ácidas da fase gástrica (pH 2,0), sendo observada uma taxa de sobrevivência de 97,17% após 120 minutos em SGS, seguido pelo grupo de bactérias encapsuladas sem inulina com taxa de sobrevivência de 88,3% e por último as bactérias encapsuladas com inulina com um percentual de sobrevivência de 76,53% ($p < 0,05$).

Os resultados do presente trabalho estão em contraste com Kim et al. (2008), os autores relataram que em pH ácido (pH 1,2), células de *L. acidophilus* não encapsuladas foram completamente destruídas após 1 hora de incubação enquanto que a mesma cepa encapsulada manteve a contagem celular acima de 10^6 UFC mL⁻¹ após 2 horas em suco gástrico simulado. Vodnar & Socaciu (2011) descobriram que a encapsulação de *L. casei* em matriz constituída de alginato em diferentes concentrações impediu a redução da sua contagem celular em suco gástrico simulado, resultando em um número de células significativamente maior que o microrganismo não encapsulado (livre).

Em contraste, Sultana et al. (2000) observaram que a encapsulação de bactérias probióticas em matriz alginato não protege efetivamente os organismos da alta acidez em suco gástrico simulado, como verificado no presente estudo.

O baixo desempenho apresentado pelas bactérias encapsuladas com prebiótico pode ser justificado pelo fato de que a inulina em ambiente ácido pode sofrer hidrólise, resultando na formação de frutose e na perda de suas propriedades funcionais (HAULY et al., 2005).

Por outro lado, na fase intestinal (pH 7,0), a taxa de sobrevivência das bactérias na forma livre decaiu para 84,34% após 2h em suco intestinal simulado (SIS) e as bactérias encapsuladas sem inulina apresentaram uma recuperação, com taxa de sobrevivência de 90,9% ao final dessa etapa ($p < 0,05$). Esses resultados demonstram que a encapsulação em matriz alginato/quitosana sem inulina conferiu

maior estabilidade as bactérias probióticas ao final da simulação gastrointestinal quando comparada as células livres.

Resultados similares foram reportado por Albazadih et al (2014) e Gandomi et al. (2016) que observaram uma maior taxa de sobrevivência de bactérias probióticas encapsuladas em matriz alginato durante condições gastrointestinais simuladas, quando comparadas as células livres.

Vodnar e Socaciu (2011) demonstraram que a encapsulação com alginato de cálcio proporcionou maior sobrevivência às células de *L. casei* em exposição sequencial a suco gástrico e suco intestinal simulados. Os autores defendem que os probióticos devem resistir às condições estressantes do estômago e intestino superior para que possam exercer efeitos positivos à saúde do hospedeiro.

Kim et al. (2008) também demonstraram que a microencapsulação usando matriz alginato pode ser eficaz em aumentar a sobrevivência de bactérias probióticas em trato gastrointestinal simulado. Krasaekoopt et al. (2004) verificaram que cápsulas constituídas por alginato e revestidas com quitosana proporcionam melhor proteção a *L. acidophilus* durante simulação gástrica e intestinal.

Acredita-se que a encapsulação em matriz alginato/quitosana promove proteção a cepa probiótica quando exposta ao suco intestinal simulado, pois forma-se um complexo insolúvel entre a quitosana e o sal biliar na membrana encapsulante, tornando limitada a difusão do sal biliar nas esferas. Isto parece proteger as células encapsuladas de interagir com o sal biliar (MURATA et. al., 1999).

A adição de inulina, por sua vez, não conferiu vantagens sobre a sobrevivência das bactérias encapsuladas em matriz alginato/quitosana ao final da simulação gastrointestinal, fato verificado pela menor taxa de sobrevivência (76,5%) apresentada nesse grupo. Esse resultado foi inesperado, pois acredita-se que a incorporação de substratos prebióticos em cápsulas probióticas fornece proteção as bactérias devido a criação de um potencial simbiótico (CHEN et al., 2005; NAZARRO et al., 2009).

Nazarro et al. (2009) observaram efeito protetor na adição de inulina em cápsulas de alginato sobre a viabilidade de *L. acidophilus* durante condições gastrointestinais simuladas. Chavarri et al. (2010) verificaram maior contagem de *L. gasseri* e *B. bifidum* quando microencapsulados com quercetina (prebiótico) em sucos gástrico e intestinal simulados. A adição de prebióticos

(galactooligossacarídeos ou inulina) durante a microencapsulação de *L. acidophilus* e *L. casei* aumentou a resistência dos microrganismos em trato gastrointestinal simulado, resultando em maior número de células (KRASAEKOOPT & WATCHARAPOKA, 2014).

