

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

Área de concentração: Ciência de Alimentos

ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Lactobacillus reuteri* CO-ENCAPSULADO EM
MATRIZ DE ALGINATO E FARINHA DE BANANA VERDE POR EXTRUSÃO COM
TECNOLOGIA DE VIBRAÇÃO

ITAPETINGA - BA
BRASIL
2022

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO SUDOESTE DA BAHIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE
ALIMENTOS

ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Lactobacillus reuteri* CO-ENCAPSULADO EM
MATRIZ DE ALGINATO E FARINHA DE BANANA VERDE POR EXTRUSÃO COM
TECNOLOGIA DE VIBRAÇÃO

MONIQUE SILVEIRA RAMOS

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia.

Orientador: Prof. Dr. Nívio Batista Santana

Co-orientador (a): Prof. Dr^a. Tercia Diniz Bezerra

ITAPETINGA - BA
BRASIL
2022

664.804772 Ramos, Monique Silveira.

R144e

Estudo da viabilidade de *Lactobacillus reuteri* co-encapsulado em matriz de alginato e farinha de banana verde por extrusão com tecnologia de vibração. / Monique Silveira Ramos. - Itapetinga: UESB, 2022.

64f.

Dissertação apresentada como parte das exigências para obtenção do título de Mestre em Engenharia e Ciência de Alimentos, no Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Sob a orientação do Prof. D.Sc. Nívio Batista Santana e coorientação da Prof.^a D.Sc. Tercia Diniz Bezerra.

1. Farinha de banana verde - *Lactobacillus reuteri*. 2. *Lactobacillus reuteri* - Probiótico. 3. Alimento funcional – Prebiótico - Probiótico. I. Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia. Programa de Pós-graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos. II. Santana, Nívio Batista. III. Bezerra, Tercia Diniz. IV. Título.

CDD(21): 664.804772

Catálogo na fonte:

Adalice Gustavo da Silva – CRB/5-535
Bibliotecária – UESB – Campus de Itapetinga-BA

Índice Sistemático para Desdobramento por Assunto:

1. Alimento funcional
2. Prebiótico
3. Probiótico

DECLARAÇÃO DE APROVAÇÃO

Título: ESTUDO DA VIABILIDADE DE *LACTOBACILLUS REUTERI* CO-ENCAPSULADO EM MATRIZ DE ALGINATO E FARINHA DE BANANA VERDE POR EXTRUSÃO COM TECNOLOGIA DE VIBRAÇÃO.

Autor (a): MONIQUE SILVEIRA RAMOS

Orientador (a): Prof. Dr. Nivio Batista Santana

Coorientador (a): Prof.^a Dr.^a Tércia Diniz Bezerra

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de **MESTRE EM ENGENHARIA E CIÊNCIA DE ALIMENTOS, ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: CIÊNCIA DE ALIMENTOS**, pela Banca Examinadora:



Prof.^a Dr.^a Elizama Aguiar de Oliveira
Membro Externo - UESC



Prof. Dr. Gildomar Lima Valasques Júnior
UESB



Prof. Dr. Nivio Batista Santana
Orientador – UESB
Presidente da Banca

Itapetinga-BA, 04 de março de 2022.

“O saber não ocupa espaço.”

(Gabriel de Queiroz Ribeiro)

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força e coragem para vencer todos os obstáculos, que me socorreu espiritualmente, dando-me serenidade e saúde para continuar e chegar até o final.

À minha mãe, Mônica, ao meu pai Romes e boadrasta Dora, aos meus avós, Josué e Judite, pela melhor criação que poderia ter recebido, pelo estímulo, confiança, orações, suporte e amor.

Aos meus irmãos, Rômulo, Anna Karolline e Kauan, pelo carinho e apoio.

À toda minha família, por acreditarem no meu potencial e vibrarem todas as minhas conquistas.

À Iane e Evelyn, minhas irmãs de alma, por se fazerem presentes mesmo distantes fisicamente.

A Matheus, pelo companheirismo, ajuda, paciência e afeto.

À Emília e Luise, amigas que Itapetinga me presenteou e que levarei por toda a vida, pela amizade, incentivos indispensáveis nos momentos difíceis, por não medirem esforços em me ajudar e pela alegria que sempre me proporcionaram.

À Izabelle e Jonathan por tornarem essa caminhada mais leve e divertida.

A Lucas, Silvânia e Sthefany, pela ajuda e cumplicidade no dia-a-dia.

Ao meu orientador, Prof. Dr. Nívio Batista Santana, por acreditar no meu trabalho, transmitir seus conhecimentos, pelo seu encorajamento, paciência, disponibilidade e dedicação.

À minha co-orientadora, Dr^a. Tercia Diniz Bezerra, pela prestatividade e por contribuir positivamente para o desenvolvimento da pesquisa.

À Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia e ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia e Ciência de Alimentos pela oportunidade.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela bolsa de estudos concedida.

E a todos aqueles que direta ou indiretamente fizeram parte dessa conquista.

Muito obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	xi
RESUMO.....	xii
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	16
2.1. Alimentos funcionais	16
2.2. Prebióticos	17
2.2.1. Fibras alimentares	18
2.2.1.1. Farinha de banana verde.....	20
2.3. Probióticos	21
2.4. Encapsulamento	23
2.4.1. Encapsulamento de probióticos por extrusão	25
2.4.2. Materiais de revestimento	27
3. OBJETIVOS	30
3.1. Objetivo geral.....	30
3.2. Objetivos específicos	30
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	31
4.1. Local de realização	31
4.2. Materiais	31
4.3. Microrganismo e condições de cultivo	31
4.4. Preparação das cápsulas.....	32
4.5. Eficiência do encapsulamento.....	34
4.6. Densidade aparente das cápsulas	34
4.7. Medição do tamanho das cápsulas.....	35
4.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)	35
4.9. Avaliação da viabilidade de <i>L. reuteri</i> livre e encapsulado durante armazenamento a -18, 4 e 25 °C.	35
4.10. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade de <i>L. reuteri</i> livre e encapsulado em fluido gástrico simulado	36

4.11. Análise estatística	36
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	37
5.1. Avaliação da eficiência do encapsulamento	37
5.2. Densidade aparente das cápsulas	39
5.3. Caracterização das cápsulas	40
5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR).....	43
5.5. Avaliação da viabilidade de <i>L. reuteri</i> livre e encapsulado durante armazenamento a -18, 4 e 25 °C	45
5.6. Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade de <i>L. reuteri</i> livre e encapsulado em fluido gástrico simulado	51
6. CONCLUSÃO.....	54
REFERÊNCIAS.....	55

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Esquema do método de extrusão para o encapsulamento de probióticos.	26
Figura 2. Estrutura química do alginato.....	28
Figura 3. Esquema de formação das cápsulas pelo método de extrusão utilizando alginato de sódio como material de revestimento.	29
Figura 4. Soluções de alimentação para a produção de cápsulas.	33
Figura 5. Produção de cápsulas a partir do método de extrusão com tecnologia de vibração.....	33
Figura 6. Cápsulas de alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde para imobilização de <i>L. reuteri</i> , produzidas por extrusão com tecnologia de vibração.....	40
Figura 7. Efeito da adição de farinha de banana verde no diâmetro (coluna) e distribuição de tamanho (linha) das cápsulas produzidas por extrusão com tecnologia de vibração. T0 (A), T1 (B), T2 (C) e T3 (D).....	42
Figura 8. Espectros de FTIR das soluções encapsulantes (A) e das cápsulas (B) produzidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.....	43
Figura 9. Viabilidade das células de <i>L. reuteri</i> livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a -18 °C por 30 dias.	45
Figura 10. Viabilidade das células de <i>L. reuteri</i> livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a 4 °C por 30 dias.	47

Figura 11. Viabilidade das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a 25 °C por 10 dias.

.....49

Figura 12. Sobrevivência das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, expostas a fluido gástrico simulado.51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição dos tratamentos avaliados.	32
Tabela 2. Contagem de células viáveis (Log_{10} UFC/g) de <i>L. reuteri</i> antes e após o encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.....	37
Tabela 3. Densidade aparente das cápsulas de <i>L. reuteri</i> obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.....	39
Tabela 4. Diâmetro das cápsulas de <i>L. reuteri</i> obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.....	40

RAMOS, M. S. **Estudo da viabilidade de *Lactobacillus reuteri* co-encapsulado em matriz de alginato e farinha de banana verde por extrusão com tecnologia de vibração.** Itapetinga – BA: UESB, 2022. 64 p. Dissertação (Mestrado em Engenharia e Ciência de Alimentos).

RESUMO

A conscientização da importância que o alimento tem sobre a saúde, vem estimulando a busca por alimentos saudáveis. Dentre esses alimentos, destacam-se os prebióticos e os probióticos, substâncias que podem proporcionar benefícios aos consumidores, como o bom funcionamento do organismo e redução dos riscos no desenvolvimento de diversas doenças. Contudo, a viabilidade dos probióticos pode reduzir de forma drástica durante o processamento, armazenamento e trânsito do alimento, pelo trato gastrointestinal humano, impedindo que ele atue de forma relevante sob o hospedeiro. Uma forma alternativa e promissora de fornecer maior proteção na entrega dos microrganismos ao consumidor, é a encapsulação. Dessa forma, este trabalho objetivou avaliar a influência da farinha de banana verde (FBV), alimento com propriedades prebióticas, combinada com alginato de sódio como materiais de revestimento no co-encapsulamento do probiótico *Lactobacillus reuteri*. Para tanto, foram produzidas cápsulas com alginato e diferentes concentrações de FBV (0,25, 0,50 e 0,75 g) pelo método de extrusão com tecnologia de vibração e avaliou-se a eficiência do encapsulamento, diâmetro e densidade das partículas, bem como a viabilidade do probiótico encapsulado sob condições de armazenamento por 30 dias a -18, 4 e 25 °C e durante a simulação do fluido gástrico. De acordo com os resultados, o método apresentou alta eficiência de encapsulamento (> 95 %) e provou não ser danoso para os microrganismos. As cápsulas obtidas apresentaram diâmetro na faixa de 2,61 a 3,49 mm e a densidade aparente foi de 0,98 a 1,02 g/mL. Verificou-se também que para o armazenamento a sobrevivência dos microrganismos melhorou significativamente ao utilizar 0,50 e 0,75 g de FBV no revestimento das cápsulas. Já na presença do fluido gástrico simulado, cápsulas com 0,75 g de FBV destacou-se na proteção das células, restringindo de maneira mais eficiente a perda da viabilidade celular, pois até 68 % das células mantiveram-se viáveis após exposição à condição adversa. Sendo assim, conclui-se que a FBV, quando associada ao alginato de sódio, possui potencialidade na proteção de *L. reuteri* co-encapsulados.

Palavras-chave: Alimentos funcionais; Prebióticos; Probióticos; Simbiose; Cápsulas.

RAMOS, M. S. **Viability study of *Lactobacillus reuteri* co-encapsulated in alginate matrix and green banana flour by extrusion with vibration technology.** Itapetinga – BA: UESB, 2022. 64 p. Dissertation (Master in Engineering and Food Sciences).

ABSTRACT

The awareness of the importance that food has on health has been stimulating the search for healthy foods. Among these foods, prebiotics and probiotics stand out, substances that can provide benefits to consumers, such as the proper functioning of the body and reduction of risks in the development of various diseases. However, the viability of probiotics can drastically reduce during processing, storage and food transit through the human gastrointestinal tract, preventing it from acting in a relevant way on the host. An alternative and promising way to provide greater protection in the delivery of microorganisms to the consumer is encapsulation. Thus, this work aimed to evaluate the influence of green banana flour (GBF), food with prebiotic properties, combined with sodium alginate as coating materials in the co-encapsulation of the probiotic *Lactobacillus reuteri*. For that, capsules with alginate and different concentrations of GBF (0,25, 0,50 and 0,75 g) were produced by the extrusion method with vibration technology and the encapsulation efficiency, diameter and density of the particles, as well as the viability of the encapsulated probiotic under storage conditions for 30 days at -18, 4 and 25 °C and during gastric fluid simulation. According to the results, the method showed high encapsulation efficiency (> 95 %) and proved not to be harmful to microorganisms. The capsules obtained had a diameter ranging from 2,61 to 3,49 mm and the apparent density was from 0,98 to 1,02 g/mL. It was also verified that for the storage the survival of the microorganisms improved significantly when using 0,50 and 0,75 g of GBF in the coating of the capsules. In the presence of simulated gastric fluid, capsules with 0,75 g of GBF stood out in protecting the cells, more efficiently restricting the loss of cell viability, as up to 68 % of the cells remained viable after exposure to the adverse condition. Therefore, it is concluded that GBF, when associated with sodium alginate, has the potential to protect co-encapsulated *L. reuteri*.

Keywords: Functional foods; Prebiotics; Probiotics; Symbiosis; Capsules.

1. INTRODUÇÃO

O constante aumento na expectativa de vida, preocupação com a saúde e consciência da relevância que uma boa alimentação tem sobre as condições de bem-estar global do indivíduo, são fatores que estimulam a busca por produtos saudáveis (KARELAKIS et al., 2020).

Dentre os alimentos que recebem a classificação de saudáveis, destacam-se os alimentos funcionais, que além de seu aporte nutritivo, também contribuem com benefícios à saúde, devido conterem em sua composição moléculas biologicamente ativas capazes de atuar no metabolismo humano. Prebióticos e probióticos são exemplos de substâncias com propriedades funcionais de extrema importância para a indústria alimentícia (GRANATO et al., 2020).

Prebióticos podem ser compreendidos como componentes alimentares não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e a atividade dos probióticos no trato gastrointestinal, causando efeitos na saúde do hospedeiro. Inulina, fruto-oligossacarídeos, galacto-oligossacarídeos e amido resistentes são os principais prebióticos utilizados na indústria de alimentos (GUIMARÃES et al., 2020).

Probióticos podem ser definidos como suplementos dietéticos que contêm cepas microbianas vivas capazes de colonizar o trato gastrointestinal humano e conferir uma influência benéfica na fisiologia do hospedeiro, como melhorar a saúde. Tais microrganismos, ampliam os efeitos fisiológicos benéficos da microbiota intestinal, aumentando a estabilidade ou promovendo sua recuperação, quando esta se encontra em desequilíbrio (SHARIFI-RAD et al., 2020).

Para que os efeitos benéficos sejam obtidos, as células probióticas devem permanecer viáveis durante o processamento e armazenamento do alimento, além de resistir a passagem pelo trato gastrointestinal humano. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são os gêneros de bactérias probióticas mais usadas como adjuvantes alimentares (PINTO et al., 2020).

Todavia, existem fatores, como oxigênio, pH, temperatura, estresse osmótico, alta acidez estomacal, elevada concentração de sais biliares e presença de enzimas digestórias, que tornam o ambiente desafiador para a sobrevivência dos probióticos. Dessa forma, distintas estratégias são estudadas e empregadas na

intenção de aumentar a viabilidade desses microrganismos em situações desfavoráveis em que são expostos (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013).

