

**MILENA PACHECO MARTIN BOSCAROLI**

**INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICOS NA ENCAPSULAÇÃO DE  
BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ADICIONADAS EM SORVETE**

**SÃO CAENTANO DO SUL**

**2010**

**MILENA PACHECO MARTIN BOSCARIOLI**

**INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICOS NA ENCAPSULAÇÃO DE  
BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ADICIONADAS EM SORVETE**

Dissertação apresentada a Escola de Engenharia  
Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de  
Tecnologia para obtenção do título de Mestre em  
Engenharia de Processos Químicos e  
Bioquímicos.

Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de  
Processos Industriais e Embalagem

Orientadora: Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz  
Kunigk

**SÃO CAENTANO DO SUL**

**2010**

Boscarioli, Milena Pacheco Martin

Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete / Milena Pacheco Martin Boscarioli. — São Caetano do Sul, SP : CEUN-EEM, 2010.

73 p.

Dissertação de Mestrado — Programa de Pós-Graduação. Linha de Pesquisa: Análise e Otimização de Processos Industriais e Embalagem — Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP, 2010.

Orientador: Profa. Dra. Cynthia Jurkiewicz Kunigk

1. – Probiótico. 2. Prebiótico. 3. Microencapsulação. 4. Sorvete. I. Instituto Mauá de Tecnologia. Centro Universitário. Escola de Engenharia Mauá. II. Título.

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus por tudo.

Ao meu marido Rubens Paschoal Boscarioli, pais e irmãos pelo carinho, apoio e incentivo.

À Professora Dr<sup>a</sup> Cynthia Jurkiewicz Kunigk pela oportunidade, orientação, paciência, amizade e apoio durante todo o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Dr<sup>a</sup> Eliana de Paula Ribeiro e Alcina Maria Liserre pelas sugestões dadas a esta dissertação.

Ao CAPES pela concessão da bolsa de estudos e às empresas Danisco Brasil Ltda., National Starch, Colloides Naturals Brasil, Vogler Ingredients e Givaldan pelas amostras fornecidas.

Ao Instituto Mauá de Tecnologia pelo fornecimento do material utilizado, equipamentos e espaço que viabilizaram a execução deste trabalho.

Aos técnicos Rubia, Sidnei, Douglas e Inês da Escola de Engenharia Mauá, pela assessoria prestada.

## RESUMO

Os microrganismos probióticos, *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* BI-04, foram encapsulados em alginato de cálcio e também em alginato de cálcio contendo um dos ingredientes prebióticos (amido resistente ou goma acácia). A sobrevivência dos probióticos encapsulados foi avaliada após a secagem em secador de bandejas a 38°C por 4 h e em sorvete de base láctea, armazenado durante 210 dias a -18 °C. A influência dos microrganismos encapsulados na aceitação sensorial do sorvete também foi avaliada. Através da tecnologia de encapsulação utilizada foi possível obter cápsulas com população inicial de ambos os microrganismos, de 10<sup>9</sup> UFC/g. A goma acácia e o amido resistente não influenciaram significativamente o diâmetro das cápsulas que apresentaram em média, 427 ± 11 µm. A secagem das cápsulas reduziu significativamente a população dos microrganismos probióticos em todos os tratamentos estudados, entretanto a presença de goma acácia aumentou a sobrevivência de ambos os microrganismos após a secagem em secador de bandejas, enquanto o amido resistente favoreceu apenas a sobrevivência de *L. acidophilus*. O congelamento do sorvete não reduziu a população dos microrganismos probióticos encapsulados ou mesmo quando adicionados livres. A encapsulação e a presença dos prebióticos não influenciaram significativamente a sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* no sorvete armazenado por 210 dias, enquanto a sobrevivência de *L. acidophilus* foi favorecida no sorvete com microrganismo encapsulado em alginato de cálcio contendo goma acácia. Após 210 dias de armazenamento, a população de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* permaneceu acima de 10<sup>7</sup> e 10<sup>8</sup> UFC/g, respectivamente, em todas as condições avaliadas, indicando que o sorvete pode ser considerado um veículo adequado para incorporação de probióticos. Não houve diferença significativa na aceitação sensorial do sorvete com e sem microrganismos encapsulados.

Palavras chaves: Probióticos. Prebióticos. Encapsulação. Sorvete.

## ABSTRACT

The probiotics, *Lactobacillus acidophilus* NCFM and *Bifidobacterium lactis* BI-04, were encapsulated in calcium alginate beads and also in calcium alginate containing prebiotics ingredients (resistant starch or acacia gum). The survival of encapsulated probiotics was evaluated when dried in a tray drier at 38 °C for 4 h and also in dairy ice cream stored at -18 °C for 210 days. The influence of encapsulated microorganisms in the acceptability of ice cream was also evaluated. The results showed that the used encapsulation technology allowed to obtain beads with initial population of both microorganism of  $10^9$  cfu/g. The mean diameter of beads was  $427 \pm 11$   $\mu$ m and there was no significant influence of acacia gum and resistant starch. The drying process significantly reduced the population of encapsulated probiotic microorganisms in all treatments. However the presence of acacia gum increased the survival of both microorganisms after drying in a tray drier, while the resistant starch only favored the survival of *L. acidophilus*. The frozen process did not reduce the population of free cells or encapsulated probiotics in ice cream. The encapsulation and the presence of prebiotics did not influence the survival of *Bifidobacterium lactis* in ice cream stored for 210 days while the survival of *L. acidophilus* was favored in ice cream with microorganisms encapsulated in calcium alginate containing acacia gum. After 210 days of storage, the population of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* remained above  $10^7$  and  $10^8$  cfu/g, respectively, in all conditions, indicating that ice cream can be considered a suitable vehicle for probiotic incorporating. The addition of encapsulated probiotics had no significant effect on sensory acceptability of ice cream.

Key words: Probiotics. Prebiotics. Microencapsulation. Ice cream.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1: Processo de encapsulação .....	39
Figura 2: Sistema de encapsulação dos microrganismos probióticos .....	40
Figura 3: Massa das cápsulas (m) em função do tempo de secagem (t). .....	49
Figura 4: População de <i>B. lactis</i> antes do congelamento (calda) e durante o armazenamento do sorvete.....	55
Figura 5: População de <i>L. acidophilus</i> antes do congelamento (calda) e durante o armazenamento do sorvete.....	57
Figura 6: Aceitabilidade dos provadores para a amostra A.....	63
Figura 7: Aceitabilidade dos provadores para a amostra B.....	63

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Formulação do sorvete.....	43
Tabela 2: População de <i>L. acidophilus</i> (Log UFC/g) nas cápsulas antes e após a secagem.....	48
Tabela 3: Média e desvio padrão (DP) da população de <i>L. acidophilus</i> e <i>B. lactis</i> (Log UFC/g) nas cápsulas antes e após a secagem para os três tratamentos T1, T2 e T3.....	50
Tabela 4: Umidade (%) das cápsulas antes e após a secagem para os três tratamentos T1, T2 e T3.....	52
Tabela 5: Média e desvio padrão de atividade de água das cápsulas produzidas conforme os tratamentos T1, T2 e T3 .....	52
Tabela 6: Diâmetro médio das cápsulas produzidas conforme os tratamentos T1, T2 e T3.....	53
Tabela 7: População de <i>B. lactis</i> , Log UFC/g (média $\pm$ desvio padrão) na calda (antes do congelamento) e no sorvete durante a estocagem, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente). ....	55
Tabela 8: População de <i>L. acidophilus</i> , Log UFC/g (média $\pm$ desvio padrão) na calda (antes do congelamento) e no sorvete durante a estocagem, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente). ....	57
Tabela 9: Diferença (média $\pm$ desvio padrão) no número de <i>L. acidophilus</i> (Log UFC/g), em relação ao número na calda, durante e estocagem do sorvete, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente). ....	58
Tabela 10: Composição centesimal do sorvete (média $\pm$ desvio padrão) .....	61



## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	12
2. OBJETIVOS.....	15
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	16
3.1 PROBIÓTICOS.....	16
3.1.1 <i>Lactobacillus</i> e <i>Bifidobacterium</i> .....	19
3.2 PREBIÓTICOS .....	20
3.2.1 Goma Acácia.....	22
3.2.2 Amido Resistente .....	23
3.3 SIMBIÓTICOS .....	26
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO .....	27
3.5 SORVETE.....	32
4. MATERIAL E MÉTODOS .....	36
4.1 DESENVOLVIMENTO EXPERIMENTAL .....	36
4.1.1 Influência do processo de secagem em estufa com circulação de ar na sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> encapsulados.....	36
4.1.2 Influência do processo de secagem em secador de bandejas na sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> encapsulados ..	36
4.1.3 Influência de prebióticos na sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i> encapsulados durante o processamento e armazenamento de sorvete	37
4.2 PREBIÓTICOS .....	37
4.3 CULTURAS PROBIÓTICAS.....	37
4.4 ENCAPSULAÇÃO .....	38
4.5 SECAGEM.....	41
4.5.1 Secagem em estufa com circulação de ar .....	41

4.5.2	Secagem em secador de bandejas .....	41
4.6	PRODUÇÃO DO SORVETE.....	42
4.7	METODOLOGIA ANALÍTICA.....	43
4.7.1	Análise Microbiológica.....	43
4.7.2	Umidade e Atividade de Água.....	45
4.7.3	Diâmetro das Cápsulas .....	46
4.7.4	Análises Físico-Químicas do Sorvete.....	46
4.8	ANÁLISE SENSORIAL .....	46
4.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	47
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	48
5.1	INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> ENCAPSULADOS.....	48
5.2	INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM EM SECADOR DE BANDEJAS NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> E <i>BIFIDOBACTERIUM LACTIS</i> ENCAPSULADOS .....	49
5.3	INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICOS NA SOBREVIVÊNCIA DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> E <i>BIFIDOBACTERIUM LACTIS</i> ENCAPSULADOS DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SORVETE .....	54
5.3.1	Análises do sorvete .....	61
5.3.2	Análise Sensorial .....	62
6.	CONCLUSÕES.....	64
	BIBLIOGRAFIA.....	65
	ANEXO A - Ficha da análise sensorial.....	73

## 1. INTRODUÇÃO

Atualmente há um grande interesse dos consumidores por uma alimentação saudável, que favoreça o bem estar físico e auxilie na prevenção de doenças. Para atender a esta demanda, a indústria de alimentos busca cada vez mais inovações, sem deixar de lado a preocupação com as características sensoriais do produto, fato que tem ocasionado um aumento no mercado de alimentos funcionais. Segundo a Associação Brasileira da Indústria de Alimentos Dietéticos e para Fins Congêneres, estima-se que o mercado de alimentos funcionais esteja por volta dos 60 milhões de dólares no mundo e que o avanço deste tipo de alimento gira em torno de 20% ao ano (AGÊNCIA BRASIL, 2008).

Alimentos funcionais são aqueles que além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica. Os efeitos funcionais dos alimentos devem ser referentes à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e à redução de riscos de doenças e não à cura de doenças (SANDERS 2003; ANVISA 1999). Os prebióticos e probióticos são exemplos atuais de ingredientes alimentares funcionais.

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, que administrados em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; SANDERS, 2003). Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são exemplos de microrganismos probióticos empregados em diversos alimentos atualmente comercializados. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis. No Brasil a legislação estabelece que a quantidade mínima de bactérias probióticas viáveis no alimento deve estar situada entre  $10^8$  a  $10^9$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (ANVISA, 2008).

Os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação e/ou

atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995; CHARALAMPOPOULOS et al., 2003). Entre os prebióticos destacam-se os frutoligossacarídeos (FOS), a inulina e o amido resistente (SIRÓ et al., 2008).

A utilização de microrganismos probióticos em alimentos é limitada principalmente a iogurtes e outros leites fermentados devido a uma grande dificuldade em mantê-los viáveis durante o processo e a vida de prateleira do produto. Leites fermentados, iogurtes e alguns queijos são considerados adequados para a incorporação de probióticos, pois são alimentos com vida de prateleira relativamente curta e são mantidos sob refrigeração.

As características físico-químicas, a formulação, a matriz do alimento e o processamento devem ser avaliados durante o desenvolvimento de novos produtos probióticos de modo a permitir uma maior sobrevivência das bactérias. Além das características do produto, muitas vezes é necessária a aplicação de tecnologias que possam proteger os microrganismos não só no processamento e armazenamento do produto, como também durante a passagem pelo trato gastrointestinal (KUSHAL et al., 2005). A tecnologia de encapsulação de bactérias em alginato de cálcio tem sido aplicada e em muitos casos resultado no aumento da sobrevivência dos microrganismos em diversos alimentos e também durante o trânsito intestinal (SHEU & MARSHAL, 1993; SULTANA et al., 2000; ANNAN et al., 2008).

Existem diversos estudos mostrando que o sorvete é um excelente alimento para incorporação de culturas probióticas, pois é um produto com composição favorável (pH, teor de gordura, proteínas, etc.), além de ser um produto com alta aceitabilidade de consumidores de várias faixas etárias. Entretanto o congelamento e a presença de oxigênio são fatores que podem prejudicar a sobrevivência de bactérias probióticas (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010; CRUZ et al., 2009; TURGUT & CAKMAKCI, 2009; HAMAYOUNI et al., 2008; AKALIN & ERISIR, 2008).

Considerando a limitação na variedade de produtos probióticos disponíveis atualmente, esse trabalho tem como objetivo avaliar a influência de diferentes agentes prebióticos e da tecnologia de encapsulação na sobrevivência de microrganismos probióticos durante o processamento e estocagem de sorvete.

## 2. OBJETIVOS

- Desenvolver uma tecnologia para a encapsulação de microrganismos probióticos em alginato de cálcio contendo ingredientes prebióticos.
- Avaliar a influência de prebióticos (amido resistente e goma acácia) na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados em alginato de cálcio e submetidos a processos de secagem;
- Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* livres e encapsulados com e sem prebiótico no processamento e armazenamento de sorvete.

### **3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA**

#### **3.1 Probióticos**

O termo probiótico deriva do grego e significa “pró-vida”, sendo o antônimo de antibiótico, que significa “contra a vida”. Apesar da definição do termo probiótico ter surgido na década de 90, o interesse pelo assunto vem de tempos remotos. Em 1899, Tissier isolou bifidobactérias de fezes de recém nascidos e aproximadamente na mesma época, em 1910, Metchnikoff afirmou que o consumo regular de leite fermentado ofereceria efeito benéfico à saúde. FULLER em 1989 definiu os probióticos como “suplemento alimentar composto de células microbianas vivas, as quais têm efeito benéfico para o hospedeiro, por melhorar ou manter o equilíbrio microbiano no intestino”. Mais recentemente os probióticos foram definidos como: “microrganismos vivos que administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. A dose terapêutica de probióticos pode variar com a linhagem de microrganismo e com o benefício à saúde desejado. Recomenda-se que a população de probióticos no alimento, no momento do consumo, deva estar entre  $10^6$  a  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama (FAO/WHO, 2002; SANDERS, 2003; CRUZ et al., 2009). No Brasil, a legislação vigente determina que a quantidade mínima necessária de microrganismos probióticos esteja na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  unidades formadoras de colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para consumo (ANVISA, 2008).

A resolução n° 2 de janeiro de 2002 (regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcionais e/ou saúde) estabelece que os probióticos não podem ter finalidade medicamentosa ou terapêutica qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como é ministrado. Deve ser seguro para o consumo humano, sem a necessidade de orientação e/ou acompanhamento médico, a não ser que seja dirigido a grupos populacionais específicos (ANVISA, 2002).

