

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

BRUNA LÚCIA DE MENDONÇA SOARES

**DESENVOLVIMENTO DE UMA BEBIDA FUNCIONAL A BASE DE
CAJU (*Anacardium occidentale L.*) COM *Lactobacillus casei* DN 114-001
LIVRE E MICROENCAPSULADO**

RECIFE, 2016

Bruna Lúcia de Mendonça Soares

**Desenvolvimento de uma bebida funcional a base de caju
(*Anacardium occidentale L.*) com *Lactobacillus casei* DN 114-001
livre e microencapsulado**

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

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Co-Orientadora: Prof.^a. Dr^o. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Recife

2016

Catálogo na Publicação (CIP)
Bibliotecária: Mônica Uchôa, CRB4-1010

S676d Soares, Bruna Lúcia de Mendonça.
Desenvolvimento de uma bebida funcional a base de caju
(*anacardium occidentale* L.) com *lactobacillus casei* DN 114-001 livre e
microencapsulado / Bruna Lúcia de Mendonça Soares. – 2016.
163 f.: il.; tab.; 30 cm.

Orientadora: Tânia Lucia Montenegro Stamford.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco,
CCS. Programa de Pós-Graduação em Nutrição. Recife, 2016.
Inclui referências, apêndices e anexos.

1. *Anacardium occidentale*. 2. Microcápsulas. 3. Probióticos. 4.
Quitosana. I. Stamford, Tânia Lucia Montenegro (Orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.) UFPE (CCS2016-085)

Bruna Lúcia de Mendonça Soares

Desenvolvimento de uma bebida funcional a base de caju (*Anacardium occidentale L.*) com *Lactobacillus casei* DN 114-001 livre e microencapsulado

Dissertação aprovada em: 23 de fevereiro de 2016

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford

Profa. Dra. Maria Goretti Pessoa de Araújo Burgos

Profa. Dra. Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud

Recife

2016

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, à Deus, que é causa primária de todas as coisas. Agradeço pela oportunidade de estar onde estou, de ser capaz de realizar este trabalho, pela possibilidade de aprender e me tornar melhor a cada dia.

Ao meu anjo da guarda, por todo amor e conselhos. Obrigada pela influencia benéfica e por me orientar quanto ao caminho correto a seguir.

Aos meus pais Silvana Mendonça e Orlando Soares, por sempre acreditarem em mim e pela confiança em minhas escolhas. Agradeço sempre a Deus por ter vocês na minha vida e por Ele ter me dado a melhor e mais guerreira mãe do mundo.

Ao meu esposo, Antônio Leonardo, pela indescritível dedicação, por todo companheirismo, por toda compreensão, por todo amor e amizade. Obrigada por sempre me ajudar e por entender minha vida de estudos.

A Malu, meu amor eterno. Obrigada por estar viva no meu coração e por me dar forças.

A minha avó Elisa, pois só cheguei até aqui por todo apoio que ela sempre deu. Obrigada por ser tão presente e ser nossa vó-mãe.

As minhas irmãs e melhores amigas, Amanda Mendonça e Nataly Mendonça, que sempre me apoiam cegamente. Obrigada pela nossa amizade, obrigada por entender quando eu desmarcava os compromissos para estudar. Vocês são tudo para mim.

A minha orientadora Tânia Stamford, por todo carinho, confiança e oportunidade. Não tenho palavras para descrever o quanto foi especial conhece-la melhor, obrigada por todo conhecimento e paciência.

A minha Co-orientadora Thatiana Stamford Arnaud, por todo apoio, por ser uma pessoa tão amiga e generosa com seu carinho e com seus conhecimentos. Obrigada pela paciência, pela amizade, pela torcida. Sou muito grata por suas palavras de apoio que me deram muita força.

A professora Thayza Stamford, pela alegria de sempre, por estar sempre dedicada em resolver as broncas, pelo carinho em todos os momentos. Agradeço a Deus pela oportunidade de conhece-la.

A professora e amiga do coração Goretti Burgos, por confiar em mim mais até do que eu mesma. Você é um presente em minha vida, por intermédio da professora Francisquinha Bion. Obrigada por participar da minha banca, é uma honra tê-la mais uma vez em um momento importante como este.

As amigas do laboratório: Fernanda Luizy que tanto me ajudou no início do laboratório, sem sua ajuda ainda estaria tentando entender o que é meio de cultura. A Natália Melo, pelo companheirismo em estarmos sempre juntas para aprender do zero. A Dra. Michelle Galindo, por sua amizade e humildade, por ser uma pessoa de coração tão lindo e por sempre estar disposta a ajudar.

A Vitória e Cherry, pelos momentos de diversão e por todo amor. Só por vocês eu largava os estudos para ir ao médico.

Ao quarteto fantástico Catarine Santos, Natália Carvalho e Dayse Lima, por toda amizade que começou na graduação e vai durar a vida.

As amigas e companheiras do mestrado Maria Izabel, Patrícia Fortes, Priscilla Santos, Stella Vasconcelos pela convivência em mais esta jornada.

Aos técnicos e funcionários do LEAAL, por toda disponibilidade e ajuda nas análises necessárias para a conclusão deste trabalho. Em especial e com grande carinho e admiração a Camilo e Vivaldo, por serem tão dedicados a ajudar acima de tudo.

Ao Departamento de Química Fundamental da UFPE, pela ajuda no recebimento e realização das análises referentes a caracterização da quitosana.

Aos funcionários do Lika, por me receberem com carinho e me ajudarem quando precisei realizar análises nos laboratórios. Um agradecimento especial ao Profº Drº José Luiz de Lima Filho, por me receber com tanto carinho, humildade e por abrir as portas do Lika para meus experimentos.

Ao CNPQ pela bolsa de mestrado, a qual foi muito importante para minha dedicação exclusiva a esta pesquisa.

RESUMO

O grande interesse e consumo de alimentos contendo probióticos deve-se aos benefícios trazidos à saúde. Entretanto a maioria desses produtos são de origem láctea, resultando num impedimento para o consumo por alguns grupos populacionais, como intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite e hipercolesterolêmicos, tornando o uso de alimentos de origem vegetal uma prática promissora. A técnica da microencapsulação contribui para aumentar a sobrevivência dos microrganismos por formar uma barreira física contra condições desfavoráveis. Desta forma, o presente estudo tem como objetivo desenvolver uma bebida funcional à base de caju adicionada de *Lactobacillus casei*, livre ou microencapsulado com matriz alginato de cálcio-quitosana. Microcápsulas foram preparadas pelo método de emulsão/gelificação interna, com o alginato como agente encapsulante e posterior revestimento das esferas com quitosana. As microcápsulas de *L. casei* foram caracterizadas quanto à morfologia, tamanho das partículas e rendimento de encapsulação. A bebida de caju foi elaborada com 45% de polpa e adição de 10% de açúcar e teve sua composição físico-química e nutricional detalhada. As bebidas controle (sem probióticos), com *L. casei* livres e com microcápsulas foram armazenadas em refrigeração (4°C) por 4 semanas, análises físico-químicas e microbiológicas foram realizadas nos tempos 0, 7, 14, 21 e 28 dias. Simulações gastrointestinais (SGI) *in vitro*, no início e final do armazenamento, foram realizadas para avaliar a taxa de sobrevivência das células. Foram realizados testes de aceitabilidade e intenção de compra com o objetivo de obter informações sobre a aceitação do consumidor quanto as três formulações da bebida de caju. Durante SGI, *L. casei* livre perdeu toda viabilidade, enquanto que células encapsuladas mostraram resistência, reduzindo 1,42 log UFC após simulação gástrica e <1 log UFC ao termino da simulação intestinal. Após 28 dias de estocagem, bebidas contendo microcápsulas e células livres apresentaram 10,2 e 8,1 log UFC/mL, respectivamente. As características físico-químicas mantiveram-se estáveis durante armazenamento e frente bebida controle (sem probióticos). A análise sensorial demonstrou que as bebidas foram aceitas pelos provadores, apesar das microesferas terem sido percebidas. Concluímos que bebida de caju é um substrato favorável para sobrevivência de *L. casei* livre e microencapsulado por 28 dias e que a microencapsulação é uma técnica promissora para prolongar a viabilidade das células e a sobrevivência em SGI.

Palavras-chaves: *Anacardium occidentale*. Microcápsulas. Probióticos. Quitosana.

ABSTRACT

The great interest and consumption of probiotic foods is due to the health benefits, however most of these products are of dairy origin, resulting in an impediment to consumption for some population groups, as lactose intolerant, allergic to milk protein and hypercholesterolemic, which makes the use of foods of vegetable origin, for the development of functional products, a promising practice. The microencapsulation technique increases the survival of microorganisms in hostile environments, as the gastric juice, assisting the arrival of a greater number of viable bacteria to the intestine. Thus, this study aims to develop a functional beverage cashew apple added of *Lactobacillus casei*, free or microencapsulated with matrix calcium alginate-chitosan. The microcapsules are prepared by the emulsification/ internal gelation method, with calcium alginate as encapsulating agents and subsequent coating of the beads with chitosan. The microcapsules produced are characterized for morphology, particle size and encapsulation efficiency. The cashew apple beverage was prepared with 45% pulp and adding 10% sugar and had its physical-chemical and nutritional composition detailed. Beverages control (no probiotics), with *L. casei* free and with microcapsules were stored in refrigerator (4°C) for 4 weeks, physico-chemical and microbiological analyzes were performed on days 0, 7, 14, 21 and 28 days. Gastrointestinal simulations (SGI), *in vitro*, at the beginning and end of storage, were performed to evaluate the survival rate of the cells. Acceptability and purchase intent tests were performed in order to obtain information about consumer acceptance as the three formulations of cashew apple beverages. During SGI, *L. casei* free lost all viability, while encapsulated cells showed resistance, reducing 1.42 log CFU after gastric simulation and <1 CFU log at the end of the intestinal simulation. After 28 days of storage, beverage containing microcapsules and free cells showed 10.2 and 8.1 log CFU / mL, respectively. The physico-chemical characteristics were stable during storage and front control beverage (no probiotics). Sensory analysis showed that the drinks were accepted by the judges, despite the microspheres have been perceived. Conclude that cashew apple beverage is a favorable substrate for *L. casei* free and microencapsulated survival for 28 days and that microencapsulation is a promising technique to prolong cell viability and survival in SGI.

Key words: *Anacardium occidentale*. Microcapsules. Probiotics. Chitosan.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1. Estrutura molecular do alginato de sódio _____	23
Figura 2. Modelo caixa-de-ovos proposto para representar a ligação das cadeias do alginato com os íons cálcio _____	23
Figura 3. Estrutura molecular da quitosana _____	24
Figura 4. Ilustração de uma microcápsula de alginato de cálcio revestida com quitosana ____	26
Figura 5. Fase aquosa e fase oleosa emulsificadas _____	31
Figura 6. Microcápsulas de alginato de cálcio com <i>L. casei</i> aprisionado, revestidas com quitosana, fabricadas pelo método de emulsificação/gelificação interna _____	32
Figura 7. Espectro no infravermelho da quitosana Kiofine [®] -B _____	39
Figura 8. Espectro de RMN ¹ H da quitosana Kiofine [®] -B _____	41
Figura 9. Média das contagens (log UFC/mL) de <i>L. casei</i> na forma de microesferas e células livres na bebida de caju durante estocagem refrigerada (4±1°C) _____	49

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Metodologias usadas nas análises físico-químicas para determinação da composição centesimal da bebida de caju _____	34
Tabela 2. Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Kiofine®-B _____	39
Tabela 3. Integração dos picos do espectro de RMN ¹ H da quitosana Kiofine®-B para o cálculo do grau de desacetilação _____	41
Tabela 4. Valores dos graus de desacetilação da quitosana determinados por RMN ¹ H, a partir de duas equações distintas _____	41
Tabela 5. Valor da viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média da quitosana Kiofine®-B _____	42
Tabela 6. Resultado das análises físico-químicas obtidos durante estocagem das bebidas de caju controle (C), com microesferas (M) ou células livres (L) de <i>L. casei</i> _____	44
Tabela 7. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico nas bebidas de caju controle, com <i>L. casei</i> livre ou microencapsulados durante armazenamento refrigerado (4°C) _____	46
Tabela 8. Diferença total de cor (ΔE^*) das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de <i>L. casei</i> (L) durante estocagem _____	47
Tabela 9. Avaliação microbiológica da bebida controle e com adição de microesferas e células livres de <i>L. casei</i> no tempo zero e no último dia de armazenamento refrigerado _____	47
Tabela 10. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do <i>L. casei</i> microencapsulado (M) e Livre (L), no tempo inicial (dia zero - D0) e no período final de armazenamento (dia 28 – D28), durante exposição ao suco gástrico simulado (SGS) ou suco intestinal simulado (SIS) _____	52
Tabela 11. Médias das pontuações obtidas no teste de aceitação e intenção de compra das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de <i>L. casei</i> (L) _____	53

SUMÁRIO

1. APRESENTAÇÃO	11
2. OBJETIVOS	14
2.1. OBJETIVO GERAL	14
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	14
3. REVISÃO DA LITERATURA	15
3.1. PROBIÓTICOS	15
3.2. <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	16
3.3. SUCOS DE FRUTA COMO FONTE DE PROBIÓTICOS	17
3.4. CAJU (<i>ANACARDIUM OCCIDENTALE, L</i>)	19
3.5. MICROENCAPSULAÇÃO	20
3.5.1. EMULSIFICAÇÃO/GELIFICAÇÃO INTERNA	21
3.5.2. ALGINATOS	22
3.5.3. QUITOSANA	24
3.5.4. MICROCÁPSULAS DE ALGINATO REVESTIDAS COM QUITOSANA	25
4. MATERIAIS E MÉTODOS	27
4.1. MATERIAIS	27
4.2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA KIOFINE® - B	27
4.2.1. DETERMINAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS ESTRUTURAIS DA QUITOSANA	27
4.2.2. GRAU DE DESACETILAÇÃO	27
4.2.3. MASSA MOLAR	28
4.3. CULTIVO E ENUMERAÇÃO DO <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	29
4.3.1. CULTURA DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	29
4.3.2. ENUMERAÇÃO DO <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	29
4.4. PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS	30
4.4.1. PREPARO DAS CÉLULAS DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> PARA MICROENCAPSULAÇÃO	30
4.4.2. PREPARAÇÃO DAS MICROESFERAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM <i>LACTOBACILLUS CASEI</i>	30
4.4.3. REVESTIMENTO DAS MICROESFERAS DE ALGINATO COM QUITOSANA	31
4.4.4. ENUMERAÇÃO DAS BACTÉRIAS ENCAPSULADAS (EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO)	32
4.4.5. ANÁLISE DA DISTRIBUIÇÃO DE TAMANHO	33
4.5. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BEBIDAS DE CAJU	33
4.5.1. OBTENÇÃO DA POLPA	33
4.5.2. PROCESSAMENTO DA BEBIDA DE CAJU	33
4.5.3. DETERMINAÇÃO DA COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DAS BEBIDAS DE CAJU	33
4.5.4. ADIÇÃO DE <i>LACTOBACILLUS CASEI</i> LIVRE OU MICROENCAPSULADO ÀS BEBIDAS DE CAJU	34
4.6. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS DURANTE ARMAZENAMENTO	35
4.6.1. PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICOS	35

4.6.2. ANÁLISES MICROBIOLÓGICAS	36
4.7. SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS <i>IN VITRO</i>	36
4.8. ANÁLISE SENSORIAL	37
4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA	38
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	39
5.1. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA KIOFINE® - B	39
5.2. COMPOSIÇÃO QUÍMICA DA BEBIDA DE CAJU	43
5.3. CARACTERIZAÇÃO DAS MICROESFERAS	43
5.4. CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS DE CAJU DURANTE ARMAZENAMENTO	44
5.5. SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS <i>IN VITRO</i>	49
5.6. ANÁLISE SENSORIAL	53
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS	56
APÊNDICES	70
APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)	71
APÊNDICE B - FICHA DE ANÁLISE SENSORIAL	73
APÊNDICE C – ARTIGO DE REVISÃO	74
APÊNDICE D – ARTIGO ORIGINAL	99
ANEXOS	132
ANEXO A. APROVAÇÃO DA PESQUISA PELO COMITÊ DE ÉTICA DO CCS/UFPE	133
ANEXO B. TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY (ARTIGO DE REVISÃO)	136
ANEXO C. JOURNAL OF FUNCTIONAL FOOD (ARTIGO ORIGINAL)	149

1. APRESENTAÇÃO

Probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002), e, portanto, têm sido amplamente adicionados em produtos alimentícios, pertencendo à classe de “alimentos funcionais” (SONG et al., 2014; TRABELSI et al., 2013).

Os benefícios que podem ser exercidos pelos probióticos incluem sua capacidade em prevenir e tratar infecções intestinais, estimular o sistema imunológico, aumentar a utilização da lactose em pessoas intolerantes, atuar no controle dos níveis de colesterol sérico e na prevenção de alergias, além de possuir atividade anticarcinogênica (BAKR, 2015; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). A fim de promover estes efeitos benéficos à saúde, a dose mínima eficaz é de $10^8 - 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC) por dia (ANVISA, 2002; CHAMPAGNE et al., 2005; KAILASAPATHY; CHIN, 2000), e a concentração mínima de microrganismos vivos não pode ser menor que 10^7 UFC/g do alimento no momento do consumo (FAO/WHO, 2002), isto porque muitas células morrem durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Os *Lactobacillus casei* possuem um grande valor comercial para a indústria de alimentos por sua utilização na produção de leite fermentados, iogurtes, na fabricação de queijos e de alimentos funcionais de modo geral. Estudos indicam que o consumo regular de produtos contendo *L. casei* pode estar relacionado com a diminuição do risco de câncer e a supressão do câncer colo-retal (DENIPOTE et al., 2010; ITSARANUWAT et al., 2003; OUWEHAND et al., 1999).

Nos últimos anos, é notória a maior preocupação da população com a alimentação, isto é decorrente da conscientização da influência da dieta na saúde. O mercado mundial envolvendo alimentos probióticos representa 30% do mercado global de alimentos funcionais, movimentando aproximadamente 50 bilhões por ano (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014).

Probióticos são incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente em derivados lácteos (leite, sorvete, iogurte, queijo), mas também em leite de soja, maionese, carnes, patês, comidas para bebês, confeitaria, doces, bolos e gomas de mascar (BAKR, 2015; SOHAIL et al., 2012). Sucos de fruta também podem ser uma alternativa para veículo de probióticos, por ter uma ampla aceitação pela população mundial, por ser rico em

nutrientes e por não conter uma cultura iniciadora que compete com os probióticos (DING; SHAH, 2008). O uso de alimentos não lácteos justifica-se, também, pela possibilidade de atender a distintos grupos populacionais como os intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite e hipercolesterolêmicos (ANTUNES et al., 2013; BAKR, 2015).

A sobrevivência de cepas probióticas tem sido estudada em diferentes sucos de fruta como laranja, abacaxi, uva, pera, lichia, romã, limão, cranberry, acerola, pêssego, morango, manga e caju (ANTUNES et al., 2013; DING; SHAH, 2008; GARCIA-CEJA et al., 2015; KINGWATEE et al., 2015; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NUALKAEKUL et al., 2011; NUALKAEKUL et al., 2012; PEREIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012; SOHAIL et al., 2012; VERGARA et al., 2010; YING et al., 2013). Os fatores que influenciam a viabilidade do probiótico no suco de fruta, incluem a espécie/cepa utilizada, o método de preparação de culturas, o tipo de fruta, tempo e temperatura de estocagem, os níveis de oxigênio e o tipo de embalagem (ANTUNES et al., 2013; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; SAARELA et al., 2006).

A tecnologia da microencapsulação pode aumentar a sobrevivência dos probióticos em alimentos funcionais, a exemplo de sucos de fruta, uma vez que, as microcápsulas podem proporcionar um ambiente mais anaeróbico para as bactérias, além de formar uma barreira física contra as condições desfavoráveis, como o baixo pH da bebida, contribuindo, desta forma, para redução das injúrias celulares, tanto durante o armazenamento quanto na passagem pelo trato gastrointestinal (ANTUNES et al., 2013; DING; SHAH, 2008;).

A técnica de Emulsão, destinada a encapsulação dos probióticos, é um método delicado, que causa mínimo estresse e danos às células microbianas e pode ser aplicado facilmente em grandes volumes (SULTANA et al., 2000; ZOU et al., 2011).

Diversos polímeros podem ser usados como materiais encapsulantes incluindo o alginato, pectina, goma xantana, goma gelana, amido modificado, celulose, caseína, proteínas do soro de leite e gelatina; dentre estes o alginato é o material mais utilizado em pesquisas por não ser tóxico e ser de fácil disponibilidade (ADHIKARI et al., 2000; CHÁVARRI et al., 2010; KRASAEKOOPT et al., 2003; SIUTA-CRUCÉ, 2001; SHAH; RAVULA, 2000). A quitosana tem sido utilizada como material para revestimento das cápsulas de alginato, estudos associam a sua utilização com a maior sobrevivência dos probióticos as simulações do trato gastrointestinal *in vitro*, quando comparadas as cápsulas de alginato não revestidas (GARCIA-CEJA et al., 2015; CHÁVARRI et al., 2010; NUALKAEKUL et al., 2012; ZOU et al., 2011).

O caju (*Anacardium occidentale L.*) é nativo do Brasil e tem grande importância econômica e social no Nordeste Brasileiro. O pedúnculo é uma ótima fonte de Vitamina C, em níveis três vezes maior que na laranja, e vitaminas do complexo B, como a riboflavina e a tiamina (LAVINAS et al., 2006; TACO, 2011). A vitamina C pode ser benéfica para a sobrevivência do probiótico durante a estocagem, uma vez que é um eliminador de oxigênio, o que pode favorecer a um ambiente mais anaeróbico (ANTUNES et al., 2013).

O desenvolvimento de um novo produto funcional proporciona uma oportunidade para contribuir com a melhoria da qualidade dos alimentos e da saúde dos consumidores. Diante da diversidade de aplicações tecnológicas e dos benefícios associados, torna-se relevante a utilização da técnica da microencapsulação com alginato/quitosana proporcionando maior proteção às células probióticas adicionadas em alimentos, tendo em vista, sua aplicação na alimentação da população em geral, atuando na promoção da saúde.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Desenvolver uma bebida funcional à base de caju adicionada de *Lactobacillus casei*, livre ou microencapsulados com matriz alginato de cálcio-quitosana.

2.2. Objetivos específicos

- Caracterizar a Quitosana Fúngica comercial Kiofine®-B;
- Produzir e caracterizar as microcápsulas de alginato de cálcio com revestimento de quitosana, contendo o probiótico *L. casei*;
- Produzir e caracterizar a bebida de caju;
- Identificar alterações físico-químicas e microbiológicas da bebida controle, com *L. casei* livre ou microencapsulado durante estocagem por 4 semanas a 4°C.
- Determinar a viabilidade do probiótico *L. casei* microencapsulado ou não, na bebida de caju, durante armazenamento refrigerado por 4 semanas;
- Investigar a sobrevivência do *L. casei* livre e microencapsulado durante simulação das condições gastrointestinais *in vitro*, no início e final do armazenamento;
- Avaliar os atributos de qualidade organolépticos da bebida controle, com *L. casei* livre ou microencapsulado.

3. REVISÃO DA LITERATURA

3.1. PROBIÓTICOS

A palavra probiótico que significa “para vida” surgiu pela primeira vez em 1965, com uma abordagem muito semelhante da que se utiliza na atualidade, definindo-se um probiótico como um agente microbiológico que estimula o desenvolvimento de outros organismos. Em 1989, Roy Fuller ressaltou a viabilidade dos probióticos e acrescentou a ideia de que estes têm um efeito benéfico para o hospedeiro (GUARNER et al., 2012; MORAIS; JACOB, 2006). Atualmente, a Legislação Brasileira os define como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2002).

A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana é descrita por diversos autores e pode incluir o equilíbrio da homeostase intestinal; restauração da microbiota após uso de antibióticos; alívio da constipação; tratamento para alguns tipos de diarreias e infecções por *Helicobacter pylori*; produção de vitaminas que são absorvidas pelo hospedeiro; promoção da resistência gastrointestinal e urogenital à patógenos; controle dos níveis de colesterol; fortalecimento do sistema imune; aumento da absorção de minerais; produção da enzima lactase, auxiliando na digestão da lactose em pessoas intolerantes e redução do risco de desenvolvimento de câncer de colón (COOK et al., 2012; DENIPOTE et al., 2010; EJTAHED et al., 2012; KRASAEKOOPT et al., 2006; LECERF, 2011; MARTEAU, 2011; MENEZES et al., 2013; SANTOS; VARAVALLLO, 2011; SCARPELLINI et al., 2010).

Diversos microrganismos são utilizados e estudados como probióticos, mas apenas alguns possuem alegação de propriedade funcional aprovada pela ANVISA, que são: *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei* variedades *shirota*, *rhamnosus* e *defensis*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus lactis*; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium animalis*; *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

A implantação e sobrevivência desses microrganismos quando administrados como probióticos vai depender do tipo de dieta consumida pelo hospedeiro, a qual pode promover ou não sua proliferação. Por este motivo, a ANVISA recomenda que o consumo de probióticos esteja associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis. Além disso, para garantir um efeito contínuo no organismo humano, devem ser ingeridos diariamente (ANVISA, 2008; COOK et al., 2012).

Hodiernamente, a recomendação de ingestão é com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de $10^8 - 10^9$ UFC ao dia (ANVISA, 2008; CHAMPAGNE et al., 2005; KAILASAPATHY; CHIN, 2000). No entanto, diversos problemas são relatados com relação a baixa viabilidade das bactérias probióticas presentes nos alimentos funcionais, vários fatores podem afetar a sobrevivência desses microrganismos, como: acidez do alimento, valor de pH e peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, interação com outros microrganismos contidos no produto, concentração de ácido lático e acético e a concentração de proteínas (ANVISA, 2008; COOK et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

Para exercer os efeitos benéficos à saúde, os probióticos, além da necessidade de estar viável no produto alimentício, durante a vida de prateleira, precisam sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, superando as condições ácidas do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino, e, ainda, multiplicar-se no hospedeiro (COOK et al., 2012; MARTÍN et al., 2015).

Por conseguinte, diversos procedimentos têm sido realizados para aumentar a resistência desses microrganismos contra condições adversas, dentre elas, a seleção correta em presença de ácido estomacal, cepas resistentes à bile, adaptação ao estresse, incorporação de peptídeos e aminoácidos e a microencapsulação (COOK et al., 2012; CHAMPAGNE et al., 2011; MENEZES et al., 2013)

3.2. *Lactobacillus casei*

O gênero *Lactobacillus* foi isolado pela primeira vez por Ernst Moro em 1900 a partir de fezes de lactentes amamentados com leite materno. São bactérias Gram positivas; não formadoras de esporos; podem possuir forma bacilar ou cocobacilar; são desprovidos de flagelos; anaeróbios, porém aerotolerantes e fermentam carboidratos com produção de ácido lático (FERNANDES et al., 2008).

O Grupo taxonômico *Lactobacillus casei* compreende as espécies *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* e *Lactobacillus rhamnosus*, que representam uma fração substancial da microbiota formada por *Lactobacillus* ssp. no intestino humano. Estas bactérias colonizam vários ambientes naturais, como a boca, trato intestinal, vagina, laticínios e produtos de origem vegetal, como frutas deterioradas (BURITI; SAAD, 2007).

Lactobacillus casei é a bactéria probiótica mais utilizada na produção de leites fermentados e de outros alimentos lácteos devido ao seu poder de sobrevivência e multiplicação no trato gastrointestinal após sua ingestão garantindo efeito benéfico ao consumidor (BURITI; SAAD, 2007; HUNGRIA; LONGO, 2009). Além dos efeitos benéficos, esses microrganismos podem também conferir aroma, sabor, textura aos alimentos e contribuir na bioconservação dos mesmos (BURITI e SAAD, 2007; VÁSQUEZ et al., 2006).

3.3. SUCOS DE FRUTA COMO FONTE DE PROBIÓTICOS

Juntamente com o interesse crescente por alimentos funcionais surge a necessidade da versatilidade destes produtos que trazem benefícios à saúde (SAARELA et al., 2006). Probióticos são tradicionalmente adicionados a leites fermentados e outros alimentos lácteos, tal como iogurte, queijo, sorvete, e em menor escala em produtos derivados de carnes, cereais, vegetais e frutas (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011).

Alimentos não lácteos como sucos de fruta, podem representar, também, uma forma de veículo desses microrganismos, tais bebidas são consideradas saudáveis e são consumidas em larga escala pela população global, além de ser uma opção para intolerantes a lactose, alérgicos a proteína do leite e hipercolesterolêmicos (KINGWATEE et al., 2015; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; SHEEHAN et al., 2007).

De acordo com Luckow e Delahunty (2004), existe um interesse crescente pelo desenvolvimento de bebidas funcionais a base de frutas adicionadas de probióticos. Segundo Champagne e Gardner (2008) existem duas marcas de sucos de fruta contendo probióticos no mercado Canadense, apresentando entre 1 e 3 bilhões de células na porção de 250 mL.

A sobrevivência de diferentes cepas probióticas tem sido estudada em sucos de fruta como laranja, abacaxi, uva, pera, lichia, romã, limão, cranberry, acerola, pêssego, morango, manga e caju (ANTUNES et al., 2013; DING; SHAH, 2008; GARCIA-CEJA et al., 2015; KINGWATEE et al., 2015; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NUALKAEKUL et al., 2011; NUALKAEKUL et al., 2012; PEREIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2012; SOHAIL et al., 2012; VERGARA et al., 2010; YING et al., 2013).

Embora exista significativamente menos informações sobre a sobrevivência de probióticos em sucos de fruta, quando comparados aos produtos lácteos, os fatores mais prováveis são a espécie ou cepa utilizada, o método de preparação das culturas, a composição do produto, o

tempo e temperatura de estocagem, os níveis de oxigênio e o tipo de embalagem (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011).

Sucos de fruta são ricos em nutrientes, contém altas quantidades de açúcares, que contribuem para maior sobrevivência dos probióticos durante estocagem e não possuem cultura iniciadora que competem com os probióticos pelos nutrientes (ANTUNES et al., 2013; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Além disso, essas bebidas contêm naturalmente ou são suplementados com eliminadores de oxigênio, a exemplo do ácido ascórbico, que promove condições anaeróbicas (DING; SHAH, 2008).

Tradicionalmente, frutas e seus subprodutos são considerados seguros microbiologicamente devido ao pH baixo e estocagem em temperaturas de refrigeração, ambos os fatores atuam como barreira para o crescimento e sobrevivência de patógenos (SHEEHAN et al., 2007).

Apesar das facilidades citadas, a adição de probióticos em sucos de fruta apresenta algumas dificuldades, que incluem o baixo pH dos sucos, tipicamente em torno de 2.5 e 4.0, o que torna essencial a utilização de espécies de microrganismos que permaneçam viáveis, apesar do ambiente hostil; as quantidades insuficientes de peptídeos e aminoácidos livres necessários para os probióticos; e, em adição, estudos mostram que a tolerância ao ácido e a bile é melhor em células adicionadas a produtos lácteos, quando comparadas as introduzidas em sucos (ANTUNES et al., 2013; CHAMPAGNE; GARDNER, 2008; SAARELA et al., 2006; SAARELA et al., 2011; SHEEHAN et al., 2007).

Alguns pesquisadores concluíram que células livres sobrevivem bem durante estocagem refrigerada por 6 semanas, apresentando reduções de $< 1\log$, em determinados sucos de fruta como maçã, uva, laranja, groselha, limão e abacaxi (CHAMPAGNE et al., 2008; DING; SHAH, 2008; NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; NUALKAEKUL et al., 2011; SAARELA et al., 2006; SHEEHAN et al., 2007). Por outro lado, em outros sucos, tal como romã, morango e cranberry, as células morreram entre 1 e 4 semanas, isto pode ser devido ao baixo pH destes sucos ($\text{pH} \leq 3$) e a alta concentração de compostos fenólicos (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; NUALKAEKUL et al., 2011).

Contudo, existe pouca informação dos efeitos da composição química dos sucos de frutas na sobrevivência dos probióticos (NUALKAEKUL et al., 2011).

3.4.CAJU (*Anacardium occidentale*, L)

O cajueiro pertence à família *Anacardiaceae*, gênero *Anacardium* L., espécie *Anacardium occidentale*, L. É uma planta rústica, originária do Brasil, que cresce até em solos pobres, com baixa precipitação e é cultivado em 32 países ao redor do mundo, tendo o Brasil, Índia, Vietnã e Nigéria como principais produtores (SANCHO et al., 2007; VERGARA et al., 2010).

A cultura do caju é de grande importância social e econômica para o Nordeste Brasileiro, ocupando 710 mil hectares e representando 99,5% da área com esta cultura no Brasil, sendo cultivado principalmente nos estados do Ceará, Rio Grande do Norte e Piauí (IBGE, 2006; MAIA et al., 2001).

O Caju é composto pela castanha, considerado o fruto verdadeiro, e pelo pseudofruto ou pedúnculo. A castanha de caju apresenta grande valor comercial no Brasil e no exterior, desta forma, o pedúnculo do caju acaba sendo subutilizado. Este pseudofruto, que corresponde a 90% do peso do caju, representa uma matéria prima desperdiçada em grandes quantidades anualmente (LAVINAS et al., 2006; SANCHO et al., 2007).

O Brasil produz cerca de 2 milhões de toneladas de caju ao ano, no entanto, menos de 10% do pedúnculo é aproveitado industrialmente. Este resultado é consequência da alta perecibilidade, curto período da safra, inexistência de métodos de preservação da matéria-prima e, principalmente, porque grande parte é perdida no beneficiamento da castanha (IBGE, 2006; SANCHO et al., 2007; VERGARA et al., 2010).

O caju apresenta em sua composição vitaminas, taninos, sais minerais, ácidos orgânicos e carboidratos, que o torna uma importante fonte nutricional, mas também bastante perecível, exigindo cuidados de transporte, armazenamento, limpeza e processamento (BROINIZI et al., 2007). O pedúnculo é uma ótima fonte de vitamina C, em níveis três vezes maior que na laranja; vitaminas do complexo B, como a riboflavina e a tiamina; apresenta bom conteúdo de compostos fenólicos; é também rico em minerais e em alguns aminoácidos (LAVINAS et al., 2006; PEREIRA et al., 2011; TACO, 2011).

O pedúnculo do caju apresenta diversas propriedades funcionais, dentre as quais a prevenção de câncer, prevenção de infecções por *Helicobacter pylori* e propriedades antioxidantes (CARVALHO et al., 2005; KUBO et al., 1993; KUBO et al., 1999).

O pedúnculo pode ser consumido *in natura* ou industrializado sob a forma de sucos, sorvetes, geleias, licor, doces diversos, mel, cajuína, refrigerantes, vinho e aguardente. O suco de caju tem grande aceitação no mercado nacional e é o derivado do pedúnculo de maior importância econômica. Apesar do grande percentual de perda do pseudofruto, o Brasil é líder no reaproveitamento e é considerado o país com mais experiência, tecnologia e hábito de consumo (AGOSTINI-COSTA et al., 2003; LIMA et al., 2007).

O suco de caju é definido como “a bebida não fermentada, obtida da parte comestível da polpa de caju, por meio de processo tecnológico adequado, devendo apresentar odor e sabor próprios e coloração variando de branca a amarelada” (BRASIL, 2000).

3.5.MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação pode ser definida como tecnologia que permite recobrir materiais sólidos, líquidos ou gasosos, formando cápsulas em miniatura que podem liberar seu conteúdo em taxas controladas ou sob condições específicas (ANAL; SINGH, 2007). As microcápsulas são estruturas semipermeáveis, esféricas e com uma membrana resistente, com diâmetro que varia de 1 – 1000 micrômetros (ANAL; SINGH, 2007; MARTÍN et al., 2015). O material que fica contido no interior da cápsula é denominado ingrediente ativo, enquanto que a substância externa é o agente encapsulante (MENEZES et al., 2013).

O processo de microencapsulação tem sido aplicado em diferentes áreas, incluindo a farmacêutica, agrícola, terapêutica e alimentícia (AGHBASHLO et al., 2012; BRINGAS-LANTIGUA et al., 2012; DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; RUBILAR et al., 2012; SHIN et al., 2012). A microencapsulação apresenta diversas aplicações na indústria de alimentos, podendo ser utilizada para proteger o material encapsulado do ambiente externo, evitando sua degradação; para liberação controlada do material ativo; para controlar reações oxidativas; mascarar sabor, cor ou odor desagradável; isolar componentes que reagem com outros dentro da matriz do alimento; prolongar a vida útil e proteger o valor nutricional (BOSCARIOLI, 2010; MENEZES et al., 2013).

Com base nas propriedades de liberação controlada, o ingrediente ativo pode ser liberto em áreas específicas do organismo dependendo de mecanismos de acionamento, como por exemplo, mudanças de pH, estresse mecânico, temperatura, atividade enzimática, tempo e força osmótica (BOSCARIOLI, 2010; CHAMPAGNE et al., 2011).