Uma alternativa promissora é o encapsulamento, que consiste em aprisionar os microrganismos em pequenas cápsulas formadas por meio de um revestimento escolhido criteriosamente, fornecendo maior proteção e resistência durante o processamento, armazenamento e trânsito pelo trato gastrointestinal (GANDOMI et al., 2016).

O alginato de sódio é um biopolímero amplamente utilizado no encapsulamento de bactérias e isso se deve à sua condição de geleificação na presença de íons divalentes e baixa temperatura, ser um bom estabilizante de emulsões, possuir baixo custo e ser atóxico. No entanto, não existe um material de revestimento que proteja por total a viabilidade dos microrganismos. Em vista disso, a combinação do alginato com outro material de revestimento, originando um co-encapsulamento, pode melhorar a viabilidade celular e fornecer maior controle de liberação dos probióticos encapsulados (SERRANO-CASAS et al., 2017; GAUDREAU et al., 2016).

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a influência da farinha de banana verde (FBV), alimento com propriedades prebióticas, combinada com alginato de sódio como materiais para o co-encapsulamento de *Lactobacillus reuteri* por extrusão com tecnologia de vibração, visando sua aplicação industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Alimentos funcionais

Apesar de ser um termo popular na mídia social e científica, ainda não existe uma definição única e universal para alimentos funcionais. O Japão foi o primeiro país a formular um processo de aprovação regulatória específica para alimentos funcionais e o Ministério Japonês de Saúde, Trabalho e Bem-estar, refere-se a alimentos funcionais como “alimentos contendo ingrediente(s) com funções para a saúde e oficialmente aprovados para reivindicar seus efeitos fisiológicos no corpo humano, destinado a ser consumido para a manutenção/promoção da saúde ou usos especiais de saúde por pessoas que pretendam controlar as condições de saúde” (MARTIROSYAN; SINGHARAJ, 2016).

Para a Comissão Europeia, o conceito de alimento funcional é “produto alimentar que, juntamente com o impacto nutricional básico, tiver efeitos benéficos em uma ou mais funções do organismo humano, melhorando assim as condições físicas gerais e/ou diminuindo o risco da evolução de doenças” (ORRU et al., 2018).

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), através da Resolução nº 18 de 30 de abril de 1999, estabeleceu a definição de que “alimentos ou ingredientes alimentares com propriedades funcionais pode, além de funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica” (BRASIL, 1999).

Dentre os benefícios, temos a prevenção de alguns problemas de saúde, como hipertensão, hipercolesterolemia, hiperglicemia, obesidade, riscos de doenças cardiovasculares e câncer, além de fornecer ao corpo quantidades necessárias de nutrientes essenciais. Tais fatores impulsionam o interesse por alimentos funcionais, devido a uma maior conscientização em relação a alimentação e saúde, visto que a alimentação fornece os nutrientes indispensáveis à manutenção do organismo, mantendo-o em equilíbrio e permitindo uma melhor qualidade de vida (KAUR; SINGH, 2017).

Dessa forma, produtos alimentícios funcionais têm provocado mudanças positivas no estilo de vida de muitos indivíduos, o que levou a formação de um nicho

de mercado especialmente lucrativo para a indústria alimentícia, que vem crescendo globalmente. Dado que, a tendência no cenário atual é o desejo dos consumidores por alimentos e ingredientes produzidos e processados de forma sustentável e segura, práticos, em razão do dia-a-dia e naturalmente funcionais (MIROSA; MANGAN-WALKER, 2018).

Dentro deste grupo de alimentos, os mais comuns no mercado por conta de suas funções são o iogurte (promove a saúde digestiva), cereais (promove a saúde cardíaca) e os ingredientes alimentares potencialmente funcionais mais difundidos são os ácidos graxos poli-insaturados, antioxidantes, prebióticos, probióticos e simbióticos (GRANATO et al., 2020).

2.2. Prebióticos

A primeira definição de prebióticos surgiu em 1995, por Gleen Gibson e Marcel Roberfroid e não sofreu alterações por mais de 15 anos. Em 2008, a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP) atualizou o conceito dos prebióticos dietéticos como ingredientes alimentares não digeríveis, fermentados seletivamente e que resultam em mudanças específicas na composição e/ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios sobre a saúde do hospedeiro (GIBSON et al., 2017).

A microbiota gastrointestinal é composta por trilhões de microrganismos, de várias espécies diferentes, é altamente dinâmica e influenciada por fatores como idade, dieta e medicamentos. Apesar de ser complexa e diversa, é considerada excepcionalmente estável em composição e função, atuando ativamente em processos biológicos como na utilização de nutrientes, resistência a infecções, maturação do sistema imunológico e eficiência metabólica geral (KHAN et al., 2020).

As alterações composicionais ou metabólicas, promovidas pelos prebióticos, na microbiota gastrointestinal, são consideradas, atualmente, estratégias convincentes que visam reverter a disbiose intestinal, que é um desequilíbrio da microbiota responsável por manifestar várias doenças infecciosas, metabólicas e imunomediadas, como desnutrição, câncer, doença renal crônica, obesidade e diabetes, esclerose múltipla e alergias alimentares (VON MARTELS et al., 2017).

No caso da disbiose, os prebióticos fornecem substratos não digeríveis para microrganismos residentes da microbiota que ao fermentá-los, obtêm sua energia de sobrevivência e produzem metabólitos (vitaminas e ácidos orgânicos, como ácidos graxos de cadeia ramificada e de cadeia curta (AGCC)), que possuem efeitos fisiológicos benéficos, com fortes implicações para a saúde (DAVANI-DAVARI et al., 2019).

Entre os AGCC, o acetato é utilizado diretamente como fonte de energia ou precursor para a síntese de moléculas complexas pelo fígado, músculo e outros tecidos periféricos. O butirato é utilizado como fonte de energia pelas células epiteliais do intestino e possui propriedades anticancerígenas e anti-inflamatórias. Já o propionato é utilizado pelo tecido adiposo e pelo fígado e também tem potencial anti-inflamatório, além de desempenhar papel na sensação de saciedade e melhorar a sensibilidade à insulina (BINDELS et al., 2015; BINDELS et al., 2013).

Os prebióticos mais comumente usados são os carboidratos do tipo oligossacarídeos não digeríveis, a inulina e alguns fruto-oligossacarídeos são exemplos de compostos que pertencem a este grupo. A inulina encontra-se distribuída na natureza como carboidratos de armazenamento de plantas e a maior parte comercialmente disponível é extraída das raízes de chicória. Os fruto-oligossacarídeos são amplamente distribuídos em plantas como cebola, aspargo, chicória, alcachofra de Jerusalém, alho, trigo, aveia e também podem ser produzidos comercialmente por meio de reações de transferência enzimática de açúcares de baixo peso molecular ou por hidrólise de polissacarídeos (fibras alimentares, amido) (SARAO; ARORA, 2017).

No entanto, para um composto ser classificado como prebiótico e proporcionar os benefícios supracitados, alguns parâmetros devem ser atendidos, como: resistência à acidez gástrica, hidrólise enzimática e absorção gastrointestinal; capacidade de ser fermentado pela microbiota intestinal e estimular seletivamente o crescimento e/ou atividades de bactérias intestinais associadas à saúde e ao bem estar (GIBSON et al., 2017).

2.2.1. Fibras alimentares

As fibras alimentares, também nomeadas de fibras dietéticas, são compostos de origem vegetal constituído por polímeros de carboidratos, com três ou

mais unidades monoméricas, e mais lignina (polímero de fenilpropano) e podem ser subdividida em fibras solúveis e insolúveis, com base nas propriedades químicas, físicas e funcionais (WILLIAMS et al., 2017).

As fibras solúveis abrangem fibras viscosas, como inulina, fruto-oligossacarídeos, pectina, goma, mucilagem e fibras não viscosas, como hemicelulose. Tais fibras são a parte comestível das plantas, capazes de absorver água para formar solução ou gel viscoso, que aumentam o tempo de trânsito dos alimentos, retardam o esvaziamento gástrico, diminuem a absorção de nutrientes e atrasam a digestão. Ao passo que, as insolúveis, que incluem algumas hemicelulose, celulose e lignina, não dissolvem em água e nos fluidos gástricos-intestinais, passando pelo trato digestivo praticamente intactas, promovendo menor tempo de trânsito e desenvolvimento de fezes volumosas, além de aliviar a constipação intestinal (GONZÁLEZ-AGUILAR; BLANCAS-BENÍTEZ; SÁYAGO-AYERDI, 2017).

Tanto as fibras solúveis quanto insolúveis, desempenham papéis importantes para a saúde digestiva, pois são resistentes à ação das enzimas e não são hidrolisadas no estômago, além de atuarem como substrato para a microbiota intestinal. Ao compará-las, as fibras solúveis são fermentadas com mais facilidade e rapidez pelas bactérias e, portanto, têm algumas funções e benefícios prebióticos, enquanto as não solúveis apresentam baixa fermentabilidade (PADAYACHEE et al., 2017).

Redução do desenvolvimento de doenças (arterial coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, diabetes, desordens gastrointestinais), melhoria dos níveis lipídicos séricos, funcionamento do sistema imunológico e redução do peso corporal são exemplos dos inúmeros benefícios relacionados ao consumo adequado de fibras. No entanto, a quantidade consumida pela população ainda é menor em relação a quantidade recomendada (indivíduos com idade entre 19 e 50 anos, recomenda-se: 25 gramas / dia para mulheres e 38 gramas / dia para homens) (SOLIMAN, 2019).

As fibras alimentares insolúveis são encontradas em grãos inteiros, trigo, farelos, nozes e sementes, bem como algumas frutas e vegetais. Para fibras solúveis, exemplos de alimentos são vegetais (cenoura, brócolis, cebola e

alcachofra), legumes (aveia e cevada) e frutas (maçã, pêra e banana) (SOLIMAN, 2019). Ambas fibras são encontradas simultaneamente em farinhas integrais (farinha de trigo, farinha de aveia, farinha de arroz, farinha de chia, farinha de linhaça, farinha de banana verde, entre outras), opção rica em vitaminas, proteínas, minerais e especialmente, fibras (YANG et al., 2017).

2.2.1.1. Farinha de banana verde

A farinha de banana verde é obtida por meio de secagem natural ou artificial da banana verde ou semi-madura e sua qualidade, ou seja, as melhores características físico-químicas, tecnológicas e funcionais estão relacionadas com o tipo de cultivar ou variedade da fruta, presença ou ausência de casca, método de desidratação e condições de operações do equipamento (BEZERRA et al., 2013).

A polpa da banana verde trata-se de uma massa com baixo teor de açúcares, palatabilidade desagradável, em virtude da dureza e adstringência decorrente da presença de taninos e rica em carboidratos indigeríveis, especialmente fibra alimentar (14,5 g/100 g) e amido resistente (17,5 g/100 g) (RAYO et al., 2015).

O amido resistente é o componente mais importante da banana verde, definido como uma porção do amido que não é digerido pelas enzimas digestivas e passa para o colón para ser fermentado pela microbiota intestinal, produzindo AGCC e implicando em efeitos positivos para a saúde. Esse tipo de amido têm sido o foco de uma ênfase crescente de pesquisa, ganhando reconhecimento como fonte de fibras alimentares e como alimento funcional (ALMEIDA-JUNIOR et al., 2017; BIRT et al., 2013).

Visando os benefícios à saúde ao consumir fibras alimentares e amido resistente, como efeitos de redução do colesterol, triglicerídeos e aumento da saciedade, a produção de FBV vem sendo considerada um produto interessante para industrialização, porque além dos benefícios nutricionais, diminui as perdas pós-colheita (FALCOMER et al., 2019).

Os maiores produtores de banana são a Índia e a China, com, em média, 29 e 11 milhões de toneladas por ano, respectivamente. O Brasil ocupa a quinta posição, com produção em torno de 7 milhões de toneladas por ano. No entanto,

cerca de um quinto de toda banana colhida é desperdiçada e os frutos rejeitados normalmente são descartados inadequadamente (FAO, 2021; RAYO et al., 2015).

Portanto, a fabricação da FBV atenua essa problemática e conseqüentemente, prologa a *shelf-life* e agrega valor à fruta, já que o processo de obtenção do produto não se utiliza bananas maduras. Além disso, a banana é um alimento que apresenta baixo custo e sua utilização é de praticamente 100%, ou seja, aproveita-se desde a casca até a polpa (RAYO et al., 2015).

A farinha da banana verde é vastamente utilizado como ingrediente na elaboração de diversos produtos alimentícios, como pães, bolos, biscoitos barras de cereais, macarrão, entre outros e destaca-se por ser um alimento sem glúten, possibilitando sua utilização em produtos destinados a pessoas que são portadoras da doença celíaca (SARDÁ et al., 2016; ZANDONADI et al., 2012).

Devido aos altos teores de amido resistente a digestão humana e sua capacidade de passar pelo intestino delgado sem ser degradado, outra aplicabilidade da FBV que vem ganhando destaque, é no encapsulamento de diversos produtos, incluindo microrganismos probióticos, protegendo-os e contribuindo para um melhor desenvolvimento metabólico, exibindo ação prebiótica (BUSANELLO et al., 2019).

2.3. Probióticos

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez por Parker para definir substâncias e organismos que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Porém, essa definição foi considerada muito ampla e Fuller modificou para microrganismos vivos que influenciam positivamente a saúde do hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal. Em 2014, a ISAPP atualizou o conceito e definiu-se probióticos como microrganismos vivos, que ao serem administrados em doses adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (ZENDEBOODI et al., 2020).

Os probióticos promovem benefícios à saúde humana, inibindo o crescimento de bactérias patogênicas, por meio da capacidade de competir por nutrientes para o crescimento e proliferação, que seriam utilizados pelos patógenos e de secretar algumas substâncias, como bacteriocinas e ácidos orgânicos, que

atuam como agentes antimicrobianos. Dessa forma, conseguem estimular no intestino um maior crescimento de bactérias benéficas em comparação às bactérias patogênicas (GALDEANO et al., 2019).

Para exibir impactos benéficos à saúde, com segurança e eficácia, a Organização Mundial de Saúde (OMS) juntamente com a Organização para Alimentação de Agricultura das Nações Unidas (FAO) estabeleceu vários critérios que devem ser atendidos pelos microrganismos probióticos. Dentre as exigências, incluiu-se resistência à passagem pelo trato gastrointestinal, capacidade de aderir às células epiteliais, se multiplicar, colonizar e exercer suas funções no intestino (DE MELO PEREIRA et al., 2018).

Entre os microrganismos que possuem propriedades probióticas estão as bactérias lácticas (BAL), como *Lactobacillus* spp., *Enterococcus* spp., *Streptococcus* spp., e *Bifidobacterium* spp., que possuem as seguintes características: gram-positivas, morfologia de cocos ou bastonetes, não formadoras de esporos, não produtoras de catalase, tolerantes a ácidos e microaerófilas (crescem em condições anaeróbias, mas são tolerantes ao oxigênio). Outra forma de caracterização desses microrganismos, é pela produção de ácido láctico como principal produto metabólico da fermentação de carboidratos. Quando produzem somente ácido láctico, são homofermentativas e quando produzem, além do ácido láctico, dióxido de carbono, ácido acético, etanol, entre outros, são heterofermentativas (MORA-VILLALOBOS et al, 2020).