Sathyabama et al. (2016) ao compararem a taxa de crescimento e fermentação de duas diferentes cepas probióticas na presença de diferentes prebióticos, observaram que a taxa de sobrevivência e tolerância das bactérias ao ambiente gastrointestinal simulado é cepa dependente. Apoiados nisso, os autores concluíram que há vantagem na adição de açúcar de beterraba e chicória em cápsulas de alginato na sobrevivência de *Streptococcus succinus* e *Enterococcus fecium*.

Krasaekoopt & Watcharapoka (2014) também acreditam que o efeito simbiótico dos probióticos e prebióticos depende da cepa probiótica utilizada. Yeo e Liong (2010) relataram diferença no crescimento de diferentes estirpes de lactobacilos e bifidobactérias encapsuladas com diferentes prebióticos e verificou que o fruto-oligossacarídeo aumentou apenas o crescimento de *Lactobacillus sp. FTDC 2133*, enquanto outros prebióticos não.

Portanto, esses autores defendem a existência de uma forte dependência entre o tipo de cepa probiótica utilizada e o tipo de substrato prebiótico escolhido para que o efeito simbiótico seja verificado, e consequentemente um efeito positivo adicional sobre a viabilidade e crescimento da cepa.

Por outro lado, é importante destacar que apesar de redução substancial na sobrevivência das bactérias encapsuladas com inulina, a contagem celular permaneceu acima de 6 log/UFC/ml, valor mínimo preconizado pela legislação internacional para que o iogurte possa exercer efeitos positivos à saúde.

Esses resultados indicam que apesar do decréscimo verificado na contagem de *L. rhamnosus*, nos três grupos estudados, durante condições gastrointestinais simuladas, a encapsulação em matriz alginato/quitosana ofereceu maior proteção às células quando comparadas as células livres. No entanto a presença de inulina não promoveu efeito positivo nessas mesmas condições.

Sendo assim, devido ao melhor desempenho apresentado, a formulação de “iogurte” com adição de *L. rhamnosus* encapsulados sem inulina foi selecionada para realização da análise sensorial.

7.5 Análise sensorial

A análise sensorial do produto foi realizada através do teste de aceitação e intenção de compra, desenvolvidos com a participação de 119 provadores não treinados. A equipe sensorial foi composta por 55% de mulheres e 45% de homens, com idade variando de 18 a 50 anos.

O “iogurte” de soja elaborado apresentou notas superiores a 6 em todos os atributos avaliados e, portanto, está dentro de um limite crítico de aceitação (nota 6,0 – “gostei ligeiramente”). Esse resultado pode ser considerado bom, levando-se em conta o fato do produto ser derivado de soja.

De acordo com Barbosa (2007), produtos a base de extrato de soja apresentam ainda sabor amargo provavelmente devido à presença de saponinas e isoflavonas, o que pode afetar negativamente a aceitabilidade desses produtos.

Apesar disso, o “iogurte” de soja apresentou índices de aceitabilidade superiores a 70% em todos os aspectos avaliados, apresentando boa repercussão de acordo com Dutosky (2009).

A saborização dos produtos derivados da soja pela adição de açúcar, agentes adoçantes ou geleia de frutas demonstra ser uma estratégia eficiente para minimizar o amargor do extrato e a acidez resultante do processo fermentativo (FERREIRA et al., 2000). Acredita-se que a presença da geleia de abacaxi na composição do “iogurte” foi determinante para produto alcançar bons resultados durante a análise sensorial, principalmente em relação ao atributo sabor.

De fato, o sabor tem papel de destaque na aceitação de alimentos, especialmente daqueles a base de soja, em função de características típicas como adstringência e sabor de feijão cru, consideradas desagradáveis ao paladar ocidental (LV et al., 2011).

De acordo com Chaves (1993) e Morales (1994), o atributo sabor é a combinação de três propriedades: odor, aroma e paladar. Portanto, sua mensuração e apreciação são mais complexas que cada uma dessas propriedades separadamente.

A avaliação do sabor em “iogurte” a base de extrato de soja e saborizado com geleia de abacaxi é importante, considerando o caráter inovador deste produto. Além disso, serve de subsídio para verificar se a fermentação do extrato de soja e subsequente saborização resulta em produto com características de sabor aceitáveis pelo consumidor.

Verifica-se na Tabela 7, que a nota média em relação ao sabor foi de 6,56, sendo acima do valor reportado por Rossi et al. (1999) durante o desenvolvimento de um “iogurte” à base de extrato hidrossolúvel de soja e potencialmente probiótico. Os autores verificaram pontuação média de 5,9 para o atributo sabor no produto formulado com as culturas de *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416.

Nos últimos anos, tem se observado esforços no sentido de desenvolver novos produtos a base de soja, tendo em vista a melhoria da qualidade sensorial do extrato hidrossolúvel de soja através de fermentação láctica e, ainda, da adição de sacarose, aromatizantes, saborizantes, entre outros (ROSSI et al., 1990; UMBELINO et al., 2001; MIGUEL et al., 2004; HAULY, 2005; MANZANO, 2007; CABRAL, 2009; ESTÉVEZ et al., 2010).