O desenvolvimento de uma barreira física ao redor de células probióticas, adicionadas a alimentos, tem sido uma abordagem cada vez mais estudada nos últimos anos. A tecnologia da microencapsulação é explorada em vários estudos como alternativa promissora para introdução de microrganismos benéficos vivos em diferentes produtos alimentícios, proporcionando maior viabilidade e funcionalidade destes. (CHAMPAGNE et al., 2015; DE PRISCO et al., 2015; GARCÍA-CEJA et al., 2015; KAILASAPATHY, 2006; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; NUALKAEKUL et al., 2012; SAARELA et al., 2006; ORTAKCI; SERT, 2012).

O confinamento de células microbianas em microesferas proporciona um obstáculo entre os probióticos e as condições ambientais severas, protege contra danos mecânicos, mantém relativo crescimento e atividade metabólica do microrganismo por um maior período de tempo (GUIMARÃES et al., 2013; MENEZES et al., 2013; RATHORE et al., 2013).

A seleção do material encapsulante depende de vários fatores, entre eles: a não reatividade com o material a ser encapsulado, a resistência frente ao material do meio externo, a técnica utilizada para a formação da microcápsula, o procedimento de liberação do ingrediente, suas propriedades reológicas e a viabilidade econômica. Vários polímeros são utilizados como matriz encapsulante, como o alginato, carragena, gelatina, carboximetilcelulose, pectina, amido, goma xantana, goma gelana, goma acácia e proteína do soro do leite (ADHIKARI et al., 2000; CHÁVARRI et al., 2010; KRASAEKOOPT et al., 2003; SIUTA-CRUCÉ, 2001; SHAH; RAVULA, 2000).

3.5.1. Emulsificação/Gelificação interna

Várias técnicas de encapsulamento têm sido desenvolvidas, destinadas a produção de microcápsulas contendo probióticos, sendo divididas em três categorias: extrusão, emulsão e spray drying (COOK et al., 2012).

Na técnica de extrusão, a mistura do material encapsulante com as células probióticas é forçada a passar por um orifício, formando-se gotas, geralmente são utilizadas seringas e agulhas. Estas gotas caem dentro de uma solução gelificante de cloreto de cálcio, formando as cápsulas (URBANO, 2004). Este método é extensivamente estudado, devido a facilidade de preparação e, pelo fato, de poder encapsular qualquer substância. Em contrapartida, apresenta como desvantagens a formação de esferas grandes, variando de 1 a 3 mm e a impossibilidade de ampliação para escala industrial (COOK et al., 2012; URBANO, 2004).

A técnica de spray drying, também utilizada para encapsular probióticos, envolve um processo de dispersão e homogeneização do material de revestimento, seguida da atomização da mistura em uma câmara de secagem para evaporação do solvente. Possui como vantagens o baixo custo e a facilidade de produção em grande escala. A grande desvantagem desta técnica é a utilização de altas temperaturas o que implica em grandes perdas na viabilidade das células probióticas (MARTÍN et al., 2015; MENEZES et al., 2013).

A metodologia de encapsulação utilizada neste trabalho designa-se por emulsificação/gelificação interna. A emulsificação envolve a dispersão da suspensão polímero - células microbianas (fase aquosa) em óleo vegetal (fase oleosa). A mistura é homogeneizada até formar uma emulsão água-óleo, com o auxílio de um surfactante e agitação (RATHORE et al., 2013). A gelificação refere-se ao tipo de solidificação da micropartícula, de acordo com a fonte do agente solidificante, ou seja, se vem de fora ou se já se encontra disperso na solução polimérica juntamente com o ingrediente ativo (probióticos), a gelificação pode ser chamada de externa ou interna (KRASAEKOOPT et al., 2003; URBANO, 2004).

O tamanho das microesferas, no método de emulsão, é influenciado pela velocidade de agitação, e pode variar entre 25 e 500 μm (RATHORE et al., 2013; ZHAO et al., 2015). Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para encapsular bactérias ácido lácteas (KRASAEKOOPT et al., 2003).

3.5.2. Alginatos

Os alginatos, são polímeros naturais lineares, extraídos de algas marinhas marrons, compostos por dois tipos de ácidos poliurônico, o ácido β -D-Manurômico (M) e ácido α -L-Gulurômico (G), ligados por ligações glicosídicas α (1,4), conforme ilustrado na Figura 1. Os alginatos são comercializados, em sua maioria, na forma de sais hidrossolúveis, branqueados e purificados, como o ácido algínico, alginato de sódio, alginato de potássio, alginato de amônio, entre outros (ANAL; SINGH, 2007; PAULO et al., 2009).

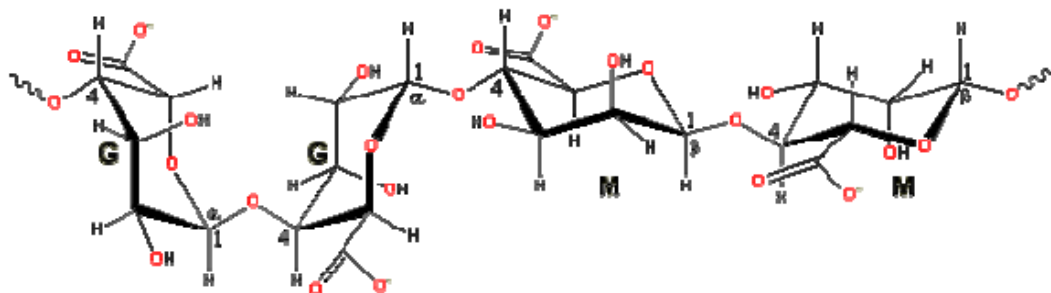


Figura 1. Estrutura molecular do alginato de sódio. Fonte: OLIVEIRA, 2009

Entre os biopolímeros utilizados como agentes encapsulantes, o alginato é o mais comumente empregado. As cápsulas de alginato são formadas quando uma solução de alginato de sódio entra em contato com cátions multivalentes como o cálcio, promovendo a precipitação de alginato de cálcio, com posterior gelificação interna mais gradual (CHÁVARRI et al., 2010; KOO et al., 2001; TRABELSI et al., 2013). Estruturalmente, os íons cálcio encontram-se localizados nas cavidades eletronegativas do alginato, este modelo, conforme Figura 2, por analogia, é designado modelo caixa-de-ovos (OLIVEIRA, 2009).

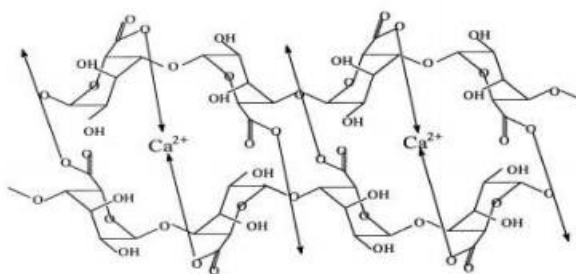


Figura 2. Modelo caixa-de-ovos proposto para representar a ligação das cadeias do alginato com os íons cálcio. Fonte: MUSA et al., 1999.

Entre as vantagens do uso do alginato, pode-se citar a não toxicidade, baixo custo e formação de matrizes suaves com o cloreto ou carbonato de cálcio, para preencher materiais sensíveis, tais como células microbianas vivas. O alginato também é um aditivo alimentar aceitável e pode ser aplicado com segurança em alimentos (KRASAEKOOPT et al., 2006; RODRIGUES et al., 2012; TRABELSI et al., 2013).

Apesar de ser o mais utilizado para o processo de encapsulação, o alginato tem seu uso limitado devido a sua baixa estabilidade na presença de agentes quelantes, como lactatos, fosfatos e citratos que possuem afinidade pelo cálcio e desestabilizam o gel formado entre o alginato e o cálcio; e a baixa estabilidade em condições ácidas com $\text{pH} < 2$. Outra limitação do seu uso 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 ingrediente ativo (BOSCARIOLI, 2010; HANSEN et al., 2002; JIANG et al., 2014; SONG et al., 2014; SULTANA et al., 2000).

O tamanho das cápsulas pode variar de nanômetros a micrômetros e milímetros, geralmente depende da viscosidade da solução do polímero, da técnica de encapsulamento e do agente reticulante escolhido. Apesar do tamanho variado, se as cápsulas de alginato apresentarem tamanho superior a 1 mm podem alterar a textura dos alimentos e se o tamanho for inferior a 100 μm não protegem significativamente as culturas na presença do suco gástrico, em comparação com as células livres (HANSEN et al., 2002).

3.5.3. Quitosana

A quitosana é um biopolímero linear natural, formada por unidades glucosaminas e N-acetilglucosamina unidas por ligações glicosídicas do tipo β (1,4), como ilustrado na Figura 3. Este polímero é encontrado naturalmente na parede celular de fungos, como o *Mucor*; na cutícula de insetos; mas é, principalmente, proveniente da desacetilação da quitina, extraída do exoesqueleto de crustáceos aquáticos (JIANG et al., 2014; MATTÉ; ROSA, 2013; MENEZES et al., 2013; SUAVE et al., 2006).

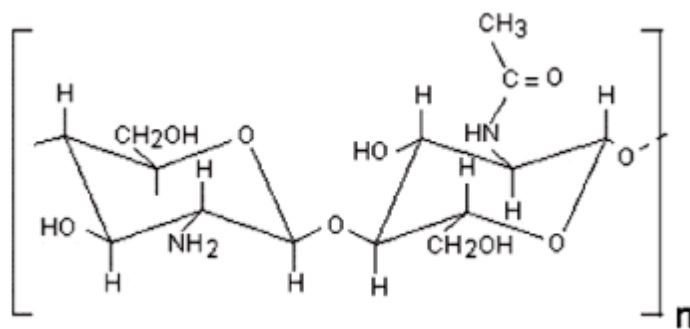


Figura 3. Estrutura molecular da quitosana. Fonte: JANEGITZ et al., 2007.

As principais fontes comerciais da quitosana têm sido a carapaça de caranguejos e cascas de camarão, oriundas de resíduos da indústria pesqueira. Entretanto, existem algumas limitações quanto a utilização desse meio de obtenção, tais como: utilização de soluções alcalinas fortes para realizar a desacetilação da quitina que podem poluir o meio ambiente e a possibilidade de os resíduos de proteínas dos crustáceos causarem reações alérgicas (BERGER et al., 2011; MENEZES et al., 2013).

A produção de quitosana a partir da biomassa micelial de fungos é uma alternativa, uma vez que, é um processo fácil e economicamente viável. Além disso, esses biopolímeros obtidos não apresentam contaminação por proteínas alergênicas (BERGER et al., 2011; MENEZES et al., 2013). Devido as suas propriedades, a quitosana apresenta grande importância na área farmacêutica, de alimentos e na biomedicina (BERGER et al., 2011). Este polissacarídeo apresenta as vantagens de ser biodegradável por bactérias do colón, apresenta biocompatibilidade, hipoalergenicidade e propriedades mucoadesivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras intestinais (KANMANI; LIM, 2013; SIMEONI et al., 2014).

A quitosana apresenta, também, boa capacidade de formação de películas e com o objetivo de obter uma estabilidade adequada, o gel de quitosana é utilizado para revestimento exterior das cápsulas feitas com polímeros aniônicos como o alginato (ANAL; SINGH, 2007; SIMEONI et al., 2014; SONG et al., 2014). A associação com o alginato de cálcio leva a formação de cápsulas mais estáveis e resistentes, pela formação de uma dupla parede (KRASAEKOOPT et al., 2003; PAULO et al., 2009).

3.5.4. Microcápsulas de alginato revestidas com quitosana

Estudos relatam que as microcápsulas de alginato com revestimento de quitosana apresentam melhor estabilidade química, mecânica e na presença de quelantes; proporcionam maior viabilidade dos organismos probióticos em ambientes hostis, como o suco gástrico, quando comparados às células livres destes microrganismos (ADHIKARI et al., 2000; CHANDRAMOULI et al., 2004; CHAVARRI et al., 2010; HANSEN et al., 2002; IYER; KAILASAPATHY, 2005; JIANG et al., 2014; KAILASAPATHY, 2002; KRASAEKOOPT et al., 2006; KRASAEKOOPT et al., 2003; SONG et al., 2014; SULTANA et al., 2000; TRABELSI et al., 2013).

As moléculas de quitosana e alginato de cálcio sofrem uma complexação que reduz a porosidade das microcápsulas, consequentemente, diminui o vazamento do probiótico encapsulado para o meio externo, e proporciona estabilidade em vários níveis de pH. Desse modo, as microcápsulas de alginato-quitosana são consideradas alternativa promissora para administrar microrganismos probióticos oralmente, e conduzi-los em níveis desejados para o colón, mantendo sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrintestinal (CHÁVARRI et al., 2010; TRABELSI et al., 2013). A Figura 4 ilustra uma microcápsula de alginato com revestimento de quitosana e o probiótico aprisionado.

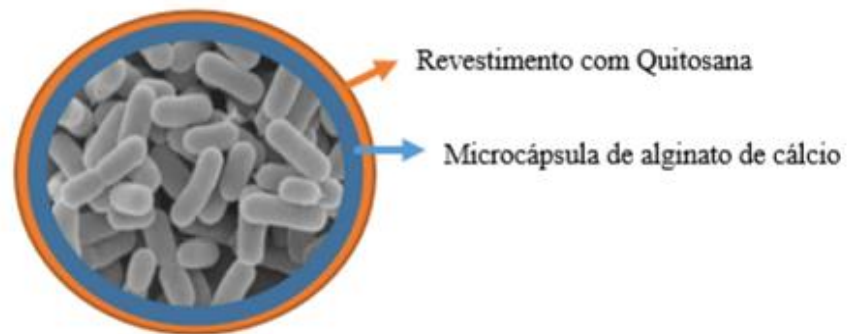


Figura 4. Ilustração de uma microcápsula de alginato de cálcio revestida com quitosana

A liberação do probiótico encapsulado, após a ingestão do alimento, pode ocorrer em duas etapas: primeiro a dissolução da quitosana se inicia no estômago, pelo pH ácido, este polímero termina de ser degradado pela microbiota que está disponível no cólon e, posteriormente, ocorre a solubilização do gel de alginato, pelo sequestro dos íons de cálcio no mesmo local (CHÁVARRI et al., 2010; HEJAZI; AMIJI, 2003). Segundo Hejazi e Amiji (2003) considerando as propriedades bio-mucoadesivas de polímeros naturais, o sistema de microcápsulas de alginato-quitosana apresenta potencialidade para atingir diretamente o cólon.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. MATERIAIS

A cultura liofilizada de *L. casei* DN 114-001 foi obtida de Roval (Recife, PE, Brazil). Alginato de sódio proveniente de algas marrons, de média viscosidade (viscosidade: ≥ 2.000 cP, 2% H₂O; proporção M/G de 1.56; Peso molecular de 100 kDa) e Span[®]80 (Sorbitane Monooleate) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A quitosana comercial Kiofine[®]-B, de origem fúngica (*Aspergillus niger*), foi gentilmente cedida pela KitoZyme S. A. (Herstal, Belgium). *Lactobacilli* MRS caldo e ágar foram comprados de HiMediaTM (Paraná, Brazil). Pepsina proveniente de mucosa gástrica de porcos (1:1000) e pancreatina de pâncreas de porcos foram obtidas de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e Bio Basic Inc (Markham, Canadá), respectivamente.

4.2. CARACTERIZAÇÃO DA QUITOSANA KIOFINE[®] - B

A quitosana Kiofine[®] - B foi caracterizada estruturalmente por espectroscopia vibracional na região do infravermelho. Foram determinados também o grau de desacetilação por ressonância magnética nuclear (RMN) ¹H e a massa molar estimada a partir de medidas de viscosidade. As análises foram realizadas na Central Analítica do Departamento de Química Fundamental da UFPE.

4.2.1. Determinação das características estruturais da quitosana

A técnica utilizada para observar as características estruturais da quitosana foi a Espectroscopia vibracional na região do infravermelho, de acordo com Santos et al. (2003). Foi utilizado espectrofotômetro modelo IF66, os espectros foram obtidos na região entre 400 cm⁻¹ e 4000 cm⁻¹ utilizando 1,5 mg de quitosana previamente seca em estufa a vácuo à 60°C durante 15 horas. O espectro do pó da quitosana foi obtido utilizando pastilha KBr como suporte, para tanto, adicionou-se 100mg de KBr e a mistura foi homogeneizada em almofariz de ágata.

4.2.2. Grau de desacetilação

O grau de desacetilação da quitosana foi determinado por meio de RMN ¹H utilizando equipamento Varian Unity Plus em 300 MHz, de acordo com procedimento descrito por Signini et al. (2000). Foi preparada uma solução pela mistura de 10 mg de quitosana em 1 mL de D₂O dissolvida em 1% de HCl (v/v), com agitação por 24 horas para completa dissolução. Em seguida, uma alíquota dessa solução foi colocada em tubo de 55 mm de diâmetro para análise

a 50°C, com tempo de relaxamento de 6 segundos e pulso de 90°. O grau de desacetilação foi calculado mediante equações I e II propostas por Hirai et al. (1991) e Signini e Campana-Filho (1998), respectivamente:

$$I) \quad GD (\%) = \left(1 - \left(\frac{\frac{1}{3}H^{ac}}{\frac{1}{6}H^{2-6}} \right) \right) \times 100$$

$$II) \quad GD (\%) = \left(1 - \left(\frac{H^{ac}}{3H^2} \right) \right) \times 100$$

4.2.3. Massa Molar

O peso molecular da quitosana foi determinado pela viscosidade seguindo o procedimento descrito por Santos et al. (2003). As medidas de viscosidade foram determinadas em viscosímetro AVS – 350 (Schott-Garate) utilizando capilar de vidro Cannon-Fenske ($d_{\text{interno}} = 1,01 \text{ mm}$), a 25°C. Para determinação da viscosidade intrínseca foram preparadas soluções de quitosana, utilizando ácido clorídrico como solvente, com concentrações variando entre 0,1 e 1,0 mg/mL, com tempo de escoamento pelo capilar expressos em segundos. Foram realizadas três medidas de cada amostra, das quais foi calculada a média.

A razão do tempo de escoamento da solução do polímero pelo tempo de escoamento da solução do solvente é chamada de viscosidade relativa. A viscosidade específica da quitosana foi calculada aplicando a média dos tempos de escoamento na fórmula abaixo:

$$\eta_{esp} = \left(\frac{t - t_0}{t_0} \right)$$

Onde:

η_{esp} = viscosidade específica da amostra

t = tempo de escoamento da solução no viscosímetro

t_0 = tempo de escoamento do solvente puro no viscosímetro

Já a viscosidade reduzida é a viscosidade específica dividida pela concentração e tem como dimensão o inverso da concentração, como ilustrado na equação abaixo:

$$\eta_{red} = \frac{\eta_{esp}}{C}$$

Onde:

η_{red} = viscosidade reduzida da amostra.

C = concentração em gramas de polímero em 100 mL de solução.

A viscosidade intrínseca da quitosana foi encontrada pela extrapolação do gráfico de viscosidade reduzida versus concentração à diluição infinita, com base na equação de Huggins (1942) mostrada abaixo:

$$\eta_{\text{red}} = [\eta] + K_H [\eta]^2 C$$

A viscosidade intrínseca de uma solução polimérica está relacionada com a massa molar viscosimétrica média, que foi calculada utilizando a equação de Mark-Houving:

$$[\eta] = K (\bar{M}_v)^a$$

Onde $[\eta]$ é a viscosidade intrínseca, K e a são constantes relacionadas ao solvente utilizado, neste estudo foi o ácido clorídrico o qual apresenta os valores de $1,81 \times 10^{-5}$ e 0,93 respectivamente para K e a .

4.3.CULTIVO E ENUMERAÇÃO DO *LACTOBACILLUS CASEI*

4.3.1. Cultura de *Lactobacillus casei*

A ativação das cepas ocorreu pela adição do inóculo a 1% (v/v) em meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe (MRS) caldo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 horas, de acordo com Sheehan et al. (2007). As células foram separadas por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 minutos á 4°C , o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com solução salina estéril 0,9% (Sohail et al., 2012). A biomassa de *L. casei* obtida foi ressuspensa em 3 mL da solução salina estéril, apresentando uma concentração celular final de $1,9 \times 10^{10}$ UFC/mL, conforme Nualkaekul et al. (2011). Esta metodologia foi realizada para a formação da biomassa celular a ser adicionada a bebida de caju na forma de células livres.

4.3.2. Enumeração do *Lactobacillus casei*

O número de unidades formadoras de colônia do probiótico foi determinado por meio de diluições seriadas em solução salina estéril. Alíquotas de 1 mL das diluições selecionadas foram plaqueadas em meio MRS ágar, utilizando a técnica *pour-plate*, e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 horas, em anaerobiose. Placas contendo de 20 a 350 colônias foram contadas e registradas como unidades formadoras de colônia por mL da solução. De acordo com Vinderola et al.

(2000), *L. casei* se caracterizam por formar colônias redondas e brancas com diâmetro entre 0,9 e 1,3 mm.

4.4.PRODUÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS

4.4.1. Preparo das células de *Lactobacillus casei* para microencapsulação

A ativação e o cultivo do *L. casei* seguiu a mesma metodologia descrita no item 4.3.1. A biomassa de *L. casei*, obtida após centrifugação, foi suspensa em 10 mL de solução salina estéril 0,9%, apresentando concentração celular de $1,24 \times 10^{10}$ UFC/mL (CAI et al, 2014; ZOU et al, 2011). Esta metodologia foi adotada para a obtenção da biomassa celular destinada ao processo de encapsulação para, posterior adição a bebida de caju.

4.4.2. Preparação das microesferas de alginato de cálcio com *Lactobacillus casei*

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna (CAI et al., 2014; PONCELET et al., 1992; ZOU et al., 2011). A emulsificação e gelificação foram realizadas em Becker de 500 mL utilizando um agitador magnético.

4.4.2.1. Solução de Alginato de sódio 3% e cálcio 37,5 mM

O carbonato de cálcio (CaCO_3) foi utilizado como fonte de cálcio para o processo de encapsulação. Para isso foi preparada uma suspensão estoque de CaCO_3 500mM pela dispersão do pó seco em água deionizada. Em seguida, solução base de alginato 3% e cálcio 37,5 mM foi preparada pela mistura de 3 g de alginato de sódio, 7,5 mL da suspensão de 500mM CaCO_3 e 89,5 g de água, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, overnight para completa hidratação.

4.4.2.2. Emulsificação: Fase aquosa e fase oleosa

A biomassa de *L. casei* suspensa em 10 mL de solução salina, descrito no item 4.4.1, foi adicionada à 20 mL da solução base de alginato e cálcio, descrita acima, resultando, portanto, numa solução final de alginato de sódio 2% e 25mM de cálcio caracterizando a fase aquosa. A fase oleosa consistiu em 70 mL de óleo de soja contendo 1% (v/v) do emulsificante Span-80, homogeneizados a 200 rpm por 15 minutos. A fase aquosa foi então dispersa na fase oleosa sob agitação de 300 rpm por 15 minutos para emulsificação, conforme ilustrado na Figura 5:

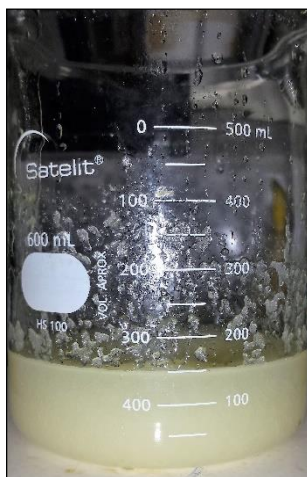


Figura 5. Fase aquosa e fase oleosa emulsificadas

4.4.2.3. Formação das esferas de alginato de cálcio e Gelatinização

Após emulsificação, 20 mL de óleo de soja acidificado com ácido acético glacial (0,95 mL) foi adicionado lentamente, até alcançado pH final de 3,5, sob agitação contínua de 100 rpm por 30 minutos, permitindo a solubilização do carbonato de cálcio, a quebra da emulsão e a formação/gelatinização das cápsulas.

4.4.2.4. Lavagem e Isolamento das microesferas

Após a etapa anterior, adicionou-se 300 mL de tampão fosfato (48 mL Fosfato monossódico 0,4M, 76,3 mL fosfato dissódico 0,4M; Tampão 0,1M; pH 7,0) para separar as fases, as microesferas ficam depositadas na fase aquosa e a fase oleosa superior é removida por aspiração. As microesferas foram lavadas com tampão fosfato até remoção total do óleo, isoladas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 minutos à $4 \pm 1^\circ\text{C}$ e estocadas em peptona salina (PS, 1 g L^{-1} peptona, $8,5 \text{ g L}^{-1}$ NaCl) sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$).

4.4.3. Revestimento das microesferas de alginato com quitosana

O revestimento com quitosana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Zou et al. (2011). A quitosana fúngica (0,2 g) foi dissolvida em 90 mL de água destilada acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial, resultando em uma concentração de 0,2% (p/v). Após a dissolução, o pH da solução foi ajustado para faixa a de 5,7 a 6,0 pela adição de Hidróxido de sódio (NaOH) 1M.

As microesferas, lavadas com água destilada, foram imersas em 100 mL da solução de quitosana e agitadas a 100 rpm por 20 minutos. Após o revestimento, as microesferas foram

lavadas, filtradas em papel filtro (Whatman nº 4) e armazenadas em peptona salina (1 g L⁻¹ peptona, 8,5 g L⁻¹ NaCl) a 4±1°C. A Figura 6 ilustra as microesferas de alginato, contendo *L. casei* aprisionado, após o revestimento com quitosana.



Figura 6. Microcápsulas de alginato de cálcio com *L. casei* aprisionado, revestidas com quitosana, fabricadas pelo método de emulsificação/gelificação interna.

4.4.4. Enumeração das bactérias encapsuladas (Eficiência da Encapsulação)

Para calcular a eficiência de encapsulação das bactérias foi adotado procedimento descrito por Zou et al. (2011). Microesferas filtradas (1g) foram adicionadas a 9 g de peptona salina (1 g L⁻¹ peptona, 8,5 g L⁻¹ NaCl) pré-aquecida a 37°C. Para quebra das microesferas e liberação das células de *L. casei* aprisionadas, a suspensão bacteriana foi homogeneizada, em homogeneizador (PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) a 10.000 rpm por 30 segundos e, em seguida, agitada suavemente em shaker rotacional por 30 minutos, para posteriormente, ser submetida ao processo de plaqueamento e enumeração de colônias, como descrito no item 4.3.2. A eficiência da encapsulação (EE) foi calculada por meio da seguinte fórmula:

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

Onde N é o número de células viáveis liberadas das microesferas e N₀ é o número de células viáveis no concentrado de células utilizado para encapsulação.

4.4.5. Análise da distribuição de Tamanho

A distribuição granulométrica das partículas foi determinada em água destilada utilizando um zetâmetro modelo Zetratec (Microtrac, Montgomeryville) associado a software Microtrac flex 10.5.0. O tamanho das partículas é expresso em diâmetro médio de volume (μm). A distribuição dos tamanhos das partículas foi calculada utilizando o fator de expansão, conforme a fórmula (CAI et al., 2014):

$$\text{Fator de expansão} = \frac{[D(v, 90) - D(v, 10)]}{D(v, 50)}$$

Onde $D(v, 90)$, $D(v, 50)$ e $D(v, 10)$ são os diâmetros do volume cumulativo em 90%, 50% e 10%. Este resultado fornece uma indicação direta da variação de tamanho das esferas em relação ao diâmetro de volume médio. Quanto mais elevado o valor do fator de expansão mais ampla é a distribuição de tamanho das partículas (CAI et al., 2014).

4.5. DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DAS BEBIDAS DE CAJU

4.5.1. Obtenção da polpa

O caju foi adquirido no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco (CEASA). Os frutos foram lavados em água corrente e depois sanitizados em solução clorada à 150 ppm durante 15 minutos. Posteriormente foram submetidos a esmagamento das partes comestíveis, com auxílio de triturador (Philips Wallita).

4.5.2. Processamento da bebida de caju

Para elaboração das bebidas foi realizado teste piloto, com diferentes concentrações de polpa, para avaliar as características organolépticas e selecionar a concentração de polpa ideal na bebida. Foi selecionado e elaborado para os experimentos bebidas de caju contendo 45% de polpa, misturada em água destilada, o que está de acordo com a legislação vigente que determina concentração máxima de 50% para bebidas desta fruta (ANVISA, 2000). As bebidas foram acrescentadas de açúcar (10%) (ANVISA, 2000).

4.5.3. Determinação da composição centesimal das bebidas de caju

Para determinação da composição centesimal foram realizadas análises físico-químicas, segundo o Instituto Adolfo Lutz, de umidade (012/IV), cinzas (018/IV), proteína (036/IV), lipídio (032/IV), açúcares totais (040/IV) e redutores (038/IV), em triplicata, com os valores

médios obtidos expressos em g/100g (IAL, 2008). A descrição das análises pode ser visualizada na Tabela 1. O valor energético total (VET) foi calculado pelo somatório das calorias fornecidas pelos macronutrientes, isto é, 9 Kcal/g para lipídios (LIP) e 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN). Conforme a seguinte equação:

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

Tabela 1. Metodologias usadas nas análises físico-químicas para determinação da composição centesimal da bebida de caju.

Análise	Princípio	Referência
Umidade (U)	Perda por dessecação a partir da secagem direta em estufa a 105°C	IAL, 2008
Cinzas (CZ)	Resíduos por incineração em Mufla à 550°C	IAL, 2008
Proteínas	Determinação de nitrogênio pelo método clássico de digestão Kjeldahl e conversão para proteína por meio do fator 6,25	IAL, 2008
Lipídio	Extração direta em Soxhlet	IAL, 2008
Açúcares redutores em glicose	Reação com solução cupro-alkalina	IAL, 2008
Açúcares não redutores em sacarose	Inversão ácida dos açúcares	IAL, 2008

IAL: Instituto Adolf Lutz

4.5.4. Adição de *Lactobacillus casei* livre ou microencapsulado às bebidas de caju

As bebidas adicionadas de *L. casei*, na forma de células livres, foram elaboradas conforme metodologia descrita por Nualkaekul et al. (2011), onde a suspensão de *L. casei* em solução salina, conforme exposto no item 4.3.1, foi adicionada à 40 mL da bebida de caju, resultando em uma concentração de $7,8 \times 10^9$ UFC/mL. As bebidas contendo os probióticos encapsulados foram formulados segundo Rodrigues et al. (2012) e Sohail et al. (2012). Para cada 10 mL de bebida de caju foi adicionado 1 g de microesferas contendo *L. casei* aprisionado, apresentando $8,7 \times 10^9$ UFC/mL.

As bebidas foram agitadas e acondicionadas em tubos plásticos estéreis com tampa e capacidade para 50 mL. Totalizou-se, portanto, três formulações:

- Bebida controle (Sem probióticos): Amostra C
- Bebida com *L. casei* na forma de células livres (Não fermentada): Amostra L
- Bebida com *L. casei* Microencapsulado: Amostra M

4.6.CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E MICROBIOLÓGICA DAS BEBIDAS DURANTE ARMAZENAMENTO

As bebidas de caju controle, com *L. casei* livre e microencapsulado foram mantidas em refrigeração a $4\pm1^{\circ}\text{C}$ durante quatro semanas. Amostras foram recolhidas nos tempos zero (após adição dos microrganismos) e em seguida, após 7, 14, 21 e 28 dias.

4.6.1. Parâmetros Físico-Químicos

Os parâmetros físico-químicos, dos três experimentos, foram determinados em triplicata como detalhado a seguir:

4.6.1.1.Sólidos Solúveis totais

Determinados por meio da leitura em refratômetro de bancada modelo AUS JENA Model II, com os resultados expressos em $^{\circ}\text{Brix}$ (IAL, 2008).

4.6.1.2.Vitamina C

O teor de ácido ascórbico (mg/100mL), foi determinado pelo método titulométrico de Tillmans que se baseia na redução do corante sal sódico de 2,6-diclorofenol indofenol por uma solução ácida de vitamina C (IAL, 2008).

4.6.1.3.Acidez Total Titulável

A acidez total titulável, expressa em ácido cítrico, foi determinada por meio da diluição da amostra homogeneizada em água destilada, e posterior titulação com solução de hidróxido de sódio (NaOH) 0,1N, seguida da viragem para coloração rosa com utilização do indicador de fenolftaleína (IAL, 2008).

4.6.1.4.pH

Determinado em potenciômetro digital da marca Tecnal modelo pH Meter Tec (IAL, 2008).

4.6.1.5.Colorimetria

A variação de cor foi determinada em um colorímetro modelo Minolta Chroma Mater CR-400 com base na escala CIELab. Os instrumentos de refletância identificaram três parâmetros de cor: o parâmetro L^* que está associado à luminosidade, a coordenada cromática a^* que indica a dimensão verde-vermelho e a coordenada cromática b^* associada a dimensão azul-amarelo. Os valores numéricos de L^* , a^* , b^* foram convertidos em ΔE^* , de acordo com a equação a seguir (PEREIRA et al., 2011).

$$\Delta E = \{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)\}^{\frac{1}{2}}$$

4.6.2. Análises Microbiológicas

As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata e envolveram a determinação de coliformes a 45°C, bolores e leveduras e *Salmonella spp*, conforme legislação brasileira (ANVISA, 2000), utilizando as metodologias descritas por APHA (2001) e SILVA et al. (2001).

A população de bolores e leveduras foi determinada inoculando-se as amostras em placas de ágar batata dextrose pH 3,5, acidificado com ácido tartárico 10%, pelo método de plaqueamento em superfície, incubadas a 25°C por 5 dias, com resultados expressos em UFC/mL. O número mais provável de coliformes a 45°C (NMP/50mL) foi realizado em caldo *Escherichia coli* (EC) incubado a 45°C por 24 horas. A detecção de *Salmonella sp* foi feita empregando as etapas de pré-enriquecimento em caldo não seletivo (caldo lactosado) a partir de 25 mL de amostra; após esta etapa foi realizado um enriquecimento em caldo seletivo a 35°C por 24 horas. A partir destes, semeou-se uma alíquota em placas com ágar *Salmonella-Shiguella* a 35°C por 24 horas e verificou-se o desenvolvimento de colônias de *Salmonella sp*. As colônias típicas foram inoculadas em tubos inclinados de ágar lisina ferro e ágar tríplice açúcar ferro. Os tubos foram incubados e foram observadas as reações típicas de *Salmonella sp*.

A quantidade de células viáveis de *L. casei* nas bebidas L e M também foram determinadas durante o armazenamento refrigerado, para tanto as amostras coletadas nos tempos indicados foram plaqueadas e tiveram o número de UFC determinados, conforme o item 4.4.4.

4.7. SIMULAÇÃO DAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS *in vitro*

Lactobacillus casei, na forma livre e encapsulada, foram submetidos a condições gastrointestinais simuladas, a fim de evidenciar a taxa de sobrevivência desta bactéria tanto na

bebida recém preparada, quanto após armazenamento refrigerado por 28 dias. A simulação *in vitro* da digestão seguiu a metodologia descrita por García-Ceja et al., 2015.

O suco gástrico simulado (SGS) consistiu em uma mistura de água com 0,2% de NaCl, 0,32% de pepsina e HCl (37%) para obtenção final de pH 2,0. O suco intestinal simulado (SIS) foi preparado pela mistura de solução de fosfato monopotássico a 2,8% em água destilada com 1% de pancreatina, o pH foi ajustado para 7,5 pela adição de NaOH 0,2 mol/L.

As condições gastrointestinais simuladas ocorreram pela inoculação da SGS ou SIS com 10% (v/v) da bebida de caju contendo a bactéria probiótica livre ou encapsulada (CHAMPAGNE; GARDNER, 2008), em seguida, a solução foi misturada em vortex por 10 segundos e incubadas a 37°C durante 2 horas, sob agitação. Amostras foram retiradas, em duplicata, para determinação da viabilidade, nos tempos 0, 1h e 2h de exposição ao SGS ou SIS. O pH das amostras foi neutralizado com solução fosfato (0,1M; pH 7,0), após exposição ao SGS. A detecção de células viáveis dentro das microesferas se procedeu pela quebra das cápsulas e agitação, com posterior plaqueamento e enumeração como descrito no item 4.4.4.

4.8. ANÁLISE SENSORIAL

A análise sensorial foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFPE/CCS (Anexo A) e todos os voluntários assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE; Apêndice A). Só foram submetidos a este teste as formulações cuja análise microbiológica demonstrou resultados em conformidade com a legislação pertinente (ANVISA, 2001). O teste de aceitabilidade foi realizado utilizando a escala hedônica de nove pontos, sendo avaliados aparência, preferência global, sabor, textura e aroma (IAL, 2008; Apêndice B). Paralelamente também foi avaliada a intenção de compra, para tanto, foi empregada escala hedônica de cinco pontos (IAL, 2008; Apêndice B). Os julgadores também foram orientados quanto ao teste de ordenação de preferência, onde indicaram a amostra mais e menos preferida.