No gênero *Lactobacillus* estão incluídas mais de 200 espécies com atividade probiótica, destacando-se *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *L. bulgaricus*, *L. casei* e *L. reuteri*. Tais microrganismos são encontrados em habitats ricos em nutrientes associados a produtos alimentícios fermentados, também podem ser encontrados no sistema gastrointestinal de humanos e animais em quantidades variáveis, dependendo da espécie, idade do hospedeiro ou localização no intestino (DUAR et al., 2017).

L. reuteri, foi caracterizada, por meio de diversos estudos, como espécie que atende os pré-requisitos para ser reconhecida como probiótico em potencial. Elas são capazes de colonizar naturalmente o trato gastrointestinal, resistir a uma ampla variedade de ambientes com pH baixo, inibir o desenvolvimento de patógenos e

secretar metabólitos antimicrobianos, que contribuem para diversos efeitos benéficos na saúde do hospedeiro, como prevenção e/ou melhoria de diversos distúrbios (MU; TAVELLA; LUO, 2018).

Para exercer tais funções, os microrganismos devem estar presentes em concentrações maiores que 10^6 unidades formadoras de colônias por mL ou g de alimento (UFC / mL ou g), para garantir sua chegada ao cólon humano e subsequente colonização (DODOO et al., 2017).

No entanto, as bactérias probióticas são submetidas a diversas condições adversas, tanto nas operações de processamento (incluindo oxigênio, pH, temperatura, estresse osmótico) quanto na passagem pelo ecossistema gastrointestinal (alta acidez estomacal, elevada concentração de sais biliares e presença de enzimas digestórias), até a chegada ao intestino, que resultam na redução de células bacterianas viáveis (MBYE et al., 2020).

Existem preocupações e questionamentos relacionados à eficácia dos produtos probióticos comerciais, pois bactérias benéficas podem não sobreviver a condições limitantes em que são submetidas. Dessa forma, estratégias têm sido desenvolvidas com o objetivo de aumentar a estabilidade e manter a viabilidade dos probióticos durante a vida útil dos alimentos e passagem pelo intestino humano, já que os microrganismos são de grande interesse industrial, tecnológico e nutricional (ANSELMO et al., 2016; CORONA-HERNANDEZ et al., 2013).

Um dos métodos que tem se destacado de maneira eficaz na proteção de células probióticas é o encapsulamento (ŠIPAILIENĖ; PETRAITYTĖ, 2018; COOK et al., 2012).

2.4. Encapsulamento

O encapsulamento é um processo no qual partículas, denominadas núcleo ou princípio ativo, são envoltas por um revestimento, ou incorporadas em um filme homogêneo ou heterogêneo de matriz polimérica, resultando em uma pequena esfera, que pode variar o tamanho de nanômetros a milímetros. Sua finalidade é empacotar o núcleo, seja na forma sólida, líquida ou gasosa e estabelecer uma barreira seletiva entre o núcleo e o ambiente externo, protegendo-o de condições adversas. Outras vantagens do encapsulamento são: permite a liberação controlada

ou prolongada dos materiais encapsulados, mascara sabor e odor indesejáveis, controla reações de oxidação e estende a vida útil (BAH; BILAL; WANG, 2019).

Esta técnica é amplamente utilizada em diversas áreas, principalmente na farmacêutica e médica. Na indústria alimentícia, vem sendo considerada como uma alternativa viável na proteção de células probióticas, pois aumenta a resistência das células durante o armazenamento dos produtos e promove bom trânsito gastrointestinal e, conseqüentemente, reduz a perda da atividade celular. No entanto, a taxa de sucesso alcançada ainda é limitada, uma vez que não existe método de encapsulamento e nem material de revestimento que garanta a viabilidade total dos microrganismos. Dessa forma, a escolha da metodologia e dos materiais utilizados deve ser feita através de avaliação criteriosa para que taxas de sucesso mais relevantes sejam obtidas (COOK et al., 2012; RASHIDINEJAD et al., 2020).

Os métodos de encapsulação envolvem vários princípios físicos e químicos, incluindo processos de alta temperatura, como *spray drying* e processos de baixa temperatura, como liofilização, emulsificação, extrusão, gelificação e atomização eletro-hidrodinâmica. Cada um desses métodos possui seus próprios pontos positivos e negativos no encapsulamento, como facilidade de uso, proteção do núcleo, biocompatibilidade, custo, utilização de solventes orgânicos, entre outros. Mas, na produção de cápsulas contendo células probióticas, destaca-se os métodos de *spray drying*, liofilização, emulsão e extrusão (PECH-CANUL et al., 2020).

Spray drying é uma técnica que consiste na atomização de uma solução ou suspensão líquida em pequenas gotículas, seguida de secagem em uma corrente de ar quente, gerando como produto partículas esféricas porosas secas contendo o núcleo incorporado no material de parede. Este método tem sido aplicado com sucesso no encapsulamento de ingredientes alimentícios, pois permite a formação de cápsulas de alta qualidade e estabilidade por meio de um processo contínuo e com capacidade de produção em escala industrial. Como desvantagem, encontra-se a utilização de temperaturas elevadas durante o processo (DI BATTISTA et al., 2017).

Na técnica de liofilização, um líquido contendo o material de revestimento e o núcleo são congelados em temperaturas extremamente baixas e depois sublimado

em ambiente sob alto vácuo. As vantagens dessa técnica é o curto tempo do processo e boa taxa de sobrevivência dos microrganismos. No entanto trata-se de em método de custo elevado e a formação de cristais de gelo extracelulares resulta em alguns danos à parede da célula probiótica (RASHIDINEJAD et al., 2020).

No método de emulsão, a fase descontínua (núcleo e o material de revestimento) interage com a fase contínua (óleo) e o emulsificante para formar uma emulsão água / óleo. Depois disso, um agente geleificante é necessário para formar partículas de gel. A principal vantagem da emulsificação é a capacidade de formar cápsulas pequenas e como desvantagem temos a formação de cápsulas com formas e tamanhos desiguais, os danos causados às cápsulas por meio de sua separação das diferentes fases e o desperdício de óleo, mesmo em escala laboratorial (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012).

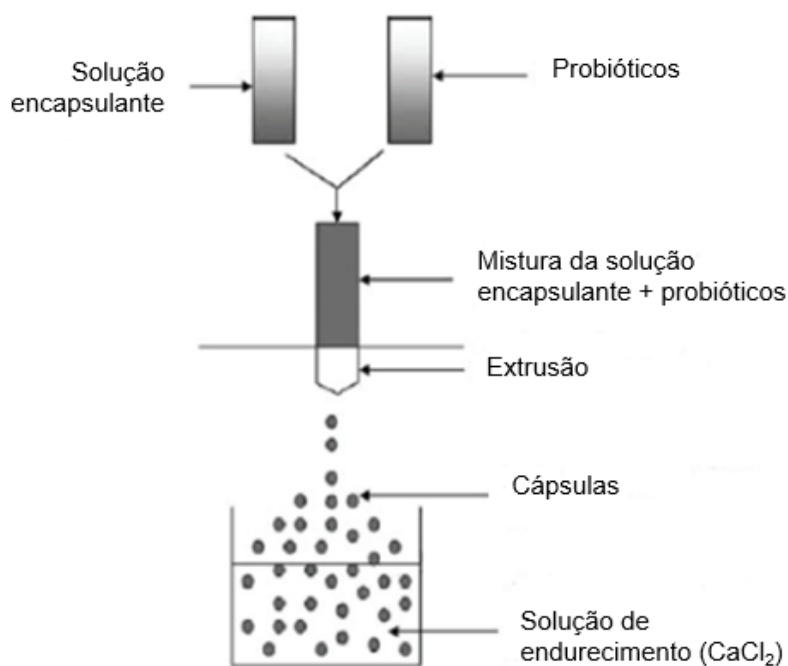
No encapsulamento por extrusão, uma solução contendo o material de revestimento e o núcleo é gotejada em uma solução de endurecimento que são imediatamente transformadas em cápsulas. As principais vantagens são a simplicidade de operação, bom desempenho em ambiente laboratorial, baixo custo e alta viabilidade celular e as desvantagens são tamanho e formato das cápsulas, duração do processo e dificuldade de aplicação em escala industrial, devido a lenta formação dos grânulos (RAMOS et al., 2018).

2.4.1. Encapsulamento de probióticos por extrusão

O processo de extrusão é amplamente utilizado no encapsulamento celular para o aprisionamento de probióticos, pois não requer utilização de altas temperaturas e solventes orgânicos. Lee et al. (2019), utilizaram o encapsulamento por extrusão para verificar a ação protetora das cápsulas na sobrevivência de *L. acidophilus* quando expostas às condições intestinais simuladas. Eckert et al. (2018) desenvolveram cápsulas utilizando o método de extrusão para avaliar os efeitos na proteção da viabilidade de *L. paracasei*, *L. pentosus* e *L. plantarum* ao serem armazenados em temperatura de refrigeração e durante exposição à condição simulada do trato gastrointestinal. Darjani e colaboradores (2016) investigaram o efeito do encapsulamento por extrusão na morfologia, tamanho das partículas e na viabilidade de *L. casei* durante exposição às condições gastrointestinais.

Ao usar esta técnica, uma solução encapsulante é misturada com uma suspensão de células e, em seguida, essa mistura sofre extrusão gota a gota, através de uma seringa ou bocal do equipamento, em uma solução de endurecimento, geralmente cloreto de cálcio (CaCl_2), resultando na formação instantânea das cápsulas que aprisionam as bactérias probióticas (Figura 1) (SILVA et al., 2016).

Figura 1. Esquema do método de extrusão para o encapsulamento de probióticos.



Fonte: Adaptado de ETCHEPARE et al., 2015a; ETCHEPARE et al., 2015b.

No entanto, a extrusão manual gera cápsulas com diferentes tamanhos e formatos, devido as vibrações naturais e irregulares, o que não é desejável. A fim de melhorar essa problemática, a tecnologia de vibração foi combinada ao método de extrusão. O princípio consiste na quebra do jato laminar pela aplicação de uma frequência vibracional, gerando cápsulas de tamanhos e formas homogêneas (SILVA et al., 2018).

Além da tecnologia de vibração, existem outras formas de controlar o tamanho das cápsulas, como: viscosidade da solução encapsulante (maior viscosidade, menor efeito da vibração e maior probabilidade de entupimento do bocal, que determina o tamanho das cápsulas e baixa viscosidade limita a produção

de cápsulas completamente esféricas), diâmetro do bico de extrusão (varia de 50 a 1000 μm) e distância entre o gotejamento da solução encapsulante até a solução de endurecimento (5 a 10 cm) (FANGMEIER et al., 2019).

2.4.2. Materiais de revestimento

A escolha do material de revestimento é um requisito importante para a encapsulação, pois tem impacto direto na eficiência e estabilidade das cápsulas. Uma ampla variedade de materiais encontra-se disponível e para ser considerado ideal, o material deve apresentar as seguintes características (PECH-CANUL et al., 2020):

- Baixa viscosidade em concentrações elevadas e fácil manipulação durante o processo;
- Baixo custo;
- Não reagir com o núcleo;
- Possuir habilidade de selar e segurar o núcleo dentro da estrutura da cápsula;
- Liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o encapsulamento;
- Proporcionar máxima proteção ao núcleo contra condições adversas, como pH, luz, oxigênio e ingredientes reativos;
- Ter solubilidade em solventes comumente utilizados;
- Possuir propriedades desejadas de liberação do núcleo;
- Ser de grau alimentar e apresentar sabor e odor suaves, para que possa ter aplicação em alimentos.

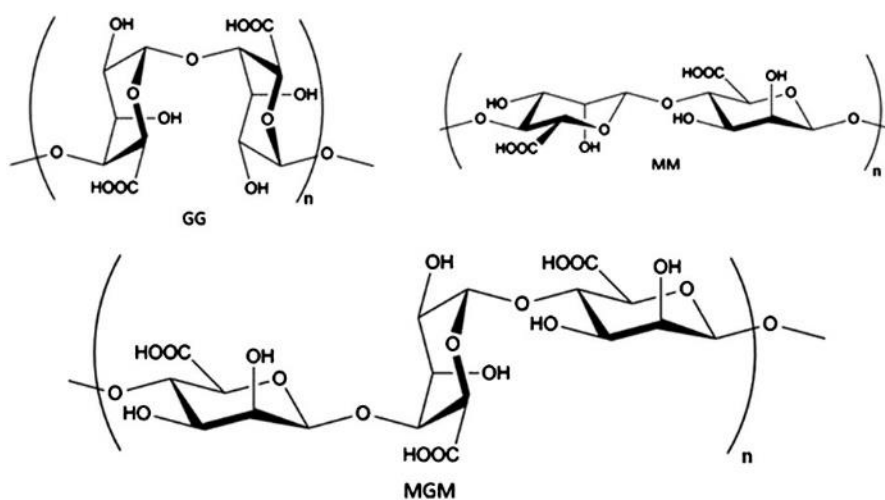
Existem diversos materiais de revestimento que podem ser utilizados na encapsulação de substâncias, como polissacarídeos (alginato, pectina, carragenina, goma xantana, goma gelana, goma arábica, quitosana, amido, maltodextrinas, etc.), proteínas de origem vegetal (milho, ervilha, trigo e proteína de soja) e de origem animal (gelatina, caseína, concentrado de proteína de soro de leite, isolado de proteína de soro de leite, clara de ovo e caseinatos), lipídeos de origem vegetal (girassol, milho ou azeite) e de origem animal (óleo de peixe, manteiga ou óleo de porco). Entretanto, na produção de cápsulas contendo células, o alginato é o material encapsulante mais comumente utilizado, graças às suas propriedades de

capacidade de gelificação, compatibilidade com o meio ambiente, não tóxico, baixo custo, sustentável e biodegradável (PAVLI et al., 2018; QUIRÓS-SAUCEDA et al., 2014).

Qi et al. (2020), produziram cápsulas de *L. rhamnosus* usando alginato de sódio como estrutura principal das partículas de hidrogel. Darjani et al. (2016), ao fabricarem cápsulas de *L. casei* empregaram alginato de sódio como material de revestimento. Xu et al. (2016), realizaram o encapsulamento de *L. casei* com alginato de sódio por meio da tecnologia de extrusão. Shi e colaboradores (2013), utilizaram alginato de sódio no encapsulamento do probiótico *L. bulgaricus* para melhorar a sobrevivência do microrganismo.

O alginato é um heteropolissacarídeo não ramificado, extraído da parede celular de algas marrons (*Laminaria spp.*) e formado por ligações β (1,4) de ácido-D-manurônico (M) e ácido-L-gulurônico (G) unidos por ligações α (1,4) (Figura 2) (DODERO et al., 2019).