Cavallini et al. (2010) obtiveram médias entre 6 e 7, para um produto de soja fermentado com culturas *E. faecium* CRL183 e *L. helveticus* 416 e suplementado com isoflavonas. Kolling et al. (2014) desenvolveram uma formulação de “iogurte” de soja com adição de prebióticos com o objetivo de avaliar sua aceitação em estudantes de graduação de uma universidade no Rio Grande do Sul e encontram índices de aceitação próximos aos encontrados no presente trabalho. Barbosa (2007) elaboraram diferentes formulações de bebidas fermentadas a base de extrato soja com variações no teor de sacarose e polpa de pêssago e submeteram os produtos a análise sensorial. Os autores concluíram que os consumidores têm maior preferência por bebidas com maior teor de sacarose e atribui esse resultado ao fato de que a sacarose e o sabor característico de produtos fermentados mascaram o sabor amargo de produtos a base de soja tão indesejável pelos consumidores.

Quanto à atitude de compra, os consumidores mostraram intenção de compra duvidosa ($3,64 \pm 1,05$), ou seja, variando entre “provavelmente compraria” e “tenho dúvidas se compraria”. Esse resultado pode ser considerado esperado, por se tratar de um produto à base de soja submetido a pessoas que não possuem o hábito de consumir soja.

8. Conclusão

O “iogurte” de soja sabor abacaxi mostrou-se como uma boa opção para atender aos consumidores que buscam alimentos fermentados de origem vegetal, apresentando alto valor nutricional e boa aceitabilidade sensorial.

A tecnologia de encapsulação de *L. rhamnosus*, com e sem inulina, retardou a pós acidificação dos produtos durante armazenamento refrigerado e a presença de inulina potencializou esse resultado.

A matriz alginato/quitosana utilizada durante a encapsulação de *L. rhamnosus* desempenhou papel positivo na manutenção da viabilidade do microrganismo durante a vida de prateleira do “iogurte” de soja, bem como durante exposição às condições gastrointestinais simuladas.

A incorporação de inulina durante a encapsulação do probiótico favoreceu a manutenção da viabilidade da cepa durante estocagem do produto, embora esse efeito não tenha sido observado durante exposição ao ambiente gastrointestinal simulado.

Portanto, o “iogurte” de soja sabor abacaxi com adição de esferas de alginato revestidas com quitosana é uma boa maneira de administrar *L. rhamnosus*, mas a adição de inulina não demonstrou vantagens sobre a sobrevivência dessas células no intestino.

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.

ALMEIDA, J. dos S. O. de. *Avaliação do efeito protetor da matriz de queijo tipo mascarpone adicionado de Bifidobacterium BB-12*. 2016. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2016.

ARGENTA, A. B. et al. Desenvolvimento de queijo tipo minas frescal caprino adicionado de bactéria probiótica. *Revista thema*. v. 13, n. 3, 2016.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Selective and differential enumerations of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium* spp. in yogurt – a review. *International Journal of Food Microbiology*, v.149, n. 3, p. 194-208, 2011.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis, Methods AOAC, (991.14); (998.08); (967.26); (980.31), 2002.

APOLINÁRIO, A. C. et al. Inulin-type fructans: A review on different aspects of biochemical and pharmaceutical technology. *Carbohydrate Polymers*, Barking, v. 101, n. 30, p. 368- 378, 2014.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução-RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/33880/2568070/RDC_12_2001.pdf/15ffddf6-3767-4527-bfac-740a0400829b. Acesso em: 14 jun., 2015.

BRASIL. EMBRAPA. Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. Estabelecimento de Condições adequadas para obtenção de “leite” de soja integral. Rio de Janeiro: EMBRAPA, 2003.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº2 de 7 de Janeiro de 2002. Regulamento Técnico de substâncias bioativas e probióticos, isolados com alegação de propriedades funcionais ou de saúde. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Publicado no Diário Oficial da União em 9 de Janeiro de 2002, seção 1, p. 191. Atualizado em Julho de 2008.

BRASIL. ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. Diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/18_99.htm. Acesso em: 14 jun., 2015.

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

BABU, G.; NITHYALAKS, V. Influence of Prebiotic Composition on Probiotic Survivability in Calcium Alginate Coated Synbiotic Microcapsules at Thermal Incubation. *Agricultural Journal*, 2011

BARBOSA, E. G. *Prevalência de bactéria probiótica Lactobacillus acidophilus – NCFM em extrato de soja fermentado e saborizado com sacarose e polpa de pêssgo*. Dissertação. UFPEL, Pelotas, 2007.

BARCLAY, T. et al. Inulin – A versatile polysaccharide with multiple pharmaceutical and food chemical uses. *Journal of excipients and Food Chemicals*, v. 1, p. 27-50, 2010.