O microrganismo para ser classificado como probiótico deve apresentar as características descritas a seguir (SUSKOVIC et al., 2001):

- Ter identificação taxonômica exata;
- Ser geneticamente estável;
- Ser habitante normal das espécies alvo: origem humana para probióticos humanos;
- Ser atóxico e não patogênico;
- Aderir e colonizar o cólon;
- Sobreviver, proliferar e estimular as atividades metabólicas no trato gastrointestinal;
- Resistir ao suco gástrico e à bile;
- Competir no trato gastrointestinal, resistir a bacteriocinas, ácidos e outras substâncias antimicrobianas produzidas pela microbiota residente;
- Ser antagonista a patógenos;
- Exercer efeitos benéficos à saúde (documentados e validados clinicamente);

As culturas probióticas ao serem ingeridas através dos alimentos vão para o intestino e ali se somam à microbiota já existente, aumentando a população de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e auxiliando a absorção dos nutrientes (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).



Podem-se destacar três possíveis mecanismos de atuação de bactérias probióticas, sendo o primeiro a supressão de microrganismos patogênicos no trato intestinal por produção de substâncias antibacterianas, como por exemplo, ácido láctico, ácido acético, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, além de competição por nutrientes e por sítios de adesão no epitélio intestinal. O segundo seria a alteração do metabolismo microbiano no trato intestinal através do aumento da atividade de enzimas benéficas, como a  $\beta$ -galactosidase, que é responsável pela digestão da lactose, e redução da atividade de enzimas presentes no colón com efeitos cancerígenos, como a  $\beta$ -glucuronidase,  $\beta$ -glucosidase e nitroredutase. O terceiro seria a estimulação da imunidade do hospedeiro, através do aumento do nível de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos (SUSKOVIC et al., 2001; ROY, 2005; SAAD, 2006).

Os principais microrganismos probióticos empregadas nos alimentos são espécies de lactobacilos e bifidobactérias, como por exemplo, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum* (TERGUT & CAKMAKCI, 2009; HAMAYOUNI et al., 2008; KALAIAPATHY & SULTANA, 2003).

Vários benefícios à saúde, produzidos por bactérias probióticas, têm sido relatados na literatura, dentre os quais se destacam: equilíbrio da microbiota intestinal; redução dos níveis de colesterol; redução do risco de câncer; redução dos sintomas de indivíduos com intolerância à lactose, devido à produção da enzima lactase que facilita a digestão da lactose; aumento do valor nutritivo e terapêutico dos alimentos devido ao aumento dos níveis de vitaminas do complexo B e aminoácidos, além de uma maior absorção de cálcio e ferro; e fortalecimento do sistema imunológico (GOMES & MALCTA, 1999; FOOKS et al., 1999; KRASAEKOOPT et al., 2003).

Os produtos probióticos encontrados no mercado são em sua maioria iogurtes e outros leites fermentados, pois apresentam condições favoráveis para a multiplicação ou sobrevivência dos microrganismos, além de serem conservados sob refrigeração e apresentarem uma vida de prateleira relativamente curta. Porém, como os alimentos funcionais, em especial os probióticos, apresentam uma forte tendência de mercado, existem diversos estudos mostrando a aplicação destes

microrganismos em queijos de diferentes tipos, sorvetes, mousse, sucos, entre outros (GODWARD & KAILASAPATHY, 2003; CARDARELLI et al.; 2008; DING & SHAH, 2008, SHAH & RAVULA; 2000, ÖZER et al.; 2008, AKIN, 2005).

### 3.1.1 *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*

O gênero *Lactobacillus* é formado por microrganismos gram-positivos, não formadores de esporos, e que sobrevivem na presença de pequenas quantidades de oxigênio. Pertencem ao grupo das bactérias lácticas e algumas espécies fazem parte da microbiota natural de humanos (intestino delgado e colón). Sua fonte de energia é proveniente do metabolismo fermentativo sendo o ácido láctico o produto final da degradação de carboidratos, motivo pelo qual sobrevive em ambientes ácidos (concentrações entre 0,3% e 1,9%). O pH ótimo de crescimento está na faixa de 5,5 a 6,0 e temperatura ótima entre 35 e 40°C, mas crescem em temperaturas mais elevadas (até 45°C). As espécies, *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. reuteri* e *L. rhamnosus* são os principais probióticos do gênero atualmente empregados em alimentos. Estes microrganismos são tolerantes ao ácido e a bile presente no trato gastrintestinal e são capazes de aderir às células do epitélio intestinal (GOMES & MALCATA, 1999; GOKTEP et al., 2006).

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* são bastonetes anaeróbios, gram-positivos, não formam esporos e não apresentam mobilidade. Fermentam diversos açúcares (glicose, galactose, lactose e frutose) produzindo ácido acético e láctico sem a geração de gás carbônico. O pH ótimo de crescimento de bifidobactérias está entre 6 e 7, praticamente sem crescimento abaixo de 5,0 e acima de 8,0. A temperatura ótima de crescimento está entre 37°C e 41°C, com máximo entre 43 e 45°C e praticamente sem crescimento na faixa abaixo de 25 e 28°C (GOMES & MALCATA, 1999; GOKTEPE et al., 2006; ROY D., 2005).

Espécies do gênero *Bifidobacterium* estão presentes na microbiota intestinal de adultos, mas são predominantes em intestino de bebês recém nascido. Apresentam

propriedade de aderência ao epitélio intestinal e dessa forma, podem competir com microrganismos patogênicos no intestino. Este gênero de probiótico sobrevive à passagem através do trato gastrointestinal e pode favorecer o funcionamento do intestino. O uso de bifidobactérias em alimentos fermentados e alimentos lácteos têm aumentado nos últimos anos. *B. lactis* é a espécie mais utilizada pela indústria de alimentos por se mostrar mais tolerante ao oxigênio, ao pH, ao processamento e à estocagem do que outras espécies de bifidobactérias (GOKTEPE et al., 2006; ROY D., 2005).

A seleção da cepa de bifidobactéria para aplicação tecnológica é um aspecto crítico no desenvolvimento de alimentos probióticos. A viabilidade do microrganismo depende do pH, do tempo de exposição a ácidos, e da espécie e cepa usada. Nem todas as linhagens de bifidobactérias são de fácil cultivo industrial devido à baixa velocidade de crescimento e/ou baixa sobrevivência ao congelamento e a liofilização. A viabilidade e o crescimento de bifidobactérias podem ser aumentados pela adição de fontes de nitrogênio como de extrato de levedura, aminoácidos e peptídeos que são considerados promotores de crescimento. Porém alto potencial de óxido redução pode ser prejudicial à sobrevivência de bifidobactéria, que apresentam grande sensibilidade ao oxigênio (ROY, 2005).

### **3.2 Prebióticos**

Os prebióticos são considerados ingredientes funcionais, uma vez que exercem influência sobre processos fisiológicos no organismo, resultando em melhoria da saúde e em redução no risco de diversas doenças, como por exemplo, diarréias e câncer de colón, sem precisar de supervisão médica (KAUR & GRUPTA, 2002; PHILLIPS et al., 2008).

Prebióticos são definidos como ingredientes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias benéficas no cólon. O consumo regular de

prebiótico pode reduzir a multiplicação de microrganismos patogênicos no intestino, pois como é fermentado no intestino grosso, ele se converte em nutrientes que serão utilizados pelas bactérias benéficas, proporcionando um aumento na microbiota bacteriana e garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Além disso, outros efeitos benéficos à saúde do hospedeiro são associados ao consumo de prebióticos, como por exemplo, maior absorção de cálcio e, possivelmente, o metabolismo lipídico e redução do risco de câncer do cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995; CHARALAMPOPOULOS et al., 2003; BIELECKA et al., 2002; SAAD, 2006).

Os prebióticos conhecidos atualmente são carboidratos não digeríveis, incluindo oligofrutose, inulina, lactulose e galactooligossacarídeos (SAAD, 2006). Outros dois prebióticos importantes, entretanto menos utilizados, são a goma acácia e o amido resistente (MICHEL et al., 1998; PEREIRA, 2007).

Os critérios para um ingrediente ser classificado como prebiótico são (GIBSON & ROBERFROID, 1995; FOOKS et al., 1999):

- Ausência de hidrólise ou absorção no intestino delgado;
- Capacidade de ser metabolizado seletivamente por bactérias benéficas;
- Capacidade de alterar benéficamente a microbiota intestinal; e
- Indução do efeito fisiológico que seja importante para a saúde.

Após a fermentação dos prebióticos, alguns metabólitos são liberados pelas bactérias no trato intestinal, em especial os ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, o acético, o butírico e o propiônico. Esses ácidos podem atuar diretamente ou indiretamente sobre as células intestinais participando do controle de processos de inflamação, de carcinogênese e eliminação de compostos nitrogenados, podendo atuar, também, no alívio da constipação e na redução de infecções intestinais e na redução do nível do colesterol sérico (SAAD, 2006).

### 3.2.1 GOMA ACÁCIA

As gomas, conhecidas como hidrocolóides, são frequentemente estudadas por sua capacidade de promover alteração de textura. São polímeros de cadeia longa, de alto peso molecular, extraídas de algas marinhas, sementes, exsudados de árvores e de colágeno animal (RIBEIRO, 2004).

A goma acácia, também conhecida como goma arábica, é um exsudado natural obtido do tronco da *Acácia senegal*. É um polímero formado por moléculas de ácido D-glucurônico, L-raminose, D-galactose e L-arabinose, com cerca de 5% de proteína (SHAHIDI & HAN, 1993; RÉ, 1998; RIBEIRO, 2004).

A goma acácia é considerada um prebiótico porque, além de não ser digerida no estômago, como as fibras dietéticas, ela promove o desenvolvimento de bactérias benéficas no intestino, principalmente bifidobactérias e lactobacilos. Outro fator importante é que, através da sua fermentação, há produção de ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, o ácido propiônico. Tais fatores contribuem para a inibição de microrganismos patogênicos e prevenção de doenças gastrintestinais, até mesmo câncer de cólon. Outros benefícios também são atribuídos ao consumo regular de goma acácia, como por exemplo, redução da absorção de glicose, aumento da massa fecal, devido à incorporação de água nas fezes e redução do colesterol sérico (MICHEL et al., 1998; CHERBUT et al., 2003, PHILLIPS et al., 2008, GLOVER et al., 2009).

Michel et al. (1998) verificaram que diferentes tipos de goma acácia comercial foram totalmente fermentadas, *in vitro*, por bactérias intestinais, havendo redução da população de *Clostridium* sp. e aumento de *Lactobacillus* sp. O efeito benéfico da goma acácia como prebiótico também foi estudado por, Chebut et al. (2003). Os autores verificaram que a ingestão de 10 a 15 gramas por dia de goma acácia aumentou a população de bactérias lácticas e bifidobactérias nas fezes. Sua degradação no intestino grosso foi ao redor de 95% e o peso das fezes aumentou em 30% devido ao maior teor de água. Outro estudo mostrou que a suplementação

da dieta com 25 g de goma acácia comercial durante 12 semanas diminuiu a pressão arterial de indivíduos saudáveis e diabéticos (GLOVER et al., 2009).

Os estudos mostram que para obter os efeitos benéficos da goma acácia como prebiótico, é necessário o consumo contínuo e de alguns dias de adaptação do organismo. Além disso, há uma tolerância maior do organismo em relação aos efeitos adversos causados pela maioria das fibras, podendo ser consumido em maior quantidade, cerca de 10 g por dia. (PHILLIPS et al., 2008; GLOVER et al., 2009).

Além dos efeitos benéficos à saúde, existem vantagens tecnológicas importantes para a indústria de alimentos. A goma acácia é usada como agente encapsulante de materiais voláteis durante processos de secagem e também pode atuar como agente de proteção dos microrganismos probióticos das condições desfavoráveis de processamento (Ré, 1998). Desmond et al. (2002), verificaram que a adição goma acácia a uma suspensão de *Lactobacillus paracasei*, submetida ao processo de secagem em “spray drying”, aumentou a sobrevivência do microrganismo durante a secagem, estocagem em temperatura ambiente e sob refrigeração, e durante o trânsito gástrico. Segundo os autores, essa proteção ocorreu devido à encapsulação do microrganismo.

### 3.2.2 AMIDO RESISTENTE

Amido é um polissacarídeo constituído por grânulos de amilose e amilopectina. A amilose tem sua estrutura linear (ligações  $\alpha(1,4)$ ), é encontrada na forma de hélice e tem alta susceptibilidade à retrogradação. A amilopectina é uma molécula maior que a amilose, é ramificada (ligações  $\alpha(1,4)$  e  $\alpha(1,6)$ ) e tem baixa susceptibilidade à retrogradação. Normalmente a amilopectina está presente em maior quantidade no grão de amido do que a amilose. O teor de amilose representa de 15 a 30% do grão (RIBEIRO, 2004; SHARMA, 2008).

Amidos com alto teor de amilopectina geralmente têm temperatura de gelatinização menor, estão presentes na região cristalina da estrutura do grão e são normalmente de rápida digestão. Já os amidos com alto teor de amilose estão presentes na região amorfa do grânulo e tem temperatura de gelatinização maior, entretanto, uma vez gelatinizado, a retrogradação durante o resfriamento, acontece mais rapidamente formando cristais insolúveis, tornando assim, o amido resistente a hidrólise enzimática. A resistência do grão de amido aumenta com o aumento do teor de amilose presente no grão, devido às estruturas das mesmas. A amilose, como dito anteriormente, apresenta uma estrutura linear e tem formato de hélice, ou seja, suas moléculas de glicose terminal não estão disponíveis ao ataque da enzima responsável pela sua digestão (beta amilase). Em contrapartida, a estrutura da amilopectina é maior e ramificada, dessa forma as moléculas de glicose estão mais expostas, além de estarem em maior quantidade facilitando, assim, o acesso da enzima. (SHARMA, 2008; CONWAY, 2001; BIRD et al., 2000).

Entre os tipos de amidos, destaca-se o amido resistente que é um componente natural de alguns alimentos, com composição bastante heterogênea e teor de amilose acima de 50%. Sua classificação depende da estrutura física e da susceptibilidade ao ataque enzimático. Dessa forma, têm-se quatro tipos de amido resistente (AR). O AR tipo 1 está presente em alimentos como grãos e leguminosas e estão fisicamente inacessíveis, encapsulados na matriz do alimento; o AR tipo 2 está presente na banana verde e na batata crua; o AR tipo 3 é formado após a retrogradação do amido; e o AR tipo 4 é modificado quimicamente, e quando incorporado à formulação dos alimentos não altera suas características organolépticas (PEREIRA, 2007; SHARMA et al., 2008; SALGADO et al., 2005).

Alguns processos de alimentos, como por exemplo, aplicação de altas temperaturas na presença de água (autoclave) e aplicação de calor seco, aumentam o nível de amido resistente. Outros fatores influenciam no aumento do teor de AR no alimento, como a origem botânica do amido e a quantidade de água utilizada durante a gelatinização (PEREIRA, 2007; SALGADO et al., 2005; BIRD et al., 2000). Como a formação de amido resistente é influenciada por fatores que envolvem

processamento e armazenamento, seu teor nos alimentos não pode ser generalizado (SALGADO et al., 2005).

Amido resistente é definido como: “a quantidade total de amido, e seus produtos de degradação, resistentes à digestão no intestino delgado de pessoas saudáveis”. É considerado prebiótico por resistir à digestão e ser fermentado no intestino grosso, principalmente por bifidobactérias. Por ser um carboidrato de fermentação lenta, a digestão do amido resistente produz ácidos graxos de cadeia curta (acético, propiônico e butírico), que são responsáveis por promover a saúde do colón, pois reduzem o aparecimento de células cancerígenas, reduzem a constipação e inibem a síntese de colesterol, diminuindo o risco de doenças cardiovasculares. Além disso, o pH ácido formado pela fermentação, favorece a vasodilatação e aumenta a absorção de água e sais, melhorando os sintomas de indivíduos com diarreia. Para que os efeitos benéficos sejam obtidos e não que haja desconforto abdominal (formação de gases e diarreia) é recomendado o consumo de 8 g diárias de amido resistente (HI-MAIZE, 2009; SHARMA et al., 2008; SALGADO et al., 2005; PEREIRA, 2007; CONWAY, 2001).