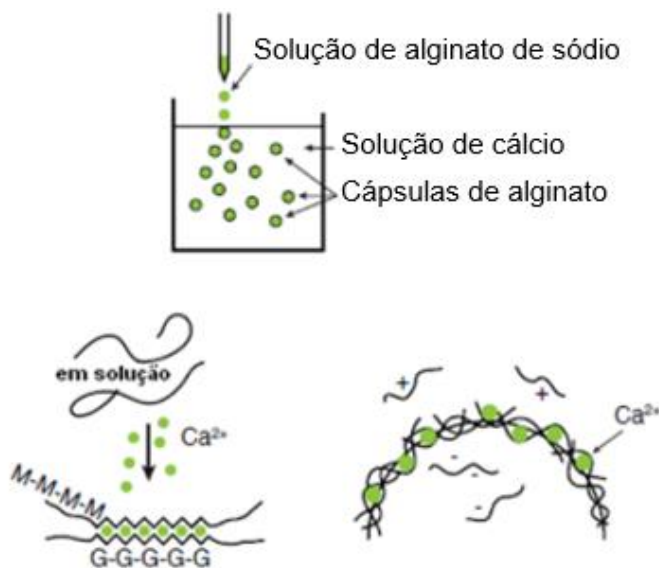
Figura 2. Estrutura química do alginato.



Fonte: COOK et al., 2012.

No encapsulamento por meio do método de extrusão, ao gotejar a solução de alginato de sódio em uma solução de endurecimento, ocorre a formação das cápsulas. Isso acontece devido a troca de íons de sódio do α -L-gulurônico presente no alginato com o cátion divalente presente na solução de endurecimento, transformando, assim, sua estrutura linear em uma estrutura tridimensional (Figura 3) (ATENCIO et al., 2020).

Figura 3. Esquema de formação das cápsulas pelo método de extrusão utilizando alginato de sódio como material de revestimento.



Fonte: Adaptado de MACIEL, 2013.

No entanto, o alginato de sódio apresenta algumas limitações, como instabilidade em ambientes ácidos e estrutura porosa. Mas essas desvantagens podem ser solucionadas ao utilizar a combinação de dois ou mais materiais de revestimento, originando um co-encapsulamento (LIU et al., 2017; SIMÓ et al., 2017).

Na encapsulação de probióticos, ingredientes alimentares não digeríveis, como prebióticos, são indicados como materiais co-encapsulantes eficazes, devido aos efeitos sinérgicos que eles proporcionam. O efeito sinérgico consiste na junção de dois ou mais compostos para produzir um efeito maior do que aqueles produzidos pela soma de todos os componentes individuais. Dessa forma, a presença do prebiótico na solução encapsulante melhora a estabilidade e viabilidade dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, no armazenamento e consumo de produtos alimentícios, além dos benefícios adicionais que proporcionam a saúde (CHAWDA et al., 2017; RASHIDINEJAD et al., 2020).

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar a influência da FBV, alimento com propriedades prebióticas, combinada ao alginato de sódio como materiais para o co-encapsulamento de *L. reuteri* por extrusão com tecnologia de vibração, visando sua aplicação industrial.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar as diferentes concentrações de FBV sobre formato, tamanho e estabilidade das cápsulas;

- Avaliar a viabilidade celular do *L. reuteri* encapsulado com alginato de sódio e combinado com FBV em diferentes concentrações, em relação às células livres, logo depois de serem produzidas;

- Avaliar a viabilidade celular do *L. reuteri* encapsulado armazenado a -18, 4 e 25 °C em relação às células livres nas mesmas condições de armazenamento;

- Avaliar a viabilidade celular do *L. reuteri* encapsulado frente às condições do fluido gástrico simulado em relação às células livres.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Local de realização

O trabalho foi conduzido nos Laboratórios de Análise de Alimentos, Microbiologia e Resíduos Agroindustriais da Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia (UESB) – *Campus Itapetinga*, no período de abril de 2020 a fevereiro de 2022.

4.2. Materiais

Ácido clorídrico (HCl) (Ecibra, Brasil), Ágar Bacteriológico (Acumedia, Estados Unidos), Alginato de sódio ((C₆H₇O₆Na)_x) (Êxodo Científica, Brasil), Caldo Man-Rogosa-Sharp (MRS) (Acumedia, Estados Unidos), Citrato de sódio (Na₃C₆H₅O₇) (LABSYNTH, Brasil), Cloreto de cálcio (CaCl₂) (VETEC Química Fina, Brasil), Cloreto de sódio (NaCl) (VETEC Química Fina, Brasil), Glicerol (C₃H₅(OH)₃) (VETEC Química Fina, Brasil), Pepsina (Marcela Dourada, Brasil). Farinha de banana verde da variedade Terra Anã foi fornecida pela Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) Mandioca e Fruticultura, localizada na cidade de Cruz das Almas – BA. ProVance (Aché, Brasil) foi obtido em farmácia na cidade de Itapetinga – BA.

4.3. Microrganismo e condições de cultivo

O microrganismo utilizado neste estudo, *L. reuteri* DSM 17938, foi obtido através do medicamento comercial ProVance. Para isso, um comprimido foi dissolvido em 25 mL de caldo MRS esterilizado a 121 °C por 15 min e incubado em estufa incubadora refrigerada tipo BOD, modelo CE-300/350 (Cienlab, Brasil) a 37 °C por 24 h sem agitação. Após esse período, placas contendo meio MRS foram estriadas por esgotamento e incubadas a 37 °C por 48 h para obtenção de culturas puras.

Após o crescimento, uma colônia isolada da placa foi inoculada em 25 mL de caldo MRS e incubado a 37 °C por 24 h. Posteriormente, padronizou-se a densidade óptica (DO) do inóculo a 1,000 ± 0,1 no espectrofotômetro modelo SP-22 (Biospectro, Brasil) a 600 nm, utilizando caldo MRS puro como branco. Em seguida, as células foram colhidas em centrifuga, modelo DT-4500 (Daika), a 2150 x g por 15 min, lavadas duas vezes com solução salina estéril 0,9 % (p/v) e ressuspensas em 5

mL de água destilada estéril. A concentração celular desta suspensão foi determinada após diluições seriadas, plaqueamento em triplicata em meio MRS e incubação a 37 °C por 48 h (MIRZAEI; POURJAFAR; HOMAYOUNI, 2012). Realizou-se a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC), dando preferência às placas que continham de 25 a 250 UFC e a população de bactérias foram expressas em Log_{10} UFC/g de suspensão de células probióticas livres. Ressalta-se que essa suspensão foi utilizada tanto para a produção de cápsulas como para as demais análises.

4.4. Preparação das cápsulas

As cápsulas foram produzidas através do método de extrusão com tecnologia de vibração e a composição dos tratamentos avaliados encontra-se na Tabela 1.

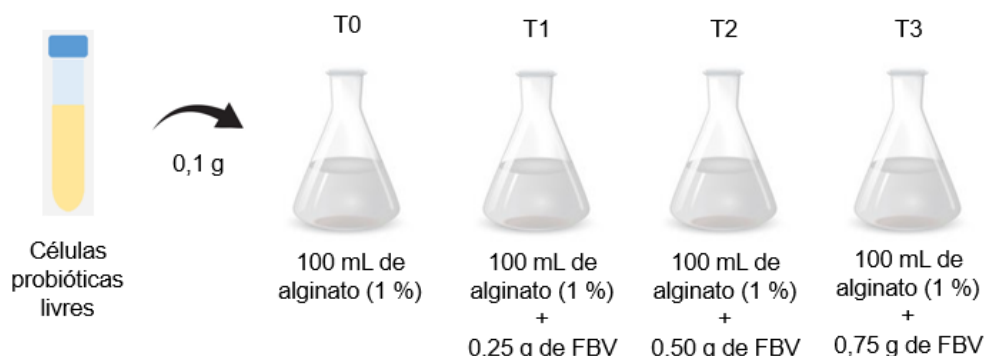
Tabela 1. Composição dos tratamentos avaliados.

Tratamentos	Composição			
	Água	Alginato	Microrganismo	FBV
T0	100 mL	1 g	0,1 g	-
T1	100 mL	1 g	0,1 g	0,25 g
T2	100 mL	1 g	0,1 g	0,50 g
T3	100 mL	1 g	0,1 g	0,75 g

Fonte: Própria autoria.

Inicialmente, o alginato de sódio foi previamente solubilizado à 70 °C na concentração de 1 % (p/v). Posteriormente, nos tratamentos T1, T2 e T3, adicionou-se respectivamente, 0,25, 0,50 e 0,75 g de FBV e esterilizou-se a 121 °C por 15 min. Após esfriamento, incluiu-se 0,1 g da suspensão de células probióticas livres, contendo 1×10^{11} UFC/g equivalente a 11,08 Log_{10} UFC/g, dando origem as soluções de alimentação para cada tratamento, conforme Figura 4.

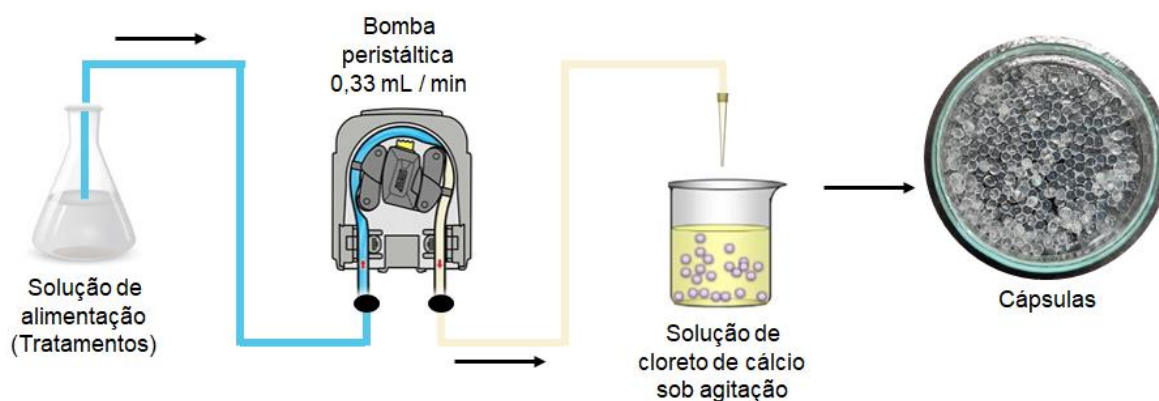
Figura 4. Soluções de alimentação para a produção de cápsulas.



Fonte: Própria autoria.

A solução de alimentação foi então bombeada e gotejada em solução de CaCl_2 10 % (p/v) mantida sob agitação magnética, modelo 114 (Nova Ética, Brasil), através de uma bomba dosadora peristáltica digital, modelo KRONOS 50 Full KRFM-2 (Seko,), na seguinte condição de operação: vazão: 0,33 mL/min, equivalente a 1 % da sua taxa de fluxo máxima. Para melhorar a morfologia das cápsulas, acoplou-se uma ponteira de pipeta de 10-100 μL na mangueira da bomba e a distância entre a ponteira e a superfície da solução de CaCl_2 foi de 5 cm (Figura 5).

Figura 5. Produção de cápsulas a partir do método de extrusão com tecnologia de vibração.



Fonte: Própria autoria.

As cápsulas resultantes permaneceram em repouso na solução de CaCl_2 por aproximadamente 30 min e, posteriormente, realizou-se a separação, lavagem com solução salina estéril 0,9 % (p/v) e armazenamento a 4 e 25 °C em recipientes de vidro estéreis contendo solução salina 0,9 % (p/v) para posterior análises. Para a

temperatura de -18 °C, armazenou-se as cápsulas em microtubos de centrifuga estéreis de 2 mL contendo solução salina 0,9 % (p/v) e glicerol (50 %). As respectivas temperaturas simulam três condições de armazenamento comuns do dia-a-dia, refrigeração, temperatura ambiente e congelamento (ZAEIM et al., 2019; DE PRISCO et al., 2015).

4.5. Eficiência do encapsulamento

A eficiência do encapsulamento de *L. reuteri* foi avaliada por meio da razão entre a concentração de células viáveis devidamente encapsuladas e a concentração inicial de células adicionadas à solução de alimentação utilizada para o encapsulamento, como demonstra a Equação 1:

$$\text{Eficiência (E)} = \frac{\text{Log}_{10}N}{\text{Log}_{10}N_0} \times 100 \quad (1)$$

Onde: N = UFC presente em 0,1 g de cápsula e N_o = UFC presente em 0,1 g da solução de alimentação antes do encapsulamento.

Para isso, diluiu-se 0,1 g da solução de alimentação em tubo de ensaio contendo 9 mL de citrato de sódio 0,1 M, agitou-se em agitador de tubos tipo vortex, modelo AP-56 (Phoenix, Brasil), por 5 ciclos de 1 min com intervalo de 1 min entre cada ciclo. Realizou-se diluições seriadas, plaqueamento em triplicata em meio MRS e incubação a 37 °C por 48 h. A contagem de células foram expressas em Log₁₀ UFC/g de solução de alimentação antes do encapsulamento. Para as cápsulas, executou-se igualmente e a população de células foram expressas em Log₁₀ UFC/g de cápsulas (ZAEIM et al., 2019).

4.6. Densidade aparente das cápsulas

A densidade aparente das cápsulas foi determinada pela relação entre seu peso aferido em balança semi analítica modelo AL 500C (Marte Balanças e aparelhos de precisão LTDA, Brasil) e o seu respectivo volume aferido em uma proveta de 10 mL (CÓRDOBA; DELADINO; MARTINO, 2013).

4.7. Medição do tamanho das cápsulas

O diâmetro das cápsulas foi medido por paquímetro digital (Pantec, Brasil) e os resultados expressos em milímetro (mm). Realizou-se 120 medições para cada tratamento testado, com finalidade de obter maior representatividade das amostras. As curvas de distribuição de tamanho foram representadas graficamente pelo Microsoft Excel (TA et al., 2021).

4.8. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

As soluções encapsulantes e as cápsulas foram avaliadas por meio da Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR Cary® 630, Agilent, Estados Unidos), sob faixa do infravermelho médio, com comprimento de onda variando de 4000 a 600 cm^{-1} , resolução de 4 cm^{-1} e 64 scans. Aproximadamente 0,1 g das amostras foram colocadas individualmente sobre a superfície do diamante, onde incidiam os raios na faixa do infravermelho, obtendo-se os espectros no modo de absorbância. Durante a análise, a temperatura ambiente foi mantida em torno de 25 °C (ALEHOSSEINI et al., 2019).

4.9. Avaliação da viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado durante armazenamento a -18, 4 e 25 °C.

A viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado, armazenados a -18, 4 e 25 °C foi avaliada a cada 5 dias durante 30 dias consecutivos. Para isso coletou-se 0,1 g de células livres e 0,1 g de cápsulas para determinação da viabilidade celular. As amostras coletadas foram solubilizadas, individualmente, em tubos de ensaio contendo 9 mL de citrato de sódio 0,1 M e submetidas a agitação, por 5 ciclos de 1 min com intervalo de 1 min entre cada ciclo. Realizou-se as diluições seriadas, plaqueamento em triplicata em meio MRS e incubação a 37 °C por 48 h. A contagem de células de *L. reuteri* foram expressas em Log_{10} UFC/g de células livres e Log_{10} UFC/g de cápsulas (ZAEIM et al., 2019; DE PRISCO et al., 2015).