Foram selecionados 100 provadores não treinados de 18 a 40 anos de idade, que referiram hábito e/ou interesse no consumo de suco de caju. Em ambos os testes, as amostras foram servidas, de forma aleatória, a aproximadamente 8° C, em copos plásticos de cor branca codificados com números aleatórios de 3 dígitos. Juntamente com as amostras foram oferecidos aos provadores bolacha e água, e estes foram orientados a entre uma amostra e outra utilizá-las, para remoção do sabor residual e limpeza das papilas gustativas. Os testes foram realizados em

cabines individuais e em horários previamente estabelecidos (excluindo uma hora antes e duas horas após o almoço).

4.9. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram apresentados em médias \pm desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando Anova one way e post hoc teste de Tukey quando os dados possuíam distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis quando o teste de normalidade (test Shapiro-Wilk) falhou. Os resultados da análise de ordenação de preferência das amostras (análise sensorial) foram realizados pelo teste de Friedman. A significância estatística adotada foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo software SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., Chigaco, IL, USA).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Caracterização da quitosana Kiofine® - B

5.1.1. Características estruturais

A espectroscopia na região do infravermelho permite observar e classificar algumas bandas relativas a vibrações características dos grupos funcionais presentes na estrutura da quitosana (ARNAUD et al., 2010). A Figura 7 mostra o espectro no infravermelho e a Tabela 2 indica o número de ondas observadas no espectro da quitosana Kiofine®-B.

A análise das bandas características de determinados grupos funcionais de uma molécula fornece, a partir de um simples exame do espectro, um conjunto valioso de informações sobre a estrutura da molécula (SIGNINI; CAMPANA-FILHO, 1998).

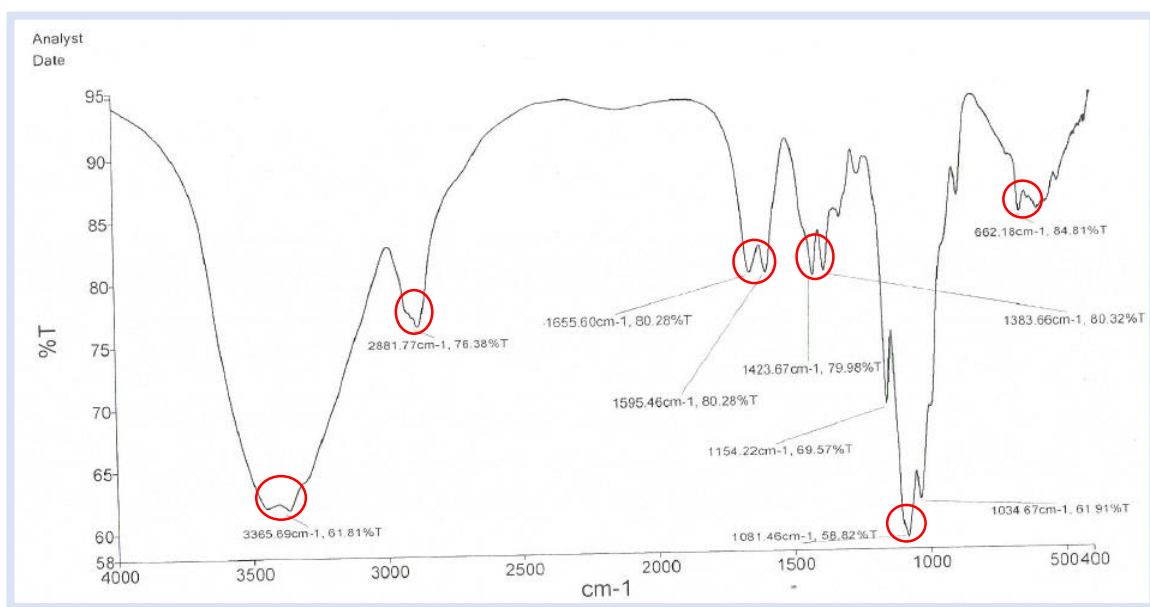


Figura 7. Espectro no infravermelho da quitosana Kiofine®-B.

Tabela 2. Atribuição das bandas do infravermelho da quitosana Kiofine®-B

Número de ondas (cm ⁻¹)	Tentativas de atribuições
662 a 1081	Anéis piranosídicos
1383	(-CH ₂ – OH) ν _{C-O}
1423	(amida) ν _{C-N}
1595	(amida II) δ _{NH}
1655	(amida I) ν _{C=O}
2881	ν _{C-H}
3365	ν _{O-H}
	(amina) δ _{NH}

Os espectros obtidos para a quitosana fúngica comercial mostram um pico largo em 3365 cm^{-1} , na região correspondente ao estiramento OH. Corroborando os dados encontrados por Oliveira et al. (2014) ao analisar quitosana extraída de *Mucor circinelloides*. O pico em 2881 cm^{-1} representa o estiramento C-H alifático e o pico em 1655 cm^{-1} corresponde à banda de deformação axial C=O do grupo amida I da quitina, indicando que a amostra não está totalmente desacetilada (ARNAUD et al., 2010).

O modo vibracional da deformação angular da ligação N-H (amida II) apresenta valor 1595 cm^{-1} semelhante ao observado por Anjos (2005). O pico em 1423 cm^{-1} representa o estiramento C-O do grupo alcoólico primário ($-\text{CH}_2 - \text{OH}$). A deformação axial de C-N da amida aparece em 1383 cm^{-1} . E, a banda intensa entre 662 e 1081 cm^{-1} está relacionada aos anéis piranosídicos, assim como foi relatado por Shigemasa et al., em 1996.

Os valores para as bandas do espectro de infravermelho achados neste estudo, estão de acordo com resultados disponíveis na literatura tanto relacionados a quitosana de origem fúngica, quanto quando proveniente da desacetilação da quitina obtida de crustáceos, mostrando que todas apresentam basicamente o mesmo grupo funcional (ARNAUD et al., 2010; OLIVEIRA et al., 2014; ANJOS, 2005; SHIGEMASA et al., 1996).

5.1.2. Grau de desacetilação

O grau de desacetilação é uma das características mais importantes da quitosana, diferentes amostras podem apresentar propriedades distintas de acordo com seu grau de desacetilação, que irá influenciar na performance final do produto. Diante disto, torna-se essencial a determinação deste parâmetro (CANELLA; GARCIA, 2001; SANTOS et al., 2011).

A determinação do grau de desacetilação por RMN ^1H está relacionada com o envolvimento de núcleos e elétrons no processo de absorção de energia, o que torna esta técnica bastante precisa (ARNAUD et al., 2010). A Figura 8 mostra o espectro de RMN ^1H para a quitosana Kiofine[®]-B e na Tabela 3 é possível observar a integração dos picos do RMN ^1H .

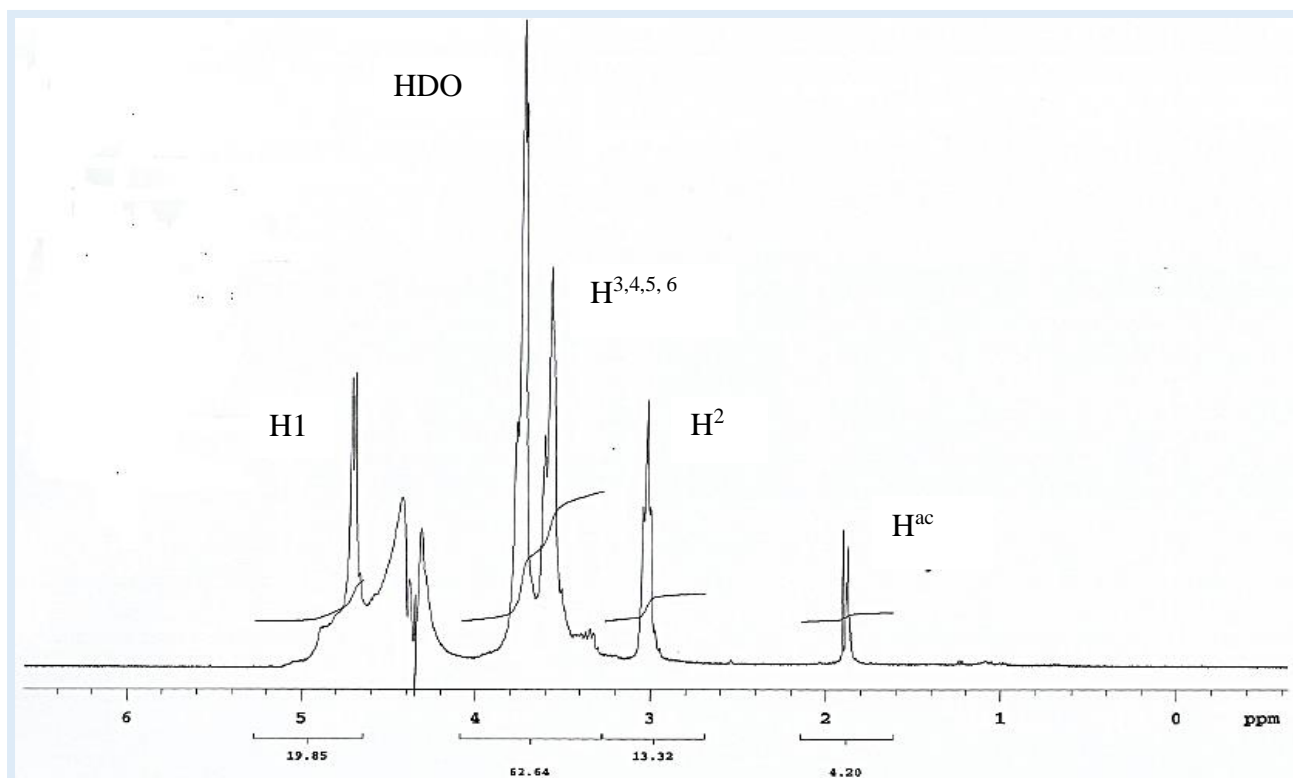


Figura 8. Espectro de RMN ^1H da quitosana Kiofine[®]-B

Tabela 3. Integração dos picos do espectro de RMN ^1H da quitosana Kiofine[®]-B para o cálculo do grau de desacetilação.

Hidrogênios	Integração dos picos
	Quitosana Kiofine [®] -B
H^{ac}	4,2
H^2	13,32
$\Sigma \text{H}^{2,3,4,5,6,6'}$	75,96

Os valores dos graus de desacetilação obtidos utilizando as equações I e II, apresentaram resultados bem semelhantes como mostrado na Tabela 4.

Tabela 4. Valores dos graus de desacetilação da quitosana determinados por RMN ^1H , a partir de duas equações distintas.

Quitosana	Eq.(I)	Eq. (II)
Kiofine®-B	89,01%	89,50%

A quitosana obtida a partir da biomassa micelial de fungos possui grau de desacetilação variando entre 80 – 90% (FRANCO et al., 2004), o que se enquadra no valor encontrado para o produto analisado nesta pesquisa, caracterizando uma quitosana com alto grau de desacetilação.

5.1.3. Massa Molar

As propriedades físico-químicas da quitosana dependem não somente do grau de desacetilação, mas também da sua massa molar, que pode variar entre 10^4 e 10^6 . A massa molar e a viscosidade intrínseca da quitosana Kiofine®-B estão expressas na Tabela 5, o resultado encontrado é semelhante aos reportados anteriormente em relação a quitosana fúngica que variam entre $1,0 \times 10^4$ e $9,0 \times 10^5$ (NADARAJAH et al., 2001). Oliveira et al. (2014) encontraram massa molar viscosimétrica de $1,74 \times 10^4$, similar a deste estudo, em quitosana extraída de *C. elegans*.

Tabela 5. Valor da viscosidade intrínseca e a massa molar viscosimétrica média da quitosana Kiofine®-B

Quitosana	Viscosidade intrínseca (mL/g)	Massa molar média (g/mol)
Kiofine B	0,464	$4,35 \times 10^4$

Diante do resultado da massa molar viscosimétrica, pode-se concluir que a quitosana apresenta baixo peso molecular (PM), inclusive menor que o PM típico de quitosanas extraídas de crustáceos (OLIVEIRA et al., 2014). Estudos prévios relatam a importância da identificação do peso molecular da quitosana destinada ao revestimento de microcápsulas de alginato, pois este polímero deve apresentar baixa massa molar. Esta característica permite que a quitosana se difunda mais rápido na matriz do alginato, resultando na formação de esferas com maior resistência e consequentemente maior proteção do ingrediente ativo (KRASAEKOOPT et al., 2006; ZHOU et al., 1998).

5.2. Composição Química da bebida de caju

A bebida de caju apresentou valor energético total de 40,77 Kcal/ 100 mL. Os valores médios referentes a composição química das bebidas formuladas com 45% de polpa de caju e 10% de açúcar foi de 90,3% de umidade, 0,06 g de cinzas, 0,15 g de proteínas, 0,45 g de lipídeo, 4,27 g de açúcares redutores e 4,76 g de açúcares totais. A composição de sucos de caju varia de acordo com a espécie da fruta, grau de maturidade, pelos efeitos ambientais e climáticos da estação de crescimento, método de elaboração da bebida, % de polpa e açúcar (FONTES et al., 2013; PINHEIRO et al., 2006), o que dificulta a comparação destes resultados com os disponíveis na literatura.

5.3. Caracterização das Microesferas

As microesferas de alginato de cálcio com revestimento de quitosana, preparadas pelo método de emulsão/gelificação interna, apresentaram diâmetro médio de $205,2 \pm 30,2 \mu\text{m}$. Dados relatados por Zhao et al. (2015) realizando encapsulação pela mesma técnica, com diferentes concentrações de alginato, relataram tamanho das cápsulas variando de 268,2 – 404,6 μm , os maiores tamanhos foram associados as concentrações mais altas do polímero. Do mesmo modo, Cai et al. (2014) produziram esferas de alginato de cálcio com a técnica de emulsão, porém sem o revestimento com quitosana, e encontraram diâmetro médio de 323 μm . Menor tamanho, por outro lado, foi observado por Zou et al. (2011) que obteve diâmetro médio de 159 μm em microesferas de alginato revestidas com quitosana. Sendo assim, o tamanho da partícula produzida neste estudo está dentro da variação dos diâmetros médios encontrados na literatura, utilizando a técnica de emulsão/gelatinização interna.

O fator de expansão foi de $1,14 \pm 0,06$ o que representa a polidispersividade das esferas, assim como, a uniformidade dos tamanhos. Este resultado corrobora com Zhao et al. (2015) e Cai et al. (2014) que encontraram números que variaram de 0,93-1,12 e 1,20, respectivamente.

Em relação a eficácia do processo de encapsulação, o ensaio de eficiência demonstrou rendimento de $44,3 \pm 0,4\%$. A taxa de eficiência de encapsulação pela técnica de emulsão/gelatinização interna é geralmente observada abaixo dos 50% o que é provavelmente devido a adição do ácido acético glacial após emulsificação, proporcionando um ambiente mais ácido o que deixa os microrganismos vulneráveis (CAI et al., 2014; ZOU et al., 2011).

5.4. Caracterização físico-química e microbiológica das bebidas de caju durante armazenamento

A Tabela 6 apresenta os valores referentes aos parâmetros físico-químicos obtidos durante armazenamento da bebida sob refrigeração ($4\pm1^{\circ}\text{C}$). Os resultados médios para acidez total titulável e conteúdo de sólidos solúveis durante os 28 dias de estocagem não apresentaram diferenças significantes, independentemente do tipo de amostra e do tempo de armazenamento.

Tabela 6. Resultado das análises físico-químicas obtidos durante estocagem das bebidas de caju controle (C), com microesferas (M) ou células livres (L) de *L. casei*.

Parâmetro	Tempo (dias)	C	M	L	<i>p</i> valor*
pH	0	4,51 \pm 0,05 b	4,65 \pm 0,05 a	4,51 \pm 0,05 b	0,049†
	7	4,50 \pm 0,05 b	4,65 \pm 0,05 a	4,50 \pm 0,05 b	0,048†
	14	4,50 \pm 0,05 b	4,64 \pm 0,05 a	4,50 \pm 0,00 b	0,032†
	21	4,50 \pm 0,05 b	4,65 \pm 0,05 a	4,50 \pm 0,00 b	0,035†
	28	4,50 \pm 0,05 b	4,64 \pm 0,05 a	4,50 \pm 0,05 b	0,032†
Acidez (g ác. cítrico/100 g)	0	0,372 \pm 0,008 a	0,370 \pm 0,004 a	0,382 \pm 0,007 a	0,158
	7	0,385 \pm 0,001 a	0,376 \pm 0,005 a	0,378 \pm 0,011 a	0,358
	14	0,373 \pm 0,006 a	0,386 \pm 0,003 a	0,379 \pm 0,004 a	0,052
	21	0,384 \pm 0,003 a	0,372 \pm 0,002 a	0,382 \pm 0,009 a	0,117
	28	0,378 \pm 0,010 a	0,375 \pm 0,009 a	0,381 \pm 0,005 a	0,696
Sólidos solúveis (°Brix)	0	11,02 \pm 0,005 a	11,03 \pm 0,021 a	10,96 \pm 0,055 a	0,331
	7	11,02 \pm 0,020 a	11,02 \pm 0,020 a	11,00 \pm 0,011 a	0,395
	14	11,00 \pm 0,005 a	11,18 \pm 0,011 a	11,19 \pm 0,010 a	0,062
	21	11,12 \pm 0,005 a	11,18 \pm 0,015 a	11,19 \pm 0,005 a	0,097
	28	11,02 \pm 0,026 a	11,19 \pm 0,010 a	11,19 \pm 0,010 a	0,063

Obs.: Amostras seguidas pelas mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Médias e desvios padrão para $n = 3$. *Valor de *p* calculado pelo teste Kruskal-Wallis para pH e Anova one way e posterior teste de Tukey foram utilizados para determinação do valor de *p* para acidez e sólidos solúveis. †Estatisticamente significativo.

Em relação à média dos valores obtidos para pH observou-se que a bebida controle e aquela adicionada de *L. casei* na forma de células livres não diferiram significativamente entre si, durante todo o armazenamento. Em contrapartida, a bebida de caju com adição de microesferas, foi diferente das demais, apresentando pH mais elevado, provavelmente devido ao material encapsulante e de revestimento, além do pH final das esferas em torno de 5,8-6,0. Resultados estes também encontrados por Nualkaekul et al. (2012), apesar de utilizar outra técnica para encapsulação (Extrusão), destinada a adição a suco de romã, eles atribuíram o fato ao revestimento com quitosana, devido a sua solubilidade em ácidos orgânicos, tal como o cítrico, que estão também presentes no caju. Em oposição, Sohail et al. (2012), relatam que não

é esperado alterações nas características de sucos, como o tamponamento, pela adição de apenas 10% de cápsulas, o que não foi verificado neste estudo.

No presente estudo, não foram observadas diminuições expressivas de pH e/ou sólidos solúveis, assim como, aumento da acidez total titulável durante o armazenamento das amostras sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), sugerindo que tanto as células probióticas aprisionadas nas esferas quanto as células livres apresentavam-se com baixa atividade metabólica na bebida. Resultados estes que estão de acordo com os reportados por Antunes et al. (2013) ao estudarem a adição de probióticos livres e encapsulados pela técnica de spray drying em suco de acerola, não verificaram alterações significativas no pH e/ou acidez das bebidas durante estocagem refrigerada por 35 dias, sugerindo também a baixa ação metabólica das células bacterianas livres ou imobilizadas.

Por outro lado, Ding e Shah (2008) observaram diminuição significativa do pH (2,81 – 2,57) em suco de laranja contendo células probióticas livres após armazenamento por 6 semanas, enquanto que o mesmo suco contendo a bactéria encapsulada, pela técnica de emulsão, não teve o pH alterado (2,81 – 2,81) após o término do tempo de armazenamento. Quando avaliaram o suco de maçã, perceberam no final das 6 semanas que o pH do suco inoculado com probiótico encapsulado foi maior que a bebida contendo células livres. É importante ressaltar, ainda neste estudo, que a diminuição do pH nos sucos de laranja e maçã contendo células livres foram acompanhadas por redução na concentração de sólidos solúveis e aumento na acidez das bebidas. Estes autores concluíram que a bactéria probiótica imobilizada pela encapsulação possui maior estabilidade no produto, enquanto que as células livres fermentam os açúcares do suco, o que é refletido nas alterações das características físico-químicas.

De acordo com Rodrigues et al. (2012), é esperado uma menor variação do pH em sucos com células probióticas encapsuladas, uma vez que a membrana da cápsula provavelmente limita a difusão de açúcares, dificultando a atividade fermentativa dessas bactérias. Resultados obtidos neste estudo, por outro lado, indicaram a mesma estabilidade dos parâmetros físico-químicos para as bebidas com *L. casei* livre ou microencapsulado. Isso se deve provavelmente ao fato do suco de caju não ser um meio favorável para a atividade metabólica e fermentativa do *L. casei*, entretanto, o caju possui naturalmente altos níveis de vitamina C, o que fornece um ambiente mais anaeróbico e favorável a sobrevivência do probiótico durante a estocagem. Deste modo, justifica-se o quadro observado neste estudo, onde apesar da baixa atividade metabólica

do probiótico houve manutenção da viabilidade do *L. casei* livre nas amostras durante a maior parte do armazenamento.

A determinação do conteúdo de ácido ascórbico nas três bebidas durante armazenamento refrigerado (4°C) é expresso na Tabela 7. As bebidas de caju controle, com *L. casei* livre e microencapsulado apresentaram valores bem semelhantes de vitamina C, em todos os tempos analisados, demonstrando redução média total de 78.50 mg/100 mL no fim do armazenamento. A redução do conteúdo de vitamina C em uma bebida de fruta natural é esperada, uma vez que esta vitamina é facilmente oxidável. Apesar da diminuição observada, as bebidas de caju apresentaram bom conteúdo da vitamina, visto que dados da literatura indicam variação de 189 a 372 mg de ácido ascórbico por 100 mL de bebida extraída de caju (AKINWALE et al., 2001; ASSUNÇÃO; MERCADANTE, 2003; OLIVEIRA et al, 1999; LAVINAS et al, 2006).

Tabela 7. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico (mg/100 mL) nas bebidas de caju controle, com *L. casei* livre ou microencapsulados durante armazenamento refrigerado (4°C).

Tempo (dias)	C	M	L
0	296,48 ± 0,67 A	296,88 ± 0,72 A	296,89 ± 0,80 A
7	293,66 ± 1,25 B	293,37 ± 1,13 B	293,10 ± 1,52 B
14	287,18 ± 0,74 C	288,17 ± 0,76 C	287,11 ± 0,63 C
21	277,03 ± 0,89 D	283,51 ± 0,37 D	282,83 ± 0,86 D
28	218,67 ± 1,21 E	218,56 ± 0,75 E	217,50 ± 0,89 E

Obs.: Amostras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem ao nível de 5%. Médias e desvios padrão para n = 3. Anova one way e teste de Tukey.

Os resultados para os parâmetros de cor são expressos em diferença total de cor entre as amostras estocadas nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias e a amostra inicial, tempo 0 (Tabela 8). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a amostra controle e os tratamentos com células livres e microencapsuladas de *L. casei*, quando comparadas em cada estágio de tempo. Isto indica que a adição dos probióticos, independentemente de estar na forma livre ou encapsulada não altera a cor do produto. Por outro lado, quando cada amostra foi analisada isoladamente, durante os 28 dias de estocagem, foram observadas diferenças estatísticas quanto a cor inicial e final do produto. Esta alteração na cor, durante o armazenamento pode estar associada a redução dos níveis de Vitamina C nas amostras. Antunes et al. (2013) indicam a relação existente entre alterações nos parâmetros de cor e o conteúdo de vitamina C. Contudo, de acordo com Lee e Coates (2003), valores de $\Delta E^* \geq 2$ são indicativos de diferenças de cor perceptíveis visualmente, em nosso estudo este valor não foi alcançado, sugerindo que a alteração da cor detectada não era visível a olho nu.

Tabela 8. Diferença total de cor (ΔE^*) das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de *L. casei* (L) durante estocagem.

Tempo (dias)	C	M	L
7	0,55 \pm 0,28 a B	0,49 \pm 0,12 a B	0,58 \pm 0,06 a B
14	0,93 \pm 0,01 a B	0,75 \pm 0,25 a B	0,77 \pm 0,06 a B
21	1,48 \pm 0,30 a A	1,20 \pm 0,14 a A	1,19 \pm 0,10 a A
28	1,54 \pm 0,16 a A	1,29 \pm 0,14 a A	1,37 \pm 0,15 a A

Obs.: amostras (média \pm desvio padrão) seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Amostras (média \pm desvio padrão) seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na mesma coluna, não diferem ao nível de 5%. Médias e desvio padrão para n = 3. Anova one way e teste de Tukey.

O controle microbiano de *Salmonella* e Coliformes a 45°C são obrigatórias pela legislação brasileira em se tratando de sucos de fruta. Embora os padrões legais em vigor não estabeleçam a contagem para bolores e leveduras, esta determinação foi realizada, uma vez que, são contaminantes comuns em sucos. A avaliação microbiológica mostrou uma boa qualidade higiênico-sanitária das amostras durante os 28 dias de armazenamento (Tabela 9).

Tabela 9. Avaliação microbiológica da bebida controle e com adição de microesferas e células livres de *L. casei* no tempo zero e no último dia de armazenamento refrigerado.

Análises microbiológicas	C		M		L	
	0	28	0	28	0	28
Coliformes a 45°C	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Salmonella sp/25g	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente	Ausente
Fungos filamentosos e Leveduras (UFC/mL)	<10	<10	<10	<10	<10	<10

A Figura 9 mostra a viabilidade da bactéria livre e microencapsulada na bebida de caju armazenada a 4 \pm 1°C por até 28 dias. O número de células viáveis nas microcápsulas manteve-se constante durante todo o período de armazenamento, exceto entre o tempo 0 e 7 dias, quando foi observado aumento na contagem do *L. casei*. Ótima viabilidade das células de *L. paracasei* encapsuladas com alginato-quitosana, pelo método de extrusão, e adicionadas em suco de laranja e pêssgo foram observados por Rodrigues et al. (2012). Estes autores não observaram reduções na viabilidade após 50 dias de estocagem das bebidas e, do mesmo modo que esta pesquisa, também identificaram aumento da viabilidade dos microrganismos encapsulados.

Estudos têm demonstrado que apenas probióticos encapsulados são capazes de manter a viabilidade em sucos de fruta (ANAKELLA; ORSAT, 2013; CHANDRAMOULI et al., 2004; NUALKAEKUL et al., 2013; SAARELA et al., 2006; YING et al., 2013). A microencapsulação pode promover um ambiente mais anaeróbico, favorecendo a sobrevivência e multiplicação das

bactérias dentro das esferas, em adição, a encapsulação e o revestimento servem como barreira física contra condições adversas, como o baixo pH da bebida (LAELORSPOEN et al., 2014; DE PRISCO; MAURIELLO, 2016).

Em relação à sobrevivência das células livres, foi observada estabilidade no número de microrganismos até 21 dias, exibindo diminuição de 1,7 log com 28 dias de estocagem (Figura 9). Apesar da redução observada, a bebida com células livres manteve a contagem dentro do recomendado ($> 10^7$ UFC/mL), podendo ser considerada um alimento com alegação funcional (FAO/WHO, 2002). Pereira et al. (2011) ao estudarem suco de caju fermentado com *L. casei*, encontraram viabilidade > 8 log UFC/mL após 42 dias de estocagem, estes autores concluíram que o suco de caju pode ser tão eficiente quanto produtos lácteos como carreadores de *L. casei* livres, entretanto refere-se à bebida fermentada.

Resultados contrários foram encontrados por Nualkaekul et al., (2012) que identificaram perda total da viabilidade de *L. plantarum* livre adicionado a suco de romã, após 4 semanas em refrigeração. Em outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo, foi observada rápida diminuição no número de células livres em suco de romã e cranberry com *L. plantarum*, exibindo 1,1 log UFC após 6 semanas a 5°C (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011). Do mesmo modo, Ding e Shah (2008) estudando várias cepas de *Lactobacillus*, observou queda de 7 ciclos logarítmicos em 4 semanas de estocagem em suco de maçã. Dados encontrados na literatura que comparam a sobrevivência de células livres e encapsuladas em sucos de fruta, concluem, em sua maioria, que os microrganismos encapsulados apresentam maior resistência, promovendo maior viabilidade durante uma vida de prateleira mais longa (DING; SHAH, 2008; GARCIA-CEJA et al., 2015; KINGWATEE et al., 2015; KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; SOHAIL et al., 2011; YING et al., 2013).

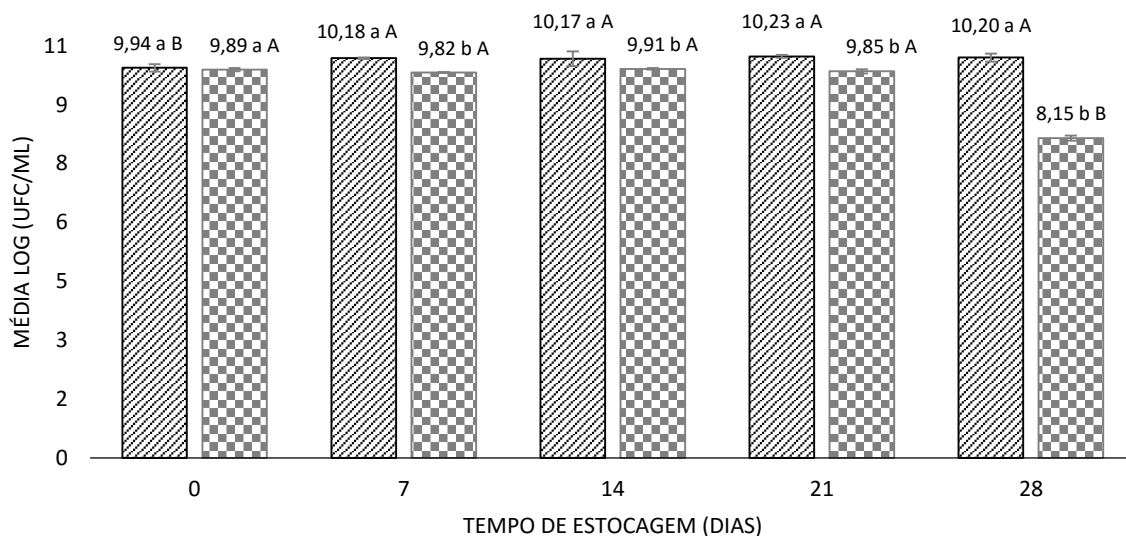


Figura 9. Média das contagens (log UFC/mL) de *L. casei* na forma de microesferas (▨) e células livres (▤) na bebida de caju durante estocagem refrigerada ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Resultados seguidos pelas mesmas letras minúsculas não diferem ao nível de 5% a respeito ao tratamento. Valores acompanhados da mesma letra maiúscula não diferem ao nível de 5% com relação ao tempo. Anova one way e test de Tukey.

5.5. Simulação das condições gastrointestinais *in vitro*

A viabilidade do *L. casei* após exposição às condições gastrointestinais simuladas estão expostas na Tabela 10. Quando as amostras foram submetidas ao SGS, verificou-se uma boa estabilidade das células microencapsuladas, com redução média de 1,42 Log UFC/mL (14,6%) após 2 horas. Em contrapartida, as bebidas contendo células livres apresentaram perda total da viabilidade após 120 minutos de exposição ao SGS. Da mesma forma, quando as condições intestinais foram simuladas, o *L. casei* aprisionado mostrou-se mais resistente, com redução de <1 Log UFC/mL durante todo período de exposição, em comparação às células livres com diminuição média de 5,69 Log UFC/mL (62,1%).

A microencapsulação influenciou beneficemente na sobrevivência do probiótico em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, o que está de acordo com relatos anteriores da literatura (DE PRISCO et al., 2015; CAI et al., 2014; ZOU et al., 2011; CHAIKHAM et al., 2012). Utilizando a mesma metodologia de simulação gastrointestinal, García-Ceja et al., (2015) observou que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus e reuteri*, encapsulados por extrusão, reduziu cerca de 1 Log UFC após simulação gástrica por 120 minutos. Em relação a exposição ao suco intestinal simulado, observaram queda de aproximadamente 2,5 Log UFC após 2 horas, exibindo menor resistência que as observadas por este estudo. De Prisco et al.,

(2015) relatam que não observaram nenhuma redução expressiva na viabilidade de *L. reuteri*, encapsulados com alginato-quitosana, quando submetidos a simulações gástrica (pH 2,5; pepsina) e intestinal (Sais biliares). Pode-se concluir que capsulas de alginato revestidas de quitosana mantém elevada viabilidade quando submetidas as condições gastrointestinais *in vitro*.

Microesferas formadas com alginato de sódio e carbonato de cálcio, como as deste estudo, apresentam ótimas propriedades mecânicas e estrutura mais densa, diminuindo a porosidade (CAI et al., 2014). A quitosana, utilizada como polímero de revestimento, fornece uma proteção adicional ao material encapsulado, pois, por possuir carga positiva, forma um complexo insolúvel com o alginato, originando uma superfície semi-permeável (DE PRISCO et al., 2015; ZOU et al. 2011). Vale ressaltar também a teoria proposta por Nualkaekul et al. (2012), que observaram que o efeito protetor das cápsulas, frente as condições adversas de baixo pH, pode ser devido ao fato dos polissacarídeos (alginato/quitosana) atuarem como tampão, aumentando o pH no interior da matriz a um nível menos nocivo para as bactérias. Deste modo, pode-se justificar os resultados deste estudo quanto a elevada viabilidade de *L. casei* encapsulado em condições gastrointestinais simuladas.

No que diz respeito as células livres adicionadas em sucos de fruta, pesquisas têm demonstrado, utilizando diferentes cepas probióticas, perda total da viabilidade já na simulação gástrica (CHAIKHAM et al., 2012; ZOU et al, 2011; NUALKAEKUL et al., 2012; TRABELSI et al., 2013; CHÁVARRI et al., 2010). O efeito da simulação gastrointestinal *in vitro* foi estudado Chaikham et al. (2012) que verificaram que células livres adicionadas a longan (*Nephelium longanum*) juice foram completamente eliminadas durante simulações gástricas (pH 1,4) após 1,5 horas para *L. acidophilus* e 1 hora para *L. casei*, fato este observado neste estudo apesar de utilizar diferente metodologia de simulação gastrointestinal. Diante das evidências, no que se refere a baixa sobrevivência de células livres em condições ácidas, como as do estômago, pesquisas tem concluído que somente probióticos microencapsulados tem a capacidade de manter a viabilidade em condições gastrointestinais (CHÁVARRI et al., 2010; TRABELSI et al., 2013; IYER; KAILASAPATHY, 2005).

Vale ressaltar que, existe um considerável corpo de evidências que mostra que mesmo as células probióticas mortas são capazes de produzir efeitos benéficos a saúde, no que se refere ao estímulo a respostas anti-inflamatórias e na modulação do sistema imunológico (ADAMS,

2010; FANG et al., 2014; HABIL et al., 2014; KISO et al., 2013; SANG et al., 2015; ORLANDO et al., 2012).

Não foram observadas diferenças significantes na viabilidade, com relação ao tempo inicial e final de armazenamento durante exposição às condições gástricas e intestinais (Tabela 10). Pesquisas mostram que pH mais baixo durante o crescimento bacteriano induz uma maior tolerância a ambientes ácidos, a condições osmóticas e oxidativas (HARTKE et al., 1996; LORCA; FONT DE VALDEZ, 2001; VAN DE GUCHTE et al., 2002). Com base nesta hipótese, as células estocadas na bebida de caju ácida por 28 dias, podem ter adquirido um certo grau de adaptação ao ambiente hostil, justificando, portanto, o fato do armazenamento não ter sido um fator interferente na sobrevivência do *L. casei* durante as condições gastrointestinais simuladas.

Estudo realizado por Champagne e Gardner (2008), é o único que também comparou o tempo de estocagem e a resistência das células às simulações gastrointestinais *in vitro*. Diferente dos resultados deste estudo, verificaram que a estocagem prévia por 35 dias a 4 °C, em diferentes sucos de frutas, resultou numa maior perda da viabilidade, cerca de 1.2 log UFC, após exposição por 2 horas ao suco gástrico simulado (pH 2,0).

Tabela 10. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do *L. casei* microencapsulado (M) e Livre (L), no tempo inicial (dia zero - D0) e no período final de armazenamento (dia 28 – D28), durante exposição ao suco gástrico simulado (SGS) ou suco intestinal simulado (SIS).