Worthley et al. (2009) verificaram que o uso do amido resistente como suplemento prebiótico aumentou a população de bactérias benéficas nas fezes de humanos. A redução do colesterol de indivíduos moderadamente hipercolesterolêmicos acima de 45 anos, também foi observada devido ao consumo de uma dieta a base de amido resistente e soja (LARKIN et al., 2005).

A aplicação tecnológica do amido resistente na indústria de alimentos é também de grande importância. Por possuir tamanho de partículas pequeno, a adição do amido resistente não altera as características organolépticas do produto. Além disso, sua adição em alimentos aumenta o valor nutricional e os benefícios fisiológicos. O amido resistente tem a funcionalidade de uma fibra dietética e possui baixa capacidade de retenção de água. Devido a estes fatores, o interesse do uso de amido resistente pela indústria aumentou, ampliando dessa forma, a variedade de produtos de alta qualidade e funcionais (SHARMA et al., 2008).



Amidos resistentes podem ser usados para encapsulação de ingredientes alimentícios devido a sua solubilidade em meio aquoso e baixa viscosidade (Ré, 1998). Conway (2001) verificou que o amido resistente pode proteger a bactéria probiótica em meios com baixo pH e na presença de sais biliares, aumentando a resistência destas bactérias ao trato gastrointestinal.

### 3.3 Simbióticos

Simbióticos são alimentos ou suplementos alimentares que contêm microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos, resultando em produtos com as características funcionais dos dois grupos que em sinergia vão beneficiar o hospedeiro (GIBSON & ROBERFORD, 1995; FOOKS et al., 1999; SAAD, 2006).

O microrganismo probiótico pode ter uma melhor sobrevivência no trato intestinal caso seu substrato específico esteja prontamente disponível para fermentação. Portanto, o consumo de simbióticos pode aumentar a população de microrganismos probióticos no trato intestinal do hospedeiro tanto por estar ingerindo os microrganismos, quanto por favorecer a multiplicação das bactérias endógenas através da ingestão dos prebióticos (GIBSON & ROBERFROID, 1995; FOOKS et al., 1999; SAAD, 2006).

Le Leu et al. (2009) verificaram que a combinação simbiótica de amido resistente e *Bifidobacterium lactis* adicionadas à dieta de ratos durante 30 dias protegeu contra o desenvolvimento de câncer colorretal. Observaram, também, que a dieta com combinação simbiótica se mostrou mais eficaz do que as dietas de prebiótico e probiótico sozinhos. Worthley et al. (2009) também verificaram que a suplementação simbiótica de amido resistente e *Bifidobacterium lactis*, para humanos, apresentou efeito superior, na população de probióticos, que o consumo de probióticos e prebióticos isoladamente.

Autores sugerem que a seleção do probiótico e prebiótico é importante para que haja a sinergia entre eles (SAAD, 2006). Özer et al. (2005) verificaram que a adição de inulina e lactulose num iogurte suplementado com *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus acidophilus* não afetou o crescimento das cepas características do iogurte, mas estimulou o crescimento de *Bifidobacterium bifidum* no produto.

A associação entre o prebiótico e o probiótico pode favorecer a sobrevivência do microrganismo bem como aumentar os efeitos benéficos de cada um deles, tanto no organismo do hospedeiro quanto no alimento. Isso se deve, provavelmente, à interação entre eles anteriormente ao consumo, podendo, em alguns casos, resultar em uma vantagem competitiva para o probiótico (FOOKS et al., 1999, PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002, SAAD, 2006).

Akin (2005) verificou que a inulina estimulou o crescimento de *L. acidophilus* e *B. lactis* em sorvete fermentado aumentando a viabilidade destes microrganismos no produto. Capela et al. (2006) observaram, que a adição dos prebióticos frutoligossacarídeo, inulina e amido resistente, em iogurte aumentou a viabilidade dos microrganismos probióticos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium* spp) quando comparado ao iogurte sem prebiótico. Cardarelli et al. (2008) mostraram que o uso de inulina associada ao probiótico *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* em mousse de chocolate conferiram um potencial simbiótico ao produto bem como propriedades sensoriais favoráveis.

### **3.4 Microencapsulação**

A Microencapsulação é a tecnologia de envolver materiais sólidos, líquidos e gasosos em pequenas cápsulas que liberam seu conteúdo sob condições controladas. Na indústria de alimentos, essa tecnologia vem sendo usada a mais de sessenta anos para o controle de sabor, cor e textura (DESAI & PARK, 2005; CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007).

Através de propriedades de liberação controlada, a microencapsulação deixa de ser somente um método de agregação de substâncias a uma formulação alimentícia, e se torna uma fonte de ingredientes com propriedades únicas. Para ocorrer à liberação do material encapsulado, vários mecanismos de acionamento podem ser usados, como por exemplo, mudança de pH, estresse mecânico, temperatura, atividade enzimática, tempo, força osmótica, entre outras (GOUIN, 2004; DESAI & PARK, 2005).

Dentre as principais aplicações da microencapsulação na indústria de alimentos, destacam-se: a proteção do material a ser encapsulado do ambiente externo, de forma a evitar sua degradação; a redução da evaporação do material encapsulado; a modificação das características físicas do material encapsulado, tornando mais fácil sua manipulação; o isolamento de componentes que reajam com outros dentro da matriz do alimento e; para mascarar odor e/ou sabor desagradáveis. No desenvolvimento de produtos alimentícios, as qualidades sensoriais não devem ser comprometidas pela adição de ingredientes encapsulados (DESAI & PARK, 2005; SHAHID & HAN, 1993).

Atualmente, a microencapsulação, vem sendo utilizada para manter a estabilidade de microrganismos probióticos durante o processamento e estocagem dos alimentos. A matriz do alimento e as condições de processo são fatores que determinam a necessidade de encapsulação dos microrganismos. Fatores como pH, atividade de água, teor de gordura e oxigênio são muito importantes, pois influenciam a sobrevivência dos microrganismos probióticos (KAILSASAPATHY, 2003; TCHAWALKAR & KALASAPATHY, 2003). A utilização da microencapsulação também pode aumentar a resistência das bactérias no decorrer do trato digestivo, visto que esse meio possui elevada acidez, além da presença de enzimas e da bile, possibilitando que as bactérias cheguem ao intestino com condições de sobrevivência e de colonização (SHEU & MARSHALL, 2003; DESAI & PARK, 2005; CHAMPAGNE. & FUSTIER, 2007; FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Existem diversos tipos de material encapsulante, como por exemplo, o alginato de cálcio, proteínas do soro do leite e gomas. A escolha do agente encapsulante

depende de uma série de fatores, entre eles: a não reatividade com o material a ser encapsulado durante o processo e estocagem; o processo utilizado para a formação da microcápsula; o mecanismo de liberação do material encapsulado; suas propriedades reológicas; a habilidade de dispersar ou emulsificar; a capacidade de prover máxima proteção para o material a ser encapsulado contra condições desfavoráveis, e ser economicamente viável (DESAI & PARKER, 2005).

O alginato de cálcio é muito utilizado para microencapsulação, não é tóxico e, portanto, seguro para a aplicação em alimentos. Além disso, as cápsulas formadas podem ser facilmente revertidas e qualquer ingrediente pode ser encapsulado, inclusive os hidrofóbicos ou hidrofílicos, os sensíveis a temperaturas, líquidos e sólidos (SHEU & MARSHAL, 1993; DESAI & PARK, 2005; GOUIN, 2004).

As cápsulas de alginato de cálcio são formadas quando uma solução de alginato de sódio entra em contato com cátions multivalentes como o cálcio. O Alginato de sódio é um polissacarídeo linear constituído por moléculas de ácidos D-manurônicos e L-gulurônicos extraídos de algas (constitui de 18 a 40% do peso seco das algas). As cápsulas de alginato de cálcio são estáveis em baixo pH, mas são frágeis em soluções básicas podendo desintegrar-se (GROSSO & TRINDADE, 2004). Apesar da sua adequação como material encapsulante, o alginato apresenta baixa estabilidade na presença de agentes quelantes, como o fosfato, lactatos e citratos, que possuem afinidade pelo cálcio e desestabilizam o gel formado entre o alginato e o cálcio. Tratamentos especiais, como cobrir as cápsulas com um filme de quitosana, pode ser usado para aumentar a estabilidade química e mecânica, de forma a prevenir a liberação das células (KRASAEKOOPT et al., 2003). Outra limitação do uso de alginato como agente encapsulante é a grande porosidade das cápsulas formadas, que permite uma rápida difusão de água e outros líquidos para o interior da cápsula, alterando a matriz de alginato e expondo o material encapsulado às condições desfavoráveis (GOUIN, 2004).

Existem diferentes tipos de processo de encapsulação, os mais comuns são a emulsão, a extrusão e o “spray drying”. A seleção do processo de microencapsulação é realizada com base nas propriedades físicas e químicas do

material que será encapsulado e do encapsulante, além disso, a finalidade de aplicação do ingrediente alimentício também é analisada (DESAI & PARK, 2005).

O tamanho das microcápsulas pode variar de poucos nanômetros até vários micrômetros e a forma também é bastante variável em função do método e do agente encapsulante utilizados para prepará-las (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008).

O método mais comum usado para a encapsulação de microrganismos com hidrocolóides é o da extrusão, devido a sua facilidade, simplicidade e baixo custo, além disso, garante maior viabilidade celular. Este método envolve o preparo de uma solução de hidrocolóide, como por exemplo, alginato de sódio, na qual é adicionada uma suspensão de microrganismo. Goteja-se essa mistura através de uma agulha, por exemplo, em uma solução contendo cálcio ( $\text{Ca}^{+2}$ ) onde as cápsulas são formadas instantaneamente. O tamanho e o formato das cápsulas dependem do diâmetro da agulha e da distância da queda. A concentração de alginato para formar as cápsulas pode variar de 1 a 2% e da solução de cloreto de cálcio varia de 0,05 a 1,5 M (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Na técnica da emulsão, a suspensão de células e polímeros (fase descontínua) é adicionada a um volume grande de óleo vegetal (fase contínua), e a mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo. Esta emulsão precisa ser quebrada para formar minúsculas gotas de gel dentro da fase oleosa, as quais são separadas por filtração. Existem muitos polímeros usados na técnica de emulsão, como por exemplo, carragena, goma locusta, acetato de celulose ftalato, alginato, quitosana, gelatina, polissacarídeos protéicos e proteínas do soro do leite. O tamanho das cápsulas pelo método da emulsão depende da velocidade de agitação na hora da formação da emulsão. Apesar de ser mais simples a produção em maior escala, tem um custo mais elevado ao da extrusão, devido ao uso do óleo vegetal (KRASAEKOOPT et al., 2003).

A aplicação de microrganismos encapsulados em diversos alimentos tem resultado, em muitos casos, no aumento da viabilidade de bactérias probióticas (SULTANA et al., 2000; KAILASAPATHY, 2003 CAPELA et al., 2006). Shah & Ravula (2000),

observaram que o baixo pH de sobremesas fermentadas e congeladas afetou a sobrevivência dos probióticos *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e que a encapsulação em alginato de cálcio teve um efeito protetor aos microrganismos. Sheu & Marshall (1993) verificaram que as células encapsuladas de lactobacilos sobreviveram mais do que as células livres em leite congelado.

Por outro lado, Godward & Kailasapathy (2003) verificaram que em queijo tipo cheddar as células de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsuladas sobreviveram menos tempo que as células livres. Isso ocorreu, provavelmente, devido à matriz do queijo ser bem estruturada, o que impediu a liberação do metabolismo celular, causando um acúmulo de ácido e o decréscimo da população de bactérias. Em sorvete fermentado e não fermentado, não houve diferença significativa na sobrevivência de células livres e encapsuladas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, provavelmente devido ao alto teor de gordura do produto que agiu como encapsulante da célula livre (KAILASAPATHY & SULTANA, 2003).

A adição de prebióticos na formação das cápsulas também pode apresentar uma influência positiva na sobrevivência dos microrganismos probióticos. Sultana et al. (2000), utilizaram 2% de amido resistente junto ao alginato de cálcio na formação das cápsulas. O amido resistente aumentou a sobrevivência de *L. acidophilus* e *B. infantis* em iogurte, porém os resultados não foram conclusivos sobre a proteção oferecida pela encapsulação às bactéria no trato gastrointestinal. Homayouni et al. (2008), também adicionaram 2% de amido resistente na encapsulação de *Lactobacillus casei* e *Bifidobacterium lactis*. Os microrganismos foram incorporados em sorvete de base láctea e os resultados indicaram que, após 180 dias de armazenamento a -18°C, a sobrevivência das células encapsuladas foi significativamente maior que as adicionadas livres ao produto.

Chen et al. (2005), incorporaram prebióticos (frutooligossacariideo e isomaltooligossacarideo) e promotor de crescimento (peptídeo) na microencapsulação de probióticos (*L. acidophilus*, *L. casei*, *B. bifidum* e *B. longun*). A maior sobrevivência dos microrganismos foi obtida quando o material encapsulante

foi produzido com 1% de alginato, 1% de peptídeo e 3% de frutoligossacarídeo. A incorporação de prebiótico na formação das microcapsulas aumentou a proteção dos microrganismos durante a estocagem das cápsulas.

Liserre et al. (2007) utilizaram alginato, quitosana e polímeros entéricos, utilizados para recobrimento em indústria farmacêutica, na microencapsulação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e avaliaram a sobrevivência do microrganismo em condições gastrintestinal simuladas. Todos os tipos de microcápsulas avaliadas protegeram o microrganismo, mas o uso da quitosana e polímeros entéricos aumentaram o efeito protetor da microencapsulação sobre o microrganismo.

Desmond et al. (2002), utilizaram goma acácia para a encapsulação de *L. paracasei* pelo método de “spray drying” e verificaram um aumento na viabilidade do microrganismo durante a estocagem e transito gástrico. Esse resultado foi atribuído ao efeito da goma acácia na proteção da bactéria das condições ambientais adversas.

### 3.5 Sorvete

Sorvete é um gelado comestível, definido como produto congelado obtido a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas; ou de uma mistura de água e açúcar(es). Podem ser adicionados de outro(s) ingrediente(s) desde que não descaracterize(m) o produto (ANVISA, 2005).

A classificação do sorvete depende da composição básica e do processo de fabricação. A composição básica do sorvete pode ser dividida em (MOSQUIM, 1999):

- Sorvete de creme (ice cream), que são produtos elaborados basicamente com leite e ou seus derivados e ou gorduras comestíveis, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;

- Sorvete de leite (ice milk), que são produtos elaborados basicamente com leite e ou seus derivados, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares;
- Sorvetes que são os produtos elaborados basicamente com leite e ou seus derivados e ou outras matérias primas alimentares e nos quais os teores de gordura e ou proteína são total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionado de outros ingredientes alimentares;
- Sherbets que são produtos elaborados basicamente com leite e ou seus derivados e ou outras matérias primas alimentares e que contém pequenas proporções de gorduras e proteínas nas quais podem ser total ou parcialmente de origem não láctea, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares; gelados de frutas;
- Sorbets que são produtos elaborados basicamente com polpas, sucos ou pedaços de frutas e açúcares, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares; gelados que são produtos elaborados basicamente com açúcares, podendo ou não conter polpas, sucos, pedaços de frutas e outras matérias primas, podendo ser adicionados de outros ingredientes alimentares.

Quanto ao processo de fabricação, o sorvete é dividido em sorvetes de massa ou cremosos e picolés. Sorvetes de massa são misturas homogêneas ou não de ingredientes alimentares, batidas e resfriadas até o congelamento, resultando numa massa aerada. Picolés são porções individuais de gelados comestíveis de várias composições, geralmente reportadas por uma haste, obtidas por resfriamento até congelamento da mistura homogênea ou não, de ingredientes alimentares, com ou sem batimento (MOSQUIM, 1999).