4.10. Avaliação *in vitro* da viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado em fluido gástrico simulado

A viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado foi avaliada em solução de fluido gástrico simulado (FGS), contendo 0,9 g/L de cloreto de sódio, 3,0 g/L de pepsina purificada e pH ajustado para 2,00 utilizando HCl. Em 9 mL de FGS, foi adicionado, individualmente, 1 g de cápsulas e 1 g de suspensão contendo células probióticas livres. As células livres e as cápsulas foram incubadas a 37 °C a 100 rpm e nos tempos de 30, 60, 90 e 120 min amostras de 0,5 g foram coletadas para determinação da viabilidade celular, conforme metodologia previamente descrita no item 4.7 (LIU et al., 2017; ARSLAN et al., 2015).

4.11. Análise estatística

As análises foram realizadas em 3 repetições e triplicata e avaliação estatística dos resultados obtidos foi realizada por meio de análise de variância (ANOVA). Para os resultados significativos, as médias foram comparadas pelo Teste de Tukey, a um nível de 95 % de significância ($< 0,05$). Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando o software *Statistical Analysis System* (SAS) e as figuras foram desenhadas pelo software SigmaPlot.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação da eficiência do encapsulamento

A concentração de células viáveis de *L. reuteri* antes e após o encapsulamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Contagem de células viáveis (Log_{10} UFC/g) de *L. reuteri* antes e após o encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.

Tratamento	Contagem de células viáveis (Log_{10} UFC/g)		Redução do Log	Eficiência (%)
	Antes do encapsulamento	Após o encapsulamento		
T0	5,85	5,59	0,26	95,50 ± 0,64 ^A
T1	5,86	5,67	0,19	96,71 ± 0,25 ^{AB}
T2	5,74	5,62	0,12	97,98 ± 1,09 ^{BC}
T3	5,80	5,78	0,02	99,51 ± 0,11 ^C

*Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g de FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Ao observar os resultados, verificou-se que o método de extrusão promoveu melhoria significativa na eficiência de encapsulamento de *L. reuteri* (> 95 %), para todos os tratamentos analisados. Notou-se que alterações na concentração de FBV utilizada no revestimento das células probióticas, proporcionaram diferença significativa ($p \leq 0,05$) no efeito da preservação de células viáveis após o encapsulamento. Constatou-se, que quanto maior a concentração de FBV, menor a redução do log da viabilidade celular e, conseqüentemente, melhor a eficiência do encapsulamento.

A melhor eficiência foi obtida nos tratamentos T2 (0,50 g de FBV) e T3 (0,75 g de FBV), que proporcionaram, respectivamente, perda de 0,12 e 0,02 log de

células viáveis durante o processo de encapsulação. Deste modo, a eficiência do encapsulamento de *L. reuteri* utilizando a combinação de alginato e FBV, em diferentes concentrações, foi melhor quando comparadas ao controle.

Os resultados obtidos são semelhantes aos observados por Jantarathin et al. (2017), no co-encapsulamento por extrusão de células probióticas utilizando matriz de alginato de sódio revestida com quitosana e dois prebióticos potenciais (inulina e alcachofra de Jerusalém). Os autores relataram uma melhor eficiência nas cápsulas produzidas com prebiótico (90,40 %) quando comparadas as cápsulas sem prebiótico (88,19 %).

As fontes prebióticas farinha de palma forrageira, farinha de bagaço de maçã e inulina foram empregadas na co-encapsulação de bactérias probióticas em estudo realizado por Serrano-Casas et al. (2017) e a eficiência do encapsulamento foi na ordem de 83,78 % a 90,91 %.

De acordo com Siang et al. (2019), produzir cápsulas de *L. rhamnosus* utilizando prebiótico e tecnologia de coextrusão resulta em eficiência que varia de 84,16 % a 90,56 %. Alto rendimento de encapsulação (>92 %), foi descrito por De Prisco et al. (2015), ao encapsular por extrusão *L. reuteri* em aginato e alginato-quitosana.

Percebe-se que o método de extrusão não é danoso para microrganismos, pois não provocou grandes impactos na viabilidade celular após a encapsulação. O fato da técnica não utilizar temperaturas extremas, envolvendo basicamente o gotejamento da solução encapsulante contendo uma matriz polimérica e substância bioativa em solução geleificante, resulta em uma maior preservação do material encapsulado, em comparação com outras técnicas existentes, como *spray drying* e liofilização (ECKERT et al., 2018; SHISHIR et al., 2018).

Além do método de co-encapsulamento, a combinação do alginato de sódio com FBV cooperou na obtenção de resultados satisfatórios para encapsulação de células. Sabe-se que não existe material de revestimento que proteja totalmente a viabilidade das células. No entanto, a combinação de dois ou mais materiais é uma estratégia que vem sendo amplamente utilizada. O alginato de sódio e o amido presente na FBV, quando combinados, formam um complexo com efeito sinérgico em meios contendo bactérias produtoras de ácido lático. Este complexo formado

permite a ligação entre os hidrogéis devido à adição de cátions divalentes (Ca^{2+} presente na solução de endurecimento), melhorando assim a estabilidade química e mecânica da micropartícula formada, bem como a eficiência de encapsulação (DE ARAÚJO ETCHEPARE et al., 2016a). À vista disso, constatou-se que maiores concentrações de FBV contém mais amido e, conseqüentemente, maior a sinergia e eficiência do processo.

5.2. Densidade aparente das cápsulas

A Tabela 3 retrata a densidade aparente das cápsulas de *L. reuteri* produzidas com diferentes concentrações de FBV.

Tabela 3. Densidade aparente das cápsulas de *L. reuteri* obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.

Tratamento	Densidade aparente (g/mL)
T0	1,02 ± 0,01 ^A
T1	1,00 ± 0,01 ^A
T2	0,99 ± 0,03 ^A
T3	0,98 ± 0,01 ^A

*Letras iguais na mesma coluna indicam que não há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p > 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

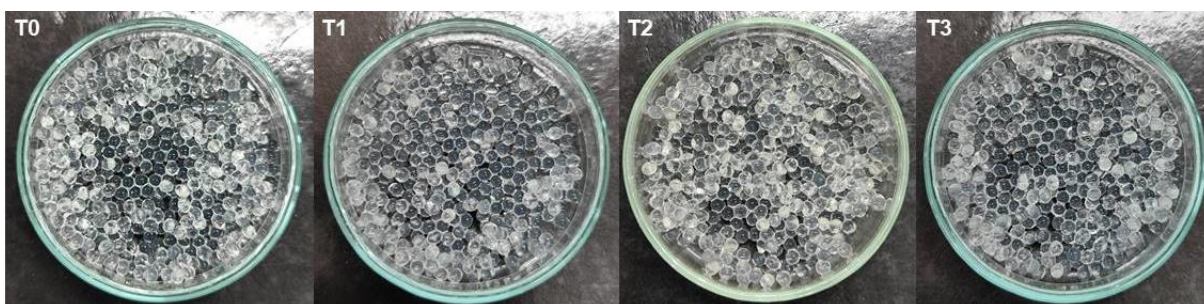
Os resultados revelaram que as concentrações de FBV utilizadas no revestimento das células probióticas não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) na densidade aparente das cápsulas.

Resultados semelhantes foram obtidos por Córdoba, Deladino e Martino (2013), ao avaliar o efeito da adição de amido em hidrogéis de alginato de cálcio. Os autores relataram que a incorporação do amido não afetou a densidade aparente e obtiveram valores de 0,78 g/mL para cápsulas de alginato e 0,79 g/mL para cápsulas com alginato de cálcio e amido.

5.3. Caracterização das cápsulas

O formato e tamanho das cápsulas foram avaliados logo após sua produção. As cápsulas obtidas apresentaram formato esférico, superfície lisa e contínua, sem orifícios e rachaduras visuais, independente da concentração de FBV utilizada como material de revestimento, conforme demonstra a Figura 6.

Figura 6. Cápsulas de alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde para imobilização de *L. reuteri*, produzidas por extrusão com tecnologia de vibração.



Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).
Fonte: Própria autoria.

Em relação ao diâmetro, obteve-se valores que variaram de 2,61 a 3,49 mm, e estão relatados na Tabela 4.

Tabela 4. Diâmetro das cápsulas de *L. reuteri* obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.

Tratamento	Diâmetro (mm)
T0	2,61 ± 0,05 ^A
T1	2,97 ± 0,04 ^B
T2	3,13 ± 0,04 ^C
T3	3,49 ± 0,04 ^D

*Letras diferentes na mesma coluna indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Ao analisar os valores do diâmetro de cada tratamento, verificou-se que a concentração de FBV utilizada no revestimento das células probióticas influenciou significativamente ($p \leq 0,05$) no tamanho das cápsulas.

As cápsulas sem FBV eram menores quando comparadas às cápsulas produzidas com FBV, implicando que a incorporação do prebiótico fez com que o diâmetro das cápsulas aumentasse de forma significativa, originando partículas de tamanho maiores.

Os grânulos de amido são insolúveis em água fria. No entanto, ao aquecê-los de forma contínua, em excesso de água, passam por um processo chamado gelatinização, que resulta no seu inchaço irreversível, lixiviação de compostos solúveis e, enfim, ruptura total, convertendo-se em uma pasta/gel viscoelástico, firme e rígido ao resfriar (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2010). A FBV possui amido na sua composição, dessa forma, ao submetê-la ao processo de esterilização (121 °C/15 min), ocorreu a gelatinização do amido e que maiores concentrações de FBV contém mais amido, maior viscosidade e, conseqüentemente, maior inchaço/volume das cápsulas.

Diâmetro médio de 3,7 mm foi encontrado por Córdoba, Deladino e Martino (2013), ao produzir cápsulas com alginato de sódio e amido de milho por geleificação iônica. Zaeim et al. (2019), também relataram um aumento no diâmetro das microcápsulas, de 0,606 mm para 0,819 mm, ao utilizar inulina e amido no co-encapsulamento de probióticos pelo método de atomização eletro-hidrodinâmica. Além disso, a presença dos prebióticos concebeu microcápsulas esféricas e com rugosidades ou rachaduras superficiais menores em comparação com as microcápsulas sem prebióticos.

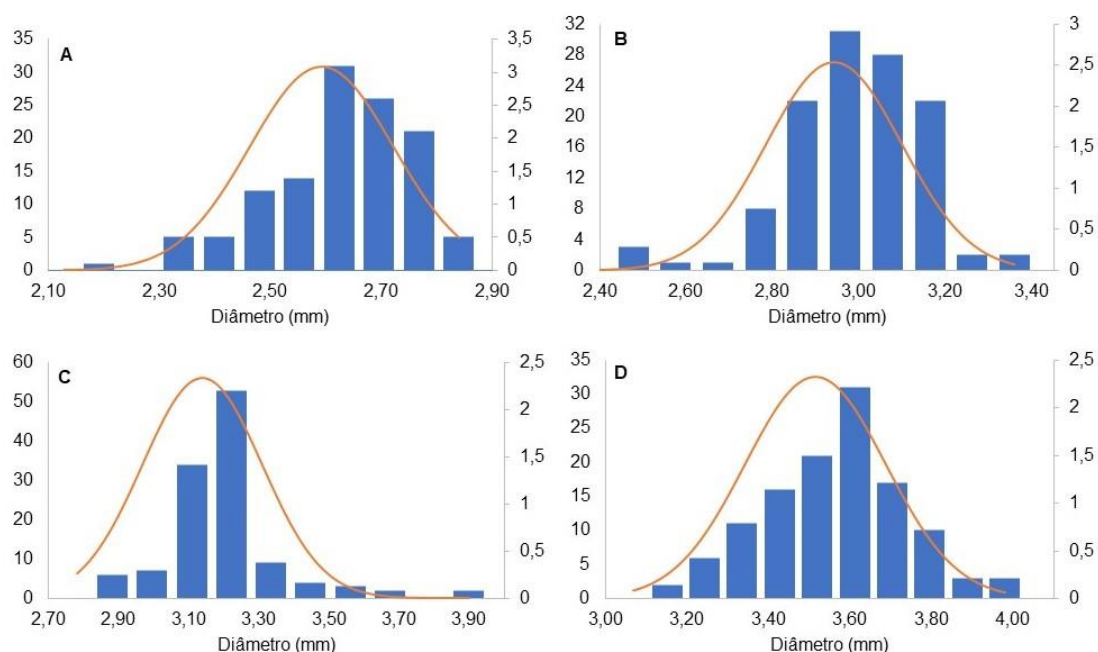
Além da presença do prebiótico, outro fator que pode ter influenciado nas características das cápsulas, principalmente no tamanho, foi a viscosidade da solução encapsulante (alginato de sódio + FBV) utilizada. Pois quanto maior a concentração, mais viscosa e difícil de extrusar se torna a solução. Em estudo realizado por García-Ceja et al. (2015), o encapsulamento de *L. acidophilus* e *L. reuteri* utilizando alginato de sódio (3 %) originou cápsulas com diâmetro, respectivamente, de 2,06 mm e 2,08 mm. Já o encapsulamento da mistura dos lactobacilos, deu origem a cápsulas de 2,10 mm.

Diferentes concentrações de alginato de sódio (0,1 %, 0,5 % e 1 %) foram analisadas por Sanna et al. (2015) e os resultados alcançados demonstraram que o aumento da concentração de alginato, aumentou a viscosidade da solução e conseqüentemente, o diâmetro das nanocápsulas. Dallabona et al. (2020), ao utilizar solução de alginato (3 %), conseguiu cápsulas com diâmetro de 1,2 mm.

Sabe-se que o tamanho das cápsulas é um parâmetro de suma importância, já que as dimensões desejadas dependem de onde e como será a aplicabilidade do produto. Cápsulas menores são mais requisitadas no ramo alimentício e farmacêutico, em razão de provocar pouca ou nenhuma alteração nas propriedades sensoriais, garantindo um produto homogêneo, de palatabilidade agradável e qualidade, ao passo que cápsulas maiores liberam o material encapsulado de forma mais prolongada (ARSLAN et al., 2015).

A Figura 7 ilustra a curva de distribuição do diâmetro das cápsulas formadas pelo método de extrusão com tecnologia de vibração.

Figura 7. Efeito da adição de farinha de banana verde no diâmetro (coluna) e distribuição de tamanho (linha) das cápsulas produzidas por extrusão com tecnologia de vibração. T0 (A), T1 (B), T2 (C) e T3 (D).



Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).
Fonte: Própria autoria.