BEAL, C. Combined effects of cultures conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. *Journal of Dairy Science*, v. 28, n. 4, p. 673-681, 1999.

BEHRENS, J.H.; DA SILVA, M. A. A. P. Atitude do consumidor em relação à soja e produtos derivados. *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, Campinas, v. 24, n.3, p. 431-439, 2004.

BETORET, E, et al. Functional foods development: Trends and technologies. *Trends in Food Science & Technology*, v. 22, n. 9, p. 498–508, 2011.

BRINQUES. G.B.; AYUB, M.A.Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration and yogurt. *Journal of Food Engineering*, v.103, p.123-128, 2011.

BROWN, I. L. Complex carbohydrates and resistant starch. *Nutritional Review.*, v. 54, p.115-119, 1996.

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 Nutricion*, v. 57, p. 373- 380, 2007.

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

CABRAL, M. R. *Vitamina B12 e isoflavonas no extrato de soja adicionado de prebióticos e fermentado com probióticos*. Dissertação. Universidade Federal de Lavras, Minas Gerais, 2009.

CANDELA, M. et al. Interaction of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains with human intestinal epithelial cells: adhesion properties, competition against enteropathogens and modulation of IL-8 production. *Journal Food Microbiol*, v.125, p.286-292, 2008.

CASTRO-CISLAGHI, F.P. et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray-drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, v.113, p.186-193, 2012.

CASEMIRO, I. P; RAMOS, P. Produção científica sobre alimentos funcionais: uma análise das publicações brasileiras entre 2007 e 2013. *Demetra: alimentação, nutrição & saúde*, Rio de Janeiro, v.9, n. 4, p.925-994, 2014

CARVALHO, H. V. M. As Evidências dos Benefícios do Consumo das Isoflavonas da Soja na Saúde da Mulher: Revisão de Literatura. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v.16, n.4, p.353-359, 2014.

CHAMPAGNE, C.P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, v.149, p.185-193, 2011.

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.

CHAVES, J.B.P. Análise sensorial: histórico e desenvolvimento. Viçosa, Universidade de Federal de Viçosa, p.31, 1993.

CHARTERIS, W.P. et al. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. *Int. J. Dairy Technol.*, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CHEN, K. N. et al. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*. v. 70, p. 260-266, 2005.

CHUMCHUVERES, S.; ROBINSON, R.K. Selection of starter culture for the fermentation of soya milk. *Food Microbiology*, London, v.16, p.129-137, 1999.

COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.

COTRELL, I. W.; KOVASCS, P. Handbook of water soluble gums and resins. *New York: Mc GrawHill*, p. 360, 1980.

COUSSEMENT, P. A. A. Inulin and Oligofructose: Safe Intakes and Legal. *J. Nutr.*, v.129. p. 1412-1417., 1999.

COUTO, D.S; HONG, Z.; MANO, J.F. Development of bioactive and biodegradable chitosan-based injectable systems containing bioactive glass nanoparticles. *Acta Biomaterialia*, v. 5, p.115-123, 2009.

CORCORAN, B. M. et al. Survival of probiotic lactobacilli in acidic environments is enhanced in the presence of metabolizable sugars. *Appl Environ Microbiol.*, v.71, n.6, p.3060-7, 2005.

DAMIAN, C.; BEIRÃO, L. H.; FRANCISCO, A.; ESPÍRITO SANTO, M. L. P.; TEIXEIRA, E. Quitosana: um amino polissacarídeo com características funcionais. *Alimentos e Nutrição*, v. 16, n. 2, p. 195- 205, 2005.

DEL PIANO, M. et al. Probiotics: from research to consumer. *Digestive and liver disease*, v.38, n. 2, p-248-255, 2006.

DE VOS, P. et al. Encapsulation of preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v. 20, p. 292-302, 2010.

DE PRISCO, A. et al. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT - Food Science and Technology*, v.61, p. 452-462, 2015.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials in the stability of probiotic bacteria. *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 1003-1011, 2009.

DONKOR, O. N. et al. Survival and activity of selected probiotic organisms in set-type yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 657-665, 2007.

DUTCOSKY, S.D. Análise sensorial de alimentos. Curitiba: Champagnat, 2009.

ETCHEPAREI, M. A. et al. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. *Ciência Rural*. Online. Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2014.

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/WHO. Guideline for the evaluation of probiotic in food. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura, 2002.

FAO/WHO. Probiotics in food-health and nutritional properties and guidelines for evaluation. Organização das Nações Unidas para a Alimentação e Agricultura. v.85, p.1-48, 2006.

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

FERNANDEZ, C. E. ; BENTO, R. A. ; STAMFORD, T. L. M. . Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Higiene Alimentar**, v. 22, p. 16-21, 2008.

FERREIRA, V.L.P. Análise sensorial: testes discriminatórios e efetivos. Campinas-SP: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Manual: série qualidade, p.127, 2000.