Procedimentos de boas práticas de fabricação, a pasteurização e a maturação, devem ser adotados durante a produção de sorvetes. A pasteurização tem como objetivo reduzir a carga microbiana da calda (mistura) e atender as seguintes



condições: 80 °C durante 25 segundos ou 70 °C durante 30 minutos (ANVISA, 2003). A maturação é outra etapa do processo muito importante, sendo seu objetivo solidificar os glóbulos de gordura, hidratar as gomas e aumentar da viscosidade da calda (mistura). Essa etapa também tem condições estabelecidas pela legislação e deve ocorrer a 4 °C por um período que pode variar de 3 a 24 horas. A maturação proporciona ao sorvete textura macia e melhora a capacidade de incorporação do ar no produto durante o congelamento. Além da maturação, a desestabilização do glóbulo de gordura, durante a batadura na sorveteira é vital para que o sorvete adquira uma boa estrutura (MOSQUIM, 1999; ANVISA, 2003).

A composição do sorvete depende da sua formulação básica. O sorvete de creme, por exemplo, deve conter, no mínimo, 8% de gorduras totais, 2,5 % de proteínas e 32% de sólidos totais. Os estabilizantes podem ser empregados até o limite máximo de 0,5% e os emulsificantes não devem ultrapassar 0,2% (MOSQUIM, 1999).

Devido ao elevado valor nutricional e o alto consumo por várias faixas etárias, o sorvete vem sendo considerado um bom alimento para incorporação de culturas probióticas. Além disso, o fato de ser um alimento congelado e com pH relativamente alto, ao redor de 5,5 a 6,5, contribui para a viabilidade dos probióticos (CRUZ et al., 2009; RANADHEERA et al., 2010). Além disso, a incorporação de bactérias probióticas em sorvete não deve prejudicar as características do produto, como a taxa de fusão e os aspectos sensoriais (CRUZ et al., 2009). Entretanto, alguns fatores podem prejudicar a viabilidade de bactérias probióticas em sorvete, como variações de temperaturas durante a estocagem, estresse mecânico durante o batimento e a incorporação de oxigênio durante a produção (HOMAYOUNI et al., 2008; AKIN, 2005).

Tergut & Cakmaci (2009) desenvolveram um sorvete probiótico contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium bifidum*, e os resultados mostraram que a população dos microrganismos se manteve em níveis adequados para o produto ser considerado probiótico durante noventa dias de armazenamento.

O uso de prebióticos na formulação de sorvetes pode aumentar a viabilidade dos microrganismos no produto. Akalin & Erisir (2008) estudaram o efeito da adição de oligofrutose e inulina, em formulação de sorvete com baixo teor de gordura, na sobrevivência dos microrganismos probióticos *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* Bb-12, durante noventa dias de armazenamento a -18 °C. Os resultados indicaram que a oligofrutose promoveu maior efeito protetor às células de ambos os microrganismos probióticos quando comparado à inulina. Akin (2005) verificou que a inulina estimulou o crescimento de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* durante a fermentação e que a população dos microrganismos se manteve estável durante noventa dias de armazenamento a -18°C.

Hamayouni et al. (2008) avaliaram a sobrevivência de duas culturas probióticas, *Lactobacillus casei* (Lc-01) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12), livres e encapsuladas com amido resistente, em sorvetes armazenados a -20°C durante 180 dias. Os resultados indicaram que a encapsulação aumentou significativamente a sobrevivência das bactérias probióticas, porém todas as amostras de sorvete (probióticos livres e encapsulados) se mantiveram com as propriedades probióticas durante noventa dias de armazenamento. Após cento e oitenta dias, somente as amostras com os probióticos encapsulados mantiveram a população com 8,0 Log UFC/g.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 Desenvolvimento Experimental

#### 4.1.1 INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR NA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* ENCAPSULADOS

Os ensaios para avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado em alginato de cálcio e submetido ao processo de secagem em estufa com circulação de ar a 55°C durante 8 horas foram realizados em triplicata.

#### 4.1.2 INFLUÊNCIA DO PROCESSO DE SECAGEM EM SECADOR DE BANDEJAS NA SOBREVIVÊNCIA de *Lactobacillus acidophilus* E *Bifidobacterium lactis* ENCAPSULADOS

Para avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados em alginato de cálcio, com e sem prebióticos goma acácia e amido resistente, e submetido ao processo de secagem em secador de bandejas a 38°C durante 4 horas com velocidade do ar a 1,2 m/s, foram realizados três tratamentos: T1 (encapsulação em alginato de cálcio); T2 (encapsulação em alginato de cálcio e amido resistente) e T3 (encapsulação em alginato de cálcio e goma acácia). Os tratamentos foram repetidos quatro vezes.

#### 4.1.3 INFLUÊNCIA DE PREBIÓTICOS NA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* ENCAPSULADOS DURANTE O PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE SORVETE

A sobrevivência das bactérias probióticas livres e encapsuladas em alginato de cálcio com e sem prebiótico (amido resistente e goma acácia) foi avaliada durante o processamento e armazenamento de sorvete a -18°C por duzentos e dez dias. Foram realizados quatro tipos de tratamentos em triplicata: Sa (sorvete com adição de microrganismos livres), Sb (sorvete com adição de microrganismos encapsulados em alginato de cálcio), Sc (sorvete com adição de microrganismos encapsulados em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (sorvete com adição de microrganismos encapsulados em alginato de cálcio e amido resistente).

### 4.2 Prebióticos

Os ingredientes prebióticos utilizados nesse trabalho foram: a goma acácia, Fibregum B da Colloides Naturels Brasil e o amido resistente, Hi Maize 260 da National Starch.

### 4.3 Culturas Probióticas

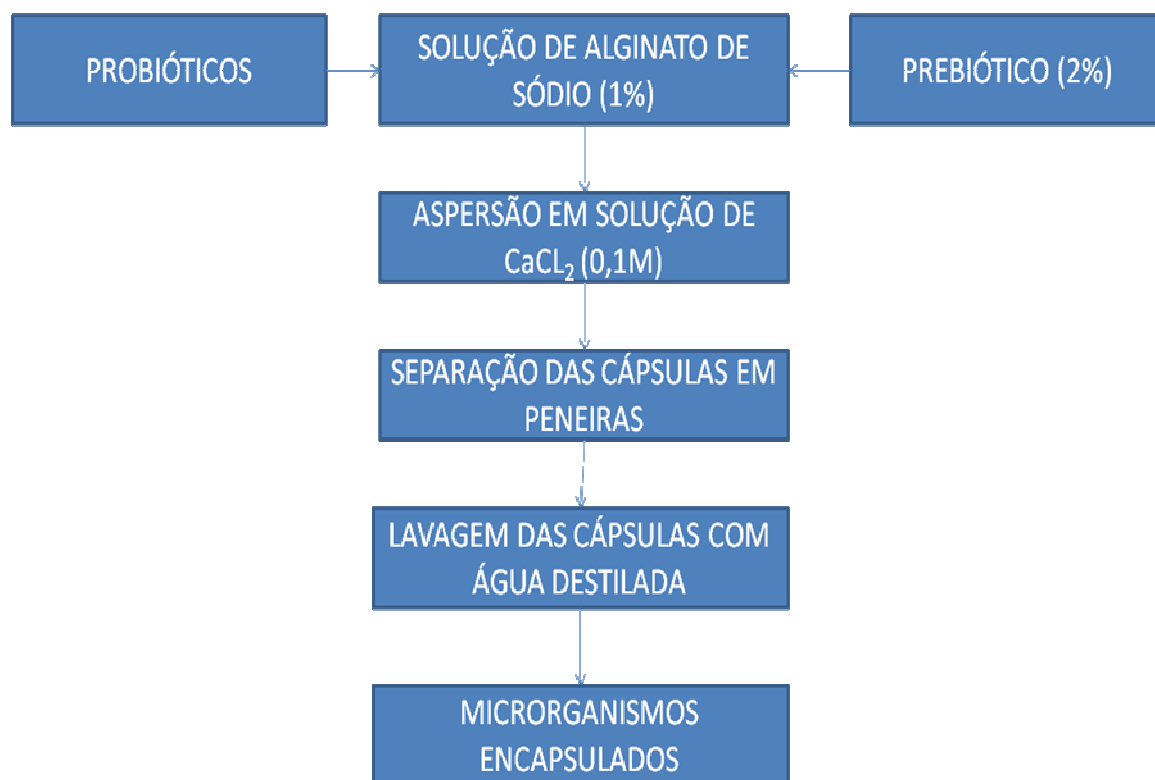
As culturas liofilizadas utilizadas no desenvolvimento do trabalho foram: *Lactobacillus acidophilus* NCFM FloraFIT com contagem celular de  $1,5 \times 10^{11}$  UFC/g de produto e *Bifidobacterium lactis* BI-04 FloraFIT com contagem celular de  $4,5 \times 10^{11}$  UFC/g, ambos da empresa Danisco Brasil Ltda. As culturas foram mantidas a -18°C até o momento da utilização.

#### 4.4 Encapsulação por aspersão

O método utilizado para a encapsulação dos microrganismos teve como base a técnica de aspersão, conforme descrito por Liserre et al. (2007). Uma determinada massa das culturas probióticas liofilizadas foi suspensa em solução de alginato de sódio, I-3G-150 (Kimica Chile Ltda), de forma que a suspensão tivesse uma população de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* de  $10^9$  UFC/mL. Os prebióticos goma acácia e amido resistente foram adicionados, separadamente, à suspensão de modo a obter uma concentração de 2%. A suspensão foi adicionada por aspersão a uma solução 0,1 M de cloreto de cálcio PA (Vetec) através de um tubo de aço inoxidável (1 m de comprimento, diâmetro interno de 12 mm e externo de 16,5 mm) com o bocal acoplado a um bico de equipamento “spray drying” com saída tipo leque (45°, modelo 1/4J da Systens do Brasil) na extremidade. A solução de alginato de sódio foi adicionada ao tubo de aço inoxidável com o auxílio de uma bomba peristáltica na vazão de 2,5 mL/min e o ar comprimido numa vazão de 2,5 m<sup>3</sup>/min. A solução de cloreto de cálcio permaneceu sob agitação magnética constante até o término da encapsulação.

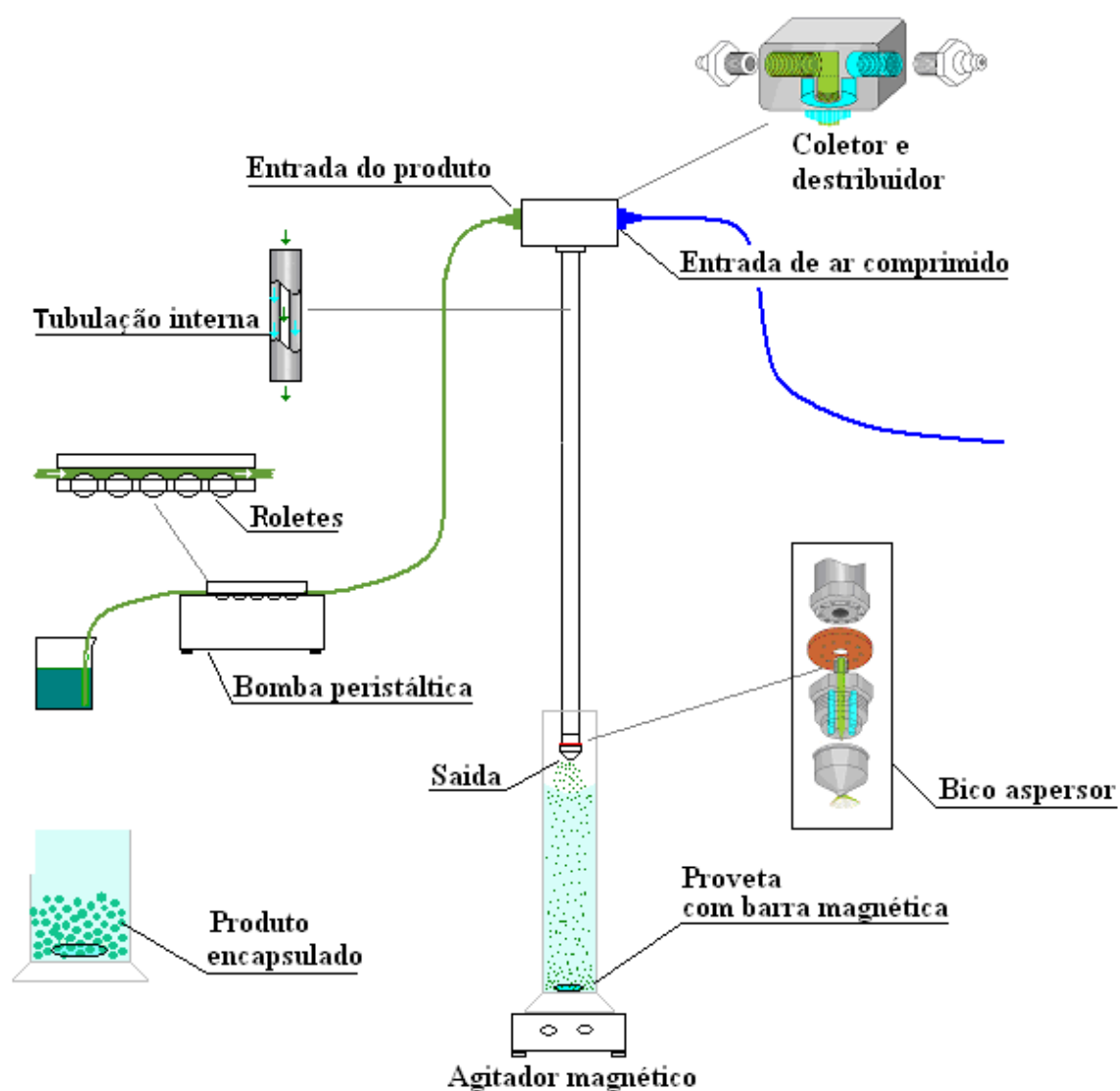
As cápsulas de alginato de cálcio foram formadas quando a solução de alginato de sódio entrava em contato com a solução de cloreto de cálcio. Terminando o processo, as cápsulas permaneceram em repouso por 30 minutos, retiradas da solução de cloreto de cálcio, com o auxílio de peneiras de aço inoxidável (mesh de 250, 355, 500, 710 e 1000 µm) e lavadas com água destilada.

A Figura 1 apresenta o fluxograma do processo de encapsulação dos microrganismos.



**Figura 1:** Processo de encapsulação

A figura 2 apresenta o esquema do sistema utilizado para encapsulação dos microrganismos.



**Figura 2:** Sistema de encapsulação dos microrganismos probióticos

## 4.5 Secagem

### 4.5.1 SECAGEM EM ESTUFA COM CIRCULAÇÃO DE AR

Esta etapa do projeto foi realizada para definição do processo de secagem das cápsulas, portanto a encapsulação foi feita sem adição de prebióticos a solução de alginato de sódio e somente *Lactobacillus acidophilus*, foi utilizado como microrganismo probiótico.

As condições de secagem (tempo e temperatura) foram fixadas em 8 h e 55 °C em estufa com circulação de ar (MA 037 da Marconi). A secagem das cápsulas foi realizada um dia após a produção. Antes do início da secagem, as cápsulas eram pesadas e colocadas em placas de Petri de forma uniforme e durante a secagem as mesmas eram pesadas e revolvidas a cada hora com o auxílio de uma haste de vidro para que a secagem ocorresse de forma uniforme.