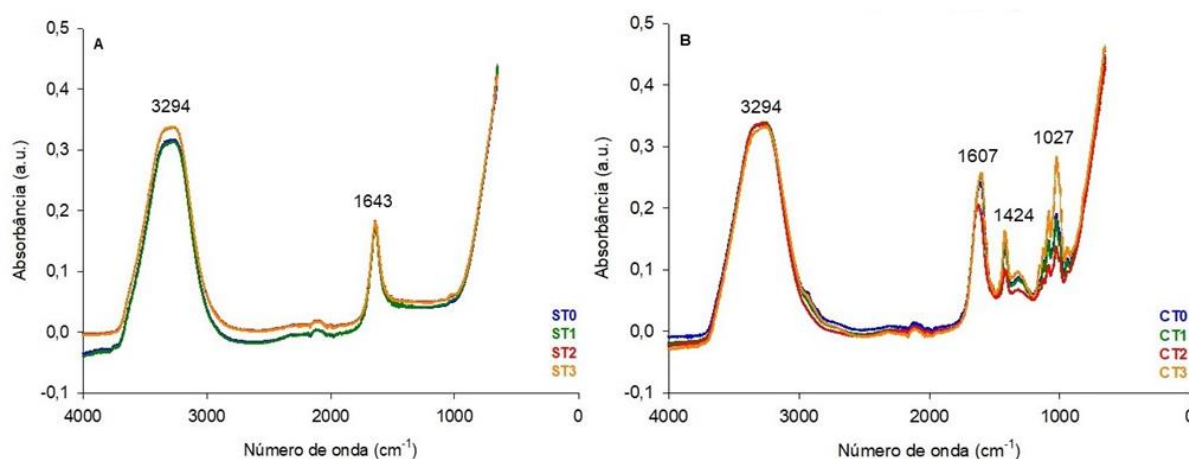
Observa-se que as curvas foram simétricas do tipo unimodal, ou seja, apresentando um único pico situado no meio da distribuição, indicando uniformidade no diâmetro das cápsulas de cada tratamento analisado.

5.4. Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

A Espectroscopia de Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR) foi usada para caracterizar tanto as soluções encapsulantes como as cápsulas e os espectros de absorbâncias obtidos encontram-se na Figura 8.

De acordo com as Figuras 8A e 8B, percebe-se que os perfis espectrais de infravermelho médio de cada gráfico foram semelhantes, sem alterações de localização, indicando a presença dos mesmos grupos funcionais nos tratamentos analisados. A principal diferença entre os dois gráficos está no número de picos principais formados. Para as soluções encapsulantes (Figura 8A), foi possível identificar dois picos principais, com número de onda 3294 e 1643 cm^{-1} e, após a formação das cápsulas (Figura 8B), notou-se comportamento espectral com quatro picos principais, localizados nas regiões de 3294 , 1607 , 1424 e 1027 cm^{-1} .

Figura 8. Espectros de FTIR das soluções encapsulantes (A) e das cápsulas (B) produzidas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como materiais de revestimento.



Legenda: ST0 (Solução T0); ST1 (Solução T1); ST2 (Solução T2); ST3 (Solução T3);
CT0 (Cápsula T0); CT1 (Cápsula T1); CT2 (Cápsula T2) e CT3 (Cápsula T3).
T0 (Controle); T1 (0,25 g FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

O pico 3294 cm^{-1} presente em ambos os gráficos, indica vibrações de alongamento do grupo funcional hidroxila (O-H), possuindo como característica

espectral uma banda larga em forma de sino (BARBOSA, 2007). Todas as substâncias utilizadas na elaboração dos tratamentos possuem o grupo O-H em sua estrutura química e resultados semelhantes foram relatados por Badita et al. (2019), ao caracterizarem filmes à base de alginato de sódio; Kumar et al. (2019), em amostras de farinha de banana verde de diferentes variedades; Córdoba, Deladino e Martino (2013), ao avaliarem cápsulas de alginato de sódio e amido de milho.

O número de onda 1643 cm^{-1} é indicativo das vibrações de flexão do grupo O-H das moléculas de água e pode ser atribuída como água agregada com ligação de hidrogênio moderadamente (XIAO; TONG; LIM, 2014). Paramasivam et al. (2021), ao explorarem diferenças nas propriedades físico-química e funcionais de amidos de banana, observaram pico em torno de $1643\text{-}1646\text{ cm}^{-1}$ e relacionaram a vibração de flexão O-H na região amorfa.

As regiões de 1607 e 1424 cm^{-1} correspondem, respectivamente, às vibrações de estiramento assimétrico e simétrico do grupo funcional carboxílico (-COO^-), provavelmente associado ao alginato de sódio, visto que é um sal carboxílico (XIAO; GU; TAN, 2014). Derkach et al. (2019), ao estudarem interações entre gelatina e alginato de sódio, encontraram picos de absorção característicos no espectro do alginato de sódio em 1616 e 1418 cm^{-1} e também associaram a vibrações de alongamento assimétrico e simétrico de COO^- , respectivamente.

O pico de 1027 cm^{-1} é atribuído às vibrações de estiramento do grupo funcional C-O-C, associados as ligações glicosídicas do amido presente na estrutura da FBV (LIMA et al., 2012). Neste pico, observou-se maior intensidade do espectro na cápsula T3, indicando que há maior concentração desse grupo químico em relação as demais cápsulas. De acordo com Jiang et al. (2015), as bandas FTIR em 1047 e 1022 cm^{-1} são características do amido e conhecidas por serem sensíveis a mudanças nas regiões cristalinas e amorfas próximas à superfície dos grânulos, respectivamente.

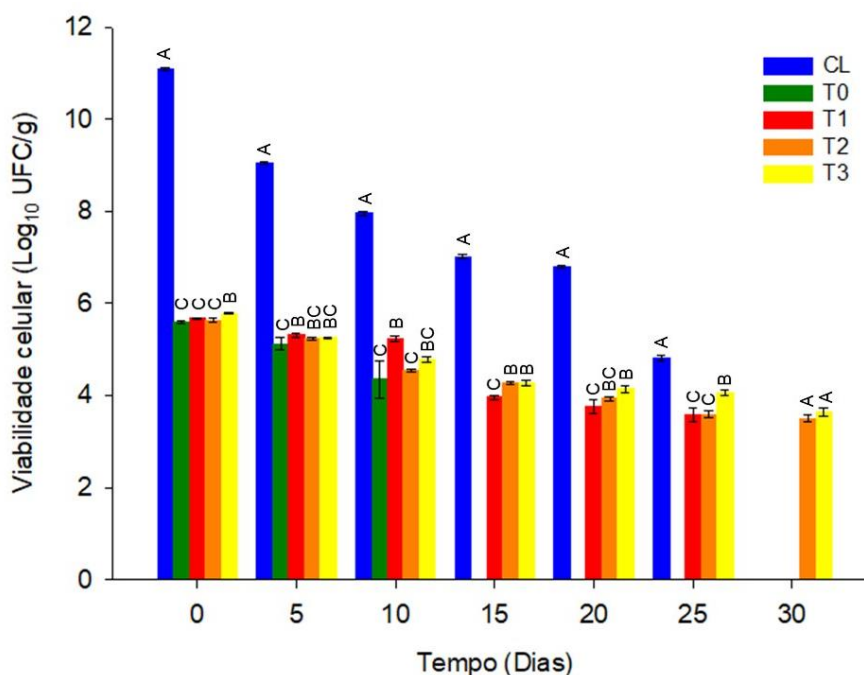
Outra associação a uma intensidade mais alta na região de 1025 cm^{-1} é relatado por Saara et al. (2013), em pesquisa desenvolvida com hidrogéis à base de alginato de sódio e gelatina reticulados com íons de cálcio, que sugerem vibração de ligação O-H mais forte ou uma ligação mais forte dos íons de cálcio (Ca^{2+}) presente na solução de endurecimento aos ácidos gulurônicos do alginato de sódio. Diante do

exposto, constatou-se que no processo de fabricação das cápsulas interações entre os materiais de revestimento e a solução de endurecimento ocorreram, uma vez que a análise proporcionou a identificação de novos grupos químicos e que os resultados obtidos são compatíveis com os encontrados na literatura.

5.5. Avaliação da viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado durante armazenamento a -18, 4 e 25 °C

Na Figura 9 encontra-se as contagens das células probióticas encapsuladas sob diferentes concentrações de FBV em comparação com as cápsulas controle e as células probióticas livres, armazenadas a -18 °C.

Figura 9. Viabilidade das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a -18 °C por 30 dias.



*Letras diferentes para o mesmo tempo indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g de FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Para o armazenamento a -18 °C, observou-se que em 10 dias, todos os tratamentos analisados apresentavam viabilidade celular. No entanto, a taxa de sobrevivência dos microrganismos encapsulados (T0 = 77,81 %; T1 = 92,24 %; T2 = 80,82 % e T3 = 82,53 %), foi superior aos microrganismos livres (71,84 %).

Aos 15 dias de armazenamento, observou-se diminuição drástica na viabilidade de T0, que passou de $4,35 \pm 0,41 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$ para perda total de células viáveis. Ao passo que CL, T1, T2 e T3 tiveram redução da taxa de sobrevivência inferior a 2 logs.

Após 25 dias, embora a viabilidade celular de T1, T2 e T3 tenha diminuído (< 1 log), essa redução foi menor em comparação as células livres (2 logs), indicando que a adição da FBV proporcionou efeito protetor na sobrevivência de *L. reuteri* co-encapsulado.

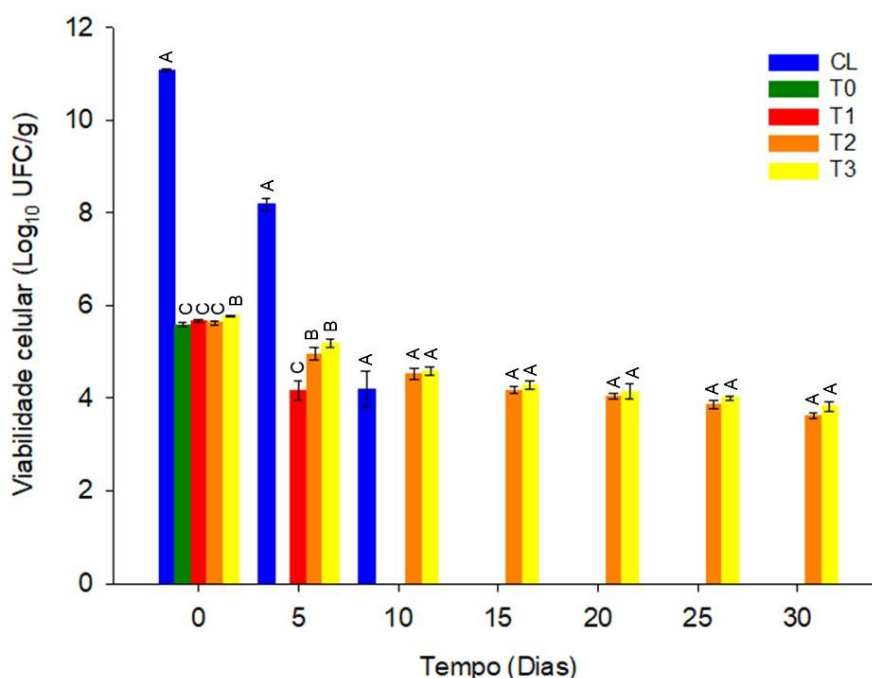
Ao final do período de armazenamento, não se constatou viabilidade celular em CL e T0. Em contrapartida, T2 e T3 finalizaram com taxas de sobrevivência das células de *L. reuteri* em 62,17 % e 62,97 %, respectivamente, após os 30 dias de estocagem a -18 °C.

Ao armazenar por 90 dias a -18 °C *B. lactis* livres e encapsulados com inulina, Zaeim et al. (2019), verificou-se ao final do período de estocagem, apenas 1 Log UFC/g de viabilidade nas células livres, enquanto as células encapsuladas apresentaram viabilidade de 7,01 Log UFC/g.

De Lara Pedroso et al. (2012) ao armazenar a -18 °C, células livres e cápsulas lipídicas de *B. lactis* e *L. acidophilus*, constatou-se que após 90 dias de armazenamento células livres de *B. lactis* tiveram redução de 4,53 Log UFC/g da viabilidade celular, enquanto as cápsulas apresentaram redução de apenas 1,85 Log UFC/g. Em relação as células viáveis de *L. acidophilus*, a redução foi de 6,08 e 1,6 Log UFC/g para células livres e cápsulas, respectivamente, durante o mesmo período de armazenamento.

Na Figura 10, estão apresentadas as contagens das células probióticas encapsuladas sob diferentes concentrações de FBV em comparação com as cápsulas controle e as células probióticas livres, armazenadas a 4 °C.

Figura 10. Viabilidade das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a 4 °C por 30 dias.



*Letras diferentes para o mesmo tempo indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g de FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Os resultados revelaram que a presença da FBV, após 5 dias de armazenamento, foi eficiente na preservação das células, pois as cápsulas sem FBV (T0) perderam completamente a viabilidade celular e as células livres (CL) tiveram uma redução em 2,90 logs de células viáveis. Em contrapartida, T1, T2 e T3, apresentaram melhor preservação do microrganismo, com $4,16 \pm 0,2$, $4,95 \pm 0,14$ e $5,19 \pm 0,09 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, respectivamente.

Ao observar o tempo de 10 dias, verificou-se uma redução de 4 logs para células livres e não se constatou viabilidade celular em T1. Para T2 e T3, viabilidade de $4,52 \pm 0,12$ e $4,58 \pm 0,09 \text{ Log}_{10} \text{ UFC/g}$, respectivamente, foram encontradas.

Aos 15 dias a viabilidade das células livres foi perdida e notou-se que somente T2 e T3 mantiveram o desempenho de proteção das células, apresentando viabilidade celular até os 30 dias de armazenamento, sugerindo melhor atuação desses tratamentos na preservação de *L. reuteri* co-encapsulado com alginato e FBV. Ao comparar a concentração inicial e final de células viáveis, T2 iniciou-se com

5,63 ± 0,04 Log₁₀ UFC/g e finalizou-se com 3,63 ± 0,06 Log₁₀ UFC/g, ao passo que T3 foi de 5,78 ± 0,01 Log₁₀ UFC/g para 3,82 ± 0,11 Log₁₀ UFC/g, que representam, respectivamente, taxas de sobrevivência de 64,48 e 66,09 % das células de *L. reuteri*.

De Araújo Etchepare et al. (2016b), ao analisar o efeito da temperatura de refrigeração (7 °C) na viabilidade de *L. acidophilus* microencapsulados, relatou que em 15 dias de armazenamento, ocorreu uma redução significativa de 3,08 log para cápsulas controle e redução em menor proporção, 1,63 log, para cápsulas contendo prebiótico e quitosana, demonstrando que a adição desses compostos melhorou significativamente a viabilidade do microrganismo sob armazenamento refrigerado.

Comportamento semelhante foi descrito por Nualkaekul et al. (2012) ao avaliar a sobrevivência de *L. plantarum* microencapsulado em suco de romã refrigerado. Constatou-se diminuição da concentração de células, com taxa semelhante, para células livres e cápsulas não revestidas com quitosana, perdendo a viabilidade total após 4 semanas de armazenamento. Em contrapartida, nas cápsulas revestidas com quitosana, a redução na concentração de células foi muito mais baixa e após 6 semanas de armazenamento, viabilidade em torno de 5 Log UFC/mL foram encontradas, indicando que as cápsulas revestidas desempenharam melhor atividade protetora aos microrganismos probióticos submetidos a condição de refrigeração.