FILHO, S.P.C et al. Extração, estruturas e propriedades de α - e β -quitina. *Quim. Nova*, v. 30, n. 3, p.644-650, 2007

FLAMM, G. et al. Inulin and oligofructose as dietary fiber: A review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 41, p. 353–362, 2001.

FRITZEN-FREIRE et al. Microcapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. v. 45, p. 306-312, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C.B. et al. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. *LWT-Food Science and Technology*, v.50, p.39-44, 2013.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of applied bacteriology*. v.66, p. 365-378, 1989.

GALLINAA, D. A. et al. Caracterização de Leites Fermentados Com e Sem Adição de Probióticos e Prebióticos e Avaliação da Viabilidade de Bactérias Lácticas e Probióticas Durante a Vida-de-Prateleira. *UNOPAR Cient Ciênc Biol Saúde*, v.13, n. 4, p. 239-44, 2011.

GANDOMI, H. et al. 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.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotic. *American Institute of nutrition*, p. 1401-1412, 1995.

GIBSON, G. R. et al. Dietary modulation of the human colonic microbiota: update on the concept of prebiotics. *Nutrition Research Review*, v. 17, p. 259-275, 2004.

GON, R.L.R. *Aplicação e viabilidade de L. acidophilus, Bifidobacterium, S. thermophilus microencapsulados em frozen yogurt de soja*. Dissertação. Universidade Tecnológica Federal do Paraná, 2014.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, n 7-8, p. 330-347, 2004.

HAMMES, W. P.; VOGEL, R. F. The genus *Lactobacillus*. *Glasgow, Blackie Academic & Professional*, 1995.

HAULY, M.C de O.; FUCHS, R.H.B.; PRUDENCIO FERREIRA, S.H. Suplementação de iogurte de soja com frutooligosacarídeos: Características probióticas e aceitabilidade. *Rev. Nutr. Campina*, p.18, n. 5, p.613-622, 2005.

HELLER, J. K. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. *American Journal of Clinical Nutrition*, v.73, p.374-379, 2001.

HELLAND, M. H; WICKLUND, T.; NARVHUS, J. A. Growth and metabolism of selected strains of probiotic bacteria, in maize porridge with added malted barley. *International Journal of Food Microbiology*, v. 91, n. 3, p. 305-313, 2004.

HEIDEBACH, T. et al. Microencapsulation of probiotic cell by means of rennet-gelation of milk proteins. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 1670-1677, 2009

HILL, C. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews. Gastroenterology & hepatology*, v. 11, p. 9, 2014.

HOLZAPFEL, W. H. et al. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. *Am J Clin Nutr.* v. 2; n. 73, 2001.

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. 2008.

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

JACKSON, C. J. C. et al. Effects of processing on the content and composition on of isoflavones during manufacturing of soy beverage and tofu. *Proscess Biochemistry*, Oxford, v. 37, n. 10, p 1117-1123, 2002.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. *Lebensmittel-Wissenschaft Technologie*, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S.L. Acidophilus and Bifidobacterium spp – Their therapeutic potential and survival in yogurt. *Australian Journal od Dairy Technology*, v.52, p.28-35, 1997.

KANDLER, O.; WEISS, N. Genus Lactobacillus Beijerinck 1901, 212AL. In Bergey's *Manual of Systematic Bacteriology*, v. 2, p. 1209–1234, 1986.

KNIGHT, H.; EDEN, J.A. Effects of phytoestrogens. *Obstetrics and Gynecology*, n.87, p.897-904, 1996.

KIM, S.J.S.Y. et al. Effect of micro encapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. *LWT - Food Sciance and Technology*, v.3, p. 493–500, 2008.

KOLLING A; LEHN, D; SOUZA, C. F. V. Elaboração, caracterização e aceitabilidade de “iogurte” de soja com adição de prebiótico. *Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial*. v. 08, n. 02, p. 1545-1556, 2014.

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.; 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, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p. 737-743, 2014.

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, 2014.

KOO, S. et al. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. *J. Microbiol. Biotechnol.*, v.11, p. 376–383, 2001.

KORBEKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A.M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotics In: Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to the human health. SHAH, N.P.; DA CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. *Nova Science Publishers*, USA, 2011.

KUMAR, M. et al. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the prevention of colon cancer. *Nutr. Rev.* 71, 23–34, 2013.

LARANJEIRA, M. C. M.; FÁVERE, V. T. Quitosana: biopolímero funcional com potencial industrial biomédico. *Química Nova*, v.32, n.3, p.672-678, 2009.

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.

LEOLORSPOEN, N. et al. Microencapsulação of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods*, v 7, p.342 – 349, 2014.

LI, X.Y et al. 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.

LV, Y. C. et al. Influence of blanching and grinding process with hot water on beany and non-beany flavor in soymilk. *Journal of Food Science*, v. 76, p. 20 – 25, 2011.