Tempo de incubação (min)	M – D0		M – D28		L – D0		L – D28	
	Log UFC/mL ¹	Sobrevivência (%) ²	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)	Log UFC/mL	Sobrevivência (%)
SGS								
0	9,69 \pm 0,23 a A	100%	9,96 \pm 0,16 a A	100%	9,61 \pm 0,06 a A	100%	8,92 \pm 0,03 b A	100%
60	9,17 \pm 0,26 a A	93,3%	9,25 \pm 0,40 a A	98,5%	5,56 \pm 0,03 b B	57,8%	2,58 \pm 0,06 c B	29,1%
120	8,42 \pm 0,12 a B	86,5%	8,38 \pm 0,30 a B	84,3%	ND ³	ND	ND	ND
SIS								
0	9,79 \pm 0,04 a A	100%	9,74 \pm 0,14 a A	100%	9,62 \pm 0,12 a A	100%	8,85 \pm 0,10 b A	100%
60	9,59 \pm 0,10 a A	97,5%	9,43 \pm 0,39 a AB	96,8%	5,80 \pm 0,16 b B	59,5%	5,28 \pm 0,42 b B	60,6%
120	9,24 \pm 0,04 a B	94,3%	9,16 \pm 0,14 a B	94,0%	3,84 \pm 0,10 b C	40,2%	3,25 \pm 0,43 b C	34,9%

Valores (médias \pm desvio padrão) seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Valores (médias \pm desvio padrão) acompanhados pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem ao nível de 5%, separadamente para SGJ e SIJ. Anova one way e teste de Tukey.

¹Média \pm desvio padrão para n = 2.

²Calculado pela divisão da população de células viáveis final pela inicial e multiplicado por 100 para obter o valor percentual.

³Não detectado (níveis abaixo de 10² UFC/mL).

5.6. Análise Sensorial

A aceitação dos provadores quanto as bebidas de caju controle, com células microencapsuladas e livres de *L. casei* estão expostas na Tabela 11. De modo geral, as bebidas foram bem aceitas pelos provadores, visto que, as pontuações atribuídas em todos os aspectos analisados variaram entre 6 e 7, o que indica, pela escala hedônica, “Gostar ligeiramente” a “Gostar moderadamente”.

Não foram observadas diferenças entre os parâmetros de aparência, aroma e sabor para as três amostras analisadas. O que está de acordo com os resultados obtidos quanto as características físico-químicas, uma vez que os valores de pH, acidez e °Brix mostraram-se estáveis, indicando que a bebida não foi fermentada, refletindo, portanto, na manutenção dos parâmetros organolépticos. Vale ressaltar que a bebida com células livres não diferiu em nenhum parâmetro analisado da amostra controle.

A bebida contendo microcápsulas foi significativamente diferente, no que se refere a textura, quando comparada com as amostras controle e com células livres (Tabela 11). Os provadores perceberam a presença das microesferas, contudo, a pontuação para textura e impressão global foram maiores que 6, indicando, portanto, aceitação pelos provadores. Resultados semelhantes aos descritos por García-Ceja et al. (2015), que relatam que os julgadores perceberam imediatamente as cápsulas (2,08 mm) em néctar de pêssago, ainda assim as bebidas tiveram boa aceitação (score > 6). Estes autores descrevem ainda que o flavor e aparência global não foram afetados pela presença das cápsulas de alginato/quitosana, o que está de acordo com este estudo.

Tabela 11. Médias das pontuações obtidas no teste de aceitação e intenção de compra das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de *L. casei* (L).

	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global	Intenção de Compra
C	7,94 ± 1,09 a	7,68 ± 1,15 a	7,58 ± 1,51 a	7,50 ± 1,48 a	7,62 ± 1,45 a	4,42 ± 0,99 a
M	7,70 ± 1,16 a	7,53 ± 1,59 a	7,44 ± 1,71 a	6,33 ± 2,00 b	6,77 ± 1,71 b	3,51 ± 1,23 c
L	7,83 ± 1,35 a	7,45 ± 1,46 a	7,52 ± 1,86 a	7,33 ± 1,33 a	7,14 ± 1,58 ab	4,02 ± 1,20 b

Médias e desvio padrão para n = 100. Amostras (média ± desvio padrão) seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

Krasaekoopt e Kitsawad (2010) mostraram que a adição de cápsulas de probióticos (0,1 – 0,2 mm) influenciou a qualidade sensorial das bebidas, pela presença de partículas

dispersas e por causar dificuldade de deglutição. Apesar disto, mais de 80% dos provadores aceitaram as bebidas, dando scores para textura e preferência global de 6.6 e 6.7 para suco de laranja; e 6.8 e 6.9 para suco de uva, exibindo um padrão de pontuação semelhante ao obtido por este estudo.

A literatura indica que cápsulas de alginato apresentando tamanho superior a 1 mm podem alterar a textura dos alimentos e se o tamanho for inferior a 100 μm não protegem significativamente as culturas na presença do suco gástrico, em comparação com as células livres (HANSEN et al., 2002). Vale ressaltar que neste estudo o diâmetro médio das esferas foi de 205,2 μm e mesmo assim foram detectadas pelos provadores.

As pontuações médias obtidas para o teste de intenção de compra, descrito na Tabela 11, apontaram que os provadores comprariam o produto controle e o com células livres (Score > 4), porém a maioria indicou que teriam dúvidas se adquiririam a bebida com microcápsulas (Score < 4). Krasaekoopt e Kitsawad (2010), relatam que mais de 86% dos participantes mostram-se dispostos a adquirir os sucos de laranja e uva com probióticos encapsulados, devido as propriedades relacionadas a saúde, refletindo a existência de um mercado potencial para sucos de frutas contendo probióticos.

O teste de ordenação de preferência indicou que a amostra controle e com células livres permaneceram como as bebidas que mais agradaram, seguidas pelo suco com microcápsulas ($p < 0,01$; teste de Friedman). Contudo, é importante ressaltar que 24% dos provadores preferiram a bebida com microcápsulas, o que foi atribuído a semelhança a um suco caseiro e natural, pois as esferas foram associadas a partículas de caju dispersas na bebida.

Dados da literatura são escassos no que diz respeito as análises sensoriais de bebidas de frutas adicionadas de probióticos encapsulados, dispondo apenas dos dois estudos utilizados nesta discussão. Em se tratando de bebidas de frutas com probióticos livres só existem trabalhos avaliando a aceitação de bebidas fermentadas, logo este trabalho vem a contribuir com informações adicionais para área.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- A caracterização da quitosana fúngica comercial Kiofine[®]-B indicou que a mesma possui alto grau de desacetilação (89%) e baixo peso molecular.
- A adição de *L. casei* na forma livre ou microencapsulada não alterou as características inerentes da bebida padrão (sem probióticos), com exceção do pH que exibiu um aumento pela adição de microesferas.
- A bebida de caju foi um substrato favorável à manutenção de células de *L. casei* livre e microencapsulado durante armazenamento sob refrigeração por até 28 dias, podendo ser considerada uma bebida com propriedades funcionais.
- A adição de probióticos livres ou microencapsulados a bebida de caju não refletiu em alterações da cor do produto. A alteração no perfil da cor das bebidas durante todo o armazenamento foi associada a redução do conteúdo de Vitamina C.
- O método de emulsão foi efetivo na formação de microesferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, proporcionando uma maior resistência as células de *L. casei* aprisionadas, principalmente durante as simulações gastrointestinais, uma vez que houve perda total da viabilidade dos microrganismos livres.
- A aceitação das bebidas pelos provadores foi positiva, apesar das microesferas terem sido percebidas.

REFERÊNCIAS

- ADAMS, C. A. The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. **Nutrition Research Review**, v. 23, p. 37 – 46, 2010.
- ADHIKARI, K. et al. Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1946- 1951, 2000.
- AGHBASHLO, M. et al. Influence of Wall Material and Inlet Drying Air Temperature on the Microencapsulation of Fish Oil by Spray Drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, p. 1561-1569, 2012.
- AGOSTINI-COSTA, T. S. et al. Determinação de taninos em pedúnculo de caju: método da vanilina versus método do butanol ácido. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, p. 763-765, 2003.
- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4th ed. Washington: APHA, 2001.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Food Science and Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.
- ANJOS, F. S. C. **Filmes e beads à base de quitosana: incorporação de compostos luminescentes e estudos de interações hospedeiro-hóspede**. Recife: UFPE, 2005. 93p.
- ANTUNES, A. E. C. et al. Acerola nectar with added microencapsulation probiotic. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013.
- ARNAUD, T. M. S.; BARROS-NETO, B.; DINIZ, F. B. Chitosan effect on dental enamel de-remineralization: an *in vitro* evaluation. **Journal of Dentistry**, v. 38, p. 848-852, 2010.
- ASSUNÇÃO, R. B.; MERCADANTE, A. Z. Carotenoids and ascorbic acids from cashew apple (*Anacardium occidentale* L.): variety and geographic effects. **Food Chemistry**, v. 81, p. 495-502, 2003.
- BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology** (in press), 2015. Disponível em:

<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1878818115001309>. Acesso em: 13 de outubro de 2015.

BERGUER, L. R. R.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, N. P. Perspectivas para o uso da quitosana na agricultura. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 12, p. 195-215, 2011.

BOSCARIOLI, M, P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de probióticos adicionados em sorvete**. São Caetano do Sul, SP: CEUNEEM, 2010. 73 p.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância sanitária. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**. Atualizado em: julho de 2008. IX-Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 28 mar. 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001. **Regulamento técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/12_01rdc.htm. Acesso em: 12 de outubro de 2015.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e/ou de saúde**. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/1c77370047457bcc8888dc3fbc4c6735/RDC_02_2002.pdf?MOD=AJPERES. Acesso em: 10 de outubro de 2015.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Instrução Normativa nº 01, de 07 de janeiro de 2000. **Regulamento Técnico geral para fixação dos padrões de identidade e qualidade para suco de fruta**. [acesso em 27 de maio de 2014]. Disponível em: www2.agricultura.rs.gov.br/.../126989581629.03_enol_in_1_00_mapa.

Brasil. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento [Internet]. Decreto nº 3.510, de 16 de junho de 2000. **Altera dispositivos do Regulamento aprovado pelo Decreto nº 2.314, de 4 de setembro de 1997, que dispõe sobre a padronização, a classificação,**

o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. [acesso 2014 maio 17]. Disponível em: <<http://extranet.agricultura.gov.br/sislegisconsulta/consultarLegislacao.do?operacao=visualizar&id=1012>>

BRINGAS-LANTIGUA, M. et al. Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 47, p. 1511-1517, 2012.

BROINIZI, P. R. B. et al. Avaliação da atividade antioxidante dos compostos fenólicos naturalmente presentes em subprodutos do pseudofruto de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 902-908, 2007.

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v. 57, p. 373- 380, 2007.

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

CANELLA, K. M. N. C.; GARCIA, R. B. Caracterização de quitosana por cromatografia de permeação em gel – influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v. 24, p. 13-17, 2001.

CARVALHO, J. M. **Bebidas à base de água de coco e suco de caju: processamento e estabilidade.** Fortaleza: UFC, 2005. 91 p.

CHAIKHAM, P. et al. Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 2229 – 2238, 2012.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bacteria in ice cream. **International Dairy Journal**, v. 47, p. 109-117, 2015.

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

CHAMPAGNE, C. P., RAYMOND, Y., GAGNON, R. Viability of *Lactobacillus rhamnosus* R0011 in an apple-based fruit juice under simulated storage conditions at the consumer level. **Food Microbiology and Safety**, v. 73, p. 221 - 226, 2008.

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

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

CHANDRAMOULI, V. et al. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, 2004.

CHÁVARRI, M. et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189, 2010.

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

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

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

DENIPOTE, F.G. et al. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, p. 93-98, 2010.

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

EJTAHED, H. S. et al. Probiotic yogurt improves antioxidante status in type 2 diabetic patients. **Nutrition**, v. 28, p. 539-543, 2012.

FANG, S. B. et al. Live and heatkilled *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. **Supportive Care in Cancer**, v. 22, p. 1647 – 1654, 2014.

FAO/WHO. Guidilines for the evaluation of probiotics in food. **Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. London, Ontario, Canadá, 2002.

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

FONTES, C. P. M. L. et al. Substitution of yeast by ammonium sulfate for manitol production in cashew apple juice. **Biocatalysis and agricultural Biotechnology**, v. 2, p. 69 – 75, 2013.

FRANCO, L. O. et al. Heavy metal biosorption by chitin and chitosan isolated from *Cunninghamella elegans* IFM 46109. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, p. 243–247, 2004.

GARCIA-CEJA, A. et al. Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. **Food Science and Tecnology**, v.63, n. 1, p. 482-489, 2015.

GUARNER, F. et al. World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: probiotics and prebiotics. **Journal of clinical gastroenterology**, v. 46, p. 468-481, 2012.

GUIMARÃES, R. R. et al. Development of probiotic beads similar to fish eggs. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 968–973, 2013.

HABIL, N. et al. Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β -defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. **Beneficial Microbes**, v. 5, p. 483 – 495, 2014.

HANSEN L. T. et al. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.

HARTKE, A. et al. The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. **Current Microbiology**, v. 33, p. 194 – 199, 1996.

HEJAZI, R., AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **J. Controlled Release**, v. 89, p. 151–165, 2003.

HIRAI, A.; ODANI, H.; NAKAJIMA, A. Determination of degree of deacetylation of chitosan by ^1H NMR spectroscopy. **Polymer Bulletin**, v. 26, p. 87-94, 1991.

HUGGINS, M. L. The Viscosity of Dilute Solutions of Long-Chain Molecules. IV. Dependence on Concentration. **Journal of the American Chemical Society**, 64, 2716 – 2718, 1942.

HUNGRIA, T. D.; LONGO, P. L. Viabilidade de *Lactobacillus casei* em alimento probiótico infantil relacionada a vida de prateleira. **Revista Saúde**, v. 3, p. 10-15, 2009.

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

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS: **Acompanhamento sistemático da produção agrícola**. Brasília: IBGE/SIDRA, 2006. 589p.

ITSARANUWAT, P. et al. The potential therapeutic benefits of consuming health-promoting fermented dairy products. **International Journal of Dairy Technology**, v. 56, p. 203-210, 2003.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under *In Vitro* Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 18-23, 2005.

JANEGITZ, B. C. et al. Desenvolvimento de um método empregando quitosana para remoção de íons metálicos de águas residuárias. **Química Nova**, v. 30, p. 879-884, 2007.

JIANG, T. et al. Oral delivery of probiotic expressing M cell homing peptide conjugated BmpB vaccine encapsulated into alginate/chitosan/alginate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, p. 766-777, 2014.

KAILASAPATHY, K. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effects on the sensory properties of yoghurt. **Food Science and Tecnology**, v. 39, p. 1221-1227, 2006.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. C. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium ssp.* **Immunology and Cell biology**, v. 78, p. 80-88, 2000.

KANMANI, P.; LIM, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. **Food Chemistry**, v. 141, p. 1041-1049, 2013.

KINGWATEE, N. et al. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in Lychee juice varied carrier materials. **Food Science and Technology**, v. 62, p. 847-853, 2015.

KISO, M. et al. Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A vírus. **Scientific Reports**, v. 3, p. 1563 – 1571, 2013.

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

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **Food Science and Tecnology**, v. 39, p. 177-183, 2006.

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

KRASAEKOOPT, W.; KITSAWAD, K. Sensory characteristics consumer acceptance of fruit juice containing probiotics beads in Thailand. **AU Journal and Technology**, v. 14, p. 33 – 38, 2010.

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

KUBO, I. et al. Antitumor agents from the cashew (*Anacardium occidentale*) apple juice. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 41, p. 1012-1015, 1993.

KUBO, J.; LEE, J.R.; KUBO, I. Anti-Helicobacter pylori agents from the cashew apple. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 47, p. 533-537, 1999.

LAVINAS, F. C. et al. Estudo da estabilidade química e microbiológica do suco de caju in natura armazenado em diferentes condições de estocagem. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 875-883, 2006.

LECERF, J. M. Prébiotiques, flore intestinale, inflammation, obésité. **Phytothérapie**, v. 9, p. 106-112, 2011.

LEE, H. S.; COATES, G. A. Effect of thermal pasteurization on Valencia orange juice color and pigments. **Lebensmittel-Wissenschaft und-Technologie**, v. 36, p. 153 – 156, 2003.

LIMA, E. S. et al. Redução de vitamina C em suco de caju (*Anacardium occidentale* L.) industrializado e cajuína. **Química Nova**, v. 30, p. 1143-1146, 2007.

LORCA, G. L.; FONT DE VALDEZ, G. A low-pH-inductible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. **Current Microbiology**, v. 42, p. 21 – 25, 2001.

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

MAIA, G. A.; MONTEIRO, J. C. S.; GUIMARÃES, A. C. L. Estudo da estabilidade físico-química e química do suco de caju com alto teor de polpa. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p. 43-46, 2001.

MARTEAU, P. Evidence of probiotic strain specificity makes extrapolation of results impossible from a strain to another, even from the same species. **Gastroenterology and Hepatology Journals**, v. 2, p. 1–3, 2011.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different Technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

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

MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 3, p. 36-41, 2013.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. O papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v. 82, 2006.

MUSA, S.; ABU FARA, D.; BADWAN, A. A. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. **Journal of Controlled Release**, v. 57, p. 223-232, 1999.

NADARAJAH, K. et al. Production of chitosan by fungi. **International Journal of Biological Sciences**, v. 4, p. 263–265, 2001.

NUALKAEKUL, S. et al. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1281-1287, 2012.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 3, p. 111-117, 2011.

NUALKAEKUL, S.; SALMERON, I.; CHARALAMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1037-1044, 2011.

OLIVEIRA, A. F. Desenvolvimento, caracterização e aplicação de biofilmes e esferas obtidos a partir de carboximetilcelulose e alginato de sódio em processos de liberação controlada de nutrientes. Florianópolis: SC, 2009. 171 p.

OLIVEIRA, C. E. V. et al. Effects of chitosan from *Cunninghamella elegans* on virulence of post-harvest pathogenic fungi in table grapes (*Vitis labrusca* L.). **International Journal of Food Microbiology**, v. 171, p. 54-61, 2014.

OLIVEIRA, M.E.B. et al. Avaliação de parâmetros de qualidade físico-químicos de polpas congeladas de acerola, cajá e caju. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p.326-332, 1999.

ORLANDO, A. et al. Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Viable or HeatKilled *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 Gastric and DLD-1 Colon Cell Lines. **Nutrition and Cancer**, v. 64, p. 1103 – 1111, 2012.

ORTAKCI, F.; SERT, S. Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 6918-6925, 2012.

OUWEHAND, A. C. et al. Adhesion of four *Bifidobacterium* strains to human intestinal mucus from subjects in different age groups. **FEMS Microbiology Letters**, v. 172, p. 61–64, 1999.

PAULO, E. M.; ASSIS, S. A.; SANTOS, V. L. C. S. Polímeros constituídos por carboidratos utilizados no processo de microencapsulação de bactérias: uma revisão. **Sitientibus Serie Ciências Biológicas**, v. 9, p. 185-191, 2009.

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

- PINHEIRO, A. M. et al. Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. **Ciência e Tecnologia dos Alimentos**, v. 26, p. 98 – 103, 2006.
- PONCELET, D. et al. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, p. 39-45, 1992.
- RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.
- RODRIGUES, D. et al. Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p. 2748-2757, 2012.
- RUBILAR, M. et al. Polyphenolic fractions improve the oxidative stability of microencapsulated linseed oil. **European Journal of Lipid Science and Technology**, v. 114, p. 760-771, 2012.
- SAARELA, M. et al. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 171-178, 2006.
- SAARELA, M. et al. Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 106-110, 2011.
- SANCHO, S. O. et al. Alterações químicas e físico-químicas no processamento de suco de caju (*Anacardium occidentale* L.). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 878-882, 2007.
- SANG, L. et al. Live and heat-killed probiotic: effects on chronic experimental colitis induced by dextran sulfate. **International Journal of Clinical and Experimental Medicine**, v. 8, p. 20072 – 20078, 2015.
- SANTOS, J. E.; SOARES, J. P.; DOCKAL, S. E. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, v.13, p. 242-249, 2003.

SANTOS, M. C.; CIRILO, A. T. O.; NUNES, M. L. Determinação do grau de desacetilação de quitosana obtida de camarão “saburica”. **Revista Scientia Plena**, v. 7, p. 1-3, 2011.

SANTOS, T. T.; VARAVALLO, M. A. A importância de probióticos para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, v. 4, 2011. Disponível em: < <http://www.itpac.br/arquivos/Revista/41/5.pdf> >. Acesso em: 05 abril. 2014.

SCARPELLINI, E. Gut microbiota and obesity. **Internal and Emergency Medicine**, v. 5, p. 53-56, 2010.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, V. 55, p. 139–144, 2000.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, p. 279-284, 2007.

SHIGEMASA, Y.; MINAMI, S. Application of chitin and chitosan for biomaterials. **Biotechnology & genetic engineering reviews**, v. 17, p. 413-420, 1996.

SHIN, M. J. et al. Microencapsulation of imidazole curing agents by spray-drying method using W/O emulsion. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 126, p. 108-115, 2012.

SIGNINI, R.; CAMPANA FILHO, S. P. Purificação e caracterização de quitosana comercial. **Polímeros**, v. 8, p. 365-372, 1998.

SIGNINI, R.; DESBRIÈRES, J.; CAMPANA FILHO, S.P. On the stiffness of chitosan hydrochloride in acid-free aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 43, p. 351-357, 2000.

SILVA, N. et al. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 2 ed. São Paulo: Livraria Varela, 2001.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental**, v. 18, p. 66-75, 2014.

SIUTA-CRUCE, P.; GOULET, J. Improving probiotic survival rates. **Food Technology**, v. 55, p. 36-44, 2001.

SOHAIL, A. et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, p. 162-168, 2012.

SONG, H. et al. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate-chitosan microencapsulated low density cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 10-16, 2014.

SUAVE, J. et al. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v. 7, p. 12-20, 2006.

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

TACO – **Tabela brasileira de composição de alimentos** / NEPA – UNICAMP. 4.ed. ver. E ampl. Campinas: NEPA – UNICAMP, 2011. 161p.

TRABELSI, I. et al. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, p. 36-42, 2013.

URBANO, A. P. A. **Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo modelo de emulsificação/gelificação interna: A albumina como fármaco modelo**. Coimbra: US, 2008. 148 p.

VAN DE GUCHTE, M. et al. Stressresponses in lactic acid bacteria. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 187 – 216, 2002.

VÁSQUEZ, M. et al. Sensory evaluation of textured sunflower/soy protein. **Journal of Food Science**, v. 44, p. 1717-1719, 2006.

VERGARA, C. M. A. C. et al. Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. **Food Science and Technology**, v. 43, p. 141-145, 2010.

VINDEROLA, C. G. et al. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and nonprobiotic microflora in Argentinean fresxo cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 1905-1911, 2000.

YING, D.Y. et al. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 98-105, 2013.

ZHAO, M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686: Correlation between bacteria survivability and physical properties of microcapsules. **Food Biophysics**, v. 10, p. 292-299, 2015.

ZHOU, Y. et al. Spectrophotometric quantification of lactic bacteria in alginate and control of cell release with chitosan coating. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 342-348, 1998.

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

APÊNDICES

APÊNDICE A - Termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Convidamos o(a) Sr.(a) para participar, como voluntário (a), da pesquisa que tem como título **“Produção de bebidas funcionais de suco de caju com *Lactobacillus casei* livre e microencapsulados com alginato de cálcio-quitosana”**, que está sob a responsabilidade da pesquisadora Bruna Lúcia de Mendonça Soares (Rua Emiliano Braga, 635 – Várzea – Recife – Pe, Telefone: 986818721, e-mail: bruna-luc@hotmail.com), sob a orientação da Prof. Dra. Tânia Lucia Montenegro Stamford (E-mail: tlmstamford@yahoo.com.br) e co-orientação da Prof. Dra. Thatiana Stamford-Arnaud (E-mail: thatianaarnaud@hotmail.com).

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

Informações sobre a pesquisa:

- Esta pesquisa tem como objetivo microencapsular o probiótico *Lactobacillus casei* e adicionar no suco de caju, para verificar se a célula quando encapsulada possui maior sobrevivência tanto em relação ao tempo de armazenamento quanto às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Através dos dados da análise sensorial, poderá ser avaliada a aceitação desta nova bebida e a intenção de compra, caso ela seja comercializada.
- O voluntário será submetido a análise sensorial de três amostras: Suco de caju controle, suco de caju com células livres e suco de caju com probiótico microencapsulado. As amostras serão provadas individualmente, e entre as mesmas, o participante receberá água filtrada para lavagem da cavidade oral e neutralização do paladar.
- Os possíveis riscos podem estar associados ao caso de alergia a algum dos componentes das amostras (Caju). Entretanto lhe serão garantidos todos os cuidados necessários à sua participação de acordo com seus direitos individuais e respeito ao seu bem-estar físico e psicológico.
- Benefícios da realização da pesquisa: conhecer a aceitabilidade das bebidas funcionais adicionadas de *Lactobacillus* livre e microencapsulados; facilitar a inserção de um produto novo com propriedades funcionais no mercado; analisar qual das formulações do produto será mais bem aceita; verificar se o consumidor teria interesse em adquirir o produto através dos resultados obtidos na ficha de intenção de compra.
- As informações desta pesquisa são confidenciais e serão divulgadas apenas em eventos ou publicações científicas, sem identificação dos voluntários, sendo assegurado

o sigilo sobre a sua participação. Os dados coletados nesta pesquisa na forma de questionário, ficarão armazenados em computador pessoal, sob a responsabilidade da pesquisadora.

Em caso de dúvidas relacionadas aos aspectos éticos deste estudo, você poderá consultar o Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da UFPE no endereço: Avenida da Engenharia s/n – 1º Andar, sala 4 - Cidade Universitária, Recife-PE). Tel.: (81) 2126.8588 – e-mail: cepccs@ufpe.br.

(Assinatura do pesquisador)

CONSENTIMENTO DA PARTICIPAÇÃO DA PESSOA COMO SUJEITO

Eu, _____, CPF _____, abaixo assinado, após a leitura deste documento e ter tido a oportunidade de conversar e ter esclarecido as minhas dúvidas com o pesquisador responsável, concordo em participar do estudo **“Produção de bebidas funcionais de suco de caju com *Lactobacillus casei* livre e microencapsulados com alginato de cálcio-quitosana”**, como voluntário (a). Fui devidamente informado (a) e esclarecido (a) pela pesquisadora sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi-me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Recife, ____/____/ 2015

Assinatura do participante:

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

APÊNDICE B - Ficha de análise sensorial

Nome: _____ Idade: _____

E-mail: _____ Data: ____/12/2015

1) TESTE DE ACEITABILIDADE

Você está recebendo três amostras codificadas de suco de caju. Por favor, prove a amostra e avalie as bebidas servidas quanto a aparência, aroma, sabor, textura e impressão global e indiquem, de acordo com a escala abaixo, o quanto você gostou ou desgostou do produto:

	Amostra: _____	Amostra: _____	Amostra: _____
(9) Gostei Extremamente			
(8) Gostei Muito			
(7) Gostei Moderadamente	Aparência ()	Aparência ()	Aparência ()
(6) Gostei Ligeiramente	Aroma ()	Aroma ()	Aroma ()
(5) Indiferente	Sabor ()	Sabor ()	Sabor ()
(4) Desgostei Ligeiramente	Textura ()	Textura ()	Textura ()
(3) Desgostei Moderadamente	Impressão Global ()	Impressão Global ()	Impressão Global ()
(2) Desgostei Muito			
(3) Desgostei Extremamente			

2) FICHA DE INTENÇÃO DE COMPRA

Você recebeu três amostras codificadas de suco de caju. Por favor, avalie também segundo a sua intenção de compra caso você encontrasse estas bebidas para comercialização: (utilize a escala abaixo de 5 pontos)

	Amostra: _____ ()	Amostra: _____ ()	Amostra: _____ ()
(5) Certamente Compraria			
(4) Provavelmente Compraria			
(3) Tenho dúvidas se compraria			
(2) Provavelmente não compraria			
(1) Certamente não compraria			

3) AVALIAÇÃO DA PREFERÊNCIA

Qual a amostra que você mais gostou? _____ Porque? _____

Qual a amostra que você menos gostou? _____ Porque? _____

OU () Não observei nenhuma diferença entre as amostras

APÊNDICE C – Artigo de Revisão

Título: Probióticos microencapsulados em bebidas à base de frutas: Avanços e Perspectivas

Bruna Lúcia de Mendonça Soares, Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud, Thayza Christina Montenegro Stamford, Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Resumo

Background: Nas últimas décadas, a tecnologia de microencapsulação tem sido aplicada na área de imobilização de células probióticas, com o objetivo de aumentar a viabilidade destes microrganismos frente a condições adversas do alimento e do trato gastrointestinal. Diante do crescente interesse da população pela melhor alimentação e saúde, estudos envolvendo o desenvolvimento de novos alimentos funcionais ganhou muita importância. De acordo com esta perspectiva, probióticos vem sendo incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, incluindo bebidas à base de frutas.

Scopes and approach: Foram coletados dados da literatura no que concerne ao uso de probióticos microencapsulados adicionados a bebidas à base de frutas, com o objetivo de revisar sobre a viabilidade das células probióticas durante a estocagem, bem como, abordar sobre as características físico-químicas e sensoriais das bebidas.

Key findings and conclusions: Estudos envolvendo bebidas de fruta com probióticos encapsulados tem mostrado resultados satisfatórios quanto a manutenção do número de células viáveis durante armazenamento. Em adição, a incorporação dos microrganismos aprisionados as bebidas reduzem a atividade metabólica das células, o que é refletido na manutenção das características físico-químicas. São necessárias mais pesquisas acerca da qualidade sensorial das bebidas adicionadas de cápsulas de probióticos, além do aperfeiçoamento das técnicas para escala industrial, reduzindo diâmetro das esferas, adequando custos e a segurança ambiental. Bebidas à base de frutas com probióticos microencapsulados podem ser a próxima categoria de alimentos a comandar o mercado.

Keywords: Funcional Food. Fruit juice. Encapsulation. Probiotic viability. Non-dairy beverage.

1. Introdução

Probiótico que significa “para vida” pode ser tecnicamente definido como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002). Os probióticos mais comumente utilizados em alimentos são os pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, contudo *Enterococcus* e *Pediococcus* também tem sido utilizados (Weinbreck, Bodnar, & Marco, 2010), assim como, outros microorganismos, como leveduras do gênero *Saccharomyces* (Jenebian, Pedersen, & Jespersen, 2010).

O conhecimento da microbiota intestinal e suas interações levaram ao desenvolvimento de estratégias alimentares, objetivando a manutenção e o estímulo ao crescimento das bactérias benéficas no colón. É possível aumentar o número de microrganismos promotores da saúde no trato gastrointestinal, através da ingestão de probióticos pela alimentação (Buriti & Saad, 2007; Soccol et al., 2010; Santos & Varavallo, 2011). Diante disto, têm-se observado um crescente aumento no mercado mundial envolvendo alimentos probióticos, que representa cerca de 65% do mercado global de alimentos funcionais, movimentando aproximadamente 62 bilhões US dólares no ano de 2014 (Global Industry Analysis, 2014; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Tripathy & Giri, 2014).

A implantação e sobrevivência desses microrganismos quando administrados como probióticos vai depender do tipo de dieta consumida pelo hospedeiro, a qual pode promover ou não sua proliferação. Por este motivo, é recomendado que o consumo de probióticos esteja associado a uma alimentação equilibrada e a hábitos de vida saudáveis, e, para garantir um efeito contínuo no organismo humano, os probióticos devem ser ingeridos diariamente (Cook, Tzortzi, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; FAO/WHO, 2002).

Probióticos são incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente em derivados lácteos como leite (García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2015), sorvete (Champagne, Raymond, Guertin, & Bélanger, 2015), iogurte (Salminen, Kneifel, & Ouwehand, 2016), queijo (Bakr, 2015), mas também em leite de soja (Cheng, Tsai, Chiu, Pan, & Tsai, 2013), maionese (Fahimdanesh et al., 2012), produtos cárneos (Cavalheiro et al., 2015), bebidas à base de frutas e vegetais

(Gawkowsky & Chikindas, 2013), comidas para bebês (Kent & Doherty, 2014), Bread products (Soukoulis et al., 2014).

Os mecanismos de ação por meio dos quais os probióticos previnem ou tratam patologias e promovem a homeostase estão relacionados principalmente ao processo de exclusão competitiva que inclui a secreção de substâncias antimicrobianas (Prince, Kneifel, & Ouwehand, 2012), competitividade para aderência na mucosa do intestino (Nishiyama et al., 2015), fortalecimento da barreira no epitélio intestinal, além da modulação do sistema imunológico (Bermudez-Brito, Plaza-Díaz, Munoz-Quezada, Gomez-Llrente, & Gil, 2012).

Os benefícios que podem ser exercidos pelos probióticos incluem sua capacidade em prevenir e tratar infecções intestinais (Kato et al., 2004), aumentar a utilização da lactose em pessoas intolerantes (He et al., 2008), atuar no controle dos níveis de colesterol sérico (Rajkumar et al., 2015), na redução da pressão sanguínea em hipertensos (Ejathed et al., 2012) e na prevenção de alergias (Cuello-Garcia et al., 2015), além de possuir atividade anticarcinogênica (Strizker et al., 2007).

A fim de promover estes efeitos benéficos à saúde, a dose mínima eficaz é de 10^8 – 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC) por dia (Anvisa, 2002; Champagne, Gardner, & Roy, 2005; Kailasapathy & Chin, 2000), e a concentração mínima de microrganismos vivos não pode ser menor que 10^7 UFC/g do alimento no momento do consumo (FAO/WHO, 2002). No entanto, diversos fatores podem afetar a sobrevivência desses microrganismos quando adicionados em alimentos, como: acidez (Donkor et al., 2006), presença de peróxido de hidrogênio (Fonteles et al., 2011), concentração de oxigênio dissolvido (Castro et al., 2013), temperatura de armazenamento (Tripathy & Giri, 2014), interação com outros microrganismos contidos no produto (Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014), concentração de ácido lático e acético (Costa et al., 2013) e a concentração de proteínas (Pereira et al., 2011).

Diversos procedimentos têm sido realizados para aumentar a resistência desses microrganismos contra condições adversas, dentre elas, a seleção correta em presença de ácido estomacal, cepas resistentes à bile, adaptação ao estresse, incorporação de peptídeos e aminoácidos e a microencapsulação (Cook, Tzortzi, Charalampopoulos, &

Khutoryanskiy, 2012; Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011; Bringas-Latigua, Valdes, & Pino, 2012).

O processo de microencapsulação tem sido aplicado em diferentes áreas, incluindo a farmacêutica, agrícola, terapêutica e alimentícia (Rubilar et al., 2012; Shin, Kim, & Shin, 2012). Na indústria de alimentos, esta ferramenta apresenta diversas aplicações, podendo ser utilizada para proteger o material encapsulado do ambiente externo, evitando sua degradação; para liberação controlada do material ativo; para controlar reações oxidativas; mascarar sabor, cor ou odor desagradável; isolar componentes que reagem com outros dentro da matriz do alimento; prolongar a vida útil e proteger o valor nutricional (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011; Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013). A microencapsulação de probióticos se baseia na imobilização das células, pelo confinamento físico, em espaço determinado, visando a preservação da sua viabilidade (De Castro-Cislaghi, Silva, Fritzen-Freire, Lorenz, & Sant'Anna, 2012).

O objetivo desta revisão foi fornecer uma visão geral sobre as aplicações de probióticos em bebidas à base de frutas, com foco no método de microencapsulação e sua eficácia refletida na viabilidade das células probióticas durante a estocagem, bem como, abordar sobre as características físico-químicas e sensoriais destas bebidas funcionais.

2. Bebidas à base de frutas como fonte de probióticos

O interesse crescente por alimentos funcionais leva a necessidade da versatilidade destes produtos que trazem benefícios à saúde (De Prisco & Mauriello, 2016). Alimentos não lácteos como sucos de fruta, podem representar, também, uma forma de veículo desses microrganismos, tais bebidas são consideradas saudáveis e são consumidas em larga escala pela população global, além de ser uma opção para intolerantes a lactose, alérgicos a proteína do leite e hipercolesterolêmicos (Kingwatee et al., 2015; Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011).

A sobrevivência de diferentes cepas probióticas, tanto na forma de células livres como encapsuladas, tem sido estudada em sucos de fruta como laranja, maçã, abacaxi, uva, pera, lichia, romã, limão, cranberry, acerola, framboesa, amora, melão, maoberry, pêssego, morango e caju (Anakella & Orsat, 2013; Antunes et al., 2013; Chaikham, 2015; Ding & Shah, 2008; García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2015; Kingwatee

et al., 2015; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Nualkaekul, Salmeiron, & Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2012; Pereira, Maciel, & Rodrigues, 2011; Rodrigues et al., 2012; Sohail, Turner, Coombes, Bostrom, & Bhandari, 2012; Vergara, Honorato, Maia, & Rogrigues, 2010; Ying et al., 2013).

Embora exista menos informações sobre a sobrevivência de probióticos em sucos de fruta, quando comparados aos produtos lácteos, os fatores mais prováveis são a espécie ou cepa utilizada, o método de preparação das culturas, a composição do produto, o tempo e temperatura de estocagem, os níveis de oxigênio e o tipo de embalagem (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011).