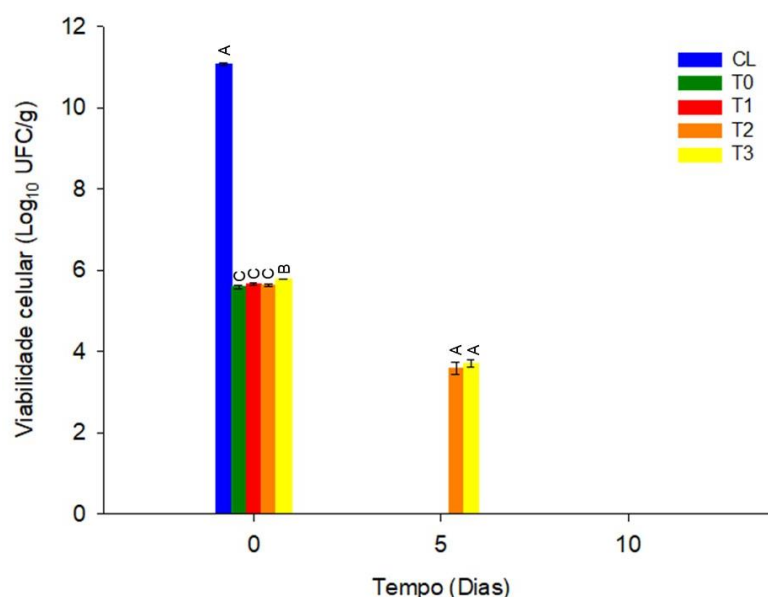
Trabelsi et al. (2013), ao armazenar a 4 °C durante 8 semanas *L. plantarum* livre e encapsulado, relatou resultados mais satisfatórios na viabilidade celular das células encapsuladas em comparação com as células livres nas mesmas condições de armazenamento. A sobrevivência de *L. plantarum* encapsulado diminuiu de 9,34 para 7 Log UFC/mL e nenhuma sobrevivência foi constatada para *L. plantarum* livre após 60 dias de armazenamento.

Células livres de *Bifidobacterium longum* foram incapazes de manter viabilidade sob condição de armazenamento a 4 °C em 28 dias de estocagem, tendo redução drástica de 8,96 Log UFC/mL para 3,96 Log UFC/mL, de acordo com estudo realizado por Prasanna e Charalamppoulos (2018). Já os resultados para as células encapsuladas com alginato de sódio e matrizes de leite (bovino e caprino),

revelaram melhorias na viabilidade das células refrigeradas por 28 dias, onde mantiveram concentração de células viáveis acima de 6 Log UFC/g.

Na Figura 11 estão apresentadas as contagens das células probióticas encapsuladas sob diferentes concentrações de FBV em comparação com as cápsulas controle e as células probióticas livres, armazenadas a 25 °C.

Figura 11. Viabilidade das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, armazenadas a 25 °C por 10 dias.



*Letras diferentes para o mesmo tempo indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g de FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Em relação a esses resultados, evidenciou-se que em apenas 5 dias de armazenamento, CL, T0 e T1 não continham células vivas e apenas T2 e T3 exibiram viabilidade celular. Inicialmente, tiveram uma contagem de células viáveis de $5,63 \pm 0,04$ Log₁₀ UFC/g e $5,78 \pm 0,01$ Log₁₀ UFC/g e reduziram, respectivamente, para $3,58 \pm 0,15$ Log₁₀ UFC/g e $3,72 \pm 0,09$ Log₁₀ UFC/g, que corresponde a uma perda superior a 2 logs.

Para 10 dias, notou-se que o intervalo de tempo foi suficiente para que todos os tratamentos analisados não apresentassem células viáveis de *L. reuteri*, sugerindo que nessas condições, a combinação de alginato e FBV não apresentaram eficiência na proteção das células probióticas co-encapsuladas. Deste

modo, as análises do tempo de 15 a 30 dias de armazenamento não foram realizadas.

De Prisco et al. (2016) expôs diminuição drástica na viabilidade das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas, quando armazenadas a 20 °C. Observou-se redução total da viabilidade de células em 14 dias de armazenamento para células livres e a partir de 21 dias para células encapsuladas.

Peredo et al. (2016) ao armazenar a 22 °C, cápsulas de *L. casei* e *L. plantarum* revestidas com três prebióticos (amido de batata, *Psyllium plantago* e inulina), relata que após 15 dias de armazenamento cápsulas de *L. casei* revestidas com *Psyllium plantago* e inulina não apresentaram viabilidade celular, enquanto cápsulas com amido de batata, expressou 4,27 Log UFC/g após 30 dias de estocagem. A respeito das cápsulas de *L. plantarum*, retenção acima de 6 Log UFC/g de células viáveis foram observadas após 30 dias de armazenamento para todos os prebióticos utilizados.

No geral, nenhum dos tratamentos analisados mantiveram por total a viabilidade das células livres ou encapsuladas durante o período de 30 dias, independente da temperatura utilizada. No entanto, se destacaram os tratamentos T2 (0,50 g de FBV) e T3 (0,75 g de FBV), formulações que apresentaram, significativamente ($p \leq 0,05$), maior eficiência na proteção de *L. reuteri* quando armazenados a -18, 4 ou 25 °C.

Com relação as temperaturas analisadas, observou-se que a temperatura ambiente (25 °C) causou maiores danos às cepas de *L. reuteri*, indicando menor resistência do microrganismo à essas condições de armazenamento. Ao passo que as temperaturas de congelamento (-18 °C) e refrigeração (4 °C), não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) na preservação das células ao fim do período de armazenamento em relação ao melhor tratamento obtido.

Para Rodrigues et al. (2011), baixas temperaturas de armazenamento são benéficas às cepas de *Lactobacillus* encapsuladas, devido promover vida útil mais longa às cápsulas por meio do aumento da estabilidade celular através da diminuição da temperatura.

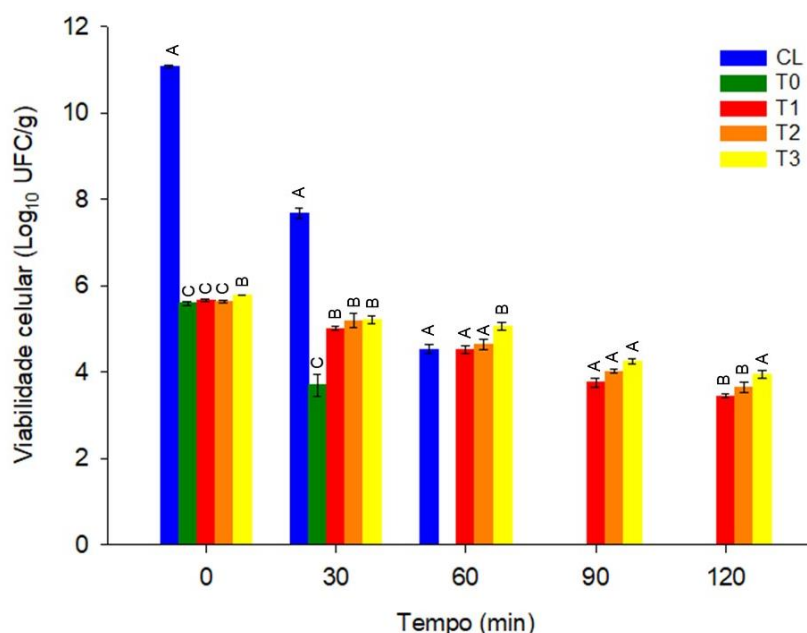
Dessa forma, torna-se interessante a aplicação das cápsulas probióticas produzidas com 0,75 g e/ou 0,50 g de FBV em alimentos refrigerados e congelados

já disponíveis no mercado, como leite, leite fermentado, manteiga, sorvete, entre outros. Além de contribuir com pesquisas que avaliem matrizes alimentares não lácteas como carreadores desses microrganismos, devido aumento do número de indivíduos com intolerância a lactose, dislipidemia e vegetarianismo, visando a importância do desenvolvimento de um produto de origem vegetal como alternativa para o consumo de probióticos, dado que ocorre, principalmente, por meio de produtos lácteos fermentados.

5.6. Avaliação *in vitro* da viabilidade de *L. reuteri* livre e encapsulado em fluido gástrico simulado

Avaliou-se a viabilidade de *L. reuteri* encapsulados sob diferentes concentrações de FBV em comparação às cápsulas controle e às células livres, frente às condições do fluido gástrico simulado e os resultados encontram-se dispostos na Figura 12.

Figura 12. Sobrevivência das células de *L. reuteri* livres e encapsuladas por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando alginato e diferentes concentrações de farinha de banana verde como material de revestimento, expostas a fluido gástrico simulado.



*Letras diferentes para o mesmo tempo indicam que há diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p \leq 0,05$) para cada tratamento analisado.

Legenda: T0 (Controle); T1 (0,25 g de FBV); T2 (0,50 g de FBV); T3 (0,75 g de FBV).

Fonte: Própria autoria.

Ao analisar o tempo de 30 min, constatou-se viabilidade celular em todos os tratamentos avaliados. Porém, CL (células livres) apresentou resistência inferior aos microrganismos encapsulados (T0, T1, T2 e T3), com redução da concentração de células viáveis maior que 3 logs.

Em 60 min, verificou-se que o intervalo de tempo foi suficiente para que T0 não apresentasse viabilidade celular, indicando que as cápsulas controle não preservaram a sobrevivência dos microrganismos. Em relação às células livres, observou-se, novamente, redução da viabilidade superior a 3 log, enquanto T1, T2 e T3 expressaram redução inferior a 1 log.

Sobre o tempo de 90 min, notou-se que CL não haviam mais células viáveis, à medida que T1, T2 e T3 apresentaram, respectivamente, $3,76 \pm 0,11$, $4,02 \pm 0,05$ e $5,07 \pm 0,09$ Log₁₀ UFC/g de viabilidade celular.

Para 120 min, viabilidade celular foi identificada em T1, T2 e T3, entretanto, taxa de sobrevivência significativamente ($p \leq 0,05$) maior foi observada em T3 (0,75 g de FBV), com 68,34 %. Tais resultados apontam que o co-encapsulamento de *L. reuteri* com alginato e 0,75 g de FBV aumentou a resistência do probiótico durante exposição ao FGS.

O presente estudo demonstrou que somente alginato de sódio não conseguiu proteger os probióticos do ambiente ácido por um longo tempo. De acordo com Prasanna e Charalampopoulos (2018), a dissolução e erosão do alginato ocorrem em pH baixo e isso leva à destruição da estrutura das cápsulas, reduzindo drasticamente a viabilidade das células probióticas.

No entanto, a co-encapsulação dos probióticos com alginato e FBV reverteu tal problemática, pois a adição do prebiótico melhorou a sobrevivência dos microrganismos encapsulados, devido ao efeito simbiótico da FBV sobre a cepa de *L. reuteri*. Prebióticos são substâncias que se disponibilizam como substrato para o metabolismo da cultura probiótica, servindo como fonte de carbono para manutenção das células, prevenindo-as de lesões causadas pela acidez e protegendo contra danos gerados pelo ambiente (AL-SHERAJI et al., 2013, PIMENTEL et al., 2015).

Abbaszadeh et al. (2014), ao avaliar a sobrevivência de *L. rhamnosus* em condições gastrointestinais simuladas, mostraram que células co-encapsuladas com

alginato-quitosana tiveram taxa de sobrevivência maior (7,8 Log UFC/g) em comparação as células livres (6 Log UFC/g).

Krasaekoopt e Watcharapoka (2014), relataram que a adição de prebióticos (inulina ou GOS) durante o encapsulamento de *L. acidophilus* e *L. casei*, aumentou a resistência desses microrganismos sob condições do sistema digestivo simulado, resultando em maior número de células viáveis em comparação às cápsulas controle. Referente a *L. acidophilus*, a redução foi de 6,7 log para cápsulas controle e de 3,4 log quando encapsulados com prebióticos. Para *L. casei*, constatou-se redução da viabilidade de 6,4 e 3,5 logs para cápsulas sem e com prebióticos, respectivamente.

Ao avaliar o efeito dos prebióticos (amido de batata, *Psyllium plantago* e inulina) na sobrevivência de *L. casei* e *L. plantarum* encapsulados quando submetidos às condições gástricas simuladas, Peredo et al. (2016) relataram maior sobrevivência das bactérias encapsuladas do que para as bactérias não encapsuladas. Para *L. casei*, constataram redução da viabilidade de 3,79 logs para células livres e em média 1,98 log para cápsulas revestidas com prebióticos. Em relação a viabilidade de *L. plantarum*, observaram redução de 2,7 logs para células livres e média de 1,99 log para cápsulas com prebióticos. Tais resultados evidenciam a capacidade de proteção dos prebióticos aos microrganismos probióticos encapsulados.

6. CONCLUSÃO

A partir do estudo realizado, foi verificado que o método de extrusão demonstrou não ser prejudicial para o probiótico analisado, pois a eficiência do processo foi superior a 95 %. Cápsulas produzidas com 0,50 e 0,75 g de FBV (T2 e T3) revelaram melhor desempenho na manutenção e viabilidade das células durante armazenamento a -18, 4 e 25 °C. Na simulação do fluido gástrico, destacou-se as cápsulas com 0,75 g de FBV (T3), evidenciando a proteção efetiva conferida pelo prebiótico. Portanto, a combinação de compostos classificados como prebióticos ao alginato de sódio, torna-se uma alternativa promissora na técnica de encapsulação de células probióticas, pois resultados mais relevantes e satisfatórios foram obtidos em relação a viabilidade das células quando expostas às condições adversas. No entanto, investigações, como estudo *in vivo*, devem ser realizadas antes de serem introduzidos na indústria alimentícia.