LIMA, J. R. et al. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. *Revista Ciência & Saúde*, v. 7, n. 1, p. 27–34, 2014.

MADRIGAL, L.; SANGRONIS, E. La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*, v. 57, n. 4, p. 387-396, 2007.

MATSUMOTO, M. et al. Promotion of intestinal peristalsis by *Bifidobacterium* spp. capable of hydrolysing sennosides in mice. *PLoS ONE*, v.7, n. 2, 2012.

MAZMANIAN SK, LIU CH, TZIANABOS AO, KASPER DL 2. An immunomodulatory molecule of symbiotic bacteria directs maturation of the host immune system. *Cell*, v.122, p.107–118, 2005.

MANDAL, S; PUNIYA, A. K. SINGH, K. Effect of alginate concentration on survival of encapsulated *Lactobacillus casei* -298. *International Dairy Journal*, v. 16, p. 1190-1196, 2006.

MANZANO, G.P.P. Aspectos sensoriais e físico-químicos de iogurtes de soja com espessantes/estabilizantes à base de fécula de inhame (*Dioscorea alata*), amido modificado e gelatina. Dissertação. UNESP, São Paulo, 2007.

MARTINS, G. H.; KWIATKOWSKI, A.; BRACHT, L.; SRUTKOSKE, C.L de Q., HAMINIUK, C. W. I. Perfil físico-químico, sensorial e reológico de iogurte elaborado com extrato hidrossolúvel de soja e suplementado com inulina. *Rev. Brasileira de Products Agroindustriais*, Campina Grande, v. 15, n.1, p.93-102, 2013.

MAESTRI, B. Avaliação do impacto da adição de inulina e de maçã em leite fermentado probiótico concentrado. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 17, n. 1, p. 2014.

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.

MARTEAU, P. et al. Survival of lactic acid bacteria in a dynamic model of the stomach and small intestine: Validation and the effects of bile. *Journal Dairy Science*, v.80, p.1031-1037, 1997.

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

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. *Carbohydrate Polymers*, v. 134, n. 10, p. 418-428, 2015.

MIQUEL, P. R.; MARMITT, T.; SCHLABITZ ITZ, C.; HAUSCHILD, F. A.D; SOUZA, C.F.V. Desenvolvimento e caracterização de “iogurte” de soja sabor morango produzido com extrato de soja desengordurado enriquecido com cálcio. *Rev. Alim. Nutr. Araraguara*, v. 21, n.1, p.57-63, 2010.

MIRZAEI, H. et al. Effect of calcium alginate and resist and starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian White brined cheese. *Food Chemistry*, v. 132, p.1966-1970, 2012.

MORALES, A. A. La evaluación sensorial de los alimentos en la teoría y la práctica. España. Acribia, p.184, 1994.

MORTAZAVIAN, A.M. et al. Preliminary investigation of the combined effect of heat treatment and incubation temperature on the viability of the probiotic microorganisms in freshly made yoghurt. *International Journal of Dairy Technology*, v.59, p.8-1, 2006.

MURATA, Y. et al. Preparation of chitosan-reinforced alginate gel beads-effect of chitosan on gel matrix erosion. *International Journal of Pharmaceutics*, v.96, p. 139–145, 1993.

NAZARRO, F; FRATIANNI, F; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, v. 1, n. 3, p. 319–323, 2009.

NUNES, J. S.; SOUSA, E. P. de; CASTRO, D. S. de; SILVA, L. S. M, MOREIRA, I. S. Avaliação do perfil físico e reológico de bebida de soja sabor iogurte com polpa de morango. *Revista Verde*, Rio Grande do Norte, v. 9, n.1, p.229-233, 2014.

O’SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures in: Probiotics in food safety and human health. Boca Raton: Taylor e Francis, 2006.

PAK, N. Inulina y fructooligosacaridos: propiedades nutricionales y funcionales. In: LAJOTO, F.M.; MENEZES, E.W. de. Carbohidratos em Alimentos regionales iberoamericanos. São Paulo: Edisp, p.337-356, 2006.

PEIXOTO, J. C. et al. Benefícios da soja no controle da obesidade. *Revista Eletrônica Novo Enfoque*, v. 12, n. 12, p. 47–67, 2011.

PINTO, S.S. Efeito da adição de bifidobacterium BB-12 microencapsulada sobre propriedades de frozen iogurte. Dissertação. Universidade Federal de Santa Catarina, UFSC, 2012.

PREZZI, LIGIA, ELEONOR. Efeito da adição de Lactobacillus rhamnous em queijos minas frescal sobre as contagens de Staphylococcus aureus e listeria monocytogenes Dissertação. Pirassunga. USP, 2014.