### 4.5.2 SECAGEM EM SECADOR DE BANDEJAS

A secagem das cápsulas de alginato de cálcio com e sem prebiótico, contendo *L. acidophilus* e *B. lactis*, foi feita um dia após sua produção. Foi utilizado um secador de bandejas (Tray Drier, da Armfield). O tempo de secagem foi fixado em 4 h, para uma temperatura do ar de 38 °C e uma velocidade de 1,2 m/s.

Antes do início da secagem, as cápsulas foram pesadas e colocadas em peneiras de plástico e durante a secagem foram revolvidas a cada hora com o auxílio de uma haste de vidro para que a secagem ocorresse de forma uniforme.



#### **4.6 Produção do Sorvete**

A formulação (tabela 1) e o processo do sorvete foram definidos com base em Mosquim (1999) e Hamayouni et al. (2008).

O processo de fabricação do sorvete consistiu em adicionar os ingredientes líquidos (leite pasteurizado e creme de leite) no pasteurizador (Frigomat – PEB 25) e aquecer até 40 °C, quando os outros ingredientes, com exceção do aroma foram adicionados. A mistura permaneceu a 80 °C durante vinte e cinco segundos e, então, resfriada até 40 °C quando o aroma foi adicionado. Quando a temperatura da mistura (calda) atingiu 25 °C, a mesma foi retirada do equipamento e maturada a 4 °C por vinte e quatro horas. Ao término do período de maturação, os probióticos, encapsulados (10%) e livres (0,1%), foram incorporados à calda de forma homogênea. Após a incorporação, a calda foi batida na sorveteira (Taylor, Batch Ice Cream Freezer) com capacidade de 1,5 L durante dez minutos. É nessa etapa onde ocorre a incorporação de ar e congelamento da mistura. Após o congelamento o sorvete foi envasado em porções individuais de aproximadamente 60 g em embalagens plásticas com tampa e armazenado a -18 °C.

**Tabela 1:** Formulação do sorvete

<b>INGREDIENTES</b>	<b>QUANTIDADE (%)</b>
Leite integral pasteurizado tipo A (Xandô)	59
Creme de leite fresco (Balkis)	17
Leite em pó desnatado (Molico – Nestlé)	8
Sacarose (União)	12
Xarope de glicose (Gluko Sicola – Giannone e Cia Ltda)	3
Goma carragena (Biomargel 30 – Sete Ondas)	0,2
Goma guar (Higum HV 400 – Hindustan India)	0,2
Carboximetilcelulose - CMC (Cekol 30000 – CP Kelco)	0,1
Emulsificante (Mono e diglicerídeos – Mono 90 – SGS)	0,2
Aroma de vanila (Givaldan)	0,3

## 4.7 Metodologia Analítica

### 4.7.1 ANÁLISE MICROBIOLÓGICA

Foram realizadas análises microbiológicas para as cápsulas de alginato de cálcio antes e após os processos de secagem, para as amostras da calda dos sorvetes após a incorporação dos microrganismos probióticos livres ou encapsulados e para os sorvetes durante o armazenamento a -18°C, sendo o primeiro ponto no dia de fabricação e os subsequentes a cada trinta dias durante duzentos e dez dias.

#### 4.7.1.1 *Diluição das amostras de cápsulas antes e após o processo de secagem*

O procedimento para preparo das diluições das amostras de cápsulas antes e após a secagem consistiu em pesar 10 g de amostra, adicionar 90 g de solução tampão fosfato estéril (pH 7,5) e homogeneizar. Para as cápsulas antes do processo de secagem, a homogeneização foi feita em Stomacher® 400 (Seward) por 5 minutos e para as cápsulas após o processo de secagem, a homogeneização foi feita em agitador “Shaker” da New Brunswick Scientific durante 1 hora e 5 minutos em homogenizador (Stomacher® 400) da Seward. A partir desta primeira diluição foram realizadas as diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% estéril.

#### 4.7.1.2 *Diluição das amostras de calda e sorvete*

O procedimento para diluição das amostras de calda e de sorvete consistiu em pesar 25 g de amostra, adicionar 225 g de solução tampão fosfato estéril (pH 7,5) e homogeneizar em Stomacher® 400 (Seward) por 2 minutos. A partir dessa primeira diluição, foram realizadas diluições decimais seriadas em solução salina 0,85% estéril.

#### 4.7.1.3 *Plaqueamento*

O procedimento para plaqueamento foi o mesmo para todas as amostras: cápsulas, antes e após o processo de secagem, calda e sorvete.

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus*, foram transferidas alíquotas de 0,1mL de diluições adequadas, em duplicata, para placas de Petri contendo meio de cultura MRS ágar (De Man Rogosa e Sharpe, OXOID) que foram espalhadas com o auxílio de alça de Drigalski. A incubação foi realizada a 43°C por 72 horas em jarras de

anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose anaerogem (OXOID). As colônias típicas de *L. acidophilus* apresentam diâmetro de aproximadamente 3 mm, coloração branca, leitosa, achatadas e com borda irregular. A confirmação das colônias típicas foi realizada através de observação da morfologia em microscópio.

Para a contagem de *Bifidobacterium lactis*, foram transferidas alíquotas de 1,0 mL das diluições adequadas, em duplicata, para placas de Petri. Sobre cada amostra foi adicionado o meio de cultura MRS ágar (De Man Rogosa e Sharpe, OXOID) contendo as soluções A, B e C. A solução A consistia em uma solução a 10% de antibiótico Dicloxacilina de sódio monohidratada (Sigma); a solução B consistia em cloreto de lítio (Vetec) a 10%, e a solução C consistia em Cloridrato de L-cisteína (Synth) a 10%. Para cada litro de meio de cultura, foram adicionados 5 mL da solução A, 10 mL da solução B e 5 mL da solução C. As três soluções foram adicionadas ao meio de cultura após filtração em membrana com diâmetro de 0,20 µm (Sartorius Stedim Biotech - Minisart). A incubação foi realizada a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose, contendo gerador de anaerobiose anaerogem (OXOID). As colônias de *B. lactis* apresentam diâmetro entre 2 e 3 mm, coloração branca, leitosa e forma de lentilha. A confirmação das colônias típicas foi realizada através de observação da morfologia em microscópio.

#### 4.7.2 UMIDADE E ATIVIDADE DE ÁGUA

A umidade das cápsulas foi determinada antes e após o processo de secagem em secador de bandejas (item 4.4.2), conforme descrito em Instituto Adolfo Lutz (2005). Amostras de cápsulas foram pesadas (5 g) em placas de Petri (previamente secas em estufa durante uma hora a 105 °C) e colocadas em estufa a 105 °C até que a massa ficasse constante.

A atividade de água das cápsulas após a secagem em secador de bandejas (item 4.4.2) foi determinada através do equipamento Aqualab da empresa Decagon.

#### 4.7.3 DIÂMETRO DAS CÁPSULAS

A determinação do diâmetro das cápsulas foi realizada em microscópio biocular (CBA Olympus) com ocular micrométrica previamente calibrada. Amostras de cápsulas foram colocadas sobre as lâminas com o auxílio de alça de inoculação, tingidas com corante fucsina e cobertas com lamínula. Foram realizadas vinte medidas de diâmetro para cada lâmina em duplicata. A determinação do diâmetro das cápsulas foi realizada antes e após a secagem em secador de bandejas (item 4.4.2).

#### 4.7.4 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DO SORVETE

O pH do sorvete foi determinado por método direto utilizando um pHmêtro digital (Tec-2, Tecnalise). A acidez titulável expressa em % de ácido láctico (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de sólidos totais foi determinado pelo método gravimétrico secando-se a amostra em estufa (Quimis) a 105°C por 5 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de cinzas foi determinado através do método gravimétrico secando-se a amostra em mufla (Brasimet) a 550°C por 8 horas (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de gordura foi determinado pelo método de Gerber para creme (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de proteína foi determinado pelo método de Kjeldahl (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2005). O teor de carboidratos foi determinado por diferença em relação aos demais componentes. Todas as análises foram realizadas em quadriplicata.

### 4.8 Análise Sensorial

O objetivo da análise sensorial do sorvete foi avaliar se as cápsulas com microrganismos probióticos eram perceptíveis ao paladar.

O método utilizado foi o de preferência indireta. Foi avaliada também, a intenção de compra do produto (DUTCOSKY, 1996).

Cada provador recebeu duas amostras de sorvete: a amostra A, onde os microrganismos foram adicionados na forma livre e a amostra B, onde os microrganismos foram adicionados encapsulados em alginato de cálcio. A avaliação por cada provador foi feita em uma escala hedônica de nove pontos (desde desgostei extremamente até gostei extremamente). A ficha utilizada na análise sensorial encontra-se no anexo A.

A análise sensorial foi feita com 74 provadores não treinados, sendo que 37 eram do sexo feminino e 37 do sexo masculino na faixa etária de 17 a 52 anos.

#### **4.9 Análise estatística**

Os resultados foram analisados através da análise de variância (ANOVA) com nível de significância de 5%, utilizando-se o programa Excel, versão 2007. Foi utilizado o método de Duncan para comparações múltiplas.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1 Influência do processo de secagem em estufa com circulação de ar na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* encapsulados

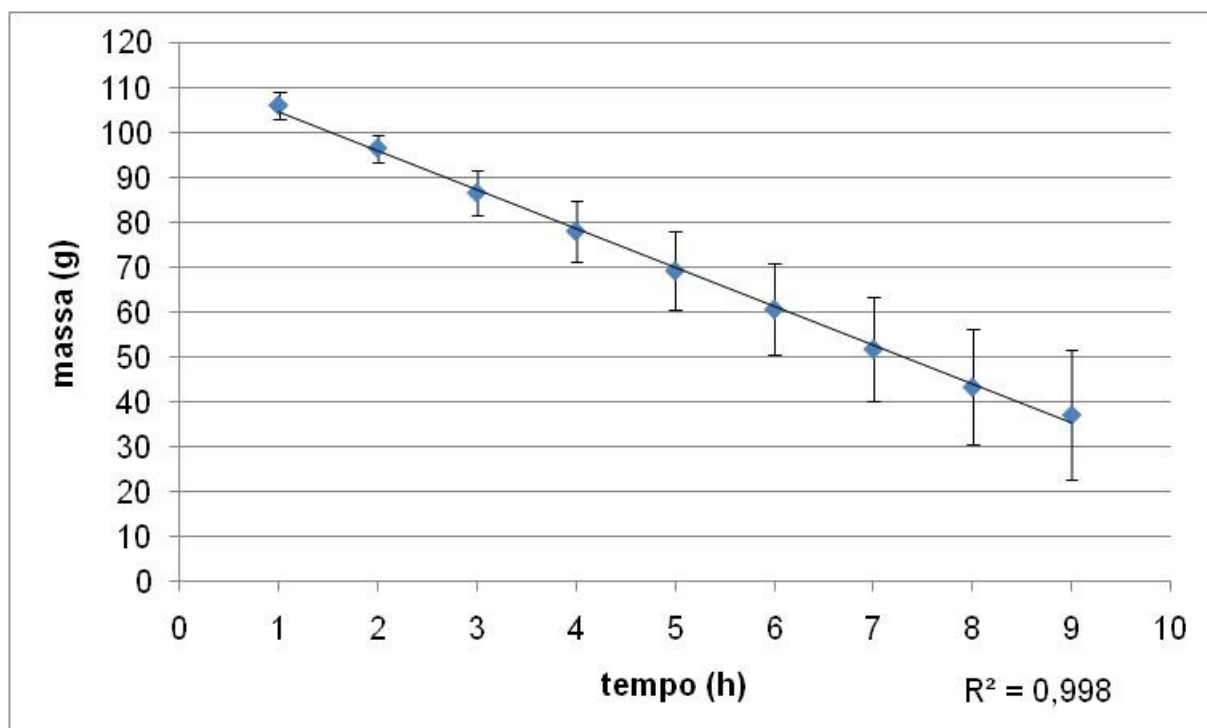
Os resultados da população de *Lactobacillus acidophilus* nas cápsulas antes e após a secagem em estufa com circulação de ar a 55 °C por 8 horas estão apresentados na tabela 2.

**Tabela 2:** População de *L. acidophilus* (Log UFC/g) nas cápsulas antes e após a secagem

RÉPLICA	LOG UFC/g	
	ANTES	APÓS
1	8,89	6,00
2	8,04	6,30
3	8,28	7,32
<b>MÉDIA</b>	<b>8,4</b>	<b>6,5</b>
<b>DESVIO PADRÃO</b>	<b>0,4</b>	<b>0,7</b>

Observa-se na tabela 2, que o processo de encapsulação utilizado no presente estudo é viável no que diz respeito à sobrevivência de *L. acidophilus*, pois a concentração do microrganismo nas cápsulas antes do processo de secagem permaneceu em média 8,4 Log UFC/g, mostrando-se adequado sua aplicação em produtos alimentícios que não sejam secos. Entretanto, os resultados mostraram que o processo de secagem em estufa com circulação de ar a 55°C não foi adequado para a sobrevivência de *L. acidophilus*, pois a população do microrganismo nas cápsulas após este processo de secagem ficou em torno de 10<sup>6</sup> UFC/g. Dessa forma, para atender a legislação brasileira vigente, seria necessário adicionar uma quantidade grande de cápsulas no alimento, tornando inviável sua aplicação (ANVISA, 2008).

A curva de secagem das cápsulas de alginato de cálcio contendo *L. acidophilus* está apresentada na figura 3.



**Figura 3:** Massa das cápsulas (m) em função do tempo de secagem (t).

Pode-se observar que o perfil de secagem das cápsulas em estufa a 55 °C foi linear ( $R^2 = 0,998$ ) e, portanto a temperatura das cápsulas deveria ser menor que a da estufa, o que não causaria redução na população de microrganismos devido à alta temperatura. Porém conforme observado na tabela 2, a população de *L. acidophilus*, durante o processo, foi reduzida em aproximadamente 2 Log UFC/g. Este fato ocorreu, provavelmente, devido à temperatura da superfície das cápsulas ter atingido temperaturas altas (acima de 40 °C) ocasionando a redução da população do microrganismo. Influência do processo de secagem em secador de bandejas na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados.

A Tabela 3 apresenta os valores médios e desvio padrão, de quatro réplicas, da população de *L. acidophilus* e *B. lactis* nas cápsulas produzidas de acordo com cada



tratamento, onde: T1, cápsulas de alginato de cálcio; T2, cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3, cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia

**Tabela 3:** Média e desvio padrão (DP) da população de *L. acidophilus* e *B. lactis* (Log UFC/g) nas cápsulas antes e após a secagem para os três tratamentos T1, T2 e T3

	Log UFC/g							
	<i>L. acidophilus</i>				<i>B. lactis</i>			
	Antes		Após		Antes		Após	
	Média	DP	Média	DP	Média	DP	Média	DP
T1	9,3 <sup>Aa</sup>	0,1	6,3 <sup>Ba</sup>	0,1	9,04 <sup>Aa</sup>	0,03	4,96 <sup>B,a</sup>	0,2
T2	9,3 <sup>Aa</sup>	0,2	7,2 <sup>Bb</sup>	0,1	9,2 <sup>Aa</sup>	0,3	5,3 <sup>B,a</sup>	0,3
T3	9,0 <sup>Ab</sup>	0,2	7,5 <sup>Bc</sup>	0,2	9,01 <sup>Aa</sup>	0,05	7,8 <sup>B,b</sup>	0,5

A, B: médias com letras iguais na mesma linha para o mesmo microrganismo não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ );

a, b,c: médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ );

T1: cápsulas de alginato de cálcio; T2: cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3: cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia.

Observa-se na tabela 3 que o processo de secagem em secador de bandejas reduziu a população de *L. acidophilus* e *B. lactis* encapsulados de acordo com os três tratamentos. Nas cápsulas produzidas apenas com alginato de cálcio (T1) a sobrevivência do *L. acidophilus* após a secagem foi significativamente menor ( $p < 0,05$ ) que nas cápsulas produzidas com adição com amido resistente (T2) e goma acácia (T3). A redução na população de *L. acidophilus* nas cápsulas sem os prebióticos, amido resistente e goma acácia, foi de 3,0 Log UFC/g e nas cápsulas produzidas com a adição de amido resistente e goma acácia a redução na população de *L. acidophilus* foi de 2,1 e 1,5 Log UFC/g respectivamente, havendo diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre os três processos de encapsulação na sobrevivência de *L. acidophilus*.