As vantagens da adição de probióticos em sucos de fruta, incluem o fato dessas bebidas serem ricas em nutrientes, conter altas quantidades de açúcares, que contribuem para maior sobrevivência dos probióticos durante estocagem e não possuir cultura iniciadora que competem com os probióticos pelos nutrientes (Antunes et al., 2013; Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011). Tradicionalmente, frutas e seus subprodutos são considerados seguros microbiologicamente devido ao pH baixo e estocagem em temperaturas de refrigeração, ambos os fatores atuam como barreira para o crescimento e sobrevivência de patógenos (Simforiam; Nonga, & Ndabikunze, 2015).

Além disso, essas bebidas contêm naturalmente ou são suplementados com eliminadores de oxigênio, a exemplo do ácido ascórbico, que atua capturando o oxigênio presente no meio, através de reações químicas estáveis tornando-o, conseqüentemente, indisponível, o que promove condições anaeróbicas (Ding & Shah, 2008).

Apesar das facilidades citadas, a adição de probióticos em sucos de fruta apresenta algumas dificuldades, que incluem o baixo pH destas bebidas, tipicamente em torno de 2.5 e 4.0, o que torna essencial a utilização de espécies de microrganismos que permaneçam viáveis, apesar do ambiente hostil; as quantidades insuficientes de peptídeos e aminoácidos livres necessários para os probióticos; e, em adição, estudos mostram que a tolerância ao ácido e a bile é melhor em células adicionadas a produtos lácteos, quando comparadas as introduzidas em sucos (Antunes et al., 2013; Champagne & Gardner, 2008; Saarela et al., 2011; Sheehan, Rozz, & Fitzgerald, 2007).

Com o objetivo de manter a viabilidade dos microorganismos durante os estágios de preparação, estocagem, distribuição e consumo dos produtos alimentícios foram desenvolvidas técnicas, sendo a microencapsulação bastante estudada e aperfeiçoada como método eficaz para proteger células probióticas adicionadas em alimentos (Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015).

3. Microencapsulação

A microencapsulação pode ser definida como tecnologia que permite recobrir materiais sólidos, líquidos ou gasosos, formando cápsulas em miniatura que podem liberar seu conteúdo em taxas controladas ou sob condições específicas (Anal & Singh, 2007). As microcápsulas são estruturas semipermeáveis, esféricas e com uma membrana resistente, com diâmetro que varia de 1 – 1000 micrômetros (Anal & Singh, 2007; Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015). O material que fica contido no interior da cápsula é denominado ingrediente ativo, enquanto que a substância externa é o agente encapsulante (Menezes et al., 2013).

Com base nas propriedades de liberação controlada, o ingrediente ativo pode ser liberto em áreas específicas do organismo dependendo de mecanismos de acionamento, como por exemplo, mudanças de pH, estresse mecânico, temperatura, atividade enzimática, tempo e força osmótica (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011; Champagne, Ross, Saarela, Hansen, & Charalampopoulos, 2011).

O desenvolvimento de uma barreira física ao redor de células probióticas, adicionadas a alimentos, tem sido uma abordagem cada vez mais estudada nos últimos anos. A tecnologia da microencapsulação é explorada em vários estudos como alternativa promissora para introdução de microrganismos benéficos vivos em diferentes produtos alimentícios, proporcionando maior viabilidade e funcionalidade destes (Champagne, Raynond, Guertin, & Belanger, 2015; De Prisco, Maresca, Ongeng, & Mauriello, 2015; García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2015; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Sanchez, Ruiz, Guidemond, Ruas-Madiedo, & Morgolles, 2012; Ortakci & Sert, 2012).

O confinamento de células microbianas em microesferas proporciona um obstáculo entre os probióticos e as condições ambientais severas, protege contra danos mecânicos, mantém relativo crescimento e atividade metabólica do microrganismo por um maior

período de tempo (Guimarães, Vendramini, Santos, Leite, & Miguel, 2013; Song, Yu, Liu, & Ma, 2014; Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013).

Vários polímeros são utilizados como matriz encapsulante, como o alginato, carragena, gelatina, carboximetilcelulose, maltodextrina, pectina, amido, goma xantana, goma gelana, goma acácia, e proteína do soro do leite. A seleção do material encapsulante depende de vários fatores, entre eles: a não reatividade com o material a ser encapsulado, a resistência frente ao material do meio externo, a técnica utilizada para a formação da microcápsula, o procedimento de liberação do ingrediente, suas propriedades reológicas e a viabilidade econômica. (Chávarri et al., 2010; Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003; Siuta-Cruce & Goulet, 2001; Shah & Ravula, 2000; Song, Yu, Liu, & Ma, 2014).

Várias técnicas de encapsulamento têm sido desenvolvidas, destinadas a produção de microcápsulas contendo probióticos, sendo os métodos mais estudados: extrusão, emulsão/Gelatinização interna ou externa e spray drying (Cook, Tzortzi, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Trabelsi et al., 2013).

Na técnica de extrusão, a mistura do material encapsulante com as células probióticas é forçada a passar por um orifício, formando-se gotas, geralmente são utilizadas seringas e agulhas. Estas gotas caem dentro de uma solução gelificante de cloreto de cálcio, formando as cápsulas (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011). Este método é extensivamente estudado, devido a facilidade de preparação e, pelo fato, de poder encapsular qualquer substância. Em contrapartida, apresenta como desvantagens a formação de esferas grandes, variando de 1 a 3 mm e a dificuldade de ampliação para escala industrial (Choinska-Oulit, Mitula, Sliwka, Laba, & Skaradzinska, 2015).

A emulsão envolve a dispersão da suspensão polímero - células microbianas (fase aquosa) em óleo vegetal (fase oleosa). A mistura é homogeneizada até formar uma emulsão água-óleo, com o auxílio de um surfactante e agitação (Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013). A gelificação refere-se ao tipo de solidificação da micropartícula, de acordo com a fonte do agente solidificante, ou seja, se vem de fora ou se já se encontra disperso na solução polimérica juntamente com o ingrediente ativo (probióticos), a gelificação pode ser chamada de externa ou interna (Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2003). Esta técnica pode ser facilmente ampliada para escala industrial, apresenta alta taxa de sobrevivência das células bacterianas, forma cápsulas de pequeno diâmetro, mas como

desvantagem as esferas apresentam grande variabilidade no tamanho e na forma. Além disto, utilizam óleos vegetais no processo o que aumenta os custos e os riscos para natureza, caso não haja cuidados adequados (Kailasapathy, 2009; Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2006).

A técnica de spray drying, também utilizada para encapsular probióticos, envolve um processo de dispersão e homogeneização do material de revestimento, seguida da atomização da mistura em uma câmara de secagem para evaporação do solvente. Possui como vantagens o baixo custo e a facilidade de produção em grande escala. A grande desvantagem desta técnica é a utilização de altas temperaturas o que implica em grandes perdas na viabilidade das células probióticas (Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015; Menezes et al., 2013).

4. Avanços relacionados a adição de células probióticas microencapsuladas em bebidas à base de fruta

O grande desafio na formulação de bebidas vegetais com probióticos encontra-se na dificuldade de agregar a funcionalidade à manutenção do sabor, culturalmente reconhecido como agradável, dos sucos de fruta, porque a fermentação induzida pelos microorganismos probióticos, tende a modificar em demasia as características organolépticas do suco (Yoon, Woodams, & Hang, 2006). Desse modo, a utilização de probióticos encapsulados na composição de sucos de frutas, em substituição as células-livres, evita a fermentação e garante maior preservação das características sensoriais do produto (Rodrigues et al., 2012).

De Prisco e Mauriello (2016) identificaram a distribuição percentual da aplicação de microcápsulas probióticas em diversas categorias de alimentos e verificaram que 49% das publicações científicas envolvem derivados lácteos, seguido de produtos à base de frutas e vegetais com 28%, produtos cárneos abrangendo 13% e panificação com um total de 10%.

Diante do exposto, têm-se observado, nos últimos anos, um aumento significativo de estudos científicos envolvendo a adição de células probióticas aprisionadas por diferentes processos de microencapsulação, assim como, materiais encapsulados, em bebidas não lácteas, obtidas a partir de variadas frutas, como simplificado na Tabela 1.

4.1. Viabilidade dos probióticos microencapsulados adicionados em bebidas de frutas durante estocagem

A tecnologia da microencapsulação pode aumentar a sobrevivência dos probióticos em alimentos funcionais, a exemplo de sucos de fruta, uma vez que, as microcápsulas podem proporcionar um ambiente mais anaeróbico para as bactérias, além de formar uma barreira física contra as condições desfavoráveis, como o baixo pH da bebida, contribuindo, desta forma, para redução das injúrias celulares, tanto durante o armazenamento quanto na passagem pelo trato gastrointestinal (Antunes et al., 2013; DING; SHAH, 2008). De acordo com Weinbreck, Bodnár and Marco (2010), o processo de encapsulação mantém a viabilidade dos microrganismos em detrimento da baixa atividade de água e da reduzida exposição ao oxigênio no interior das esferas.

O efeito protetor da encapsulação, frente as condições adversas das bebidas à base de frutas, tem sido comprovado por pesquisas recentes. Rodrigues et al. (2012) observaram que a viabilidade de *L. paracasei* L26 encapsulado por extrusão, e adicionados em sucos de laranja e pêssago, foi muito boa, não sendo observadas diminuições após 50 dias de estocagem. Estes autores identificaram, nos primeiros 20 dias do armazenamento refrigerado, aumento no número de células viáveis no suco de laranja, concluindo a partir destes resultados, que a composição das microcápsulas (alginato/quitosana), bem como, o tipo de suco foram os fatores determinantes para sobrevivência do *L. paracasei*.

Reduções na viabilidade de probióticos encapsulados também não foram observadas por Antunes et al. (2013), que afirmam que a encapsulação do probiótico se mostrou eficiente para manter a viabilidade da cultura de *B. animalis* em nectar de acerola, apresentando uma vida de prateleira de 30 dias com respeito as alegações funcionais, uma vez que as contagens se mantiveram acima de 8 log UFC por porção de 200 mL.

García-Ceja, Mani-López, Palou e López-Malo (2015) também encontraram resultados favoráveis em relação a viabilidade de Lactobacilos mesmo sob as condições ácidas de néctar de pêssago (pH 3,23), indicando que esta bebida pode ser considerada como uma alternativa para incorporar *Lactobacillus* encapsulados. Vale ressaltar que, esses autores encontraram maior manutenção da viabilidade nas cápsulas de alginato revestidas com quitosana. As esferas de alginato de cálcio, sem revestimento, apresentam

naturalmente poros, o que permite rápida difusão de líquidos para o interior das cápsulas, afetando sua estabilidade.

Ainda no que se refere a importância do revestimento das esferas para garantir maior sobrevivência das cepas probióticas adicionadas em bebidas de frutas, Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, and Charalampopoulos (2012), notaram que a viabilidade foi preservada apenas no suco de romã contendo cápsulas de alginato revestidas com quitosana. As cápsulas sem esta segunda camada protetora, apresentaram constante queda na contagem provavelmente devido ao pH baixo do suco (pH 3,2) e aos altos conteúdos de compostos fenólicos. O que mostra o importante papel protetor da quitosana quando utilizada para revestir as esferas de alginato.

Uma abordagem recentemente estudada é a co-encapsulação dos probióticos com fibras prebióticas e a influência desta na viabilidade dos microrganismos. Krasaekoopt and Watcharapoka (2014), perceberam que a sobrevivência de *Lactobacillus* encapsulados em suco de laranja, foi muito maior quando as células foram co-encapsuladas com galactoligossacarídeos (GOS), indicando que a adição de prebióticos no processo de encapsulação pode promover adicional proteção as células frente as severas condições do suco de laranja.

Estudos tem mostrado que somente probióticos microencapsulados são capazes de manter a viabilidade elevada em sucos de frutas ácidas (Adhikari, Mustapha, Grun, & Fernando, 2000; Ding & Shah, 2008; Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, & Charalampopoulos, 2012; Saarela, Virkajarvi, Nohynek, Vaari, & Matto, 2006). A vistas disto, Ding and Shah (2008) verificou que o processo de encapsulação protegeu o probiótico do ambiente ácido de suco de laranja e maçã, mantendo a viabilidade durante estocagem por 6 semanas a 5°C. Este estudo comparou a sobrevivência das células livres e microencapsuladas e percebeu que as cepas livres perderam rapidamente a viabilidade, indicando que suco de laranja e maçã são muito ácidos para o crescimento de probióticos não encapsulados.

Uma maior redução na sobrevivência foi observada por Chaikham (2015), que verificou diminuição média de 5,9 log UFC por mL dos sucos de mulberry e maoberry armazenados por 4 semanas a 4°C. Maiores taxas de sobrevivência foram observadas nos

sucos de Longan e Melão, que mostraram reduções médias de 3,4 log UFC por mL, provavelmente devido ao pH destas bebidas, em torno de 7,10 e 6,8, respectivamente.

Sohail, Turner, Coombes, Bostom, & Bhandari (2012) indicam que a viabilidade do probiótico em sucos é dependente da espécie do microrganismo. Estes autores perceberam que tanto as células livres quanto as encapsuladas de *L. rhamnosus* exibiram o mesmo padrão de sobrevivência no suco de laranja armazenado por 35 dias a 4°C. As microcápsulas de alginato produzidas por este estudo não eram revestidas, o que, segundo os autores, poderia ter protegido mais significativamente os probióticos.

Vale ressaltar que, segundo Nualkaekul, Cook, Khutoryansky, & Charalampopoulos (2013), a seleção e combinação correta do polímero destinado a encapsulação e ao revestimento é muito importante para garantir a sobrevivência do probiótico e as propriedades físicas das cápsulas. Diante disso, foi observado que cápsulas de alginato e pectina revestidas com quitosana ou gelatina aumentam a sobrevivência de *L. plantarum* e *B. longum* em suco de romã e cranberry por 6 semanas sob refrigeração, quando comparados com células livres.

O método spray drying utiliza altas temperaturas durante o processo de encapsulação, o que acarreta a morte das células. Portanto, estudos tem sido realizados a fim de otimizar o processo e aumentar a viabilidade das cepas encapsuladas. Conforme Anekella and Orsat (2013), os efeitos prejudiciais proporcionados pelas altas temperaturas podem ser contornados pelo choque térmico subletal e pelo aumento da concentração do material de encapsulamento que elevam a sobrevivência das bactérias. Kingwatee et al. (2015) verificaram que a melhor temperatura de spray drying com *L. casei* 01 em suco de lichia é em torno de 80°C, formando um produto com satisfatório número de células viáveis. Perceberam também que a maior taxa de sobrevivência foi observada quando o material de encapsulamento foi composto por 15% maltodextrina e 5% de inulina.

4.2. Características físico-químicas e sensoriais das bebidas à base de frutas adicionadas de probióticos encapsulados

Com relação as possíveis alterações das características físico-químicas dos sucos de fruta, quando adicionados de células bacterianas microencapsuladas, estudos tem demonstrado que a encapsulação do probiótico pode resultar em alimentos mais estáveis

durante a vida de prateleira (Ding & Shah, 2008; Iyer & Kailasapathy, 2005; Saarela, Virkajarvi, Nohynek, Vaari, & Matto, 2006).

Estudo conduzido por Ding and Shah (2008), não observou variações de pH e °Brix e apenas discretas variações no conteúdo de ácido málico, nos sucos de laranja e maçã, durante 6 semanas de estocagem. Este resultado demonstra que as microcápsulas, contendo probióticos, podem ampliar a validade dos produtos a qual são adicionadas, pela manutenção das características físico-químicas (Ding & Shah, 2008). Ratificando estas evidências, Sohail, Turner, Coombes, Bostom, & Bhandari (2012) observaram que a encapsulação diminuiu significativamente a acidificação de suco de laranja, em comparação com as células livres.

O revestimento de microcápsulas forma uma segunda barreira protetora entre as bactérias aprisionadas e o meio externo, o que provavelmente limita a difusão de açúcares para o interior das esferas, impedindo a ação fermentativa por estes microrganismos (Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013). Rodrigues et al., 2012 observaram uma menor variação de pH nas bebidas com cápsulas revestidas com quitosana, as esferas sem revestimento não inativaram metabolicamente as células probióticas, uma vez que, foi observada significativa variação de pH, indicando que os açúcares da bebida foram fermentados.

Antunes et al. (2013) identificaram que a adição de microcápsulas a néctar de acerola aumentou o pH da bebida, quando comparado ao suco controle (sem probióticos), este fato foi relacionado ao material de encapsulação e revestimento das esferas. Situação também relatada por Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiy, and Charalampopoulos (2012) que atribuíram o fato ao revestimento com quitosana, devido a sua solubilidade em ácidos orgânicos, tal como o cítrico. Em contraste a estes achados, Sohail, Turner, Coombes, Bostom, & Bhandari (2012) relatam que não é esperado alterações nas características de sucos, como o tamponamento, pela adição de apenas 10% de cápsulas.

Dados da literatura são escassos no que diz respeito as análises sensoriais de bebidas de frutas adicionadas de probióticos encapsulados, dispondo de apenas dois estudos. Krasaekoopt and Kitsawad (2010), avaliaram as características sensoriais e a aceitabilidade a partir da opinião de 400 provadores em Bangkok, Tailândia. Os resultados mostraram que a adição de cápsulas de probióticos (0,1 – 0,2 mm) influenciou

a qualidade sensorial das bebidas, pela presença de partículas dispersas e por causar dificuldade de deglutição. Apesar disto, mais de 80% dos julgadores aceitaram as bebidas, dando scores para textura e preferência global de 6.6 e 6.7 para suco de laranja; e 6.8 e 6.9 para suco de uva. Em adição, mais de 86% dos participantes mostram-se dispostos a adquirir o produto, devido as propriedades relacionadas a saúde, refletindo a existência de um mercado potencial para sucos de frutas contendo probióticos.

García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-Malo (2015), recrutaram 20 provadores para avaliar flavor, textura e aparência global de nectar de pêsego adicionados de microcápsulas (diâmetro médio 2,08 mm). Os julgadores imediatamente perceberam as cápsulas de alginato, contudo, flavor e aparência global não foram afetados pela adição das esferas a bebida. Além disso, concordando com o estudo citado anteriormente, os provadores referiram que poderiam optar por beber o néctar de pêsego e que a baixa pontuação foi principalmente decorrente da nova sensação de textura experimentada.

A técnica de microencapsulação não somente aumenta a sobrevivência de probióticos em sucos de frutas, mas também melhora o off-flavor dos produtos. Contudo, a adição de microcápsulas pode afetar a aceitabilidade do alimento devido ao tamanho das esferas que resultam na alteração de atributos sensoriais, como a textura.

5. Perspectivas futuras envolvendo probióticos encapsulados em bebidas a base de frutas

A grande maioria dos alimentos probióticos, incluindo bebidas, disponíveis no mercado, são adicionados de microrganismos na forma de células livres, entretanto, nos últimos anos, alimentos contendo células encapsuladas tem sido progressivamente introduzidos no mercado (Prisco & Mauriello, 2016).

Um suco patenteado, desenvolvido pela University of Queensland, chamado Perkii®, contém probióticos vivos encapsulados em grânulos naturais minúsculos identificados como microgéis. Estes microgéis, segundo os fabricantes, mantem os microrganismos vivos na bebida e os protege da acidez estomacal, proporcionando maior benefício para a saúde dos consumidores (www.perkii.com).

O primeiro suco de laranja “Dawn” probiótico tem sido desenvolvido pelo grupo Kerry em Ireland. De acordo com a companhia, as células probióticas terão sua

viabilidade mantidas durante a vida de prateleira pelo uso de probióticos microencapsulados, que irão proporcionar melhores condições de sobrevivência frente as adversidades encontradas no suco (www.chr-hansen.com).

Segundo o global industry analysis, o mercado mundial envolvendo probióticos está em forte crescimento, com previsão de ultrapassar cerca de 96 bilhões US dólares em 2020 (Global Industry Analysis, 2014). A indústria de sucos em particular tem sido considerada uma nova classe de alimentos para distribuição de probióticos por meio da alimentação, é esperado um aumento significativo desta categoria nos anos futuros, caracterizando uma segunda geração de produtos probióticos (Bakr, 2015; Prado, Parada, Pandey, & Soccol, 2008).

A tecnologia da microencapsulação tem sido explorada pelas companhias como um direcionamento para aumentar a sobrevivência de células probióticas em produtos alimentícios onde usualmente não teriam significante viabilidade (De Prisco & Mauriello, 2016).

Um importante desafio na encapsulação de probióticos é a redução do diâmetro das partículas, para que não altere as características sensoriais, mais especificamente a textura, das bebidas. Além disso, a avaliação com consumidores não tem sido realizada pela maioria dos estudos, ficando uma lacuna no que se refere a aceitação destas bebidas. Outra questão é o aprimoramento das tecnologias para escala industrial com custo adequado e responsabilidade ecológica.

As perspectivas futuras apontam para um caminho ascendente, uma vez que, os benefícios a saúde associados aos probióticos são bem documentados, a dose recomendada de ingestão já está definida, técnicas capazes de ampliar a sobrevivência das células foram descobertas e continuam sendo amplamente estudadas, a demanda de consumidores é crescente e o mercado envolvendo probióticos é bilionário, com boas expectativas de aumento de crescimento. No que se refere a abordagem das bebidas probióticas a base de frutas, a expectativa também é positiva, visto que, por não conter lactose, colesterol, compostos alergênicos lácteos, podem atender distintos grupos de pessoas, inclusive aquelas apenas preocupadas com a saúde.

Referências

- Adhikari, K., Mustapha, A., Grun, I. U., & Fernando, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yoghurt during refrigerated storage. *Journal of Dairy Science*, 83, 1946- 1951.
- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *LWT - Food Science and Technology*, 18, 240-251.
- Anekella, K., & OrsatV. (2013). Otimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 17 – 24.
- Antunes, A. E. C., Liserre, A. M., Coelho, A. L. A., Menezes, C. R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K. et al. (2013). Acerola nectar with added microencapsulation probiotic. *Food Science and Technology*, 54, 125-131.
- Anvisa, Brazilian Agency of Sanitary surveillance. (2002). Food with health claims, new food/ingredientes, bioatie compounds and probiotics. http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.html [Online].
- Bakr, S. A. (2015). The potencial applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 423-431.
- Bermudez-Brito, M., Plaza-Díaz, J., Munoz-Quezada, S., Gómez-Lliorente, C., & Gil, A. (2012). Probiotic mechanisms of action. *Annals of Nutrition & Metabolism*, 61, 160 – 174.
- Bringas-Lantigua, M., Valdés, D., & Pino, J. (2012). Influence of spray-dryer air temperatures on encapsulated lime essential oil. *International Journal of Food Science and Technology*, 47, 1511 – 1517.
- Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., & Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104, 467 – 483.

- Buriti, F. C. A., & Saad, S. M. I. (2007). Bacteria *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotics in foods and their importance paragraph to human health. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57, 373- 380.
- Castro, W. F., Cruz, A. G., Bisinotto, M. S., Guerreiro, L. M. R., Faria, J. A. F., Bolini, H. M. A. et al. (2013). Development of probiotic dairy beverages: Rheological properties and application of mathematical models in sensory avaliation. *Journal of Dairy Science*, 96, 16 – 25.
- Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. (2015). Application of probiotic delivery systems in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 120 – 131.
- Chaikham, P., Srivilai, A. A., Worametrachanon, W. S., Chokiatiroted, E., & Wielee, T. V. (2012). Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA 5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 2229 – 2238.
- Champagne, C. P. Ross, R. P., Saarela, M., Hansen, K. F., & Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 185-193.
- Champagne, C. P., & Garder, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequeunte survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543.
- Champagne, C. P., Gardner, N. J., & Roy, D. (2005). Challenges in the addition of probiotics cultures of foods. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 45, 61-84.
- Champagne, C. P., Raymond, Y., Guertin, N., & Bélanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bactéria in ice cream. *International Dairy Journal*, 47, 109-117.
- Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185-189.

- Cheng, C. P., Tsai, S. W., Chiu, C. C., Pan, T. M., & Tsai, T. U. (2013). The effect of probiotic-fermented soy milk on enhancing the no-mediated vascular relaxation factors. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 93, 1219 – 1225.
- Choinska-Pulit, A., Mitula, P., Sliwka, P., Laba, W., & Skaradznska, A. (2015). Bacteriophage encapsulation: trends and potential applications. *Trends in Food Science & Technology*, 45, 212 – 221.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56 – 67.
- Costa, M. G. M., Fonteneles, T. V., De Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2013). Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. *Food Chemistry*, 139, 261 – 266.
- Cuello-Gardia, C. A., Brozek, J. L., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nunez, J. J., Terracciano, L. et al. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136, 952 – 961.
- De Castro-Cislaghi, F. P., Silva, C. R., Fritzen-Freire, C. B., & Sant'Anna, E. S. (2012). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, 113, 186-193.
- De Prisco, A., & Mauriello, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27 – 39.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 452-462.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in Orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15, 219-232.

- Donkor, O. N., Henriksson, A., Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2006). Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. *International Dairy Journal*, 16, 1181 – 1189.
- Ejatehed, H., Nia, J. M., Rad, A. H., Niafar, M., Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). The effects of probiotics yoghurt consumption on blood pressure and serum lipids in type 2 diabetic patients: randomized clinical trial. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 6, 1 – 12.
- Fahimdanesh, M., Mohammadi, N., Ahai, H., Zanjani, M. A. K., Hargaloni, F. Z., & Behrouznasab, K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 6853 – 6858.
- FAO/WHO. (2002). In guidelines for the evaluation of probiotics in food – Joint Food and Agricultural Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Meeting Report, London, Canada.
- Fonteles, T. V., Costa, M. G., De Jesus, A. L. T., & Rodrigues, S. (2011). Optimization of the fermentation of cantaloupe juice by *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *Food Bioprocess Technology*, 5, 2819 – 2826.
- García-Ceja, A., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 482 - 489.
- Gawkowski, D., & Chikindas, M. L. (2013). Non-dairy probiotic beverages: the next step into human health. *Beneficial Microbes*, 4, 127 – 142.
- Global probiotics Market (dietary supplements, animal feed, foods & beverages) – Industry size, share, trends, analysis, growth and forecast, 2014 – 2020. (January 2016) (transparency Market Research).
- Guimarães, R. R., Vendramini, A. L. A., Santos, A. C., Leite, S. G. F., & Miguel, M. A. L. (2013). Development of probiotic beads similar to fish eggs. *Journal of Functional Foods*, 5, 968–973.

- He, T., Priebe, M. G. Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C. et al. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 595 – 604.
- Iyer, C., & Kailasapathy, K. (2005). Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under *in vitro* Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science*, 70, 18-23.
- Jenebian, S. M., Pedersen, L. L., & Jespersen, L. (2010). Beneficial Effects of probiotic and food borne yeasts on human health. *Nutrients*, 2, 449 – 473.
- Kailasapathy, K. (2006). Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effects on the sensory properties of yoghurt. *LWT - Food Science and Tecnology*, 39, 1221-1227.
- Kailasapathy, K. (2009). Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science Nutrition and Natural Resources*, 4, 1 - 19.
- Kailasapathy, K., & Chin, J. C. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. *Immunology and Cell biology*, 78, 80-88.
- Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., Ishii, Y., Sugitani, M., Imaoka, A. et al. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20, 1133 – 1141.
- Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64, 567 – 576.
- Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Worametrachanon, S., Techarung, J., & Pankasemsuk, T. (2015). Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in Lychee juice varied carrier materials. *Food Science and Technology*, 62, 847-853.
- Krasaekoopt, W., & Kitsawad, K. (2010). Sensory characteristics consumer acceptance of fruit juice containing probiotics beads in Thailand. *AU Journal and Technology*, 14, 33 – 38.

- Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 761-766.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt: a review. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. C. (2006). Survival probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT - Food Science and Tecnology*, 9, 177-183.
- Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of diferent Technologies and their impacto n the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15-25.
- Menezes, C. R., Barin, J. S., Chicoski, A. J., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E. Fries, L. L. M. et al. (2013). Microencapsulation of probiotics: progress and prospects. *Ciência Rural*, 3, 36-41.
- Nishiyama, K., Nakazato, A., Veno, S., Seto, Y., Kakuda, T., Takai, S., Yamamoto, Y. et al. (2015). Cell surface – associated aggregation – promoting factor from *Lactobacillus gasseri* SBT 2055 facilitates host colonization and competitive exclusion of *Campylobacter jejuni*. *Molecular Microbiology*, 98, 712 – 726.
- Nualkaekul, S., & Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 111-117.
- Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryansky, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juice. *Food Research International*, 53, 304 – 311.
- Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiv, V. V., & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1281-1287.

- Nuallkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, 129, 1037-1044.
- Ortakci, F., & Sert, S. (2012). Stability of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 in yogurt and in an artificial human gastric digestion system. *Journal Dairy Science*, 95, 6918 - 6925.
- Pereira, A. L. F, Marciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44, 1276 – 1283.
- Prado, F. C., Parada, J. L., Pandey, A., & Soccol, C. R. (2008). Trends in non-dairy probiotics beverages. *Food Research International*, 41, 111 – 123.
- Prince, T., McBain, A. J., & O'Neill, C. A. (2012). *Lactobacillus reuteri* protects epidermal keratinocytes from *Staphylococcus aureus* – Induced cell death by competitive exclusion. *Applied and Environmental Microbiology*, 78, 5119 – 5126.
- Rajkumar, H., Kumar, M., Das, N., Kumar, S. N., Challa, H. R., & Nagpal, R. (2015). Effect of probiotic *L. salivarius* UBL S22 and prebiotic fructo-oligosaccharide on serum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity, and gut bacteria in healthy Young volunteers: A randomized controlled single-blind pilot study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20, 289 – 298.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W, S. (2013). Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369-381.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P. et al. (2012). Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2748-2757.
- Rubilar, M., Morales, E., Sáez, R., Acevedo, F., Palma, B., Villarroel, M. et al. (2012). Polyphenolic fractions improve the oxidative stability of microencapsulated linseed oil. *European Journal of Lipid Science and Technology*, 114, 760-771.

- Saarela, M., Alakomi, H. L., Matto, J., Ahonen, A. M., Puhakka, A., & Tynkkynen, S. (2011). Improving the storage stability of *Bifidobacterium breve* in low pH fruit juice. *International Journal of Food Microbiology*, 149, 106-110.
- Saarela, M., Virkajarvi, L., Nohynek, L., Vaari, A., & Matto, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 171-178.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: the case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231 – 242.
- Salminen, S., Kneifel, W., & Ouwehand, A. C. (2016). Probiotics: Application of probiotics in dairy products: established and potential benefits. *Food Science*, 24, 234 – 241.
- Sanchez, B., Ruiz, L., Guidemond, M., Ruas-Madiedo, P., & Margolles, A. (2012). Toward improving technological and functional properties of probiotics in food. *Trends in Food Science and Technology*, 26, 56 – 63.
- Santos, T. T., & Varavallo, M. A. (2011). The Importance of probiotics to control and / or restructuring of the intestinal microbiota. *Revista Científica do ITPAC*, 4, 17 - 21.
- Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 139–144.
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 279-284.
- Shin, M. J., Kim, J. G., & Shin, J. S. (2012). Microencapsulation of imidazole curing agents by spray-drying method using W/O emulsion. *Journal of Applied Polymer Science*, 126, 108-115.
- Simforian, E., Nonga, H. E., Ndabikunze, B. K. (2015). Assessment of microbiological quality of raw fruit juice vended in Dar es Salaam city, Tanzania. *Food Control*, 57, 302 – 307.

- Siuta-Cruce, P., & Goulet, J. (2001). Improving probiotic survival rates. *Food Technology*, 55, 36-44.
- Socol, C. R., Vandenberghe, L. P. S., Spier, M. R., Medeiros, A. B. P., Yamagishi, C. T., Lindner, J. D. et al. (2010). The potential of probiotics: A review. *Food Technology and Biotechnology*, 48, 413 – 434.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostom, T., & Bhandari, B. (2012). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162 – 168.
- Song, H., Yu, W., Liu, X., & Ma, X. (2014). Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate–chitosan microencapsulated low density cells. *Carbohydrate Polymers*, 108, 10 – 16.
- Strizker, J., Weibel, S., Hill, P. J., Oelschlager, T. A., Goebel, W., & Szalay, A. A. (2007). Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 151- 162.
- Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., et al. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 36 - 42.
- Tripathy, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225 – 241.
- Vergara, C. M. A. C., Honorato, T. L., Maia, G. A., & Rodrigues, S. (2010). Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale* L.) juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 141-145.
- Weinbreck, F., Bodnár, I., & Marco, M. L. (2010). Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, 136, 364 – 367.
- Ying, D.Y., Schawander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey

protein and resistant starch matrices: probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, 5, 98-105.

Yoon, K. Y., Woodams, E. E., & Hang, Y. D. (2006). Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. *Bioresource Technology*, 97, 1427-1430.

Tabela 1. Aplicações de probióticos microencapsulados em bebidas de frutas, técnicas e materiais de encapsulação.

Bebidas à base de fruta	Cepa probiótica	Tecnologia de encapsulação	Materiais Encapsulantes	Revestimento	Referência
Orange and Apple Juice	<i>L. rhamnosus</i> , <i>B. longum</i> , <i>L. salivarius</i> , <i>L. plantarum</i> , <i>L. acidophilus</i> , <i>L. paracasei</i> , <i>B. lactis</i>	Emulsão	Alginato de sódio (3%); Cloreto de cálcio (0.01 M)	-	Ding and Shah (2008)
Orange and grape juice	<i>L. casei</i> 01	Extrusão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.05 M)	-	Krasaekoopt and Kitsawad (2010)
Longan juice	<i>L. acidophilus</i> LA 5, <i>L. casei</i> 01	Emulsão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.1 M)	-	Chaikham et al. (2012; 2015)
Pomegranate juice	<i>L. plantarum</i>	Extrusão	Alginato de sódio (3%); Cloreto de cálcio (0.15 M)	-	Nualkaekul et al. (2012)
Orange and Peach juice	<i>L. paracasei</i> L26	Extrusão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.1 M)	Revestimento com quitosana (0,5%) ou dextrana (0,75%)	Rodrigues et al. (2012)
Orange juice	<i>L. rhamnosus</i> GG, <i>L. acidophilus</i> NCFM	Extrusão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.1 M)	-	Sohail et al. (2012)
Raspberry	<i>L. rhamnosus</i> NRRL-B-4495, <i>L. acidophilus</i> NRRL-B-442	Spray drying	Maltodextrina	-	Anekella and Orsat (2013)
Acerola nectar	<i>B. lactis</i> BB-12	Spray drying	Maltodextrina	-	Antunes et al. (2013)

Pomegranate and Cranberry juice	<i>L. plantarum</i> NCIMB 8826 and <i>B. longum</i> NCIMB 8809	Extrusão	Alginato de sódio (4%); Cloreto de cálcio (0.15 M)	Revestimento com quitosana (0,4%), gelatina ou glucomannan (0,4%)	Nuakhaekul et al. (2013)
Apple juice	<i>L. rhamnosus</i> GG	Spray drying	Amido modificado e/ou Whey protein	-	Ying et al. (2013)
Lychee juice	<i>L. casei</i> 01	Spray Drying	Maltodextrina	-	Kingwatee et al. (2014)
Orange juice	<i>L. acidophilus</i> LA 5, <i>L. casei</i> LC 01	Extrusão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.05 M)	Revestimento com quitosana (0,4%)	Krasaekoopt and Watcharapoka (2014)
Amora, maoberry, longan and melon juice	<i>L. acidophilus</i> LA 5, <i>L. casei</i> 01 and <i>B. lactis</i> BB-12	Extrusão	Alginato de sódio (2%); Cloreto de cálcio (0.1 M); extratos de plantas		Chaikham (2015)
Peach nectar	<i>L. acidophilus</i> NRRL-B-4495, <i>L. reuteri</i> NRRL-B-14171	Extrusão	Alginato de sódio (3%); Cloreto de cálcio (0.1 M)	Revestimento com quitosana (1%)	García-Ceja et al. (2015)

APÊNDICE D – Artigo Original

Bebida à base de caju (*Anacardium occidentale* L.) com *Lactobacillus casei* DN 114-001 livre e microencapsulado

Bruna Lúcia de Mendonça Soares, Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud, Thayza Christina Montenegro Stamford, Tânia Lúcia Montenegro Stamford

Resumo

Este estudo comparou a sobrevivência de *Lactobacillus casei* livre e microencapsulado com alginato/quitosana, adicionados em bebida de caju, durante estocagem refrigerada e sob simulação gastrointestinal (SGI). Propriedades físico-químicas e sensoriais também foram analisadas. Durante SGI, *L. casei* livre perdeu toda viabilidade, enquanto que células encapsuladas mostraram resistência, reduzindo 1,42 log UFC após simulação gástrica e <1 log UFC ao termino da simulação intestinal. Após 28 dias de estocagem, bebidas contendo microcápsulas e células livres apresentaram 10,2 e 8,1 log UFC/mL, respectivamente. As características físico-químicas mantiveram-se estáveis durante armazenamento e frente bebida controle (sem probióticos). A análise sensorial demonstrou que as bebidas foram aceitas pelos provadores, apesar das microesferas terem sido percebidas. Concluímos que bebida de caju é um substrato favorável para sobrevivência de *L. casei* livre e microencapsulado por 28 dias e que a microencapsulação é uma técnica promissora para proteger microrganismos probióticos em condições gastrointestinais simuladas.