RAJAM, R. *et al.* Microencapsulation of Lactobacillus plantarum MTCC 5422 in fructooligosaccharide and whey protein wall systems and its impact on noodle quality. *Journal of Food Science and Technology*, v. 52, n. 7, p. 4029–4041, 2015.

RIBEIRO, M.C.E. Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de Lactobacillus acidophilus livre e encapsulado. Dissertação. Universidade Estadual de Campinas, Campinas, São Paulo, 2011.

ROKKA, S.; RANTAMAKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges of industrial applications. *European Food Research and Technology*, v. 231, p. 1-12, 2010.

RONKART *et al.* Determination of physical changes of inulin related to sorption isotherms: An X-ray diffraction, modulated differential scanning calorimetry and environmental scanning electron microscopy study. *Carbohydrate Polymers*, v. 63, p. 210–217, 2006.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients. *The Journal of Nutrition*, v. 137, p. 2493-2502, 2007.

RODRIGUES, D. *et al.* Storage Stability of Lactobacillus paracasei as Free Cells or Encapsulated in Alginate-Based Microcapsules in Low pH Fruit Juices. *Food and Bioprocess Technology*, v.5, n.7, p.1-10, 2011.

ROSSI, E. A.; FARIA, J. B.; BORSATO, D.; BALDOCHI, F. L. Otimização de um sistema estabilizante para o “iogurte” de soja. *Alimentos e Nutrição*, v. 2, p. 83-92, 1990.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p.1-16, 2006.

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

SALADO, G.A.; ANDRADE, O. Processamento e qualidade nutricional do iogurte. *Boletim Cultural*, v.7, p.1-35, 1989.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. *Nutr. Rev.*, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003.

SATHYABAMA, S. *et al.* Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. *LWT - Food Science and Technology*, v. 57, n. 1, p. 419–425, 2014.

SHAH, N. P. Functional cultures and helth benefits. *International Dairy Journal*, v. 17, p. 1262 – 1277, 2007.

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

SILVA, K.M.C. *et al.* Soja (glycine max) beneficis a saúde humana com melhor qualidade de vida. IX Jornada de Ensino, pesquisa e extensão. Semana Nacioanl de Ciência e Tecnologia, 2009.

SMIDSRD, O.; SKJAK-BRAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends Biotechnol.* v.8, n.3, p.71-8, 1990.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival on daity foods. *Journal of Dairy Science*, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHOAIB, M. *et al.* Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydrate Polymers*, v.147, p. 444–454, 2016.

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

SOHAIL, A. *et al.* Survivability of probiotics encapsulated in slginate gel microbeads using a novel impinging aerosoes method. *International Journal of Food Microbiology*, v. 145, p. 162-168, 2011.

SOUZA, A.F. de. Estudo da viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras alimentares. Dissertação. USP. São Paulo, 2015.

STANTON, C. et al. Market potential for probiotics. *American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, p.476-483, 2001.

SULTANA et al. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of food microbiology*, v. 62, p. 47-55, 2000.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E 800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. *International Dairy Journal*. v.19, p.209-214, 2009.

TEIXEIRA, A. C. M; OSELAME, C. S. O uso de alimentos funcionais no cotidiano e seus benefícios a saúde. *Kur'yt'yba*, v.5, n.1, 2013.

TRINDADE, C.S.F.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *Lactobacillus* (LA-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, n. 4, p.485-494, 2002.

UMBELINO, D. C.; CARDELLO, H.M.; ROSSI, E.A. Efeito de diferentes sais de ferro sobre as características sensoriais do "iogurte" de soja. *Arch Latinoam Nutr.*, v.51, n.2, p.199-203., 2001.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, p.714-728, 2008.

VODNAR, D. C., SOCACIU, C. Metabolic Activity and Behavior of *Lactobacillus Casei* During Fermentation and Microencapsulation. *Bulletin UASVM Agriculture*, v.68, n. 2, 2011.

VORAGEN A.G. Technological aspects of functional food-related carbohydrates. *Trends Food Sci. Technol.* v.9, p.328–335, 1998.

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.

WU, Q. X.; LIN, D.Q.; YAO, S.J. Design of Chitosan and Its Water Soluble Derivatives-Based Drug Carriers with Polyelectrolyte Complexes. *Mar Drugs*, v.12, n.12, P.6236-6253, 2014.

YONEKURA et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 by spray drying: impact of soluble fibres on storage stability and survival after in vitro digestion. *Journal of Functional Foods*, 2013.

YEO S.K.; LIONG, M. T. Effect of prebiotics on viability and growth characteristics of probiotics in soymilk. *J Sci Food Agric.*, v. 30, n.2, p.267-75, 2010.

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

Convido o (a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa que tem como título “**Influência da encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* em matriz alginato quitosana adicionados em “iogurte” a base de soja**”, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Hayane Ferreira Leite Ladislau, Telefone: 98703 2743, e-mail: rayane_leite@hotmail.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, 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.