Nas cápsulas produzidas com alginato de cálcio e o prebiótico goma acácia (T3) a sobrevivência de *B. lactis* após a secagem foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que nas cápsulas produzidas somente com alginato de cálcio (T1) e com adição de amido resistente (T2). A redução na população de *B. lactis* nas cápsulas com o prebiótico goma acácia (T3) foi de 1,2 Log UFC/g, já nas cápsulas sem prebiótico (T1) e com o prebiótico amido resistente (T2), a redução foi de 4,1 e 3,9 UFC/g, não

havendo diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre estes dois processos de encapsulação na sobrevivência de *B. lactis*.

Os resultados mostraram que, quando a encapsulação foi enriquecida com goma acácia, a sobrevivência dos microrganismos nas cápsulas após o processo de secagem foi maior. Isso ocorreu devido à propriedade da goma acácia de formação de filme, o que tornou a cápsula menos porosa, aumentando, assim, a sobrevivência dos microrganismos probióticos encapsulados estudados no presente estudo.

A adição de amido resistente ao alginato de cálcio no processo de encapsulação de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* ssp já foi reportada anteriormente por Sultana et al.. (2000). Os resultados mostraram que a recuperação dos microrganismos encapsulados com alginato de cálcio e 2% de amido resistente, foi 3 Log UFC/g maior que quando adicionados livres ao iogurte.

O processo de secagem em secador de bandejas não foi adequado no que diz respeito à sobrevivência de *L. acidophilus* e *B. lactis*, pois houve uma redução significativa na população de ambos os microrganismos ( $p < 0,05$ ). A população de *L. acidophilus* nas cápsulas contendo amido resistente e goma acácia, após a secagem, permaneceu em torno de  $10^7$  UFC/g e para *B. lactis*, em torno de  $10^5$  e  $10^7$  UFC/g respectivamente. Assim para atender a legislação vigente (ANVISA, 2008), seria necessário acrescentar uma grande quantidade de cápsulas ao alimento, tornando inviável a aplicação das mesmas.

Outro ponto a ser considerado é a elevada umidade e atividade de água das cápsulas após a secagem.

O processo de secagem empregado reduziu a umidade das cápsulas produzidas de acordo com os tratamentos T1, T2 e T3, em apenas 5,7%, 14,4% e 9,2% respectivamente (tabela 4). Dessa forma, essas cápsulas não seriam adequadas para aplicação em alimentos com baixa atividade de água, como barra de cereais.

Os valores médios de atividade de água das cápsulas produzidas de acordo com os tratamentos T1, T2 e T3 e submetidas ao processo de secagem, não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ), permanecendo em média 0,995 (tabela 5).

**Tabela 4:** Umidade (%) das cápsulas antes e após a secagem para os três tratamentos T1, T2 e T3

Tratamento	Umidade (%)	
	Antes	Após
T1	$99,7 \pm 0,1^a$	$94,0 \pm 0,2^a$
T2	$95,9 \pm 0,4^b$	$81,5 \pm 0,5^b$
T3	$97,6 \pm 0,1^b$	$88,4 \pm 0,1^c$

a, b, c: médias com letras diferentes na mesma coluna apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ ).

T1: cápsulas de alginato de cálcio; T2: cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3: cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia.

**Tabela 5:** Média e desvio padrão de atividade de água das cápsulas produzidas conforme os tratamentos T1, T2 e T3

Tratamento	Aw	
	Média	DP
T1	$0,996^a$	0,000
T2	$0,996^a$	0,002
T3	$0,994^a$	0,003

a: médias com letras iguais não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

T1: cápsulas de alginato de cálcio; T2: cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3: cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia.

Os resultados de umidade mostram que, as cápsulas produzidas somente com alginato de cálcio (T1), antes do processo de secagem, apresentaram teor de umidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que as produzidas com amido resistente (T2) e goma acácia (T3), conforme observado na tabela 4.

Além disso, após a secagem, a umidade das cápsulas contendo amido e goma acácia, apresentou valores significativamente menores ( $p < 0,05$ ) que as cápsulas produzidas apenas com alginato de cálcio. As cápsulas com amido resistente também apresentaram menor umidade (81,5 %) que as cápsulas com goma acácia (88,4%).

Embora as cápsulas submetidas ao processo de secagem tenham apresentado uma baixa população de probióticos, a aplicação das cápsulas, antes do processo de secagem, produzidas pelo método de aspersão desenvolvido no presente estudo se mostrou viável, pois a população de ambos os microrganismos, para os três tratamentos, ficou em torno de  $10^9$  UFC/g. Assim a adição de 1 g de cápsula em 200 g do alimento seria suficiente para atender a legislação (ANVISA, 2008).

A Tabela 6 apresenta o diâmetro médio das cápsulas produzidas de acordo com os tratamentos T1, T2 e T3 (T1, cápsulas de alginato de cálcio; T2, cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3, cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia, antes e após o processo de secagem em secador de bandejas a 38 °C.

**Tabela 6:** Diâmetro médio das cápsulas produzidas conforme os tratamentos T1, T2 e T3

Tratamento	Diâmetro das cápsulas ( $\mu\text{m}$ )	
	Antes	Após
T1	$432 \pm 13$ <sup>Aa</sup>	$191 \pm 6$ <sup>Ba</sup>
T2	$427 \pm 11$ <sup>Aa</sup>	$179 \pm 8$ <sup>Ba</sup>
T3	$422 \pm 10$ <sup>Aa</sup>	$170 \pm 9$ <sup>Ba</sup>

A, B: médias com letras diferentes na mesma linha apresentam diferença significativa ( $p < 0,05$ );

a: médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ );

T1: cápsulas de alginato de cálcio; T2: cápsulas de alginato de cálcio e amido resistente; T3: cápsulas de alginato de cálcio e goma acácia.

Observa-se na tabela 6 que houve uma redução significativa ( $p < 0,05$ ) nos diâmetros das cápsulas após o processo de secagem em secador de bandejas a 38 °C, porém a adição de prebióticos não apresentou influência significativa ( $p > 0,05$ ), tanto para as cápsulas antes quanto após este processo de secagem. Este resultado mostra que a adição de goma acácia e amido resistente no processo de encapsulação não influenciaram o tamanho das cápsulas. Os fatores que determinam o diâmetro das cápsulas são: viscosidade da solução de alginato de sódio; vazão da solução do alginato de sódio; vazão do ar comprimido e a distância entre o bocal de saída da solução de alginato de sódio e solução de cloreto de cálcio.

## 5.2 Influência de prebióticos na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* encapsulados durante o processamento e armazenamento de sorvete

Os resultados da contagem da população de *B. lactis* na calda (antes do congelamento) e no sorvete no tempo 0 (após o congelamento), apresentados na tabela 7, mostram que o congelamento não reduziu significativamente ( $p > 0,05$ ) o número de *B. lactis* no sorvete, para todos os tratamentos avaliados.

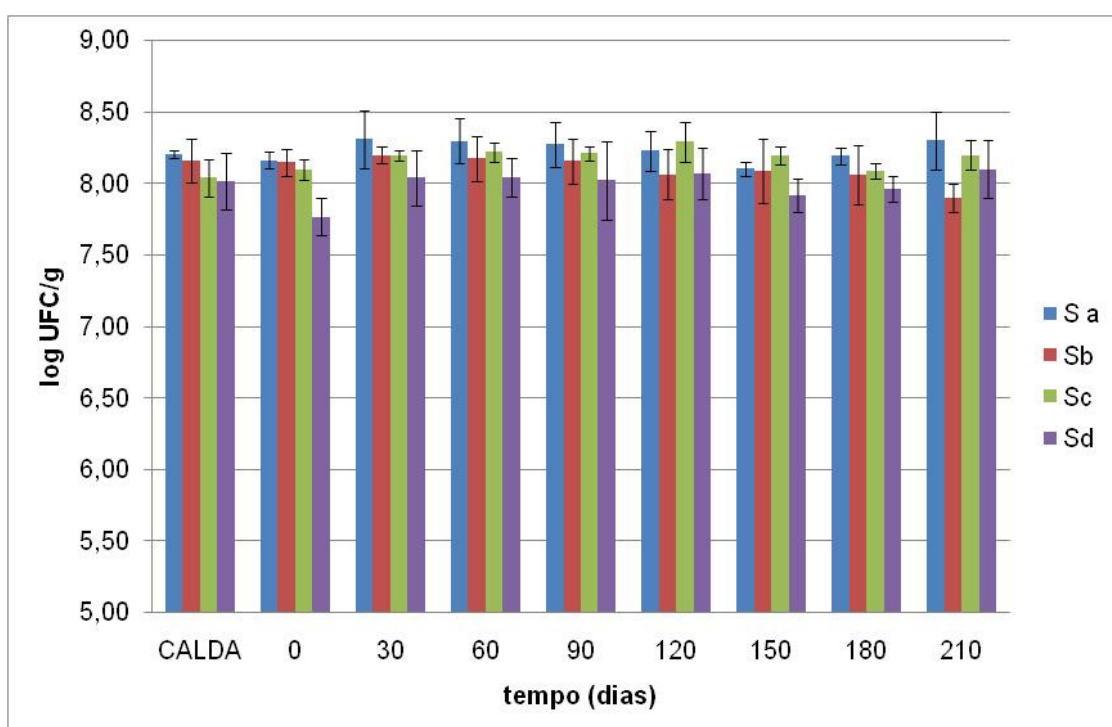
Observa-se, também na tabela 7 e figura 4, que a encapsulação em alginato de cálcio, não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) a sobrevivência do microrganismo no sorvete durante os 210 dias de armazenamento a  $-18^{\circ}\text{C}$ . No sorvete com microrganismos livres (Sa) a população de *B. lactis* ao final de 210 dias de armazenamento, permaneceu em  $8,3 \pm 0,2$  Log UFC/g, enquanto no sorvete com microrganismos encapsulados em alginato de cálcio (Sb), a população permaneceu em  $7,9 \pm 0,1$  Log UFC/g. A encapsulação com alginato de cálcio e prebióticos também não influenciou significativamente ( $p > 0,05$ ) a sobrevivência de *B. lactis* durante o armazenamento do sorvete. Após 210 dias de armazenamento do sorvete, a população do microrganismo ( $8,2 \pm 0,1$  Log UFC/g) encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia (Sc) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) em relação à população da bactéria ( $8,1 \pm 0,2$  Log UFC/g) encapsulada em alginato de cálcio e amido resistente (Sd) e também em relação aos sorvetes Sa e Sb.

**Tabela 7:** População de *B. lactis*, Log UFC/g (média  $\pm$  desvio padrão) na calda (antes do congelamento) e no sorvete durante a estocagem, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente).

Tempo (dias)	<i>B. lactis</i> (Log UFC/g)			
	S a	S b	S c	S d
<b>0 (calda)</b>	8,20 $\pm$ 0,03 <sup>Aa</sup>	8,2 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>
<b>0 (sorvete)</b>	8,16 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	8,15 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>	8,10 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>Ab</sup>
<b>30</b>	8,3 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,20 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	8,20 $\pm$ 0,04 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>
<b>60</b>	8,3 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,2 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,22 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>
<b>90</b>	8,3 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,2 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,21 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>	8,0 $\pm$ 0,3 <sup>Aa</sup>
<b>120</b>	8,2 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,3 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>
<b>150</b>	8,10 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,20 $\pm$ 0,07 <sup>Aa</sup>	7,9 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>
<b>180</b>	8,19 $\pm$ 0,06 <sup>Aa</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	8,09 $\pm$ 0,05 <sup>Aa</sup>	7,96 $\pm$ 0,09 <sup>Aa</sup>
<b>210</b>	8,3 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>	7,9 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	8,2 $\pm$ 0,1 <sup>Aa</sup>	8,1 $\pm$ 0,2 <sup>Aa</sup>

A – médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).

a – médias com letras iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 4:** População de *B. lactis* antes do congelamento (calda) e durante o armazenamento do sorvete.

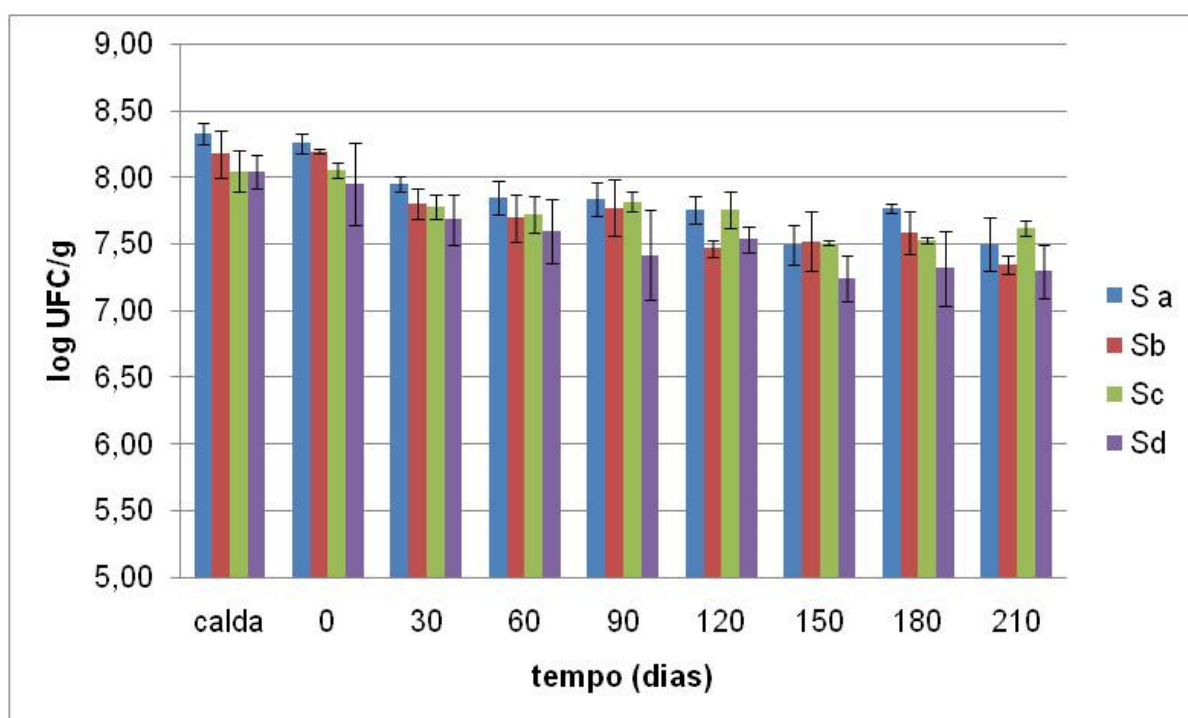
Com relação à população de *L. acidophilus*, verifica-se na tabela 8, que não houve redução significativa ( $p > 0,05$ ) da população de *L. acidophilus* durante o congelamento do sorvete para todos os tratamentos. Esse fato é observado através da comparação da população do microrganismo antes do congelamento (calda) e no tempo 0 de armazenamento do sorvete. Porém, ao longo do armazenamento a população de *L. acidophilus* é reduzida significativamente ( $p < 0,05$ ) para todos os tratamentos. No sorvete com o microrganismo livre (Sa), encapsulado em alginato de cálcio (Sb) e encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia (Sc) a redução passa a ser significativa ( $p < 0,05$ ) a partir do 30º dia de estocagem a  $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$  e para o sorvete com microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente, a partir do 60º dia (tabela 8 e figura 5).