Keywords: Alginate. Chitosan. Functional food. Storage. Consumer acceptance.

1. Introdução

Anacardium occidentale L. é nativo do Brasil e tem grande importância econômica e social no Nordeste Brasileiro. O fruto do cajueiro é composto pelo pseudofruto, conhecido por caju e pela castanha, botanicamente considerada o fruto verdadeiro e conhecida mundialmente, sendo a detentora do grande valor comercial atribuído ao fruto. Os principais países produtores de caju são o Brasil, responsável por 90% da produção mundial em 2012, Vietnã, Nigéria, Índia e Côte d'Ivoire (FAO/WHO, 2015).

Representando 90% do peso do fruto, o caju é consumido fresco e processado na forma de sucos, polpa, geleia, doces e bebidas alcoólicas (Schweiggert et al., 2016). Nutricionalmente, é uma ótima fonte de Vitamina C, em níveis três vezes maior que na laranja; vitaminas do complexo B, como a riboflavina e a tiamina (Lavinhas, Almeida, Miguel, Lopes, & Valente-Mesquita, 2006; Taco, 2011); e compostos antioxidantes (Assunção & Mercadante, 2003). Alimentos com elevados teores de vitamina C, considerada um eliminador de oxigênio, favorece um ambiente mais anaeróbico, o que contribui benéficamente para sobrevivência de probióticos (Ding & Shah, 2008).

Probióticos podem ser definidos como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (FAO/WHO, 2002), e, portanto, têm sido amplamente adicionados em produtos alimentícios, pertencendo à classe de “alimentos funcionais” (Song, Yu, Liu, & Ma, 2014; Tavera-Quiroz et al., 2015).

Os benefícios que podem ser exercidos pelos probióticos incluem sua capacidade em prevenir e tratar infecções intestinais (Kato et al., 2004), aumentar a utilização da lactose em pessoas intolerantes (He et al., 2008), atuar no controle dos níveis de colesterol sérico (Rajkumar et al., 2015), na redução da pressão sanguínea em hipertensos (Ejathed et al., 2012) e na prevenção de alergias (Cuello-Garcia et al., 2015), além de possuir atividade anticarcinogênica (Strizker et al., 2007). A fim de promover estes efeitos benéficos à saúde, a dose mínima eficaz é de $10^8 - 10^9$ unidades formadoras de colônia (UFC) por dia (Anvisa, 2002; Kailasapathy & Chin, 2000), e a concentração mínima de microrganismos vivos não pode ser menor que 10^7 UFC/g do alimento no momento do consumo (FAO/WHO, 2002), isto porque muitas células morrem durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

Nos últimos anos, é notória a maior preocupação da população com a alimentação, isto é decorrente da conscientização da influência da dieta na saúde. Diante disto, têm-se observado um crescente aumento no mercado mundial envolvendo alimentos probióticos, que representa cerca de 65% do mercado global de alimentos funcionais, movimentando aproximadamente 62 bilhões US dólares no ano de 2014 (Global Industry Analysis, 2014; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Tripathy & Giri, 2014).

Probióticos são incorporados em uma grande variedade de produtos alimentícios, principalmente em derivados lácteos como leite (Mani-López, Palou, & López-Malo, 2014), sorvete (Champagne, Raymond, Guertin, & Bélanger, 2015), iogurte (Salminen, Kneifel, & Ouwehand, 2016), queijo (Bakr, 2015), mas também em leite de soja (Cheng, Tsai, Chiu, Pan, & Tsai, 2013), maionese (Fahimdanesh et al., 2012), produtos cárneos (Cavalheiro et al., 2015), bebidas à base de frutas e vegetais (De Prisco & Mauriello, 2016), comidas para bebês (Kent & Doherty, 2014), produtos de panificação (Soukoulis et al., 2014). Sucos de fruta também podem ser uma alternativa para veículo de probióticos, por ter uma ampla aceitação pela população mundial, por ser rico em nutrientes e por não conter uma cultura iniciadora que compete com os probióticos (Tripathy & Giri, 2014). O uso de alimentos não lácteos justifica-se, também, pela possibilidade de atender a distintos grupos populacionais como os intolerantes à lactose, alérgicos à proteína do leite e hipercolesterolêmicos (Bakr, 2015).

A sobrevivência de cepas probióticas tem sido estudada em diferentes sucos de fruta como laranja, abacaxi, uva, pera, lichia, romã, limão, cranberry, acerola, pêssego, morango, manga e caju (Antunes et al., 2013; Ding & Shah, 2008; García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-Malo, 2015; Kingwatee et al., 2015; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Nualkaekul, Salmeron, & Charalampopoulos, 2011; Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiv, & Charalampopoulos, 2012; Pereira, Maciel, & Rodrigues, 2011; Rodrigues et al., 2012; Sohail, Turner, Coombes, Bostom, & Bhandari, 2012; Vergara, Honorato, Maia, & Rodrigues, 2010; Ying et al., 2013). Os fatores que influenciam a viabilidade do probiótico no suco de fruta, incluem a espécie/cepa utilizada, o método de preparação de culturas, o tipo de fruta, tempo e temperatura de estocagem, os níveis de oxigênio e o tipo de embalagem (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011; Yonekura, Sun, Soukolis, & Fisk, 2014).

Para exercer benefícios à saúde, os probióticos, além da necessidade de estarem viáveis no produto alimentício, durante a vida de prateleira, precisam sobreviver a passagem pelo trato gastrointestinal, superando as condições ácidas do estômago, os sais biliares e enzimas pancreáticas no intestino, e, ainda, multiplicar-se no hospedeiro (Cook, Tzortzi, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015).

A tecnologia da microencapsulação pode aumentar a sobrevivência dos probióticos em alimentos funcionais, a exemplo de sucos de fruta, uma vez que, as microcápsulas podem proporcionar um ambiente mais anaeróbico para as bactérias, além de formar uma barreira física contra as condições desfavoráveis, como o baixo pH da bebida, contribuindo, desta forma, para redução das injúrias celulares, tanto durante o armazenamento quanto na passagem pelo trato gastrointestinal (Etchepare et al., 2016; Wurth et al., 2015).

Diante do exposto, este estudo tem como objetivo avaliar a viabilidade do *Lactobacillus casei*, livre ou microencapsulado com alginato-quitosana, adicionados a bebida à base de caju, durante estocagem refrigerada e sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, e, identificar os efeitos da adição dos probióticos sobre as propriedades sensoriais e físico-químicas das bebidas.

2. Materiais e Métodos

2.1. Materiais

A cultura liofilizada de *L. casei* DN 114-001 foi obtida de Roval (Recife, PE, Brazil). Alginato de sódio proveniente de algas marrons, de média viscosidade (viscosidade: ≥ 2.000 cP, 2% H₂O; proporção M/G de 1.56; Peso molecular de 100 kDa) e Span[®]80 (Sorbitane Monooleate) foram adquiridos da Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA). A quitosana comercial Kiofine[®]-B, de origem fúngica (*Aspergillus niger*), foi gentilmente cedida pela KitoZyme S. A. (Herstal, Belgium). *Lactobacilli* MRS caldo e ágar foram comprados de HiMediaTM (Paraná, Brazil). Pepsina proveniente de mucosa gástrica de porcos (1:1000) e pancreatina de pâncreas de porcos foram obtidas de Sigma-Aldrich (Saint Louis, MO, USA) e Bio Basic Inc (Markham, Canadá), respectivamente.

2.2. Condições de cultura e enumeração do *Lactobacillus casei*

A ativação das cepas ocorreu pela adição do inóculo a 1% (v/v) em meio de cultura Man, Rogosa e Sharpe (MRS) caldo a $37 \pm 2^\circ\text{C}$ por 24 h, de acordo com Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007). Para obtenção da biomassa, as células foram separadas por centrifugação a 10.000 rpm durante 10 min á 4°C , o sobrenadante foi descartado e o *pellet* foi lavado com solução salina estéril 0.9%. O concentrado celular a ser adicionado a bebida de caju na forma de células livres, foi obtido pela suspensão da biomassa de *L. casei* em 3 mL da solução salina estéril, apresentando uma concentração celular final de $10.2 \log \text{UFC/mL}$, conforme Nualkaekul, Salmeron and Charalampopoulos (2011). As células destinadas ao processo de microencapsulação, após a centrifugação, foram suspensas em 10 mL de solução salina estéril 0.9%, apresentando concentração celular de $10.0 \log \text{UFC/mL}$ (Cai et al, 2014; Zou et al, 2011).

O número de unidades formadoras de colônia do probiótico foi determinado por meio de diluições seriadas em solução salina estéril. Alíquotas de 1 mL das diluições selecionadas foram plaqueadas em meio MRS ágar, utilizando a técnica *pour-plate*, e incubadas a $37 \pm 2^\circ\text{C}$, durante 48 h, em anaerobiose. Placas contendo de 20 a 350 colônias foram contadas e os resultados expressos em $\log \text{UFC/mL}$ de solução.

2.3. Microencapsulação

As microesferas foram preparadas pelo método de emulsificação/gelificação interna proposto por Cai et al., 2014 e Zou et al., 2011. A emulsificação e geleificação foram realizadas em Becker de 500 mL utilizando um agitador magnético (Cientc CT-103, Brasil). O carbonato de cálcio (CaCO_3) foi utilizado como fonte de cálcio para o processo de encapsulação. Para isso foi preparada uma suspensão estoque de CaCO_3 500 mM pela dispersão do pó seco em água deionizada. Em seguida, solução base de alginato 3% e cálcio 37.5 mM foi preparada pela mistura de 3 g de alginato de sódio, 7.5 mL da suspensão de 500mM CaCO_3 e 89.5 g de água, sob agitação contínua, à temperatura ambiente, overnight para completa hidratação. A biomassa de *L. casei* suspensa em de solução salina, foi adicionada à 20 mL da solução base de alginato e cálcio, resultando, portanto, numa solução final de alginato 2% e 25 mM de cálcio caracterizando a fase aquosa. A fase oleosa consistiu em 70 mL de óleo de soja contendo 1% (v/v) do emulsificante Span-80, homogeneizados a 200 rpm por 15 min. A fase aquosa foi então dispersa na fase oleosa sob agitação de 300 rpm por 15 min. Após emulsificação, 20 mL de óleo de soja acidificado com ácido acético glacial (0.95 mL) foi adicionado lentamente,

até alcançado pH final de 3.5, sob agitação contínua de 100 rpm por 30 min. As microesferas formadas foram lavadas com tampão fosfato (48 mL NaH₂PO₄ 0.4 M, 76.3 mL Na₂HPO₄ 0.4 M; pH 7,0) até remoção total do óleo, isoladas por centrifugação a 10.000 rpm por 10 min à 4 °C e estocadas em peptona salina (1 g/L peptona, 8.5 g/L NaCl) sob refrigeração (4 ± 1 °C).

2.4. Revestimento com quitosana

O revestimento com quitosana foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Zou et al. (2011). A quitosana fúngica (0.2 g) foi dissolvida em 90 mL de água destilada acidificada com 0.4 mL de ácido acético glacial, resultando em uma concentração de 0.2% (p/v). Após a dissolução, o pH da solução foi ajustado para faixa a de 5.7 a 6.0 pela adição de Hidróxido de sódio (NaOH) 1 M. As microesferas, lavadas com água destilada, foram imersas em 100 mL da solução de quitosana e agitadas a 100 rpm por 20 min. Após o revestimento, as microesferas foram lavadas, filtradas em papel filtro (Whatman nº 4) e armazenadas em peptona salina a 4 ± 1 °C.

2.5. Ensaio de Eficiência da Encapsulação

Para calcular a eficiência de encapsulação da bactéria foi adotado procedimento descrito por Zou et al., 2011. Microesferas filtradas (1 g) foram adicionadas a 9 g de peptona salina pré-aquecida a 37 °C. Para quebra das microesferas e liberação das células de *L. casei* aprisionadas, a suspensão bacteriana foi homogeneizada, em homogeneizador (PT-MR 2100, Kinematica, Switzerland) a 10.000 rpm por 30 s e, em seguida, agitada suavemente em shaker rotacional por 30 min, para posteriormente, ser submetida ao processo de plaqueamento e enumeração de colônias, como descrito no item 2.2. A eficiência da encapsulação (EE) foi calculada por meio da seguinte fórmula:

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

Onde N é o número de células viáveis liberadas das microesferas e N₀ é o número de células viáveis no concentrado de células utilizado para encapsulação.

2.6. Análise da distribuição de Tamanho

A distribuição granulométrica das partículas foi determinada em água destilada utilizando um zetâmetro modelo Zetratec (Microtrac, Montgomeryville) associado a

software Microtrac flex 10.5.0. O tamanho das partículas é expresso em diâmetro médio de volume (μm). A distribuição dos tamanhos das partículas foi calculada utilizando o fator de expansão, conforme a fórmula (Cai et al., 2014):

$$\text{Fator de expansão} = \frac{[D(v, 90) - D(v, 10)]}{D(v, 50)}$$

Onde $D(v, 90)$, $D(v, 50)$ e $D(v, 10)$ são os diâmetros do volume cumulativo em 90%, 50% e 10%. Este resultado fornece uma indicação direta da variação de tamanho das esferas em relação ao diâmetro de volume médio. Quanto mais elevado o valor do fator de expansão mais ampla é a distribuição de tamanho das partículas (Cai et al., 2014).

2.7. Desenvolvimento e caracterização das bebidas de caju

O caju foi adquirido no Centro de Abastecimento e Logística de Pernambuco, Brasil (CEASA). Os frutos foram lavados em água corrente e depois sanitizados em solução clorada à 150 ppm durante 15 min. Posteriormente foram submetidos a esmagamento das partes comestíveis, com auxílio de triturador (Philips Wallita). Foram elaboradas bebidas de caju contendo 45% de polpa, misturada em água destilada, e 10% de açúcar. Para determinação da composição das bebidas foram realizadas análises físico-químicas de umidade, resíduo mineral fixo, proteína, lipídeos, açúcares totais e redutores, em triplicata, com os valores médios obtidos expressos em g/100g (AOAC, 2003). O valor energético total (VET) foi calculado pelo somatório das calorias fornecidas pelos macronutrientes, isto é, 9 Kcal/g para lipídios (LIP) e 4 Kcal/g para carboidratos (CHO) e proteínas (PTN).

2.8. Incorporação de *L. casei* livre e microencapsulado a bebida de caju

As bebidas com de *L. casei*, na forma de células livres, foram preparadas conforme metodologia descrita por Nualkaekul, Salmeron and Charalampopoulos (2011), onde a suspensão de *L. casei* em solução salina foi adicionada à 40 mL da bebida de caju, resultando em uma concentração de 9.89 log UFC/mL. As bebidas contendo os probióticos encapsulados foram formulados segundo Rodrigues et al. (2012) e Sohail, Turner, Coombes, Bostom and Bhandari (2012). Para cada 10 mL de bebida de caju foi adicionado 1 g de microesferas contendo *L. casei* aprisionado, apresentando 9.94 log UFC/mL. As bebidas foram agitadas e acondicionadas em tubos plásticos estéreis com tampa e capacidade para 50 mL.

2.9. Caracterização físico-química

As bebidas controle (sem probióticos), com células livres ou microencapsuladas foram mantidas em refrigeração a 4 ± 1 °C durante quatro semanas. Amostras foram recolhidas nos tempos zero (após adição dos microrganismos) e em seguida, após 7, 14, 21 e 28 dias, para determinação de pH, acidez total titulável, conteúdo de sólidos solúveis e ácido ascórbico. O valor de pH foi determinado usando um pHmetro digital (Micronal B-375). A acidez total foi determinada por titulação e expressa em gramas de ácido cítrico por 100 g de amostra (AOAC, 2003). O conteúdo de sólidos solúveis foi mensurado utilizando refratômetro de bancada (AUS JENA Model II, Germany) e os resultados expressos em °Brix. A variação de cor foi determinada em um colorímetro modelo Minolta Chroma Mater CR-400 (Osaka, Japan) com base na escala CIELab. Os valores numéricos obtidos para o parâmetro L, e as coordenadas cromáticas a^* e b^* foram convertidos em ΔE^* , de acordo com a equação a seguir (Pereira, Maciel, & Rodrigues, 2011).

$$\Delta E = \{(\Delta L^2) + (\Delta a^2) + (\Delta b^2)\}^{\frac{1}{2}}$$

Onde Δ é igual a diferença de cor entre a bebida estocada e a recém preparada.

2.10. Segurança microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas em triplicata e envolveram a determinação de coliformes a 45°C, bolores e leveduras e *Salmonella spp*, de acordo com Downes and Ito (2001). Os resultados foram expressos em UFC/mL para bolores e leveduras e em número mais provável (NMP/50 mL) para coliformes a 45 °C, a análise de *Salmonella* foi expressa em presença ou ausência.

2.11. Condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

Lactobacillus casei, na forma livre e encapsulada, foram submetidos a condições gastrointestinais simuladas, a fim de evidenciar a taxa de sobrevivência desta bactéria tanto na bebida recém preparada, quanto após armazenamento refrigerado por 28 dias. A simulação *in vitro* da digestão seguiu metodologia descrita por García-Ceja, Mani-López, Palou and López-Malo (2015). O suco gástrico simulado (SGS) consistiu em uma mistura de água com 0.2% de NaCl, 0.32% de pepsina e HCl (37%) para obtenção final de pH

2.0. O suco intestinal simulado (SIS) foi preparado pela mistura de solução de fosfato monopotássico a 2.8% em água destilada com 1% de pancreatina, o pH foi ajustado para 7.5 pela adição de NaOH 0.2 mol/L. As condições gastrointestinais simuladas ocorreram pela inoculação da SGS ou SIS com 10% (v/v) da bebida de caju contendo a bactéria probiótica livre ou encapsulada (Champagne & Gardner, 2008), em seguida, a solução foi misturada em vortex por 10 s e incubadas a 37 °C durante 2 h, sob agitação. Amostras foram retiradas, em duplicata, para determinação da viabilidade, nos tempos 0, 1h e 2h de exposição ao SGS ou SIS. O pH das amostras foi neutralizado com tampão fosfato, após exposição ao SGS. A detecção de células viáveis dentro das microesferas se procedeu pela quebra das cápsulas e agitação, com posterior plaqueamento e enumeração.

2.12. Análise sensorial

A avaliação sensorial foi realizada em laboratório com cabines individuais. Foram recrutados 100 provadores voluntários, homens e mulheres com idade entre 18 e 40 anos, que referiram hábito e/ou interesse no consumo de suco de caju. Os provadores receberam três amostras da bebida de caju (controle, com *L. casei* livre e microencapsulado), com aproximadamente 40 mL cada uma, em copos plásticos codificados com três dígitos aleatórios. Água e bolacha foram fornecidas, a fim de limpar o paladar após a avaliação de cada bebida. Foi utilizada a escala hedônica de nove pontos (1 = Desgostei extremamente, 5 = Nem gostei e nem desgostei, 9 = Gostei extremamente) para avaliar os parâmetros de cor, sabor, aroma, textura e impressão global. A intenção de compra foi avaliada usando a escala estruturada de cinco pontos (1 = Definitivamente não compraria e 5 = Definitivamente compraria). Os provadores também foram orientados quanto ao teste de ordenação de preferência, onde indicaram a amostra mais e menos preferida. Esta pesquisa foi aprovada pelo comitê de ética da Universidade Federal de Pernambuco - UFPE, Brazil, sob o número de protocolo 1.052.814.

2.13. Análise estatística

Os resultados obtidos foram apresentados em médias \pm desvio padrão. Os dados foram analisados utilizando Anova one way e post hoc teste de Tukey quando os dados possuíam distribuição normal e o teste de Kruskal-Wallis quando o teste de normalidade (test Shapiro-Wilk) falhou. Os resultados da análise de ordenação de preferência das amostras (análise sensorial) foram realizados pelo teste de Friedman. A significância estatística

adotada foi de $p < 0,05$. Os dados foram analisados pelo software SPSS versão 20.0 (SPSS Inc., Chigaco, IL, USA).

3. Resultados and discussão

3.1. Composição Química da bebida de caju

A bebida de caju apresentou valor energético total de 40.77 Kcal/ 100 mL. Os valores médios referentes a composição química das bebidas formuladas com 45% de polpa de caju e 10% de açúcar foi de 90.3% de umidade, 0.06 g de resíduo mineral fixo, 0.15 g de proteínas, 0.45 g de lipídeo, 4.27 g de açúcares redutores e 4.76 g de açúcares totais. A composição de sucos de caju varia de acordo com a espécie da fruta, grau de maturidade, pelos efeitos ambientais e climáticos da estação de crescimento, método de elaboração da bebida, % de polpa e açúcar (Fontes et al., 2013; Pinheiro et al., 2006), o que dificulta a comparação destes resultados com os disponíveis na literatura.

3.2. Caracterização das Microesferas

As microesferas de alginato de cálcio com revestimento de quitosana, preparadas pelo método de emulsão/gelificação interna, apresentaram diâmetro médio de $205.2 \pm 30.2 \mu\text{m}$. Dados relatados por Zhao et al. (2015) realizando encapsulação pela mesma técnica, com diferentes concentrações de alginato, relataram tamanho das cápsulas variando de $268.2 - 404.6 \mu\text{m}$, os maiores tamanhos foram associados as concentrações mais altas do polímero. Do mesmo modo, Cai et al. (2014) produziram esferas de alginato de cálcio com a técnica de emulsão, porém sem o revestimento com quitosana, e encontraram diâmetro médio de $323 \mu\text{m}$. Menor tamanho, por outro lado, foi observado por Zou et al. (2011) que obteve diâmetro médio de $159 \mu\text{m}$ em microesferas de alginato revestidas com quitosana. Sendo assim, o tamanho da partícula produzida neste estudo está dentro da variação dos diâmetros médios encontrados na literatura, utilizando a técnica de emulsão/gelatinização interna.

O fator de expansão foi de 1.14 ± 0.06 o que representa a polidispersividade das esferas, assim como, a uniformidade dos tamanhos. Este resultado corrobora com Zhao et al. (2015) e Cai et al. (2014) que encontraram números que variaram de 0.93-1.12 e 1.20, respectivamente.

Em relação a eficácia do processo de encapsulação, o ensaio de eficiência demonstrou rendimento de $44.3 \pm 0.4\%$. A taxa de eficiência de encapsulação pela técnica de emulsão/gelatinização interna é geralmente observada abaixo dos 50% o que é provavelmente devido a adição do ácido acético glacial após emulsificação, proporcionando um ambiente mais ácido o que deixa os microrganismos vulneráveis (Cai et al., 2014; Zou et al., 2011).

3.3. Caracterização físico-química e microbiológica das bebidas de caju durante armazenamento

A tabela 1 apresenta os valores médios referentes aos parâmetros físico-químicos obtidos durante armazenamento da bebida sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$). Os resultados médios para acidez total titulável e conteúdo de sólidos solúveis durante os 28 dias de estocagem não apresentaram diferenças significantes, independentemente do tipo de amostra e do tempo de armazenamento.

Em relação à média dos valores obtidos para pH observou-se que a bebida controle e aquela adicionada de *L. casei* na forma de células livres não diferiram significativamente entre si, durante todo o armazenamento. Em contrapartida, a bebida de caju com adição de microesferas, foi diferente das demais, apresentando pH mais elevado, provavelmente devido ao material encapsulante e de revestimento, além do pH final das esferas em torno de 5.8-6.0. Resultados estes também encontrados por Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiv and Charalampopoulos (2012), apesar de utilizar outra técnica para encapsulação (Extrusão), destinada a adição a suco de romã, eles atribuíram o fato ao revestimento com quitosana, devido a sua solubilidade em ácidos orgânicos, tal como o cítrico, que estão também presentes no caju. Em oposição, Sohail, Turner, Coombes, Bostom and Bhandari (2012), relatam que não é esperado alterações nas características de sucos, como o tamponamento, pela adição de apenas 10% de cápsulas, o que não foi verificado neste estudo.

No presente estudo, não foram observadas diminuições expressivas de pH e/ou sólidos solúveis, assim como, aumento da acidez total titulável durante o armazenamento das amostras sob refrigeração ($4 \pm 1^\circ\text{C}$), sugerindo que tanto as células probióticas aprisionadas nas esferas quanto as células livres apresentavam-se com baixa atividade metabólica na bebida. Resultados estes que estão de acordo com os reportados por Antunes et al. (2013) ao estudarem a adição de probióticos livres e encapsulados pela

técnica de spray drying em suco de acerola, não verificaram alterações significativas no pH e/ou acidez das bebidas durante estocagem refrigerada por 35 dias, sugerindo também a baixa ação metabólica das células bacterianas livres ou imobilizadas.

Por outro lado, Ding e Shah (2008) observaram diminuição significativa do pH (2,81 – 2,57) em suco de laranja contendo células probióticas livres após armazenamento por 6 semanas, enquanto que o mesmo suco contendo a bactéria encapsulada, pela técnica de emulsão, não teve o pH alterado (2,81 – 2,81) após o término do tempo de armazenamento. Quando avaliaram o suco de maçã, perceberam no final das 6 semanas que o pH do suco inoculado com probiótico encapsulado foi maior que a bebida contendo células livres. É importante ressaltar, ainda neste estudo, que a diminuição do pH nos sucos de laranja e maçã contendo células livres foram acompanhadas por redução na concentração de sólidos solúveis e aumento na acidez das bebidas. Estes autores concluíram que a bactéria probiótica imobilizada pela encapsulação possui maior estabilidade no produto, enquanto que as células livres fermentam os açúcares do suco, o que é refletido nas alterações das características físico-químicas.

De acordo com Rodrigues et al. (2012), é esperado uma menor variação do pH em sucos com células probióticas encapsuladas, uma vez que a membrana da cápsula provavelmente limita a difusão de açúcares, dificultando a atividade fermentativa dessas bactérias. Resultados obtidos neste estudo, por outro lado, indicaram a mesma estabilidade dos parâmetros físico-químicos para as bebidas com *L. casei* livre ou microencapsulado. Isso se deve provavelmente ao fato do suco de caju não ser um meio favorável para a atividade metabólica e fermentativa do *L. casei*, entretanto, o caju possui naturalmente altos níveis de vitamina C, o que fornece um ambiente mais anaeróbico e favorável a sobrevivência do probiótico durante a estocagem. Deste modo, justifica-se o quadro observado neste estudo, onde apesar da baixa atividade metabólica do probiótico houve manutenção da viabilidade do *L. casei* livre nas amostras durante a maior parte do armazenamento.

A determinação do conteúdo de ácido ascórbico nas três bebidas durante armazenamento refrigerado (4°C) é expresso na Tabela 2. As bebidas de caju controle, com *L. casei* livre e microencapsulado apresentaram valores bem semelhantes de vitamina C, em todos os tempos analisados, demonstrando redução média total de 78.50 mg/100 mL no fim do armazenamento. A redução do conteúdo de vitamina C em uma

bebida de fruta natural é esperada, uma vez que esta vitamina é facilmente oxidável. Apesar da diminuição observada, as bebidas de caju apresentaram bom conteúdo da vitamina, visto que dados da literatura indicam variação de 189 a 372 mg de ácido ascórbico por 100 mL de bebida extraída de caju (Akinwale, Olubamiwa, & Ajav, 2001; Assunção & Mercadante, 2003; Lavinhas, Almeida, Miguel, Lopes, & Valente-Mesquita, 2006).

Os resultados para os parâmetros de cor são expressos em diferença total de cor entre as amostras estocadas nos tempos 7, 14, 21 e 28 dias e a amostra inicial, tempo 0 (Tabela 3). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre a amostra controle e os tratamentos com células livres e microencapsuladas de *L. casei*, quando comparadas em cada estágio de tempo. Isto indica que a adição dos probióticos, independentemente de estar na forma livre ou encapsulada não altera a cor do produto. Por outro lado, quando cada amostra foi analisada isoladamente, durante os 28 dias de estocagem, foram observadas diferenças estatísticas quanto a cor inicial e final do produto. Esta alteração na cor, durante o armazenamento pode estar associada a redução dos níveis de Vitamina C nas amostras. Antunes et al. (2013) indicam a relação existente entre alterações nos parâmetros de cor e o conteúdo de vitamina C. Contudo, de acordo com Lee e Coates (2003), valores de $\Delta E^* \geq 2$ são indicativos de diferenças de cor perceptíveis visualmente, em nosso estudo este valor não foi alcançado, sugerindo que a alteração da cor detectada não era visível a olho nu.

A avaliação microbiológica mostrou uma boa qualidade higiênico-sanitária das amostras durante os 28 dias de armazenamento, uma vez que, não foi detectada *Salmonella sp* e coliformes a 45°C, e bolores e leveduras (< 10 UFC/mL) mostraram quantidades seguras e aceitáveis (Anvisa, 2001).

A Figura 1 mostra a viabilidade da bactéria livre e microencapsulada na bebida de caju armazenada a 4±1°C por até 28 dias. O número de células viáveis nas microcápsulas manteve-se constante durante todo o período de armazenamento, exceto entre o tempo 0 e 7 dias, quando foi observado aumento na contagem do *L. casei*. Ótima viabilidade das células de *L. paracasei* encapsuladas com alginato-quitosana, pelo método de extrusão, e adicionadas em suco de laranja e pêssego foram observados por Rodrigues et al. (2012). Estes autores não observaram reduções na viabilidade após 50 dias de estocagem das

bebidas e, do mesmo modo que esta pesquisa, também identificaram aumento da viabilidade dos microrganismos encapsulados.

Estudos têm demonstrado que apenas probióticos encapsulados são capazes de manter a viabilidade em sucos de fruta (Anakella & Orsat, 2013; Chandramouli, Kailasapathy, Peiris, & Jones, 2004; Nualkaekul, Cook, Khutoryansky, Charalampopoulos, 2013; Saarela, Virkajarvi, Nohynek, Vaari, & Matto, 2006; Ying et al., 2013). A microencapsulação pode promover um ambiente mais anaeróbico, favorecendo a sobrevivência e multiplicação das bactérias dentro das esferas, em adição, a encapsulação e o revestimento servem como barreira física contra condições adversas, como o baixo pH da bebida (Laelorspoen, Wongsasulak, Yoovidhya, & Devahastin, 2014; De Prisco & Mauriello, 2016).

Em relação à sobrevivência das células livres, foi observada estabilidade no número de microrganismos até 21 dias, exibindo diminuição de 1,7 log com 28 dias de estocagem (Figura 1). Apesar da redução observada, a bebida com células livres manteve a contagem dentro do recomendado ($> 10^7$ UFC/mL), podendo ser considerada um alimento com alegação funcional (FAO/WHO, 2002). Pereira, Maciel and Rodrigues (2011) ao estudarem suco de caju fermentado com *L. casei*, encontraram viabilidade > 8 log UFC/mL após 42 dias de estocagem, estes autores concluíram que o suco de caju pode ser tão eficiente quanto produtos lácteos como carreadores de *L. casei* livres, entretanto refere-se à bebida fermentada.

Resultados contrários foram encontrados por Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiv and Charalampopoulos (2012) que identificaram perda total da viabilidade de *L. plantarum* livre adicionado a suco de romã, após 4 semanas em refrigeração. Em outro trabalho desenvolvido pelo mesmo grupo, foi observada rápida diminuição no número de células livres em suco de romã e cranberry com *L. plantarum*, exibindo 1,1 log UFC após 6 semanas a 5°C (Nualkaekul & Charalampopoulos, 2011). Do mesmo modo, Ding e Shah (2008) estudando várias cepas de *Lactobacillus*, observou queda de 7 ciclos logarítmicos em 4 semanas de estocagem em suco de maçã. Dados encontrados na literatura que comparam a sobrevivência de células livres e encapsuladas em sucos de fruta, concluem, em sua maioria, que os microrganismos encapsulados apresentam maior resistência, promovendo maior viabilidade durante uma vida de prateleira mais longa (Ding & Shah, 2008; García-Ceja, Mani-López, Palou, & López-

Malo, 2015; Kingwatee et al., 2015; Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014; Sohail, Turner, Coombes, Bostom and Bhandari, 2012; Ying et al., 2013)

3.4. Sobrevivência do *L. casei* livre e microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*

A viabilidade do *L. casei* após exposição às condições gastrointestinais simuladas estão expostas na Tabela 4. Quando as amostras foram submetidas ao SGS, verificou-se uma boa estabilidade das células microencapsuladas, com redução média de 1,42 Log UFC/mL (14,6%) após 2 horas. Em contrapartida, as bebidas contendo células livres apresentaram perda total da viabilidade após 120 minutos de exposição ao SGS. Da mesma forma, quando as condições intestinais foram simuladas, o *L. casei* aprisionado mostrou-se mais resistente, com redução de <1 Log UFC/mL durante todo período de exposição, em comparação às células livres com diminuição média de 5,69 Log UFC/mL (62,1%).

A microencapsulação influenciou benéficamente na sobrevivência do probiótico em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, o que está de acordo com relatos anteriores da literatura (De Prisco, Maresca, Ongeng, & Mauriello, 2015; Cai et al., 2011; Zou et al., 2011; Chaikham et al., 2012). Utilizando a mesma metodologia de simulação gastrointestinal, García-Ceja, Mani-López, Palou and López-Malo (2015) observou que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus e reuteri*, encapsulados por extrusão, reduziu cerca de 1 Log UFC após simulação gástrica por 120 minutos. Em relação a exposição ao suco intestinal simulado, observaram queda de aproximadamente 2,5 Log UFC após 2 horas, exibindo menor resistência que as observadas por este estudo. De Prisco, Maresca, Ongeng and Mauriello (2015) relatam que não observaram nenhuma redução expressiva na viabilidade de *L. reuteri*, encapsulados com alginato-quitosana, quando submetidos a simulações gástrica (pH 2,5; pepsina) e intestinal (Sais biliares). Pode-se concluir que capsulas de alginato revestidas de quitosana mantém elevada viabilidade quando submetidas as condições gastrointestinais *in vitro*.

Microesferas formadas com alginato de sódio e carbonato de cálcio, como as deste estudo, apresentam ótimas propriedades mecânicas e estrutura mais densa, diminuindo a porosidade (Cai et al., 2014). A quitosana, utilizada como polímero de revestimento, fornece uma proteção adicional ao material encapsulado, pois, por possuir carga positiva,

forma um complexo insolúvel com o alginato, originando uma superfície semi-permeável (De Prisco, Maresca, Ongeng & Mauriello, 2015; Zou et al. 2011). Vale ressaltar também a teoria proposta por Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiv and Charalampopoulos (2012), que observaram que o efeito protetor das cápsulas, frente as condições adversas de baixo pH, pode ser devido ao fato dos polissacarídeos (alginato/quitosana) atuarem como tampão, aumentando o pH no interior da matriz a um nível menos nocivo para as bactérias. Deste modo, pode-se justificar os resultados deste estudo quanto a elevada viabilidade de *L. casei* encapsulado em condições gastrointestinais simuladas.

No que diz respeito as células livres adicionadas em sucos de fruta, pesquisas têm demonstrado, utilizando diferentes cepas probióticas, perda total da viabilidade já na simulação gástrica (Chaikham et al., 2012; Zou et al, 2011; Nualkaekul, Lenton, Cook, Khutoryanskiv, & Charalampopoulos, 2012; Trabelsi et al., 2013; Chávarri et al., 2010). O efeito da simulação gastrointestinal *in vitro* foi estudado Chaikham et al. (2012) que verificaram que células livres adicionadas a longan juice foram completamente eliminadas durante simulações gástricas (pH 1,4) após 1,5 horas para *L. acidophilus* e 1 hora para *L. casei*, fato este observado neste estudo apesar de utilizar diferente metodologia de simulação gastrointestinal. Diante das evidências, no que se refere a baixa sobrevivência de células livres em condições ácidas, como as do estômago, pesquisas tem concluído que somente probióticos microencapsulados tem a capacidade de manter a viabilidade em condições gastrointestinais (Chávarri et al., 2010; Trabelsi et al., 2013; Iyer & Kailasapathy, 2005).

Vale ressaltar que, existe um considerável corpo de evidências que mostra que mesmo as células probióticas mortas são capazes de produzir efeitos benéficos a saúde, no que se refere ao estímulo a respostas anti-inflamatórias e na modulação do sistema imunológico (Adams, 2010; Fang et al., 2014; Habil, Abate, Beal, & Foey, 2014; Kiso et al., 2013; Sang, Chang, Wang, Liu, & Jiang, 2015; Orlando et al., 2012).