Informações sobre a pesquisa:

- Esta pesquisa consiste na encapsulação do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* (bactéria benéfica à saúde) que será adicionado no “iogurte” de soja, com o objetivo de verificar se o probiótico revestido (em cápsulas comestíveis) possui uma maior sobrevivência que o não revestido. Através dos dados da análise sensorial, poderá ser avaliada a aceitação desse novo produto e a intenção de compra, caso ele seja comercializado.
- O participante será convidado a provar uma amostra de “iogurte” 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) e a soja não devem participar da análise. Este risco será amenizado através de esclarecimento sobre as substâncias constituintes do “iogurte” 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, CEP: 50740-600, Tel.: (81) 2126.8588 – email: cepcs@ufpe.br).

(assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, RG/ CPF/_____, abaixo assinado, concordo em participar deste estudo, 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 meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade ou interrupção de meu acompanhamento/ assistência/tratamento.

Recife, ____/01/ 2017

Assinatura do participante: _____

Testemunha 1	Testemunha 2:
--------------	---------------

APÊNDICE B - Ficha da Análise Sensorial

NOME: _____

SEXO: _____

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

1. TESTE DE ACEITABILIDADE

Você está recebendo uma amostra de “iogurte” de soja sabor abacaxi. 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 “iogurte” de soja sabor abacaxi. 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

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanas		UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	---	--	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INFLUÊNCIA DA CO-ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* COM INULINA EM MATRIZ ALGINATO DE CÁLCIO-QUITOSANA ADICIONADOS EM IOGURTE DE SOJA

Pesquisador: Hayane Ferreira Leite Ladislau

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 51473115.7.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.401.778

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de mestrado da Pós-Graduação em Nutrição/UFPE, sob orientação da Prof. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford. A manutenção da estabilidade e funcionalidade de probióticos durante o processamento e estocagem do alimento, bem como durante passagem pelo intestino, ainda representa um desafio tecnológico a ser contornado pela indústria alimentícia. Diante disso, a técnica de co-encapsulação, que tem como princípio a associação de pré e probióticos em matrizes poliméricas, tem sido investigada para aumentar a viabilidade e sobrevivência desses microrganismos. Considerando a tendência mais recente do mercado de alimentos funcionais para o desenvolvimento de produtos probióticos de origem vegetal, esse estudo propõe o desenvolvimento de um iogurte à base de soja com adição de inulina e *Lactobacillus acidophilus* encapsulados em matriz alginato de cálcio-quitosana.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a influência da co-encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* com inulina em matriz alginato de cálcio-quitosana durante a vida de prateleira de iogurte à base de soja.

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)2126-9588	E-mail: cepccs@ufpe.br	

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanas



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



Continuação do Parecer: 1.401.778

Objetivo Secundário:

• Produzir e caracterizar as cápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo o probiótico *L. acidophilus* e Inulina; • Produzir e caracterizar o iogurte de soja com acréscimo *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina; • Determinar a viabilidade do *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina durante armazenamento refrigerado; • Testar a sobrevivência do *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina simulando condições gastrointestinais *in vitro*; • Determinar as propriedades físico-químicas do iogurte contendo *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina; • Determinar as propriedades microbiológicas do iogurte contendo *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina; • Analisar sensorialmente os atributos de qualidade para iogurte de soja contendo *L. acidophilus* encapsulados com e sem Inulina durante o período de armazenamento dos produtos.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Bem delineados no projeto e TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Considerando a tendência mais recente do mercado de alimentos funcionais e a limitação na variedade de produtos probióticos de origem vegetal disponíveis atualmente, esse estudo propõe o desenvolvimento de um iogurte à base de soja com adição de Inulina e *Lactobacillus acidophilus* encapsulados, visando atuar benéficamente na saúde do consumidor.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados em qualidade e quantidade, com TCLE claro e carta de anuência, dentro das normas do CEP.

Recomendações:

Nenhuma

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",

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

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos



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



Continuação do Parecer: 1.401.778

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_631073.pdf	01/12/2015 01:08:05		Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLECORRIGIDO.doc	01/12/2015 01:07:21	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCORRIGIDO.doc	01/12/2015 01:00:03	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
Outros	Hayane.doc	24/11/2015 12:32:22	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
Outros	Thayza.doc	24/11/2015 12:31:55	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
Outros	Tania.doc	24/11/2015 12:31:19	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
Outros	anuencia.doc	24/11/2015 12:24:48	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto

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

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Serres Humanas	CEP-CES-UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
--	--------------	--	---

Continuação do Parecer: 1.401.778

Folha de Rosto	folha.doc	24/11/2015 12:20:30	Hayane Ferreira Leite Ladislau	Acelto
----------------	-----------	------------------------	-----------------------------------	--------

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 03 de Fevereiro de 2016

Assinado por:
LUCIANO TAVARES MONTENEGRO
(Coordenador)