Ao final de 210 dias de armazenamento a população de *L. acidophilus* permaneceu acima de  $10^7$  UFC/g para todos os tratamentos avaliados, indicando que o sorvete de creme apresentou características adequadas para a sobrevivência do microrganismo.

**Tabela 8:** População de *L. acidophilus*, Log UFC/g (média  $\pm$  desvio padrão) na calda (antes do congelamento) e no sorvete durante a estocagem, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente).

DIAS	<i>L. acidophilus</i> (Log UFC/g)			
	Sa	Sb	Sc	Sd
<b>0 (calda)</b>	8,33 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	8,2 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	8,0 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	8,0 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
<b>0 (sorvete)</b>	8,26 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	8,19 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	8,05 $\pm$ 0,06 <sup>a</sup>	8,0 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
<b>30</b>	7,95 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	7,78 $\pm$ 0,09 <sup>b</sup>	7,7 $\pm$ 0,2 <sup>ab</sup>
<b>60</b>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	7,7 $\pm$ 0,2 <sup>bc</sup>	7,7 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>	7,60 $\pm$ 0,07 <sup>bc</sup>
<b>90</b>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	7,8 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	7,82 $\pm$ 0,08 <sup>b</sup>	7,4 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup>
<b>120</b>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	7,47 $\pm$ 0,06 <sup>bc</sup>	7,8 $\pm$ 0,1 <sup>b</sup>	7,5 $\pm$ 0,1 <sup>bc</sup>
<b>150</b>	7,5 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	7,5 $\pm$ 0,2 <sup>bc</sup>	7,51 $\pm$ 0,02 <sup>d</sup>	7,2 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>
<b>180</b>	7,77 $\pm$ 0,05 <sup>b</sup>	7,6 $\pm$ 0,2 <sup>bc</sup>	7,53 $\pm$ 0,01 <sup>d</sup>	7,3 $\pm$ 0,3 <sup>bc</sup>
<b>210</b>	7,5 $\pm$ 0,2 <sup>c</sup>	7,35 $\pm$ 0,07 <sup>c</sup>	7,62 $\pm$ 0,06 <sup>cd</sup>	7,3 $\pm$ 0,2 <sup>bc</sup>

a,b,c,d – médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não apresentam diferença significativa ( $p > 0,05$ ).



**Figura 5:** População de *L. acidophilus* antes do congelamento (calda) e durante o armazenamento do sorvete.



Para comparar a sobrevivência de *L. acidophilus* entre os tratamentos Sa, Sb, Sc e Sd, calculou-se para cada tratamento a diferença da população em determinado tempo em relação à população do microrganismo na calda (antes do congelamento). Os resultados estão apresentados na tabela 9.

Observa-se na tabela 9, que o tratamento Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) foi o único que apresentou diferença significativa ( $p < 0,1$ ) em relação ao tratamento Sa (microrganismo livre), nos tempos 90, 120 e 210 dias de armazenamento. A redução da população de *L. acidophilus* no sorvete com o microrganismo livre (Sa) foi de 0,8 Log UFC/g depois de 210 dias de armazenamento, enquanto no sorvete com o microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia (Sc) a redução foi de 0,4 Log UFC/g no mesmo período. Nos sorvetes com o microrganismo encapsulado em alginato de cálcio (Sb) e alginato de cálcio e amido resistente (Sd) a redução da população de *L. acidophilus* após 210 dias de armazenamento também foi significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que no sorvete com o microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia (Sc).

**Tabela 9:** Diferença (média  $\pm$  desvio padrão) no número de *L. acidophilus* (Log UFC/g), em relação ao número na calda, durante e estocagem do sorvete, para os tratamentos Sa (microrganismo livre), Sb (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio), Sc (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e goma acácia) e Sd (microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e amido resistente).

<i>L. acidophilus</i> (Log UFC)				
Tempo (dias)	S a	S b	S c	S d
30	0,42 $\pm$ 0,02 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
60	0,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,45 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>
90	0,53 $\pm$ 0,00 <sup>a</sup>	0,41 $\pm$ 0,06 <sup>ab</sup>	0,2 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
120	0,61 $\pm$ 0,08 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,3 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,51 $\pm$ 0,05 <sup>ab</sup>
150	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,4 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>
180	0,6 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,6 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>	0,5 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>	0,7 $\pm$ 0,3 <sup>a</sup>
210	0,8 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,9 $\pm$ 0,1 <sup>a</sup>	0,4 $\pm$ 0,2 <sup>b</sup>	0,8 $\pm$ 0,2 <sup>a</sup>

a,b,c,d – médias com pelo menos uma letra igual na mesma linha não apresentam diferença significativa ( $p > 0,1$ ).

Neste estudo, o gênero *Bifidobacterium*, tanto livre quanto encapsulado, sobreviveu melhor que o gênero *Lactobacillus* durante os 210 dias de armazenamento do sorvete a -18°C. O mesmo foi observado por Akalin e Erisir (2008), que incorporaram *L. acidophilus* La-5 e *B. animalis* Bb 12, livres, em sorvetes contendo inulina e oligofrutose. Os autores mostraram que mesmo havendo redução significativa da população de ambos os microrganismos após 90 dias de armazenamento a -18 °C, o gênero *Bifidobacterium* subsp. *animalis* Bb12 incorporado ao sorvete contendo oligofrutose atingiu o nível mínimo de 10<sup>6</sup> UFC/g, enquanto *L. acidophilus* La-5 atingiu 10<sup>5</sup> UFC/g.

Assim como no presente estudo, Kailasapathy e Sultana (2003), também verificaram que o encapsulamento em alginato de cálcio não aumentou a sobrevivência de *L. acidophilus* (DD910) e *B. lactis* (DD920) incorporados em sorvete e armazenados a -20°C durante 180 dias. A redução celular de *L. acidophilus* encapsulado e livre após 6 meses de armazenamento foi de 2,06 e 2,52 ciclos logarítmicos respectivamente e para *B. lactis* encapsulado e livre a redução celular foi de 2,42 e 1,8 ciclos logarítmicos respectivamente. Godward e Kailasapathy (2003), também verificaram que em queijo tipo cheddar, o encapsulamento, em alginato de cálcio enriquecido com amido resistente, de *L. acidophilus* CCCC2401, *B. infantis* CCCC1912 e a linhagem comercial de *B. lactis* 920, prejudicou a sobrevivência dos microrganismos. Após 24 semanas de armazenamento entre 8 e 10 °C, os microrganismos probióticos encapsulados, tiveram redução de 1 a 2 ciclos logarítmicos em relação às células livres. Segundo os autores, essa redução maior de bactérias encapsuladas deveu-se à matriz do alimento que é complexa, impedindo, assim, a troca de nutrientes e metabólitos entre as cápsulas e o ambiente externo.

Conforme verificado nos trabalhos de Kailasapathy e Sultana (2003) e Godward e Kailasapathy (2003), a alta taxa de sobrevivência dos microrganismos no presente estudo, principalmente das células adicionadas livres ao produto, pode ser justificada pelo alto teor de sólidos totais (33,6 %) e gordura (6,7%), que poderia proteger ou até mesmo encapsular os microrganismos probióticos. Além disso, o sorvete apresentou pH 6,28, estando dentro da faixa de pH (5,5 a 6,5) considerada,

segundo vários autores, favorável para a sobrevivência de microrganismos probióticos (GODWARD & KILASAPATHY, 2003; CRUZ et al., 2009; RANADHEERA, 2010).

Diferentemente do observado neste trabalho, Hamayouni et al. (2008), mostraram que a encapsulação em alginato de cálcio enriquecido com amido resistente, aumentou em torno de 30% a sobrevivência de *L. acidophilus* (LC-01) e *B. lactis* (Bb-12) em sorvete contendo 1% de amido resistente armazenado durante 180 dias a -20°C, porém essa diferença só foi significativa após 90 dias de armazenamento. As diferenças observadas nos resultados do presente estudo e de Hamayouni et al. (2008) podem ser justificadas pela sensibilidade das linhagens utilizadas e pelos valores de overrun obtidos. No presente estudo, o overrun ficou em torno de 41%, enquanto em Hamayouni et al. (2008), em 95%, ou seja, houve uma maior incorporação de ar, o que pode ter sido prejudicial para a sobrevivência de *B. lactis*, que apresenta metabolismo anaeróbio (SULTANA et al., 2000; HANSEN et al., 2002; HAMAYOUNI et al., 2007).

Pinto et al. (2009), também observaram que a encapsulação em alginato de cálcio de *L. acidophilus* NCFM e *B. animalis* sbsp. *lactis* aumentou significativamente a viabilidade dos microrganismos quando incorporados em sorvete contendo inulina durante 60 dias de armazenamento a -18°C. O aumento foi de 1 Log UFC/g para *L. acidophilus* e 1,5 Log UFC/g para *B. lactis*.

A população de *B. lactis* e *L. acidophilus*, tanto livres quanto encapsulados, permaneceu em torno de 8,1 e 7,5 Log UFC/g respectivamente após 210 dias a -18 °C. Portanto, o sorvete de creme desenvolvido pode ser considerado um alimento adequado para a incorporação destes microrganismos, pois ambos se mantiveram em quantidades adequadas para o produto ser considerado probiótico conforme estabelecido na legislação brasileira que determina que, a concentração mínima de probiótico no produto deve ser de  $10^8$  a  $10^9$  UFC na porção recomendada até o momento do consumo (ANVISA 2008). Outra observação importante é que, para as condições estudadas no presente estudo, não é necessário encapsular os

microrganismos. Dessa forma, o único custo adicional na produção de um sorvete probiótico, sabor creme, seria o dos microrganismos probióticos.

### 5.2.1 ANÁLISES DO SORVETE

Os resultados da composição centesimal do sorvete (tabela 10) mostram que, conforme especificado na legislação (ANVISA, 2005), o produto pode ser classificado como sorvete de creme, pois apresenta teores de sólidos totais acima de 32% e proteínas acima de 2,5%.

**Tabela 10:** Composição centesimal do sorvete (média  $\pm$  desvio padrão)

<b>Componente</b>	<b>Teor (%)</b>
Cinzas	1,280 $\pm$ 0,004
Sólidos Totais	33,55 $\pm$ 0,02
Proteínas	3,4 $\pm$ 0,2
Gorduras	6,7 $\pm$ 0,6
Carboidratos	23,5 $\pm$ 0,9

O sorvete apresentou teor de ácido láctico de (0,20  $\pm$  0,05 %) e pH 6,28  $\pm$  0,02, valores considerados adequados para a sobrevivência de microrganismos probióticos, conforme já citado por Cruz et al. (2009).

O overrum obtido foi de (41  $\pm$  4 %), devido à limitação do equipamento utilizado para bater o sorvete. A baixa incorporação de ar no produto pode ter favorecido a sobrevivência de *B. lactis*, que apresenta metabolismo anaeróbio. (CRUZ et al., 2009).

### 5.2.2 ANÁLISE SENSORIAL

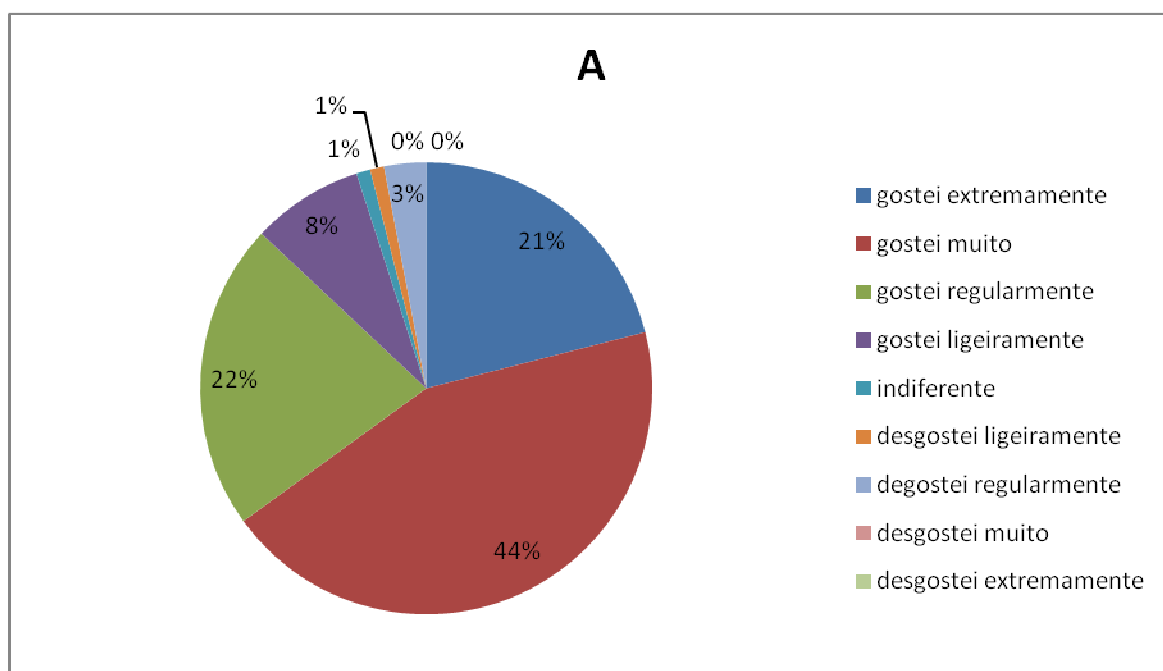
Com relação às características sensoriais dos produtos, a média das notas obtidas para a amostra A (sorvete com microrganismos livres) e amostra B (sorvete com microrganismos encapsulados em alginato de cálcio) foi de 7,61 e 7,75% respectivamente, não havendo diferença significativa entre ambas ( $p > 0,05$ ).

A amostra A (sorvete com microrganismos livres) obteve aceitação entre “gostei regularmente” (22%), “gostei muito” (44%) e “gostei extremamente” (21%), que corresponde às pontuações 7, 8 e 9 da escala hedônica de 9 pontos. Assim a porcentagem de provadores que gostaram da amostra A (pontuação igual ou maior que 6 na escala hedônica) foi de 95% (figura 6).

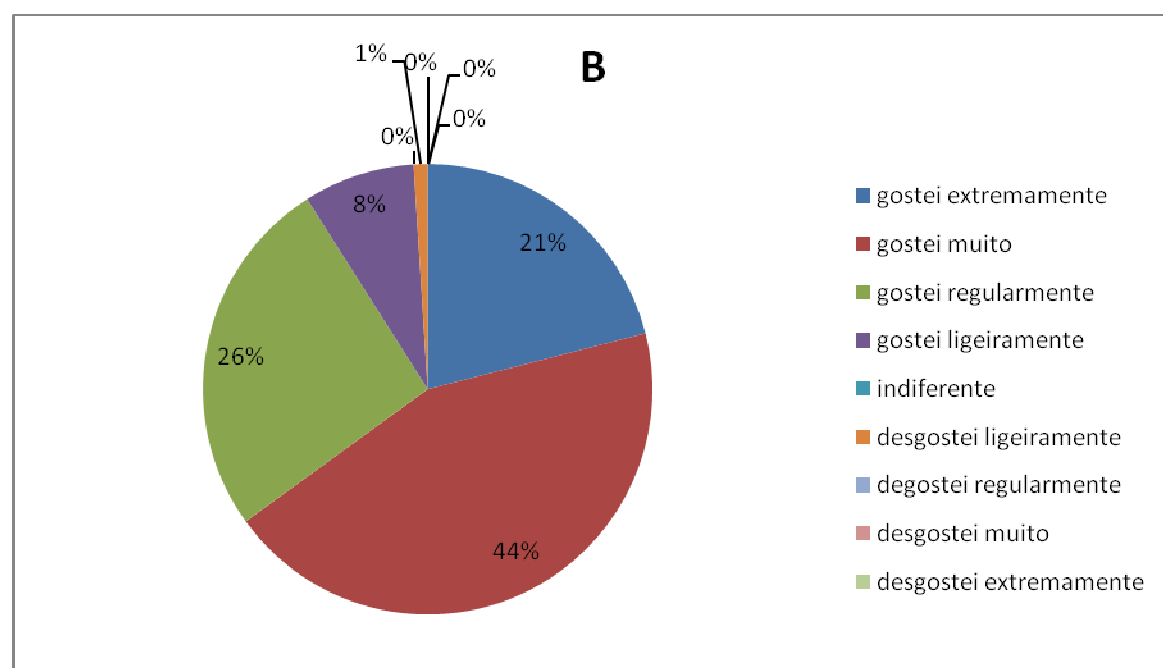
A amostra B (sorvete com microrganismos encapsulados em alginato de cálcio) obteve aceitação entre “gostei regularmente” (26%), “gostei muito” (44%) e “gostei extremamente” (21%), que corresponde às pontuações 7, 8 e 9 da escala hedônica de 9 pontos. Assim a porcentagem de provadores que gostaram da amostra B (pontuação igual ou maior que 6 na escala hedônica) foi de 99% (figura 7).