Não foram observadas diferenças significantes na viabilidade, com relação ao tempo inicial e final de armazenamento durante exposição às condições gástricas e intestinais (Tabela 4). Pesquisas mostram que pH mais baixo durante o crescimento bacteriano induz uma maior tolerância a ambientes ácidos, a condições osmóticas e oxidativas (Hartke, Bouché, Giard, Benachour, & Auffray, 1996; Lorca & Font de Valdez, 2001; Van de Guchte, Chervaux, Smokvina, Ehrlich, & Maguin, 2002). Com base nesta hipótese, as

células estocadas na bebida de caju ácida por 28 dias, podem ter adquirido um certo grau de adaptação ao ambiente hostil, justificando, portanto, o fato do armazenamento não ter sido um fator interferente na sobrevivência do *L. casei* durante as condições gastrointestinais simuladas.

Estudo realizado por Champagne and Gardner (2008), é o único que também comparou o tempo de estocagem e a resistência das células às simulações gastrointestinais *in vitro*. Diferente dos resultados deste estudo, verificaram que a estocagem prévia por 35 dias a 4 °C, em diferentes sucos de frutas, resultou numa maior perda da viabilidade, cerca de 1.2 log UFC, após exposição por 2 horas ao suco gástrico simulado (pH 2,0).

3.5. Análise sensorial

A aceitação dos provadores quanto as bebidas de caju controle, com células microencapsuladas e livres de *L. casei* estão expostas na Tabela 5. De modo geral, as bebidas foram bem aceitas pelos provadores, visto que, as pontuações atribuídas em todos os aspectos analisados variaram entre 6 e 7, o que indica, pela escala hedônica, “Gostar ligeiramente” a “Gostar moderadamente”.

Não foram observadas diferenças entre os parâmetros de aparência, aroma e sabor para as três amostras analisadas. O que está de acordo com os resultados obtidos quanto as características físico-químicas, uma vez que os valores de pH, acidez e °Brix mostraram-se estáveis, indicando que a bebida não foi fermentada, refletindo, portanto, na manutenção dos parâmetros organolépticos. Vale ressaltar que a bebida com células livres não diferiu em nenhum parâmetro analisado da amostra controle.

A bebida contendo microcápsulas foi significativamente diferente, no que se refere a textura, quando comparada com as amostras controle e com células livres (Tabela 5). Os provadores perceberam a presença das microesferas, contudo, a pontuação para textura e impressão global foram maiores que 6, indicando, portanto, aceitação pelos provadores. Resultados semelhantes aos descritos por García-Ceja, Mani-López, Palou and López-Malo (2015), que relatam que os julgadores perceberam imediatamente as cápsulas (2,08 mm) em néctar de pêssego, ainda assim as bebidas tiveram boa aceitação (score > 6). Estes autores descrevem ainda que o flavor e aparência global não foram afetados pela presença das cápsulas de alginato/quitosana, o que está de acordo com este estudo.

Krasaekoopt e Kitsawad (2010) mostraram que a adição de cápsulas de probióticos (0,1 – 0,2 mm) influenciou a qualidade sensorial das bebidas, pela presença de partículas dispersas e por causar dificuldade de deglutição. Apesar disto, mais de 80% dos provadores aceitaram as bebidas, dando scores para textura e preferência global de 6.6 e 6.7 para suco de laranja; e 6.8 e 6.9 para suco de uva, exibindo um padrão de pontuação semelhante ao obtido por este estudo.

A literatura indica que cápsulas de alginato apresentando tamanho superior a 1 mm podem alterar a textura dos alimentos e se o tamanho for inferior a 100 μm não protegem significativamente as culturas na presença do suco gástrico, em comparação com as células livres (Hansen et al., 2002). Vale ressaltar que neste estudo o diâmetro médio das esferas foi de 205,2 μm e mesmo assim foram detectadas pelos provadores.

As pontuações médias obtidas para o teste de intenção de compra, descrito na Tabela 5, apontaram que os provadores comprariam o produto controle e o com células livres (Score > 4), porém a maioria indicou que teriam dúvidas se adquiririam a bebida com microcápsulas (Score < 4). Krasaekoopt e Kitsawad (2010), relatam que mais de 86% dos participantes mostram-se dispostos a adquirir os sucos de laranja e uva com probióticos encapsulados, devido as propriedades relacionadas a saúde, refletindo a existência de um mercado potencial para sucos de frutas contendo probióticos.

O teste de ordenação de preferência indicou que a amostra controle e com células livres permaneceram como as bebidas que mais agradaram, seguidas pelo suco com microcápsulas ($p < 0,01$; teste de Friedman). Contudo, é importante ressaltar que 24% dos provadores preferiram a bebida com microcápsulas, o que foi atribuído a semelhança a um suco caseiro e natural, pois as esferas foram associadas a partículas de caju dispersas na bebida.

Dados da literatura são escassos no que diz respeito as análises sensoriais de bebidas de frutas adicionadas de probióticos encapsulados, dispondo apenas dos dois estudos utilizados nesta discussão. Em se tratando de bebidas de frutas com probióticos livres só existem trabalhos avaliando a aceitação de bebidas fermentadas, logo este trabalho vem a contribuir com informações adicionais para área.

4. Conclusão

A bebida de caju é um substrato favorável à manutenção de células de *L. casei* livre e microencapsulado durante armazenamento sob refrigeração por até 28 dias, podendo ser considerada uma bebida com propriedades funcionais. O método de emulsão foi efetivo na formação de microesferas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, proporcionando uma maior resistência as células de *L. casei* aprisionadas, principalmente durante as simulações gastrointestinais, uma vez que houve perda total da viabilidade dos microrganismos livres. A adição de *L. casei* na forma livre ou microencapsulada não alterou as características inerentes da bebida padrão (sem probióticos), com exceção do pH que exibiu um aumento pela adição de microesferas. A aceitação das bebidas pelos provadores foi positiva, apesar das microesferas terem sido percebidas.

Referências

- Adams, C. A. (2010). The probiotic paradox: live and dead cells are biological response modifiers. *Nutrition Research Review*, 23, 37 – 46.
- Akinwale, T. O., Olubamiwa, O., & Ajav, E. A. (2001). Cottage processing of cashew apple juice in Nigeria: physico-chemical and sensory evaluation of product. *The Journal of Food Technology in Africa*, 6, 56-58.
- Anekella, K., & Orsat V. (2013). Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 50, 17 – 24.
- Antunes, A. E. C., Liserre, A. M., Coelho, A. L. A., Menezes, C. R., Moreno, I., Yotsuyanagi, K., & Azambuja, N. C. (2013). Acerola nectar with added microencapsulation probiotic. *LWT - Food Science and Technology*, 54, 125-131.
- Anvisa, Brazilian Agency of Sanitary surveillance. (2001). Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/a47bab8047458b909541d53fbc4c6735/RDC_12_2001.pdf?MOD=AJPERES> Accessed 14.04.15.
- Anvisa, Brazilian Agency of Sanitary surveillance. (2002). Food with health claims, new food/ingredientes, bioactive compounds and probiotics. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.html> Accessed 04.04.15.
- AOAC. (2003). Official methods of analysis (17th ed., 2nd rev). Gaithersburg: Association of Official Analytical Chemists.
- Assunção, R. B., & Mercadante, A. Z. (2003). Carotenoids and ascorbic acid composition from commercial products of cashew apple (*Annona occidenale L.*). *Journal of Food Composition and Analysis*, 16, 647-657.
- Bakr, S. A. (2015). The potencial applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 4, 423-431.
- Cai, S., Zhao, M., Fang, Y., Nishinari, K., Phillips, G. O., & Fatang, J. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via

emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. *Food Hydrocolloids*, 39, 295-300.

Cavalheiro, C. P., Ruiz-Capillas, C., Herrero, A. M., Jiménez-Colmenero, F., Menezes, C. R., & Fries, L. L. M. (2015). Application of probiotic delivery systems in meat products. *Trends in Food Science & Technology*, 46, 120 – 131.

Chaikham, P., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., Supraditareporn, D., Chokiatiroted, E., & Wielee, T. V. (2012). Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. [*Journal of the Science of Food and Agriculture*](#), 93, 2229 – 2238.

Champagne, C. P., & Garder, N. J. (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequeute survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*, 41, 539-543.

Champagne, C. P., Raymond, Y., Guertin, N., & Bélanger, G. (2015). Effects of storage conditions, microencapsulation and inclusion in chocolate particles on the stability of probiotic bactéria in ice cream. *International Dairy Journal*, 47, 109-117.

Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27-35.

Chávarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142, 185-189.

Cheng, C. P., Tsai, S. W., Chiu, C. C., Pan, T. M., & Tsai, T. U. (2013). The effect of probiotic-fermented soy milk on enhancing the no-mediated vascular relaxation factors. *Journal of the Science o Food and Agriculture*, 93, 1219 – 1225.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56 – 67.

- Cuello-Gardia, C. A., Brozek, J. L., Fiocchi, A., Pawankar, R., Yepes-Nunez, J. J., Terracciano, L., Gandhi, S., Agarwal, A., Zhang, Y., & Schunemann, H. J. (2015). Probiotics for the prevention of allergy: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 136, 952 – 961.
- De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*, 48, 27 – 39.
- De Prisco, A., Maresca, D., Ongeng, D., & Mauriello, G. (2015). Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. *LWT - Food Science and Technology*, 61, 452-462.
- Ding, W. K., & Shah, N. P. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in Orange and apple juices. *International Food Research Journal*, 15, 219-232.
- Downes, F.P., & Ito, K. (2001). Compendium of methods for the microbiological examination of foods (4th ed.). Washington: American, Public Health Association (APHA), 676.
- Ejathed, H., Nia, J. M., Rad, A. H., Niafar, M., Jafarabadi, M., & Mofid, V. (2012). The effects of probiotics yoghurt consumption on blood pressure and serum lipids in type 2 diabetic patients: randomized clinical trial. *Iranian Journal of Nutrition Sciences & Food Technology*, 6, 1 – 12.
- Etchepare, M. A., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, E. M. M., Barin, J. S., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, 21, 321 – 329.
- Fahimdanesh, M., Mohammadi, N., Ahai, H., Zanjani, M. A. K., Hargaloni, F. Z., & Behrouznasab, K. (2012). Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. *African Journal of Microbiology Research*, 6, 6853 – 6858.
- Fang, S. B., Shih, H., Huang, C., Li, L., Chen, C., & Fang, H. (2014). Live and heat-killed *Lactobacillus rhamnosus* GG upregulate gene expression of pro-inflammatory

cytokines in 5-fluorouracil-pretreated Caco-2 cells. *Supportive Care in Cancer*, 22, 1647 – 1654.

FAO/WHO. (2002). Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. <<ftp://ftp.fao.org/es/esn/food/wgreport2.pdf>> Accessed 03.05.15.

FAO/WHO. (2015). FAOSTAT database of the food and agriculture organization of the United Nations. Production Crops. <<http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx>> Accessed 15.12.15.

Fontes, C. P. M. L., Silveira, M. S., Guilherme, A. A., Fernandes, F. A. N., & Rodrigues, S. (2013). Substitution of yeast by ammonium sulfate for manitol production in cashew apple juice. *Biocatalysis and agricultural Biotechnology*, 2, 69 – 75.

García-Ceja, A., Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2015). Viability during refrigerated storage in selected food products and during simulated gastrointestinal conditions of individual and combined lactobacilli encapsulated in alginate or alginate-chitosan. *LWT - Food Science and Technology*, 63, 482 - 489.

Global probiotics Market (dietary supplements, animal feed, foods & beverages) – Industry size, share, trends, analysis, growth and forecast, 2014 – 2020 (transparency Market Research). <<http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>> Accessed 10.01.16.

Habil, N., Abate, W., Beal, J., & Foey, A. D. (2014). Heat-killed probiotic bacteria differentially regulate colonic epithelial cell production of human β -defensin-2: dependence on inflammatory cytokines. *Beneficial Microbes*, 5, 483 – 495.

Hansen, L. T., Allan-Woitas, P. M., Jin, Y. L., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 19, 35-45.

Hartke, A., Bouché, S., Giard, J. C., Benachour, A., Boutibonnes, P., & Auffray, Y. (1996). The lactic acid stress response of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis*. *Current Microbiology*, 33, 194 – 199.

He, T., Priebe, M. G. Zhong, Y., Huang, C., Harmsen, H. J. M., Raangs, G. C., Antoine, J. M., Welling, G. W., & Vonk, R. J. (2008). Effects of yogurt and bifidobacteria

supplementation on the colonic microbiota in lactose-intolerant subjects. *Journal of Applied Microbiology*, 104, 595 – 604.

Instituto Adolfo Lutz (2008). Métodos físico-químicos para análise de alimentos (4th ed.). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020.

Iyer, C., & Kailasapathy, K. (2005). Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under *In Vitro* Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. *Journal of Food Science*, 70, 18-23.

Kailasapathy, K., & Chin, J. C. (2000). Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* ssp. *Immunology and Cell biology*, 78, 80-88.

Kato, K., Mizuno, S., Umesaki, Y., Ishii, Y., Sugitani, M., Imaoka, A., Otsuka, M., Hasunuma, O., Kirimara, R., Iwasaki, A., & Arakawa, Y. (2004). Randomized placebo-controlled trial assessing the effect of bifidobacteria-fermented milk on active ulcerative colitis. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 20, 1133 – 1141.

Kent, R. M., & Doherty, S. B. (2014). Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food Research International*, 64, 567 – 576.

Kingwatee, N., Apichartsrangkoon, A., Chaikham, P., Worametrachanon, S., Techarung, J., & Pankasemsuk, T. (2015). Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in Lychee juice varied carrier materials. *LWT - Food Science and Technology*, 62, 847-853.

Kiso, M., Takano, R., Sakabe, S., Katsura, H., Shinya, K., Uraki, R., Watanabe, S., Saito, H., Toba, M., Kohda, N., & Kawaoka, Y. (2013). Protective efficacy of orally administered, heat-killed *Lactobacillus pentosus* b240 against influenza A virus. *Scientific Reports*, 3, 1563 – 1571.

Krasaekoopt, W., & Kitsawad, K. (2010). Sensory characteristics consumer acceptance of fruit juice containing probiotics beads in Thailand. *AU Journal and Technology*, 14, 33 – 38.

Krasaekoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads

coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 761-766.

Lavinas, F. C., Almeida, N. C., Miguel, M. A. L., Lopes, M. L. M., & Valente-Mesquita, V. L. (2006). Study of the chemical and microbiological stability of cashew apple juice in different storage conditions. *Food Science and Technology*, 26, 875-883.

Lee, H. S., & Coates, G. A. (2003). Effect of thermal pasteurization on valencia orange juice color and pigments. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 36, 153 – 156.

Leolorspoen, N., Wongsasulak, S., Yoovidhya, T., & Devahastin, S. (2014). Microencapsulação of *Lactobacillus acidophilus* in zein-alginate core-shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods*, 7, 342 – 349.

Lorca, G. L., & Font de Valdez, G. (2001). A low-pH-inductible, stationary-phase acid tolerance response in *Lactobacillus acidophilus* CRL 639. *Current Microbiology*, 42, 21 – 25.

Mani-López, E., Palou, E., & López-Malo, A. (2014). Probiotic viability and storage stability of yogurts and fermented milks prepared with several mixtures of lactic acid bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97, 2578 – 2590.

Martín, M. J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different Technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 27, 15-25.

Nualkaekul, S., & Charalampopoulos, D. (2011). Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. *International Journal of Food Microbiology*, 46, 111-117.

Nualkaekul, S., Cook, M. T., Khutoryansky, V. V., & Charalampopoulos, D. (2013). Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit. *Food Research International*, 53, 304 – 311.

Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, M. T., Khutoryanskiv, V. V., & Charalampopoulos, D. (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1281-1287.

- Nuallkaekul, S., Salmeron, I., & Charalampopoulos, D. (2011). Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. *Food Chemistry*, 129, 1037-1044.
- Orlando, A., Refolo, M. G., Messa, C., Amati, L., Lavermicocca, P., Guerra, V., & Russo, F. (2012). Antiproliferative and Proapoptotic Effects of Viable or Heat-Killed *Lactobacillus paracasei* IMPC2.1 and *Lactobacillus rhamnosus* GG in HGC-27 Gastric and DLD-1 Colon Cell Lines. *Nutrition and Cancer*, 64, 1103 – 1111.
- Pereira, A. L. F., Maciel, T. C., & Rodrigues, S. (2011). Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*, 44, 1276-1283.
- Pinheiro, A. M., Fernandes, A. G., Fai, A. E. C., Prado, G. M., Sousa, P. H. M., & Maia, G. A. (2006). Avaliação química, físico-química e microbiológica de sucos de frutas integrais: abacaxi, caju e maracujá. *Ciência e Tecnologia dos Alimentos*, 26, 98 – 103.
- Rajkumar, H., Kumar, M., Das, N., Kumar, S. N., Challa, H. R., & Nagpal, R. (2015). Effect of probiotic *L. salivarius* UBL S22 and prebiotic fructo-oligosaccharide on sérum lipids, inflammatory markers, insulin sensitivity, and gut bacteria in healthy Young volunteers: A randomized controlled singleblind pilot study. *Journal of Cardiovascular Pharmacology and Therapeutics*, 20, 289 – 298.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes, A. M., Pintado, M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, M. H., Rocha-Santos, T., & Freitas, A. C. (2012). Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. *Food and Bioprocess Technology*, 5, 2748-2757.
- Saarela, M., Virkajarvi, L., Nohynek, L., Vaari, A., & Matto, J. (2006). Fibres as carries for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112, 171-178.
- Salminen, S., Kneifel, W., & Ouwehand, A. C. (2016). Probiotics: Application of probiotics in dairy products: established and potential benefits. *Food Science*, 24, 234 – 241.

- Sang, L., Chang, B., Wang, B., Liu, W., & Jiang, M. (2015). Live and heat-killed probiotic: effects on chronic experimental colitis induced by dextran sulfate. *International Journal of Clinical and Experimental Medicine*, 8, 20072 – 20078.
- Schweiggert, R. M., Vargas, E., Conrad, J., Hempel, J., Gras, C. G., Ziegler, J. U., Mayer, A., Jiménez, V., Esquivel, P., & Carle, R. (2016). Carotenoids, carotenoid esters, and antocyanins of yellow-, orange-, and red- peeled cashew apples (*Anarcadium occidentale* L.). *Food Chemistry*, 200, 274 – 282.
- Sheehan, V. M., Ross, P., & Fitzgerald, G. F. (2007). Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8, 279-284.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostom, T., & Bhandari, B. (2012). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162 – 168.
- Song, H., Yu, W., Liu, X., & Ma, X. (2014). Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate–chitosan microencapsulated low density cells. *Carbohydrate Polymers*, 108, 10 – 16.
- Soukoulis, C., Yonekura, L., Gan, H. H., Behboudi-Jobbehdar, S., Parmenter, C., & Fisk, I. (2014). Probiotic edible films as a new strategy for developing functional bakery products: the case of pan bread. *Food Hydrocolloids*, 39, 231 – 242.
- Strizker, J., Weibel, S., Hill, P. J., Oelschlager, T. A., Goebel, W., & Szalay, A. A. (2007). Tumor-specific colonization, tissue distribution, and gene induction by probiotic *Escherichia coli* Nissle 1917 in live mice. *International Journal of Medical Microbiology*, 297, 151- 162.
- TACO. (2011). Tabela brasileira de composição de alimentos. Campinas: NEPA-UNICAMP.<http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_4_edicao_ampliada_e_revisada.pdf?arquivo=taco_4_versao_ampliada_e_revisada.pdf> Accessed 02.04.14.
- Tavera-Quiroz, M. J., Romano, N., Mobili, P., Pinotti, A., Gómez-Zavaglia, A., & Bertola, N. (2015). Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of

methycellulose containing *Lactobacillus plantarum*. *Journal of Functional Foods*, 16, 164 – 173.

Trabelsi, I., Bejar, W., Ayadi, D., Chouayekh, H., Kammoun, R., Bejar, S., & Salah, B. (2013). Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. *International Journal of Biological Macromolecules*, 61, 36 - 42.

Tripathy, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225 – 241.

Van de Guchte, M., Serror, P., Chervaux, C., Smokvina, T., Ehrlich, S., & Maguin, E. (2002). Stressresponses in lactic acid bacteria. *Antonie van Leeuwenhoek*, 82, 187 – 216.

Vergara, C. M. A. C., Honorato, T. L., Maia, G. A., & Rodrigues, S. (2010). Prebiotic effect of fermented cashew apple (*Anacardium occidentale L.*) juice. *LWT - Food Science and Technology*, 43, 141-145.

Würth, R., Hörmannspurger, G., Wilke, J., Foerst, P., Haller, D., & Kulozik, U. (2015). Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. *Journal of Functional Food*, 15, 116 – 125.

Ying, D.Y., Schawander, S., Weerakkody, R., Sanguansri, L., Gantenbein-Demarchi, C., & Augustin, M. A. (2013). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: probiotic survival in fruit juice. *Journal of Functional Foods*, 5, 98-105.

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. *Journal of Functional Food*, 6, 205 – 2014.

Zhao, M., Qu, F., Cai, S., Fang, Y., Nishinari, K., phillips, G. O., & Jiang, F. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686: Correlation between bacteria survivability and physical properties of microcapsules. *Food Biophysics*, 10, 292-299.

Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H. P., Zhang, H., & Chen, W. (2011). Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science & Technology*, 46, 1672-1678.

Tabelas e Figuras

Tabela 1. Resultado das análises físico-químicas obtidos durante estocagem das bebidas de caju controle (C), com microesferas (M) ou células livres (L) de *L. casei*.

Parâmetro	Time (days)	C	M	L	p valor*
pH	0	4,51 ± 0,05 b	4,65 ± 0,05 a	4,51 ± 0,05 b	0,049†
	7	4,50 ± 0,05 b	4,65 ± 0,05 a	4,50 ± 0,05 b	0,048†
	14	4,50 ± 0,05 b	4,64 ± 0,05 a	4,50 ± 0,00 b	0,032†
	21	4,50 ± 0,05 b	4,65 ± 0,05 a	4,50 ± 0,00 b	0,035†
	28	4,50 ± 0,05 b	4,64 ± 0,05 a	4,50 ± 0,05 b	0,032†
Acidez (g ác. cítrico/100 g)	0	0,372 ± 0,008 a	0,370 ± 0,004 a	0,382 ± 0,007 a	0,158
	7	0,385 ± 0,001 a	0,376 ± 0,005 a	0,378 ± 0,011 a	0,358
	14	0,373 ± 0,006 a	0,386 ± 0,003 a	0,379 ± 0,004 a	0,052
	21	0,384 ± 0,003 a	0,372 ± 0,002 a	0,382 ± 0,009 a	0,117
	28	0,378 ± 0,010 a	0,375 ± 0,009 a	0,381 ± 0,005 a	0,696
Sólidos solúveis (°Brix)	0	11,02 ± 0,005 a	11,03 ± 0,021 a	10,96 ± 0,055 a	0,331
	7	11,02 ± 0,020 a	11,02 ± 0,020 a	11,00 ± 0,011 a	0,395
	14	11,00 ± 0,005 a	11,18 ± 0,011 a	11,19 ± 0,010 a	0,062
	21	11,12 ± 0,005 a	11,18 ± 0,015 a	11,19 ± 0,005 a	0,097
	28	11,02 ± 0,026 a	11,19 ± 0,010 a	11,19 ± 0,010 a	0,063

Amostras seguidas pelas mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Médias e desvios padrão para n = 3. *Valor de p calculado pelo teste Kruskal-Wallis para pH e Anova one way e posterior teste de Tukey foram utilizados para determinação do valor de p para acidez e sólidos solúveis.

†Estatisticamente significante.

Tabela 2. Determinação do conteúdo de ácido ascórbico nas bebidas de caju controle, com *L. casei* livre ou microencapsulados durante armazenamento refrigerado (4°C).

Tempo (dias)	C	M	L
0	296,48 ± 0,67 A	296,88 ± 0,72 A	296,89 ± 0,80 A
7	293,66 ± 1,25 B	293,37 ± 1,13 B	293,10 ± 1,52 B
14	287,18 ± 0,74 C	288,17 ± 0,76 C	287,11 ± 0,63 C
21	277,03 ± 0,89 D	283,51 ± 0,37 D	282,83 ± 0,86 D
28	218,67 ± 1,21 E	218,56 ± 0,75 E	217,50 ± 0,89 E

Amostras seguidas pelas mesmas letras maiúsculas na mesma coluna não diferem ao nível de 5%. Médias e desvios padrão para n = 3. Anova one way e teste de Tukey.

Tabela 3. Diferença total de cor (ΔE^*) das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de *L. casei* (L) durante estocagem.

Tempo (dias)	C	M	L
7	0,55 ± 0,28 a B	0,49 ± 0,12 a B	0,58 ± 0,06 a B
14	0,93 ± 0,01 a B	0,75 ± 0,25 a B	0,77 ± 0,06 a B
21	1,48 ± 0,30 a A	1,20 ± 0,14 a A	1,19 ± 0,10 a A
28	1,54 ± 0,16 a A	1,29 ± 0,14 a A	1,37 ± 0,15 a A

Amostras (média ± desvio padrão) seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Amostras (média ± desvio padrão) seguidas pelas mesmas letras maiúsculas, na mesma coluna, não diferem ao nível de 5%. Médias e desvio padrão para n = 3. Anova one way e teste de Tukey.

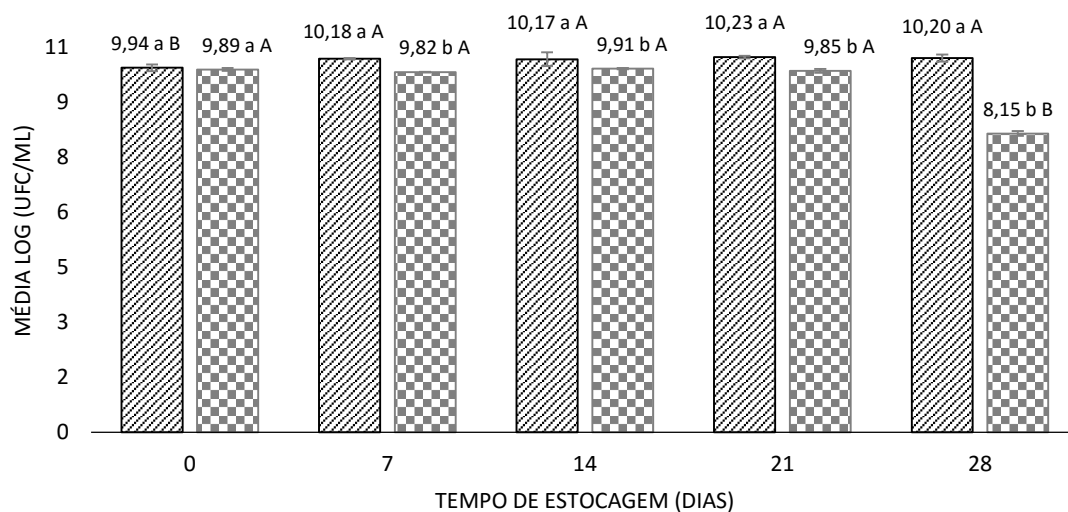


Figura 1. Média das contagens (log UFC/mL) de *L. casei* na forma de microesferas (▨) e células livres (▤) na bebida de caju durante estocagem refrigerada ($4\pm 1^{\circ}\text{C}$).

Resultados seguidos pelas mesmas letras minúsculas não diferem ao nível de 5% a respeito ao tratamento.

Valores acompanhados da mesma letra maiúscula não diferem ao nível de 5% com relação ao tempo. Anova one way e test de Tukey.

Tabela 4. Contagem de células viáveis (Média \pm desvio padrão) e taxa de sobrevivência do *L. casei* microencapsulado (M) e Livre (F), no tempo inicial (dia zero - D0) e no período final de armazenamento (dia 28 – D28), durante exposição ao suco gástrico simulado (SGJ) ou suco intestinal simulado (SIJ).

Incubation time (min)	M – D0		M – D28		F – D0		F – D28	
	Log UFC/mL ¹	Survival (%) ²	Log UFC/mL	Survival (%)	Log UFC/mL	Survival (%)	Log UFC/mL	Survival (%)
SGJ								
0	9,69 \pm 0,23 a A	100%	9,96 \pm 0,16 a A	100%	9,61 \pm 0,06 a A	100%	8,92 \pm 0,03 b A	100%
60	9,17 \pm 0,26 a A	93,3%	9,25 \pm 0,40 a A	98,5%	5,56 \pm 0,03 b B	57,8%	2,58 \pm 0,06 c B	29,1%
120	8,42 \pm 0,12 a B	86,5%	8,38 \pm 0,30 a B	84,3%	ND ³	ND	ND	ND
SIJ								
0	9,79 \pm 0,04 a A	100%	9,74 \pm 0,14 a A	100%	9,62 \pm 0,12 a A	100%	8,85 \pm 0,10 b A	100%
60	9,59 \pm 0,10 a A	97,5%	9,43 \pm 0,39 a AB	96,8%	5,80 \pm 0,16 b B	59,5%	5,28 \pm 0,42 b B	60,6%
120	9,24 \pm 0,04 a B	94,3%	9,16 \pm 0,14 a B	94,0%	3,84 \pm 0,10 b C	40,2%	3,25 \pm 0,43 b C	34,9%

Valores (médias \pm desvio padrão) seguidos pela mesma letra minúscula na mesma linha não diferem ao nível de 5%. Valores (médias \pm desvio padrão) acompanhados pela mesma letra maiúscula na mesma coluna não diferem ao nível de 5%, separadamente para SGJ e SIJ. Anova one way e teste de Tukey.

¹Média \pm desvio padrão para n = 2.

²Calculado pela divisão da população de células viáveis final pela inicial e multiplicado por 100 para obter o valor percentual.

³Não detectado (níveis abaixo de 10² UFC/mL).

Tabela 5. Médias das pontuações obtidas no teste de aceitação das bebidas de caju controle (C), com adição de microesferas (M) e células livres de *L. casei* (L).

	Aparência	Aroma	Sabor	Textura	Impressão Global	Intenção de Compra
C	7,94 ± 1,09 a	7,68 ± 1,15 a	7,58 ± 1,51 a	7,50 ± 1,48 a	7,62 ± 1,45 a	4,42 ± 0,99 a
M	7,70 ± 1,16 a	7,53 ± 1,59 a	7,44 ± 1,71 a	6,33 ± 2,00 b	6,77 ± 1,71 b	3,51 ± 1,23 c
L	7,83 ± 1,35 a	7,45 ± 1,46 a	7,52 ± 1,86 a	7,33 ± 1,33 a	7,14 ± 1,58 ab	4,02 ± 1,20 b

Médias e desvio padrão para n = 100. Amostras (média ± desvio padrão) seguidos pelas mesmas letras minúsculas na mesma coluna não diferem ao nível de 5%. Anova one way e teste de Tukey.

ANEXOS

ANEXO A. Aprovação da pesquisa pelo Comitê de Ética do CCS/UFPE

Comitê de Ética
em Pesquisa
Envolvendo
Serres Humanos

CCS - CCS - UFPE

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Produção de bebidas funcionais de suco de caju com *Lactobacillus casei* livre e microencapsulados com Alginato de Cálcio-quitosana.

Pesquisador: Bruna Lúcia de Mendonça Soares

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43646015.8.0000.5208

Instituição Proponente: CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.052.814

Data da Relatoria: 06/05/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto de Mestrado da Pós-Graduação em Nutrição, que tem como Orientadora a Prof. Tânia Lucia Montenegro Stamford. A pesquisa é na área de tecnologia de alimentos e, se propõe a produzir uma bebida funcional à base de suco de caju adicionada de *Lactobacillus casei*, considerada bactéria probiótica de grande uso das dietas de patologias específicas e como parte de uma alimentação saudável.

Objetivo da Pesquisa:

Primário:

Produzir uma bebida funcional à base de caju adicionada de *Lactobacillus casei*, livre ou microencapsulados com matriz alginato de cálcio/quitosana, para investigar o efeito da encapsulação na sobrevivência dos probióticos.

Secundário:

Produzir e caracterizar as microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo o probiótico *L. casei* (DN114 001); produzir e caracterizar o suco de caju funcional com acréscimo de *L. casei* livres e microencapsulados; determinar a viabilidade do *L. casei*,



microencapsuladas ou não, durante 28 dias de armazenamento; testar a sobrevivência do

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



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

L. casei, microencapsulados ou não, simulando condições gastrointestinais in vitro; determinar as Propriedades biológicas e os parâmetros de cor L* (luminosidade), a* e b* (coordenadas de cromaticidade) das bebidas funcionais contendo L. casei microencapsulado ou não; analisar sensorialmente os atributos de qualidade para bebidas funcionais formulados durante o período de armazenamento.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Mínimos, bem delineados no projeto e TCLE.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto de grande aplicabilidade imediata na nutrição clínica e, ainda na prevenção de algumas patologias. Atualmente a indústria de alimentos se mostra muito escassa quanto aos alimentos probióticos, principalmente os regionais.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados em qualidade e quantidade.

Recomendações:

Nenhuma

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Nenhuma

Situação do Parecer:


Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

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

Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos CEP-CCS-UFPE	UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE / UFPE-	
---	---	---

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

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

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

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

RECIFE, 07 de Maio de 2015

Assinado por:

Gisele Cristina Sena da Silva Pinho
(Coordenador)

--

ANEXO B. Instruções aos autores – Trends in Food Science & Technology (Artigo de Revisão)



TRENDS IN FOOD SCIENCE & TECHNOLOGY

An official journal of the European Federation of Food Science and Technology (EFFoST), and the International Union of Food Science and Technology (IUFoST)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.1
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 0924-2244

DESCRIPTION

Trends in Food Science & Technology is one of the premier international peer-reviewed journal publishing critical reviews and viewpoints of current technology, food science and human nutrition. Its role is to fill the gap between the specialized primary journals and general trade magazines by focusing on the most promising new research developments and their current and potential food industry applications in a readable, scientifically rigorous way.

Topics include new or novel raw materials including bioactive compounds, ingredients and technologies; molecular, micro- and macro-structure; new developments in food engineering; rapid techniques for online control; novel processing and packaging technologies; advanced biotechnological and nanoscience developments and applications in food research; quality assurance methods and application of -omics techniques; risk assessment of both biological and non-biological hazards in food; food allergies and intolerances; food function and relationships between diet and disease; and consumer attitudes to food and risk assessment.

Issues include a selection of Reviews, Viewpoints, Conference Reports and Book Reviews, plus a calendar of upcoming conferences, courses and exhibitions. It does not publish research papers.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click here for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Food scientists and technologists, R & D managers, and consultants to the industry

concerned with the application of science in the development of new and existing food products, their processing, storage and marketability.

IMPACT FACTOR

2014: 4.651 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Trends in Food Science & Technology is one of the premier international peer-reviewed journals publishing critical reviews and commentaries on current technology, food science and human nutrition. Its role is to fill the gap between the specialized primary journals and general trade magazines by focusing on the most promising new research developments and their current and potential food industry applications in a readable, scientifically rigorous way. Topics include new or novel raw materials including bioactive compounds, ingredients and technologies; molecular, micro- and macro-structure; new developments in food engineering; rapid techniques for online control; novel processing and packaging technologies; advanced bio technological and nanoscience developments and applications in food research; quality assurance methods and application of -omics techniques; risk assessment of both biological and non-biological hazards in food; food allergies and intolerances; food function and relationships between diet and disease; and consumer attitudes to food and risk assessment.

The majority of articles are specially commissioned by the Editors. However, we do welcome ideas from readers for articles on new trends and controversies at the leading edge of food research. Questions regarding content of a proposed submission can be directed to the Executive Editor: Dr Paul Finglas, Institute of Food Research, Norwich Research Park, Colney, Norwich NR4 7UA, UK. E-mail: finglasp59@gmail.com

Types of paper

Ideas are welcomed for the following types of article: Reviews; Commentaries; Conference reports; Letters to the Editor.

Reviews focus on promising areas of food research that are advancing rapidly or in need of re-review in the light of recent progress in the underlying sciences or changing priorities within the food industry. More concise than conventional reviews, they should focus on the latest developments, their potential industrial applications and future research needs. (Must not exceed 10,000 words; seven Tables/ Figures.)

The Commentary section provides a forum for personal opinions, observations or hypotheses, to present new perspectives and advance understanding of controversial issues by provoking debate and comment. Key arguments should, however, be supported by published references. (Must not exceed 5000 words; 5 Tables/Figures.)

Conference Reports highlight and assess important new developments presented at relevant conferences worldwide. If you would like to be a reporter for TIFS, please contact the Editor before the meeting, enclosing a copy of the latest conference circular.

Letters to the Editor concerned with issues raised by articles recently published in the journal or by recent developments in the food sciences are welcomed. These may be submitted informally to the Editor at any time.

Please note that Trends in Food Science and Technology does not accept research papers.

All articles should be international in scope and aimed at a broad audience of academic and industrial-based food scientists. Please note that commissioning does not guarantee acceptance; all Reviews and Commentary articles, are subjected to editorial and independent peer review by at least two international experts in the appropriate field to ensure that they are balanced and scientifically accurate.

Manuscripts that fail to follow the guidelines set out in this Guide for Authors will be returned to the authors without review.

Special Issues

The journal welcomes proposals for special issues to be published from relevant conferences, EU and other projects, and relevant themes/hot topics.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere including electronically in the same form, including electronically, in English or in any other language, without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection software iThenticate. See also <http://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution Subscription
- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).
- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following

Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3000, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <http://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may

require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of five potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Follow this order when typing manuscripts: Title, Authors, Affiliations, Abstract, Main text, Future Trends or Conclusion (indicating current hypotheses, potential applications and likely future trends and research needs), References, Figure Captions, Figures and then Tables. Do not import the Figures or Tables into your text.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lowercase superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.

- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

Structured Abstracts - a new requirement for submissions as of 1 April 2015

Review and Commentary articles for TIFS should contain a structured abstract, subdivided into sections entitled "Background"; "Scope and Approach"; and "Key Findings and Conclusions". This structured abstract should provide the context or background for the review and why it was carried out. It should emphasize any new and important findings of the review. Structured abstracts should not exceed 250 words.

Here is an example of a structured abstract for a review article.

Background

Food poisoning related to sanitary problems is among the most widespread illnesses in the world. The non-hygienic preparation and handling of food in households accounts for a large number of foodborne disease outbreaks. These outbreak cases could be avoided if preventive behaviors were adopted during food preparation. Educational actions offer a preventive information strategy for reducing the cases of foodborne diseases in households.

Scope and Approach

In this review the importance of good practices for food handling in Brazilian households in order to control foodborne diseases are described. This study emphasizes the importance of foodborne disease control, starting with changing food handlers' habits to ensure that they use best practices in their own homes. Food handlers are the consumers and employees that are most aware of the activities linked to the food production chain.

Key Findings and Conclusions

Educational actions, in the form of a program of good food preparation practices in households, are of paramount relevance. Such programs should be developed with methodologies consistent with the target audience and should take into account the causes of possible failures. Furthermore, the school place is the ideal setting for early intervention in hygiene education, assuming that childhood is the best time for learning. Children are more open to changes in attitude and can take these habits into households, encouraging hygienic behaviors throughout the family. Dissemination of knowledge as early as possible in the schools is a concrete form of risk communication because it builds trust and credibility.

Keywords - new requirement for submissions as of 1 April 2015

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes. Examples of keywords are in bold in the sample structured abstract above.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI.

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website: <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. Formats

If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats

(note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below):
 EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

References

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a

reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link: <http://open.mendeley.com/use-citation-style/trends-in-food-science-and-technology>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-05615, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples: Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book:

Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article.

In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281-304). New York: E-Publishing Inc.

Reviews should not contain more than 100 references; Commentaries or Features should not exceed 50 references.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes)
- Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet) Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white
- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required. For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](#). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.

ANEXO C. Instruções aos autores – Journal of Functional Food (Artigo original)



JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS

Journal of Functional Foods is the official scientific journal of the [International Society for Nutraceuticals and Functional Foods \(ISNFF\)](#)

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

• Description	p.1
• Audience	p.1
• Impact Factor	p.2
• Abstracting and Indexing	p.2
• Editorial Board	p.2
• Guide for Authors	p.3



ISSN: 1756-4646

DESCRIPTION

The Journal of Functional Foods aims to bring together the results of fundamental and applied research into functional foods (ie those containing various factors to ensure or enhance health) and their development and commercialization in food products. The journal will cover (but will not be restricted to) the fields of plant bioactives; antioxidants and ageing; dietary fibre, prebiotics and functional starches; probiotics and probiotic functional foods; functional lipids; bioactive peptides; vitamins, minerals and botanicals and other dietary supplements; functional beverages and food products; and molecular nutrition and other relevant aspects of disease prevention and treatment.

Papers will cover such issues as new functional food bioactives; efficacy and safety of bioactive compounds and other functional food constituents using genomic technologies, bioassays and dynamic models; characterisation of functional foods and functional constituents with reference to product development; preparation of natural and synthetic ingredients for use in foods, supplements or premixes and improvement of ingredient quality; use of natural and synthetic ingredients in foods, supplements or premixes, effects of processing (including packaging, storage etc) on functionality and improvement of product quality; verification, quality control and traceability of natural and synthetic functional food ingredients and products; improvement of the quality of foods with inherent health benefits ; development and commercialisation of specific functional food products, supplements or functional ingredients; and the regulatory aspects of functional foods and related issues eg labelling, substantiation of health claims.

Benefits to authors

We also provide many author benefits, such as free PDFs, a liberal copyright policy, special discounts on Elsevier publications and much more. Please click [here](#) for more information on our [author services](#).

Please see our [Guide for Authors](#) for information on article submission. If you require any further information or help, please visit our support pages: <http://support.elsevier.com>

AUDIENCE

Academics, scientists, nutraceutical and functional foods industries

AUTHOR INFORMATION PACK 22 Jan 2016

IMPACT FACTOR

2014: 3.574 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2015

GUIDE FOR AUTHORS

INTRODUCTION

Journal of Functional Foods focuses on fundamental and applied research and functional foods product development and commercialization. The journal covers the fields of plant bioactives; antioxidants and ageing; dietary fibre, prebiotics and functional starches; probiotics and probiotic functional foods; functional lipids; bioactive peptides; vitamins, minerals and botanicals and other dietary supplements; functional beverages and food products; molecular nutrition and other relevant aspects of disease prevention and treatment.

Authors are encouraged to submit contributions on all types of functional foods, nutraceuticals and food supplements. The focus of the journal ranges from technical issues in the production of first-generation functional foods (e.g. vitamin supplements, fibre-enriched foods), and technology for the improvement of 'whole foods', to research in areas such as nutrigenomics, informing the next generation of functional foods.

ESSENTIALS TO FASTER HANDLING OF PAPERS

Do not contact the editor-in-chief to ask if your manuscript is suitable for submission to the journal. This is a decision you have to make. There is no pre-screening of papers outside the electronic system. All papers should be submitted via the electronic submission system. Regarding authorship, include only those who have meaningfully contributed to the work; others could be placed in the acknowledgement section. The number of authors on each paper is usually no more than 5. Papers that carry more authors names should consider having some in the Acknowledgement section, unless they have all made primary contributions to the design of the study, writing of the paper. For more information on authorship please refer to: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#authorship> Please number both the pages and lines; continuous line numbering is essential. Please prepare double-spaced text of your paper. Please use British spelling of terms. The presentation language must be adequate for submission to JFF as an English journal. If not done adequately, the manuscript may be rejected without review. An English language editing service is available through Elsevier at: <http://webshop.elsevier.com/languageservices/> When suggesting 3 potential reviewers for your paper, please note that: These should not be from your own institution. These cannot be all from your own country (no more than one be from the same country). These must be expert in the field and not suggested for other reasons (such as collaborators of any sort). Please note that your reviewer suggestions will not always be used as a first choice. Demonstrate relevance to the area of the interest to the journal mandate and to the field. Proper review and citation of important papers is essential. Novelty of the work and how it advances

knowledge in the field must be highlighted and explained both in the text of the manuscript and in the cover letter. Credit must be given to prior work explicitly or else quoting of sentences, paragraphs or tables without citation is prohibited and results in rejection of papers. It should be noted that all manuscripts are screened through anti-plagiarism software, and excessive reproduction of previously published text will result in rejection of manuscripts without review. Further information can be obtained from: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> Submission to more than one journal is a very serious breach of publication ethics and such papers will be rejected, as would be use of other authors' work or even your own without reference citation. Further information can be obtained from: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#writing-an-article> When using human or animal subjects, protocols as well as permission details must be provided. Further information can be found at: <http://www.elsevier.com/journal-authors/ethics#conducting-research>

Identification of procedures from other work must be provided in the text. Simple reference to a previous paper is insufficient and makes the paper a dependent one. For full papers the usual length is 7500 words (excluding references) with no more than 8 illustrations (tables plus figures). For short communication, 2500 words (excluding references) and a maximum of 4 illustrations (tables plus figures) is permitted. For review articles, it is best to keep them at 10,000-12,000 (excluding references) words. The usual number of references for full papers is about 40, for short communication 20-25 and for reviews may vary but usually up to 150. All tables, figures should be understandable without reference to the text and be able to stand alone; abbreviations must therefore be defined in table headings / footnotes and figure captions. Abbreviations should also be fully defined on first use in the abstract and the main text. The style of the Journal of Functional Foods for referencing, both in the text and at the end must be strictly followed. Please avoid using words that are not usually used or abbreviations that are confusing. Authors must define the starting materials and details of bioactives

responsible for the observed effects, both by identifying and quantifying them. Structure-activity relationships discussion is essential in most cases. All suppliers and manufacturers should be given with addresses (city, state or province and country), in the first place they appear. When responding to the queries in your paper by including explanations in the accompanying letter, please note that these are not seen by the readers of your paper when published. It is therefore essential that you include the relevant parts of such matters in the text of your manuscript, and identify the specific changes in revised manuscripts by line number and also colour highlighted if possible. When reporting oxidation, please note that the thiobarbituric acid (TBA) test or kits measuring it, do not provide evaluation of malondialdehyde (MDA). However, results are expressed as MDA equivalents. MDA may be determined using HPLC. Please use triacylglycerol, diacylglycerol and monoacylglycerol and not triglyceride, diglyceride and monoglyceride, respectively. The editor-in-chief or associate editors should not be contacted for purposes of the review process or otherwise unless there is a special circumstance. Problems associated with submission and technical issues should be addressed to Elsevier's staff. For retrieving of password and other related issues, you also need to contact the on-line service of Elsevier and not the editors. For assistance please visit: <http://help.elsevier.com/app/answers/list/p/7923>

Types of paper

Original research articles, review papers, perspective commentaries and opinion pieces, and rapid communications.

Research papers - original full-length research papers which have not been published previously, except in a preliminary form, and which should not exceed 7,500 words (including allowance for no more than 8 tables and illustrations). Review articles - will be accepted in areas of topical interest, will normally focus on literature published over the previous five years, and should not exceed 10,000 words (including allowance for no more than 6 tables and illustrations). Perspective commentaries and opinion pieces - These should be concise, on hot topics and describe cutting-edge developments and technologies. They should not exceed 2000 words. Rapid communications - Short communications of up to 3000 words, describing work that may be of a preliminary nature but which merits immediate publication.

BEFORE YOU BEGIN

Ethics in publishing

For information on Ethics in publishing and Ethical guidelines for journal publication see <https://www.elsevier.com/publishingethics> and <https://www.elsevier.com/journal-authors/ethics>.

Conflict of interest

All authors are requested to disclose any actual or potential conflict of interest including any financial, personal or other relationships with other people or organizations within three years of beginning the submitted work that could inappropriately influence, or be perceived to influence, their work. See also <https://www.elsevier.com/conflictsofinterest>. Further information and an example of a Conflict of Interest form can be found at: http://service.elsevier.com/app/answers/detail/a_id/286/supporthub/publishing.

Submission declaration and verification

Submission of an article implies that the work described has not been published previously (except in the form of an abstract or as part of a published lecture or academic thesis or as an electronic preprint, see <https://www.elsevier.com/sharingpolicy>), that it is not under consideration for publication elsewhere, that its publication is approved by all authors and tacitly or explicitly by the responsible authorities where the work was carried out, and that, if accepted, it will not be published elsewhere in the same form, in English or in any other language, including electronically without the written consent of the copyright-holder. To verify originality, your article may be checked by the originality detection service CrossCheck <https://www.elsevier.com/editors/plagdetect>.

Changes to authorship

Authors are expected to consider carefully the list and order of authors before submitting their manuscript and provide the definitive list of authors at the time of the original submission. Any addition, deletion or rearrangement of author names in the authorship list should be made only before the manuscript has been accepted and only if approved by the journal Editor. To request such a change, the Editor must receive the following from the corresponding author: (a) the reason for the change in author list and (b) written confirmation (e-mail, letter) from all authors that they agree with the addition, removal or rearrangement. In the case of addition or removal of authors, this includes confirmation from the author being added or removed.

Only in exceptional circumstances will the Editor consider the addition, deletion or

rearrangement of authors after the manuscript has been accepted. While the Editor considers the request, publication of the manuscript will be suspended. If the manuscript has already been published in an online issue, any requests approved by the Editor will result in a corrigendum.

Copyright

Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete a 'Journal Publishing Agreement' (for more information on this and copyright, see <https://www.elsevier.com/copyright>). An e-mail will be sent to the corresponding author confirming receipt of the manuscript together with a 'Journal Publishing Agreement' form or a link to the online version of this agreement.

Subscribers may reproduce tables of contents or prepare lists of articles including abstracts for internal circulation within their institutions. Permission of the Publisher is required for resale or distribution outside the institution and for all other derivative works, including compilations and translations (please consult <https://www.elsevier.com/permissions>). If excerpts from other copyrighted works are included, the author(s) must obtain written permission from the copyright owners and credit the source(s) in the article. Elsevier has preprinted forms for use by authors in these cases: please consult <https://www.elsevier.com/permissions>.

For open access articles: Upon acceptance of an article, authors will be asked to complete an 'Exclusive License Agreement' (for more information see <https://www.elsevier.com/OAauthoragreement>).

Permitted third party reuse of open access articles is determined by the author's choice of user license (see <https://www.elsevier.com/openaccesslicenses>).

Author rights

As an author you (or your employer or institution) have certain rights to reuse your work. For more information see <https://www.elsevier.com/copyright>.

Role of the funding source

You are requested to identify who provided financial support for the conduct of the research and/or preparation of the article and to briefly describe the role of the sponsor(s), if any, in study design; in the collection, analysis and interpretation of data; in the writing of the report; and in the decision to submit the article for publication. If the funding source(s) had no such involvement then this should be stated.

Funding body agreements and policies

Elsevier has established a number of agreements with funding bodies which allow authors to comply with their funder's open access policies. Some authors may also be reimbursed for associated publication fees. To learn more about existing agreements please visit <https://www.elsevier.com/fundingbodies>.

Open access

This journal offers authors a choice in publishing their research:

Open access

- Articles are freely available to both subscribers and the wider public with permitted reuse
- An open access publication fee is payable by authors or on their behalf e.g. by their research funder or institution
- Articles are made available to subscribers as well as developing countries and patient

groups through our universal access programs (<https://www.elsevier.com/access>).

- No open access publication fee payable by authors.

Regardless of how you choose to publish your article, the journal will apply the same peer review criteria and acceptance standards.

For open access articles, permitted third party (re)use is defined by the following Creative Commons user licenses:

Creative Commons Attribution (CC BY)

Lets others distribute and copy the article, create extracts, abstracts, and other revised versions, adaptations or derivative works of or from an article (such as a translation), include in a collective work (such as an anthology), text or data mine the article, even for commercial purposes, as long as they credit the author(s), do not represent the author as endorsing their adaptation of the article, and do not modify the article in such a way as to damage the author's honor or reputation.

Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivs (CC BY-NC-ND)

For non-commercial purposes, lets others distribute and copy the article, and to include in a collective work (such as an anthology), as long as they credit the author(s) and provided they do not alter or modify the article.

The open access publication fee for this journal is USD 3550, excluding taxes. Learn more about Elsevier's pricing policy: <https://www.elsevier.com/openaccesspricing>.

Green open access

Authors can share their research in a variety of different ways and Elsevier has a number of green open access options available. We recommend authors see our green open access page for further information (<http://elsevier.com/greenopenaccess>). Authors can also self-archive their manuscripts immediately and enable public access from their institution's repository after an embargo period. This is the version that has been accepted for publication and which typically includes author-incorporated changes suggested during submission, peer review and in editor-author communications. Embargo period: For subscription articles, an appropriate amount of time is needed for journals to deliver value to subscribing customers before an article becomes freely available to the public. This is the embargo period and it begins from the date the article is formally published online in its final and fully citable form.

This journal has an embargo period of 12 months.

Language (usage and editing services)

Please write your text in good English (American or British usage is accepted, but not a mixture of these). Authors who feel their English language manuscript may require editing to eliminate possible grammatical or spelling errors and to conform to correct scientific English may wish to use the English Language Editing service available from Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/languageediting/>) or visit our customer support site (<http://support.elsevier.com>) for more information.

Authors whose native language is not English are strongly advised to have their manuscripts checked by an English-speaking colleague prior to submission.

Submission

Our online submission system guides you stepwise through the process of entering your article details and uploading your files. The system converts your article files

to a single PDF file used in the peer-review process. Editable files (e.g., Word, LaTeX) are required to typeset your article for final publication. All correspondence, including notification of the Editor's decision and requests for revision, is sent by e-mail.

Authors must provide and use an email address unique to themselves and not shared with another author registered in EES, or a department.

Referees

Authors are required to submit, with the manuscript, the names, addresses and e-mail addresses of 3 potential referees. Note that the editor retains the sole right to decide whether or not the suggested reviewers are used.

The suggested reviewers should not come from the same institute, and should not all come from the same country.

Review Policy

A peer review system involving two or three reviewers is used to ensure high quality of manuscripts accepted for publication. The Managing Editor and Editors have the right to decline formal review of a manuscript when it is deemed that the manuscript is 1) on a topic outside the scope of the Journal; 2) lacking technical merit; 3) focused on foods or processes that are of narrow regional scope and significance; 4) fragmentary and providing marginally incremental results; or 5) is poorly written.

PREPARATION

Use of word processing software

It is important that the file be saved in the native format of the word processor used. The text should be in single-column format. Keep the layout of the text as simple as possible. Most formatting codes will be removed and replaced on processing the article. In particular, do not use the word processor's options to justify text or to hyphenate words. However, do use bold face, italics, subscripts, superscripts etc. When preparing tables, if you are using a table grid, use only one grid for each individual table and not a grid for each row. If no grid is used, use tabs, not spaces, to align columns. The electronic text should be prepared in a way very similar to that of conventional manuscripts (see also the Guide to Publishing with Elsevier: <https://www.elsevier.com/guidepublication>). Note that source files of figures, tables and text graphics will be required whether or not you embed your figures in the text. See also the section on Electronic artwork.

To avoid unnecessary errors you are strongly advised to use the 'spell-check' and 'grammar-check' functions of your word processor.

Article structure

Subdivision - numbered sections

Divide your article into clearly defined and numbered sections. Subsections should be numbered 1.1 (then 1.1.1, 1.1.2, ...), 1.2, etc. (the abstract is not included in section numbering). Use this numbering also for internal cross-referencing: do not just refer to 'the text'. Any subsection may be given a brief heading. Each heading should appear on its own separate line.

Introduction

State the objectives of the work and provide an adequate background, avoiding a detailed literature survey or a summary of the results.

Material and methods

Provide sufficient detail to allow the work to be reproduced. Methods already

published should be indicated by a reference: only relevant modifications should be described. Authors must provide details about their starting material, the source, the bioactive components responsible for the observed effects and changes in their content upon processing.

Theory/calculation

A Theory section should extend, not repeat, the background to the article already dealt with in the Introduction and lay the foundation for further work. In contrast, a Calculation section represents a practical development from a theoretical basis.

Results

Results should be clear and concise.

Discussion

This should explore the significance of the results of the work, not repeat them. A combined Results and Discussion section is often appropriate. Avoid extensive citations and discussion of published literature.

Conclusions

The main conclusions of the study may be presented in a short Conclusions section, which may stand alone or form a subsection of a Discussion or Results and Discussion section.

Appendices

If there is more than one appendix, they should be identified as A, B, etc. Formulae and equations in appendices should be given separate numbering: Eq. (A.1), Eq. (A.2), etc.; in a subsequent appendix, Eq. (B.1) and so on. Similarly for tables and figures: Table A.1; Fig. A.1, etc.

Essential title page information

- Title. Concise and informative. Titles are often used in information-retrieval systems. Avoid abbreviations and formulae where possible.
- Author names and affiliations. Please clearly indicate the given name(s) and family name(s) of each author and check that all names are accurately spelled. Present the authors' affiliation addresses (where the actual work was done) below the names. Indicate all affiliations with a lower- case superscript letter immediately after the author's name and in front of the appropriate address. Provide the full postal address of each affiliation, including the country name and, if available, the e-mail address of each author.
- Corresponding author. Clearly indicate who will handle correspondence at all stages of refereeing and publication, also post-publication. Ensure that the e-mail address is given and that contact details are kept up to date by the corresponding author.
- Present/permanent address. If an author has moved since the work described in the article was done, or was visiting at the time, a 'Present address' (or 'Permanent address') may be indicated as a footnote to that author's name. The address at which the author actually did the work must be retained as the main, affiliation address. Superscript Arabic numerals are used for such footnotes.

Abstract

A concise and factual abstract is required. The abstract should state briefly the purpose of the research, the principal results and major conclusions. An abstract is often presented separately from the article, so it must be able to stand alone. For this reason, References should be avoided, but if essential, then cite the author(s) and

year(s). Also, non-standard or uncommon abbreviations should be avoided, but if essential they must be defined at their first mention in the abstract itself.

Abstracts should not exceed 150 words.

Highlights

Highlights are mandatory for this journal. They consist of a short collection of bullet points that convey the core findings of the article and should be submitted in a separate editable file in the online submission system. Please use 'Highlights' in the file name and include 3 to 5 bullet points (maximum 85 characters, including spaces, per bullet point). See <https://www.elsevier.com/highlights> for examples.

Keywords

Immediately after the abstract, provide a maximum of 6 keywords, using American spelling and avoiding general and plural terms and multiple concepts (avoid, for example, 'and', 'of'). Be sparing with abbreviations: only abbreviations firmly established in the field may be eligible. These keywords will be used for indexing purposes.

Chemical compounds

You can enrich your article by providing a list of chemical compounds studied in the article. The list of compounds will be used to extract relevant information from the NCBI PubChem Compound database and display it next to the online version of the article on ScienceDirect. You can include up to 10 names of chemical compounds in the article. For each compound, please provide the PubChem CID of the most relevant record as in the following example: Glutamic acid (PubChem CID:611). The PubChem CIDs can be found via <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pccompound>. Please position the list of compounds immediately below the 'Keywords' section. It is strongly recommended to follow the exact text formatting as in the example below: Chemical compounds studied in this article Ethylene glycol (PubChem CID: 174); Plitidepsin (PubChem CID: 44152164); Benzalkonium chloride (PubChem CID: 15865) More information is available at: <https://www.elsevier.com/PubChem>.

Abbreviations

Define abbreviations that are not standard in this field in a footnote to be placed on the first page of the article. Such abbreviations that are unavoidable in the abstract must be defined at their first mention there, as well as in the footnote. Ensure consistency of abbreviations throughout the article.

Acknowledgements

Collate acknowledgements in a separate section at the end of the article before the references and do not, therefore, include them on the title page, as a footnote to the title or otherwise. List here those individuals who provided help during the research (e.g., providing language help, writing assistance or proof reading the article, etc.).

Units

Follow internationally accepted rules and conventions: use the international system of units (SI). If other units are mentioned, please give their equivalent in SI. Temperatures should be given in degrees Celsius. The unit "billion" is ambiguous and should not be used.

Abbreviations for units should follow the suggestions of the British Standards publication BS 1991. The full stop should not be included in abbreviations, e.g. m (not m.), ppm (not p.p.m.), % and / should be used in preference to 'per cent' and 'per'. Where abbreviations are likely to cause ambiguity or may not be readily

understood by an international readership, units should be put in full.

Current recognised (IUPAC) chemical nomenclature should be used, although commonly accepted trivial names may be used where there is no risk of ambiguity. The use of proprietary names should be avoided. Papers essentially of an advertising nature will not be accepted.

Math formulae

Please submit math equations as editable text and not as images. Present simple formulae in line with normal text where possible and use the solidus (/) instead of a horizontal line for small fractional terms, e.g., X/Y . In principle, variables are to be presented in italics. Powers of e are often more conveniently denoted by \exp . Number consecutively any equations that have to be displayed separately from the text (if referred to explicitly in the text).

Formulae must be typewritten, each on a separate line. Leave ample space around the formulae. Subscripts and superscripts should be clear. All symbols used in the formulae should be explained in the margin where they are first used. Take special care to show clearly the difference between zero (0) and the letter O, and between one (1) and the letter I. Give the meaning of all symbols immediately after the equation in which they are first used. All equations should be numbered serially at the right-hand side in parentheses. The use of fractional powers instead of root signs is recommended. Levels of statistical significance which can be mentioned without further explanation are $P < 0.05$, $P < 0.01$ and $P < 0.001$. In chemical formulae, valence of ions must be given as e.g. Ca^{2+} and CO_3^{2-} , not as Ca^{++} or CO_3^{--} . Isotope numbers should precede the symbols, e.g. ^{18}O . The repeated writing of complicated chemical formulae in the text is to be avoided where reasonably possible; instead, the name of the compound followed by its abbreviation (ethylene-diamine-tetra-acetic acid, EDTA) should be given in full. The abbreviation is to be used in the case of a very long name or in the case of a compound being described as the end product of a gravimetric determination (e.g. phosphate as P_2O_5).

Footnotes

Footnotes should be used sparingly. Number them consecutively throughout the article. Many word processors can build footnotes into the text, and this feature may be used. Otherwise, please indicate the position of footnotes in the text and list the footnotes themselves separately at the end of the article. Do not include footnotes in the Reference list.

Artwork

Electronic artwork General points

- Make sure you use uniform lettering and sizing of your original artwork.
- Embed the used fonts if the application provides that option.
- Aim to use the following fonts in your illustrations: Arial, Courier, Times New Roman, Symbol, or use fonts that look similar.
- Number the illustrations according to their sequence in the text.
- Use a logical naming convention for your artwork files.
- Provide captions to illustrations separately.
- Size the illustrations close to the desired dimensions of the published version.
- Submit each illustration as a separate file.

A detailed guide on electronic artwork is available on our website:

<https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

You are urged to visit this site; some excerpts from the detailed information are given here. **Formats** If your electronic artwork is created in a Microsoft Office application (Word, PowerPoint, Excel) then please supply 'as is' in the native document format.

Regardless of the application used other than Microsoft Office, when your electronic artwork is finalized, please 'Save as' or convert the images to one of the following formats (note the resolution requirements for line drawings, halftones, and line/halftone combinations given below): EPS (or PDF): Vector drawings, embed all used fonts.

TIFF (or JPEG): Color or grayscale photographs (halftones), keep to a minimum of 300 dpi.

TIFF (or JPEG): Bitmapped (pure black & white pixels) line drawings, keep to a minimum of 1000 dpi.

TIFF (or JPEG): Combinations bitmapped line/half-tone (color or grayscale), keep to a minimum of 500 dpi.

Please do not:

- Supply files that are optimized for screen use (e.g., GIF, BMP, PICT, WPG); these typically have a low number of pixels and limited set of colors;
- Supply files that are too low in resolution;
- Submit graphics that are disproportionately large for the content.

Color artwork

Please make sure that artwork files are in an acceptable format (TIFF (or JPEG), EPS (or PDF), or MS Office files) and with the correct resolution. If, together with your accepted article, you submit usable color figures then Elsevier will ensure, at no additional charge, that these figures will appear in color online (e.g., ScienceDirect and other sites) regardless of whether or not these illustrations are reproduced in color in the printed version. For color reproduction in print, you will receive information regarding the costs from Elsevier after receipt of your accepted article. Please indicate your preference for color: in print or online only. For further information on the preparation of electronic artwork, please see <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Figure captions

Ensure that each illustration has a caption. Supply captions separately, not attached to the figure. A caption should comprise a brief title (not on the figure itself) and a description of the illustration. Keep text in the illustrations themselves to a minimum but explain all symbols and abbreviations used.

Tables

Please submit tables as editable text and not as images. Tables can be placed either next to the relevant text in the article, or on separate page(s) at the end. Number tables consecutively in accordance with their appearance in the text and place any table notes below the table body. Be sparing in the use of tables and ensure that the data presented in them do not duplicate results described elsewhere in the article. Please avoid using vertical rules.

Citation in text

Please ensure that every reference cited in the text is also present in the reference

list (and vice versa). Any references cited in the abstract must be given in full. Unpublished results and personal communications are not recommended in the reference list, but may be mentioned in the text. If these references are included in the reference list they should follow the standard reference style of the journal and should include a substitution of the publication date with either 'Unpublished results' or 'Personal communication'. Citation of a reference as 'in press' implies that the item has been accepted for publication.

Web references

As a minimum, the full URL should be given and the date when the reference was last accessed. Any further information, if known (DOI, author names, dates, reference to a source publication, etc.), should also be given. Web references can be listed separately (e.g., after the reference list) under a different heading if desired, or can be included in the reference list.

References in a special issue

Please ensure that the words 'this issue' are added to any references in the list (and any citations in the text) to other articles in the same Special Issue.

Reference management software

Most Elsevier journals have their reference template available in many of the most popular reference management software products. These include all products that support Citation Style Language styles (<http://citationstyles.org>), such as Mendeley (<http://www.mendeley.com/features/reference-manager>) and Zotero (<https://www.zotero.org/>), as well as EndNote (<http://endnote.com/downloads/styles>). Using the word processor plug-ins from these products, authors only need to select the appropriate journal template when preparing their article, after which citations and bibliographies will be automatically formatted in the journal's style. If no template is yet available for this journal, please follow the format of the sample references and citations as shown in this Guide.

Users of Mendeley Desktop can easily install the reference style for this journal by clicking the following link:

<http://open.mendeley.com/use-citation-style/journal-of-functional-foods>

When preparing your manuscript, you will then be able to select this style using the Mendeley plugins for Microsoft Word or LibreOffice.

Reference style Text: Citations in the text should follow the referencing style used by the American Psychological Association. You are referred to the Publication Manual of the American Psychological Association, Sixth Edition, ISBN 978-1-4338-0561-5, copies of which may be ordered from <http://books.apa.org/books.cfm?id=4200067> or APA Order Dept., P.O.B. 2710, Hyattsville, MD 20784, USA or APA, 3 Henrietta Street, London, WC3E 8LU, UK.

List: references should be arranged first alphabetically and then further sorted chronologically if necessary. More than one reference from the same author(s) in the same year must be identified by the letters 'a', 'b', 'c', etc., placed after the year of publication.

Examples:

Reference to a journal publication:

Van der Geer, J., Hanraads, J. A. J., & Lupton, R. A. (2010). The art of writing a scientific article. *Journal of Scientific Communications*, 163, 51-59.

Reference to a book:

Strunk, W., Jr., & White, E. B. (2000). *The elements of style*. (4th ed.). New York: Longman, (Chapter 4).

Reference to a chapter in an edited book: Mettam, G. R., & Adams, L. B. (2009). How to prepare an electronic version of your article. In B. S. Jones, & R. Z. Smith (Eds.), *Introduction to the electronic age* (pp. 281-304). New York: E-Publishing Inc.

Video data

Elsevier accepts video material and animation sequences to support and enhance your scientific research. Authors who have video or animation files that they wish to submit with their article are strongly encouraged to include links to these within the body of the article. This can be done in the same way as a figure or table by referring to the video or animation content and noting in the body text where it should be placed. All submitted files should be properly labeled so that they directly relate to the video file's content. In order to ensure that your video or animation material is directly usable, please provide the files in one of our recommended file formats with a preferred maximum size of 150 MB. Video and animation files supplied will be published online in the electronic version of your article in Elsevier Web products, including ScienceDirect: <http://www.sciencedirect.com>. Please supply 'stills' with your files: you can choose any frame from the video or animation or make a separate image. These will be used instead of standard icons and will personalize the link to your video data. For more detailed instructions please visit our video instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>. Note: since video and animation cannot be embedded in the print version of the journal, please provide text for both the electronic and the print version for the portions of the article that refer to this content.

AudioSlides

The journal encourages authors to create an AudioSlides presentation with their published article. AudioSlides are brief, webinar-style presentations that are shown next to the online article on ScienceDirect. This gives authors the opportunity to summarize their research in their own words and to help readers understand what the paper is about. More information and examples are available at <https://www.elsevier.com/audioslides>. Authors of this journal will automatically receive an invitation e-mail to create an AudioSlides presentation after acceptance of their paper.

Supplementary material

Supplementary material can support and enhance your scientific research. Supplementary files offer the author additional possibilities to publish supporting applications, high-resolution images, background datasets, sound clips and more. Please note that such items are published online exactly as they are submitted; there is no typesetting involved (supplementary data supplied as an Excel file or as a PowerPoint slide will appear as such online). Please submit the material together with the article and supply a concise and descriptive caption for each file. If you wish to make any changes to supplementary data during any stage of the process, then please make sure to provide an updated file, and do not annotate any corrections on a previous version. Please also make sure to switch off the 'Track Changes' option in any Microsoft Office files as these will appear in the published supplementary file(s). For more detailed instructions please visit our artwork instruction pages at <https://www.elsevier.com/artworkinstructions>.

Data in Brief

Authors have the option of converting any or all parts of their supplementary or additional raw data into one or multiple Data in Brief articles, a new kind of article that houses and describes their data. Data in Brief articles ensure that your data, which is normally buried in supplementary material, is actively reviewed, curated, formatted, indexed, given a DOI and publicly available to all upon publication. Authors are encouraged to submit their Data in Brief article as an additional item directly alongside the revised version of their manuscript. If your research article is accepted, your Data in Brief article will automatically be transferred over to Data in Brief where it will be editorially reviewed and published in the new, open access journal, Data in Brief (<http://www.journals.elsevier.com/data-in-brief>). The open access fee for Data in Brief is \$500. For authors who submit in 2015 a reduced fee of \$250 will apply. Please use the following template to write your Data in Brief: <https://www.elsevier.com/dib-template>.

Database linking

Elsevier encourages authors to connect articles with external databases, giving readers access to relevant databases that help to build a better understanding of the described research. Please refer to relevant database identifiers using the following format in your article: Database: xxxx (e.g., TAIR: AT1G01020; CCDC: 734053; PDB: 1XFN). See <https://www.elsevier.com/databaselinking> for more information and a full list of supported databases.

Submission checklist

The following list will be useful during the final checking of an article prior to sending it to the journal for review. Please consult this Guide for Authors for further details of any item. Ensure that the following items are present:

One author has been designated as the corresponding author with contact details:

- E-mail address
- Full postal address

All necessary files have been uploaded, and contain:

- Keywords
- All figure captions
- All tables (including title, description, footnotes) Further considerations
- Manuscript has been 'spell-checked' and 'grammar-checked'
- References are in the correct format for this journal
- All references mentioned in the Reference list are cited in the text, and vice versa
- Permission has been obtained for use of copyrighted material from other sources (including the Internet)

Printed version of figures (if applicable) in color or black-and-white

- Indicate clearly whether or not color or black-and-white in print is required.

For any further information please visit our customer support site at <http://support.elsevier.com>.

AFTER ACCEPTANCE

Use of the Digital Object Identifier

The Digital Object Identifier (DOI) may be used to cite and link to electronic documents. The DOI consists of a unique alpha-numeric character string which is

assigned to a document by the publisher upon the initial electronic publication. The assigned DOI never changes. Therefore, it is an ideal medium for citing a document, particularly 'Articles in press' because they have not yet received their full bibliographic information. Example of a correctly given DOI (in URL format; here an article in the journal Physics Letters B): <http://dx.doi.org/10.1016/j.physletb.2010.09.059>

When you use a DOI to create links to documents on the web, the DOIs are guaranteed never to change.

Online proof correction

Corresponding authors will receive an e-mail with a link to our online proofing system, allowing annotation and correction of proofs online. The environment is similar to MS Word: in addition to editing text, you can also comment on figures/tables and answer questions from the Copy Editor. Web-based proofing provides a faster and less error-prone process by allowing you to directly type your corrections, eliminating the potential introduction of errors.

If preferred, you can still choose to annotate and upload your edits on the PDF version. All instructions for proofing will be given in the e-mail we send to authors, including alternative methods to the online version and PDF.

We will do everything possible to get your article published quickly and accurately. Please use this proof only for checking the typesetting, editing, completeness and correctness of the text, tables and figures. Significant changes to the article as accepted for publication will only be considered at this stage with permission from the Editor. It is important to ensure that all corrections are sent back to us in one communication. Please check carefully before replying, as inclusion of any subsequent corrections cannot be guaranteed. Proofreading is solely your responsibility.

Offprints

The corresponding author, at no cost, will be provided with a personalized link providing 50 days free access to the final published version of the article on [ScienceDirect](http://www.sciencedirect.com). This link can also be used for sharing via email and social networks. For an extra charge, paper offprints can be ordered via the offprint order form which is sent once the article is accepted for publication. Both corresponding and co-authors may order offprints at any time via Elsevier's WebShop (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/offprints>). Authors requiring printed copies of multiple articles may use Elsevier WebShop's 'Create Your Own Book' service to collate multiple articles within a single cover (<http://webshop.elsevier.com/myarticleservices/booklets>).

AUTHOR INQUIRIES

You can track your submitted article at <https://www.elsevier.com/track-submission>. You can track your accepted article at <https://www.elsevier.com/trackarticle>. You are also welcome to contact Customer Support via <http://support.elsevier.com>.