Em relação à intenção de compra do produto 76% dos provadores comprariam a amostra A e 74% comprariam a amostra B, sendo que 19% talvez comprassem a amostra A e 21% talvez comprassem a amostra B.

Autores sugerem que, para as características sensoriais de produtos como sorvete não seja alterada, o diâmetro das cápsulas deve ser no máximo de 80  $\mu\text{m}$  (HANSEN et al., 2002; HAMAYOUNI et al., 2007; CAPELA et al., 2007) . O que não ocorreu no presente estudo, onde o diâmetro das cápsulas ficou em torno de 477  $\mu\text{m}$ . Porém, analisando-se as fichas das amostras onde continham os microrganismos encapsulados (amostra B), nenhum dos provadores observou a presença das cápsulas. Isso se deve ao fato das cápsulas terem sido bem homogeneizadas no produto e também, devido às características do produto, pois se trata de um produto cremoso, tornando, assim, as cápsulas imperceptíveis.



**Figura 6:** Aceitabilidade dos provadores para a amostra A (microrganismos livres)



**Figura 7:** Aceitabilidade dos provadores para a amostra B (microrganismos encapsulados em alginato de cálcio)

## 6. CONCLUSÕES

O método de encapsulação utilizado no presente estudo mostrou-se tecnologicamente viável, pois a população dos microrganismos probióticos atingiu valores acima de  $10^9$  UFC/g.

As condições de secagem, em secador de bandejas, fixada neste trabalho não foram adequadas para a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* NCFM e *Bifidobacterium lactis* BI-04.

A secagem em estufa com circulação de ar a 55°C por oito horas causou uma redução na população de *L. acidophilus* de aproximadamente dois ciclos logarítmicos.

A encapsulação em alginato de cálcio com goma acácia promoveu maior proteção às células de *L. acidophilus* e *B. lactis* submetidos à secagem em secador de bandejas a 38 °C por quatro horas.

A encapsulação de *L. acidophilus* em alginato de cálcio com goma acácia favoreceu a sobrevivência do microrganismo em sorvete de creme armazenado por 210 dias a -18 °C.

A encapsulação de *B. lactis* em alginato de cálcio com ou sem os prebióticos (goma acácia e amido resistente) não influenciou a sobrevivência do microrganismo em sorvete de creme armazenado por 210 dias a -18 °C.

Após 210 dias de armazenamento, todos os sorvetes estudados, podem ser considerados probióticos de acordo com a legislação brasileira vigente (ANVISA, 2008).

Os resultados da análise sensorial mostraram que a adição de microrganismos encapsulados ao sorvete não é perceptível ao paladar.

## BIBLIOGRAFIA

AGÊNCIA BRASIL. **Mercado Probiótico**. Disponível em < <http://www.agenciabrasil.gov.br> > Acessado em 13 de novembro de 2009.

AKALIN, A.S.; ERISIR, D. Effects of inulin e oligofructose on the rheological characteristics and probiotic culture survival in low-fat probiotic ice cream. **Journal of food science**, v. 73, n. 4, p. 184 – 188, 2008.

AKIN, M. S. Effects of inulin and different sugar levels on viability of probiotic bacteria and the physical and sensorial characteristics of probiotic fermented ice-cream. **Harran University Agricultural Faculty Department of Food Engineering**, v. 60, p. 297-301, 2005.

ANNAN N.T.; BORZA A.D.; TRUELSTRUP HANSEN L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food research international**, v. 41, p. 184-193, 2008.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n° 18. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, abril de 1999.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n° 360. Regulamento Técnico Sobre Rotulagem Nutricional de Alimentos Embalados. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, dezembro de 2003.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. **Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil**, Brasília, julho de 2008.

ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 267 de 25 de setembro de 2003. Regulamento Técnico De Boas Práticas De Fabricação Para Estabelecimentos Industrializadores De Gelados Comestíveis **Disponível em:** <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/> > acessado em 27 de setembro de 2010.



ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC n° 266 de 22 de setembro de 2005. Regulamento Técnico Para Gelados Comestíveis E Preparados De Gelados Comestíveis. **Disponível em:** <http://extranet.agricultura.gov.br/sislegis/> > acessado em 27 de setembro de 2010.

BACCHMI, D. C.; ALVÃO, J. C.; FRIAS, L. P. **Desenvolvimento de barra de cereal probiótica de abacaxi com amaranto**. São Caetano do Sul: IMT, 2007.

BIRD, A. R.; BROWN, I. L.; TOPPING, D. L. **Starches, Resistant Starches, the gut microflora and human health**. Curr. Issues Intest. Microbiol. v.1, p. 25-37, 2000.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. **Food research international**, v. 39, p. 203 – 211, 2006.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C.; SHAH N.P. Effect of homogenization on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food research international**, v. 40, p. 1261-1269, 2007.

CARDARELLI, H. R., ARAGON-ALEGRO, L.C., ALEGRO J.H.A., CASTRO, I.A., SAAD, S.M.I. Effect of inulin and Lactobacillus paracasei on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the science of food and agriculture**, v. 88, p. 1318-1324, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER P. Microencapsulation for the improvement delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007.

CHARALAMPOPOULOS, D.; PANDIELLA, S.S.; WEBB, C. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International dairy of food microbiologic**, v. 82, p. 133-141. 2003.

CHE, K. N., CHEN, M.J., LIU, J.R., LIN, C.W., CHIU, H.Y. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. **Food microbiology and safety**, v. 70, n. 5, p. 260-266, 2005.

CHERBUT, C., MICHEL, C., RAISON, V., KRAVTCHENKO, T., SEVERINE, M. Acacia gum is a bifidogenic dietary fiber with high digestive tolerance in healthy humans. **Microbial ecology in healthy and disease**, v.15, p. 43-50, 2003.

CONWAY, P.L. Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. **Scandinavian journal of nutrition**, v. 45, n. 13, p. 13 – 21. 2001.

CRUZ, A.G., ANTUNES, A.E.C., SOUSA, A.L.O.P., FARIA, J.A.F, SAAD, S.M.I. Ice cream as a probiotic food carrier. **Food research international**, v. 42, p. 1233 – 1239, 2009.

DESAI, K.G.H; PARK, H.J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying technology**, v. 23, p. 1361-1394, 2005.

DESMOND, C., ROSS R.P., O`CALLAGHAN, E., FITZFERALD, G., STANTON C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum Arabica. **Journal of applied Microbiology**, v.93, p. 1003-1011. 2002.

DING, W.K., SHAH, N. P. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International food research journal**, v. 15, p. 219-232, 2008.

DUTCOSKY, S.D., **Análise Sensorial de Alimentos**. Ed. Universitária Champagnat, Curitiba, 1996, 123p.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO S.C.; ROCHA G.A. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian journal of food technology**, v. 11, n. 2, p. 102-112, 2008.

FAOWHO (2002) **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting for the evaluation of probiotics in food, London Ontario, Canada. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>.

FOOKS, L. J., FULLER, R., GIBSON, G. R. Prebiotic, probiotic and human gut microbiology. **International dairy journal**, v. 9, p. 53-61. 1999.

FREITAS, D.G.C.; MORETTI, R.H. Caracterização e avaliação sensorial de barra de cereais funcional de alto teor protéico e vitamínico. **Ciência e tecnologia de alimentos**, v. 26, p. 318-324, Campinas, 2006.

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

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

GLOVER, D.A.; USHIDA, K.; PHILIPS, A.O.; RILEY, S.G. Acacia (sen) SUPERGUM™ (Gum Arabic): An evaluation of potential health benefits in human subjects. **Food hydrocolloids**, v. 23, p. 2410-2415. 2009.

GODWARD, G.; KAILASAPATHY K. Viability and survival of free and encapsulated probiotic bacteria in cheddar cheese. **Milchwissenschaft**, v. 58, p. 624-627, 2003.

GOMES, A.M.P; MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: bioLogical, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotic. **Trends and food science & technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOUIN, S.; Microencapsulation: industrial appraisal of existing Technologies and trends. **Food Science technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GROSSO, C.R.F.; TRINDADE, C.S.F. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yogurt. **Brazilian journal of microbiology**, v. 35, p. 151 – 156, 2004.

HANSEN, L.T; WOJTAS, P.M.A.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulates *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.

HATTINGH, A. L./ VILJOEN, B. C. Yogurt as probiotic carrier food. **International dairy food**, v. 11, p.1-17. 2001.

HI-MAIZE NATIONAL STARCH. Disponível em <<http://www.hi-maize.com.br>> acesso em 01 de novembro de 2009.

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M.R.; AZIZI, A.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of lecithin and calcium chloride solutions on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. **Iranian polymer journal**, v. 16, p. 597-606, 2007.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. **Food chemistry**, v. 111, p. 50 – 55, 2008.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. Brasília, DF: Ministério da Saúde, 2005. 1018 p

KAILASAPATHY, K. Protecting probiotics by microencapsulation. **Microbiology Australia**, v. 24, n. 1, p. 30-31, março 2003.

KALASAPATHY, K., SULATAN, K. Survival and  $\beta$ -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. The **Australian journal of dairy technology**, v. 58, n. 3, p. 223-227, 2003.

KAUR, N.; GUPTA, A.K.; Applications of inulin and oligofructose in health nutrition. **J. Biosci. Bangalore**, v. 27, p. 703-714, 2002.

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

KUSHAL, R.; ANAND, S.K.; CHANDER, H. Development of a direct system for a co-culture of *L. acidophilus* and *B. bifidum* based on micro-entrapped. **Division of dairy microbiology of National Dairy Research Institute**, v. 60, n. 2, p.130 – 134, 2005.

LARKIN, T.A.; ASTHEIMER, L.B.; PRICE, W.E. Dietary combination of soy with a probiotic or prebiotic food significantly reduces total LDL cholesterol in mildly hypercholesterolemia subjects. **European journal of clinical nutrition**, v. 63, p. 238 – 245, 2009.

LE LEU, R.K.; HU, Y.; BROWN, I.L.; WOODMAN, R.J.; YOUNG, G.P. Symbiotic intervention of *Bifidobacterium lactis* and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**, v. 31, n. 2, p. 246 – 251, 2009.

LISERRE, A.M; RÉ M.I.; FRANCO, B.D.G.M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.

MARTIN, P. The good bacterias-health gut foods. **Microbiology Australia**, v. 24, n. 1, p. 5-10, 2003.

MICHEL, C.; KRAVTCHENKO, T.P.; DAVID, A.; GUENEAU, S.; KOZLOWSKI, F.; CHERBUT, C. In Vitro prebiotic of Acacia Gums onto the human intestinal microbiota

depends on both botanical origin and environmental pH. **Anaerobe**, v. 4, p. 257-266, 1998.

MOSQUIM, M.C.A. **Fabricando sorvete com qualidade**. São Paulo: Fontes Comunicação 1999. 118 p.

MUTHUKUMARASAMY, P., HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International journal of food microbiology**, v. 111, p. 164-169, 2006.

ÖZER, B., UZUN, S., KIRMACI, H. A. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. **International dairy journal of dairy technology**, v. 61, n. 3, p. 237-244, 2008.

ÖZER, D; AKIN, S.; ÖZER, B. Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. **Food science technology international**, v. 11, n. 1, p. 19-24, 2005.

PASTORE, G. M.; MACEDO, G. A. Funcionais: inovação na indústria de alimentos. **Departamento de Ciência de Alimentos Faculdade de Engenharia Alimentos – Unicamp. Campinas**, 2004.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 88-92, 2007.

PHILLIPS, G. O. OGASAWARA, T., USHIDA, K. The regulatory and scientific approach to defining gum Arabic (*Acacia Senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fiber. **Food hydrocolloids**, v. 22, p. 24-35, 2008.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R., AURA, A. M., OKSMANCALENTEY, K.M., MYLLÄRINEN, N.P., SAARELA, M., MATTILA-SANHOLM, T., POUTNEN, K. Development of functional ingredient for gut health. **Trends food science technology**, v. 13, p. 3-11. 2002.

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

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying technology**, V.16, p. 1195-1236, 1998.

REID, A.A.; CHAMPAGNE C.P.; GARDNER N.; FUSTIER P.; VUILLEMARD J.C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnous* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Food microbiology and safety**, v. 72, n. 1, p 31 – 37, 2007.

RIBEIRO, E. P.; SERAVALLI, E.A.G. **Química de Alimentos**. São Caetano do Sul: IMT, 2004. 184 p.

ROY, D. Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. **Institute of nutraceuticals and functional foods and center STELA, Laval University**, v. 85, p. 39 – 56, 2005.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista brasileira de ciências farmacêuticas**, v. 42, n. 1, p. 1-12. 2006.

SALGADO, S.M.; FARO, Z.P.; GUERRA, N.B; LIVERA, A.V.S. Aspectos físico-químicos do amido resistente. **B.CEPPA**, v. 23, n.1, p. 109 – 122, 2005.

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

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A.; Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance – a review. **Appetite**, p.456 – 467, 2008.

SHAH N.P.; RAVULA R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. The **Australian journal of dairy technology**, v. 55, n. 3, p. 139 – 144, 2000.

SHAHID, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 33, p. 501 – 547, 1993.

SHARMA, A. YADAV, B.S.; RITIKA. Resistant starch: physiological roles and food application. **Food reviews international**, v. 24, n. 2, p. 194 – 234, 2008.

SHEU T.Y., MARSHALL R.T. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of food science**, v. 54, n. 3, p. 557 – 561, 1993.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY R.; PEIRIS P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival and simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International journal of food microbiology**, v. 62, p. 47 – 55, 2000.

SUSKOVIC, J., KOS, B., GORETA, J., MATOSIC, S. Role of lactic acid bacteria and Bifidobacteria in symbiotic effect. **Department of biochemical engineering, faculty of food technology and biotechnology**, v. 39, p. 227-235, 2001.

TALWALKAR, A., KAILASAPATHY, K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. **The Australian journal of dairy technology**, v. 58, n.1, p. 36-39, 2003.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the use of probiotics in ice cream manufacture. **International journal of dairy technology**, v. 62, n. 3, p. 444 – 451, 2009.

WORTHLEY,D.L.; LE LEU, R.K.; WHITEHALL, V.L.; CONLON, M.; CHRISTOPHERSEN, C.; BELOBRAJDIC, D.; MALLIT, K.A.; HU, Y.; IRAHARA, N.; OGINO, S.; LEGGET, B.A.; YOUNG, G.P. A human, double-blind, placebo-controlled, crossover trial of prebiotic, probiotic, and symbiotic, supplementation: effects on luminal, inflammatory, epigenetic, and epithelial biomarkers of colorectal cancer. **The American journal of clinical nutrition**, v. 90, n. 3 p. 578 – 586, 2009.

## **ANEXO A – FICHA DA ANÁLISE SENSORIAL**