REFERÊNCIAS

- ABBASZADEH, S.; GANDOMI, H.; MISAGHI, A.; BOKAEI, S.; NOORI, N. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, n. 11, p. 2210-2216, 2014.
- ALMEIDA-JUNIOR, L. D.; CURIMBABA, T. F. S.; CHAGAS, A. S.; QUAGLIO, A. E. V.; DI STASI, L. C. Dietary intervention with green dwarf banana flour (*Musa sp. AAA*) modulates oxidative stress and colonic SCFAs production in the TNBS model of intestinal inflammation. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 497-504, 2017.
- AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of functional foods**, v. 5, n. 4, p. 1542-1553, 2013.
- ANSELMO, A. C.; MCHUGH, K. J.; WEBSTER, J.; LANGER, R.; JAKLENEC, A. Layer-by-layer encapsulation of probiotics for delivery to the microbiome. **Advanced Materials**, v. 28, n. 43, p. 9486-9490, 2016.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015.
- ATENCIO, S.; MAESTRO, A.; SANTAMARÍA, E.; GUTIÉRREZ, J. M.; GONZALEZ, C. Encapsulation of ginger oil in alginate-based shell materials. **Food Bioscience**, v. 37, p. 100714, 2020.
- BAH, M. G.; BILAL, H. M.; WANG, J. Fabrication and application of complex microcapsules: A review. **Soft Matter**, v. 16, n. 3, p. 570-590, 2020.
- BEZERRA, C. V.; AMANTE, E. R.; OLIVEIRA, D. C.; RODRIGUES, A. M. C.; SILVA, L. H. M. Green banana (*Musa cavendishii*) flour obtained in spouted bed – Effect of drying on physico-chemical, functional and morphological characteristics of the starch. **Industrial Crops and Products**, v. 41, n. 1, p. 241-249, 2013.
- BINDELS, L. B.; DELZENNE, N. M.; CANI, P. D.; WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 12, n. 5, p. 303-310, 2015.
- BINDELS, L. B.; DEWULF, E. M.; DELZENNE, N. M. GPR43/FFA2: physiopathological relevance and therapeutic prospects. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 34, n. 4, p. 226-232, 2013.
- BIRT, D. F.; BOYLSTON, T.; HENDRICH, S.; JANE, J. L.; HOLLIS, J., LI, L.; MCCLELLAND, J.; MOORE, S.; PHILLIPS, G. J.; ROWLING, M.; SCHALINSKE, K.; SCOTT, M. P.; WHITLEY, E. M. Resistant starch: promise for improving human health. **Advances in Nutrition**, v. 4, n. 6, p. 587-601, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18, de 30 de abril de 1999. **Regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise de propriedades funcionais e/ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos.**

BUSANELLO, M.; DE MORAES FILHO, M. L.; GUERGOLETTTO, K. B.; GARCIA, S. Optimization of the growth of Lactobacillus in skim milk added with green banana flour and determination functional properties. **Nutrition & Food Science**, 2019.

CHAWDA, P. J.; SHI, J.; XUE, S.; YOUNG QUEK, S. Co-encapsulation of bioactives for food applications. **Food Quality and Safety**, v. 1, n. 4, p. 302-309, 2017.

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

CÓRDOBA, A. L.; DELADINO, L.; MARTINO, M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, n. 1, p. 315-323, 2013.

CORONA-HERNANDEZ, R. I.; ÁLVAREZ-PARRILLA, E.; LIZARDI-MENDOZA, J.; ISLAS-RUBIO, A. R.; DE LA ROSA, L. A.; WALL-MEDRANO, A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614-628, 2013.

DALLABONA, I. D.; DE LIMA, G. G.; CESTARO, B. I.; DE SOUZA TASSO, I.; PAIVA, T. S.; LAUREANTI, E. J. G.; DE MATOS JORGE, L. M.; GOLÇALVES DA SILVA, B. J.; HELM, C. V.; MATHIAS, A. L.; JORGE, R. M. M. Development of alginate beads with encapsulated jabuticaba peel and propolis extracts to achieve a new natural colorant antioxidant additive. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 163, p. 1421-1432, 2020.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DARJANI, P.; NEZHAD, M. H.; KADKHODADEE, R.; MILANI, E. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of Lactobacillus casei exposed to simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 73, p. 162-167, 2016.

DAVANI-DAVARI, D.; NEGAHDARIPOUR, M.; KARIMZADEH, I.; SEIFAN, M.; MOHKAM, M.; MASOUMI, S. J.; BERENJIAN, A.; GHASEMI, Y. Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. **Foods**, v. 8, n. 3, p. 92, 2019.

DE ARAÚJO ETCHEPARE, M.; RADDATZ, G. C.; CICHOSKI, A. J.; FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of Lactobacillus

acidophilus microencapsulated with sodium alginate. **Journal of Functional Foods**, v. 21, p. 321-329, 2016a.

DE ARAÚJO ETCHEPARE, M.; RADDATZ, G. C.; CICHOSKI, A. J.; FLORES, É. M. M.; BARIN, J. S.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT-Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016b.

DE LARA PEDROSO, D.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127-132, 2012.

DE MELO PEREIRA, G. V.; DE OLIVEIRA COELHO, B.; JÚNIOR, A. I. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, n. 8, p. 2060-2076, 2018.

DE PRISCO, A.; MARESCA, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT-Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 452-462, 2015.

DI BATTISTA, C. A.; CONSTENLA, D.; RIGO, M. V. R.; PIÑA, J. Process analysis and global optimization for the microencapsulation of phytosterols by spray drying. **Powder Technology**, v. 321, p. 55-65, 2017.

DODERO, A.; VICINI, S.; ALLOISIO, M.; CASTELLANO, M. Sodium alginate solutions: Correlation between rheological properties and spinnability. **Journal of Materials Science**, v. 54, n. 10, p. 8034-8046, 2019.

DODOO, C. C.; WANG, J.; BASIT, A. W.; STAPLETON, P.; GAISFORD, S. Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 530, n. 1-2, p. 224-229, 2017.

DUAR, R. M.; LIN, X. B.; ZHENG, J.; MARTINO, M. E.; GRENIER, T.; PÉREZ-MUÑOZ, M. E.; LEULIER, F.; GÄNZLE, M.; WALTER, J. Lifestyles in transition: evolution and natural history of the genus *Lactobacillus*. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 41, n.1, p. S27-S48, 2017.

ECKERT, C.; AGNOL, W. D.; DALLÉ, D.; SERPA, V. G.; MACIEL, M. J.; LEHN, D. N.; DE SOUZA, C. F. V. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of *Lactobacillus* spp. from adverse conditions. **Food Research International**, v. 113, p. 65-73, 2018.

ETCHEPARE, M. A.; BARIN, J. S.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; WAGNER,

R.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. D. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. **Ciência Rural**, v. 45, p. 1319-1326, 2015a.

ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, M. F. S. C.; RODRIGUES, L. Z.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Microencapsulation of bioactive compounds by extrusion method. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 97-105, 2015b.

FALCOMER, A. L.; RIQUETTE, R. F. R.; DE LIMA, B. R.; GINANI, V. C., ZANDONADI, R. P. Health benefits of green banana consumption: A systematic review. **Nutrients**, v. 11, n. 6, p. 1222, 2019.

FANGMEIER, M.; LEHN, D. N.; MACIEL, M. J.; DE SOUZA, C. F. V. Encapsulation of bioactive ingredients by extrusion with vibrating technology: Advantages and challenges. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 9, p. 1472-1486, 2019.

FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations. **Banana Market Review 2020**, p. 1-20, 2021.

GALDEANO, C. M.; CAZORLA, S. I.; DUMIT, J. M. L.; VÉLEZ, E.; PERDIGÓN, G. Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 74, n. 2, p. 115-124, 2019.

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

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

GAUDREAU, H.; CHAMPAGNE, C. P.; REMONDETTO, G. E.; GOMAA, A.; SUBIRADE, M. Co-encapsulation of *Lactobacillus helveticus* cells and green tea extract: Influence on cell survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 26, p. 451-459, 2016.

GIBSON, G. R.; HUTKINS, R.; SANDERS, M. E.; PRESCOTT, S. L.; REIMER, R. A.; SALMINEN, S. J.; SCOTT, K.; STANTON, C.; SWANSON, K. S.; CANI, P. D.; VERBEKE, K.; REID, G. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491-502, 2017.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A.; BLANCAS-BENÍTEZ, F. J.; SÁYAGO-AYERDI, S. G. Polyphenols associated with dietary fibers in plant foods: Molecular interactions and bioaccessibility. **Current Opinion in Food Science**, v. 13, p. 84-88, 2017.

GRANATO, D.; BARBA, F. J.; KOVAČEVIĆ, D. B.; LORENZO, J. M.; CRUZ, A. G.; PUTNIK, P. Functional foods: Product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v. 11, p. 93-118, 2020.

GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, R.; ROCHA, R. S.; GRAÇA, J. S.; ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; SANT'ANA, A. S.; DUARTE, M. C. K. H.; FREITAS, M. Q.; CRUZ, A. G. Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Current Opinion in Food Science**, v. 33, p. 38-44, 2020.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 291-311, 2012.

JANTARATHIN, S.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; SANGUANDEEKUL, R. Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, n. 5, p. 6166-6172, 2017.

KARELAKIS, C.; ZEVGITIS, P.; GALANOPOULOS, K.; MATTAS, K. Consumer trends and attitudes to functional foods. **Journal of International Food & Agribusiness Marketing**, v. 32, n. 3, p. 266-294, 2020.

KAUR, N.; SINGH, D. P. Deciphering the consumer behaviour facets of functional foods: A literature review. **Appetite**, v. 112, p. 167-187, 2017.

KHAN, M. S.; IKRAM, M.; PARK, J. S.; PARK, T. J.; KIM, M. O. Gut microbiota, its role in induction of Alzheimer's disease pathology, and possible therapeutic interventions: special focus on anthocyanins. **Cells**, v. 9, n. 4, p. 853, 2020.

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

LEE, Y.; JI, Y. R.; LEE, S.; CHOI, M. J.; CHO, Y. Microencapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* KBL409 by extrusion technology to enhance survival under simulated intestinal and freeze-drying conditions. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, p. 721-730, 2019.

LIU, H.; CUI, S. W.; CHEN, M.; LI, Y.; LIANG, R.; XU, F.; ZHONG, F. Protective approaches and mechanisms of microencapsulation to the survival of probiotic bacteria during processing, storage and gastrointestinal digestion: a review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 17, p. 2863-2878, 2017.

MACIEL, A. D. N. **Influência do íon Ca²⁺ no desenvolvimento de micropartículas de alginato de sódio preparadas por gelatinização iônica.** 2013.

MARTIROSYAN, D. M.; SINGHARAJ, B. Health claims and functional food: The future of functional foods under FDA and EFSA regulation. **Functional Foods for**

Chronic Diseases, v. 1, p. 410-417, 2016.

MBYE, M.; BAIG, M. A.; ABUQAMAR, S. F.; EL-TARABILY, K. A.; OBAID, R. S.; OSAILI, T. M.; AL-NABULSI, A. A.; TURNER, M. S.; SHAH, N. P.; AYYASH, M. M. Updates on understanding of probiotic lactic acid bacteria responses to environmental stresses and highlights on proteomic analyses. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 3, p. 1110-1124, 2020.

MIROSA, M.; MANGAN-WALKER, E. Young Chinese and functional foods for mobility health: Perceptions of importance, trust, and willingness to purchase and pay a premium. **Journal of Food Products Marketing**, v. 24, n. 2, p. 216-234, 2018.

MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. **Food Chemistry**, v. 132, n. 4, p. 1966-1970, 2012.

MORA-VILLALOBOS, J. A.; MONTEIRO-ZAMORA, J.; BARBOZA, N.; ROJAS-GARBANZO, C.; USAGA, J.; REDONDO-SILANO, M.; SCHROEDTER, L.; OLSZEWSKA-WIDDRAT, A.; LÓPEZ-GÓMEZ, J. P. Multi-product lactic acid bacteria fermentations: A review. **Fermentation**, v. 6, n. 1, p. 23, 2020.

MU, Q.; TAVELLA, V. J.; LUO, X. M. Role of *Lactobacillus reuteri* in human health and diseases. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, p. 757, 2018.

NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1281-1287, 2012.

ORRU, S.; IMPERLINI, E.; NIGRO, E.; ALFIERI, A.; CEVENINI, A.; POLITO, R.; DANIELE, A.; BUONO, P.; MANCINI, A. Role of functional beverages on sport performance and recovery. **Nutrients**, v. 10, n. 10, p. 1470, 2018.

PADAYACHEE, A.; DAY, L.; HOWELL, K.; GIDLEY, M. J. Complexity and health functionality of plant cell wall fibers from fruits and vegetables. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 59-81, 2017.

PAVLI, F.; TASSOU, C.; NYCHAS, G. J. E.; CHORIANOPOULOS, N. Probiotic incorporation in edible films and coatings: Bioactive solution for functional foods. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 19, n. 1, p. 150, 2018.

PECH-CANUL, A. D. L. C.; ORTEGA, D.; GARCIA-TRIANA, A.; GONZÁLEZ-SILVA, N. A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. **Coatings**, v. 10, n. 3, p. 1–34, 2020.

PEREDO, A. G.; BERISTAIN, C. I.; PASCUAL, L. A.; AZUARA, E.; JIMENEZ, M. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. **LWT-Food science and Technology**, v. 73, p. 191-196, 2016.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT-Food science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415-422, 2015.

PINTO, A.; BARBOSA, J.; ALBANO, H.; ISIDRO, J.; TEXEIRA, P. Screening of bacteriocinogenic lactic acid bacteria and their characterization as potential probiotics. **Microorganisms**, v. 8, n. 3, p. 393, 2020.

PRASANNA, P. H. P.; CHARALAMPOPOULOS, D. Encapsulation of *Bifidobacterium longum* in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. **Food Bioscience**, v. 21, p. 72-79, 2018.

QI, X.; SIMSEK, S.; CHEN, B.; RAO, J. Alginate-based double-network hydrogel improves the viability of encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion: Effect of biopolymer type and concentrations. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 165, p. 1675-1685, 2020.

QUIRÓS-SAUCEDA, A. E.; AYALA-ZAVALA, J. F.; OLIVAS, G. I.; GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1674-1685, 2014.

RAMOS, P. E.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 11, p. 1864-1877, 2018.

RASHIDINEJAD, A.; BAHRAMI, A.; REHMAN, A.; REZAEI, A.; BABAZADEH, A.; SINGH, H.; JAFARI, S. M. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics and their application in functional/synbiotic dairy products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, p. 1-25, 2020.

RAYO, L. M.; CARVALHO, L. C.; SARDÁ, F. A.; DACANAL, G. C.; MENEZES, E. W.; TADINI, C. C. Production of instant green banana flour (*Musa cavendishii*, var. Nanicão) by a pulsed-fluidized bed agglomeration. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 461-469, 2015.

RODRIGUES, D.; SOUZA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J. P.; LOBO, J. M. S.; COSTA, P.; AMARAL, M. H.; PINTADO, M. M.; GOMES, A. M.; MALCATA, F. X.; FREITAS, A. C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 11, p. 869-876, 2011.

SANNA, V.; LUBINU, G.; MADAU, P.; PALA, N.; NURRA, S.; MARIANI, A.; SECHI, M. Polymeric nanoparticles encapsulating white tea extract for nutraceutical

application. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 63, n. 7, p. 2026-2032, 2015.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.

SARDÁ, F. A. H.; DE LIMA, F. N.; LOPES, N. T.; SANTOS, A. D. O.; TOBARUELA, E. D. C.; KATO, E. T.; MENEZES, E. W. Identification of carbohydrate parameters in commercial unripe banana flour. **Food Research International**, v. 81, p. 203-209, 2016.

SERRANO-CASAS, V.; PÉREZ-CHABELA, M. L.; CORTÉS-BARBERENA, E.; TOTOSAUS, A. Improvement of lactic acid bacteria viability in acid conditions employing agroindustrial co-products as prebiotic on alginate ionotropic gel matrix co-encapsulation. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 293-297, 2017.

SHARIFI-RAD, J.; RODRIGUES, C. F.; STOJANOVIĆ-RADIĆ, Z.; DIMITRIJEVIĆ, M.; ALEKSIĆ, A.; NEFFE-SKOCIŃSKA, K.; ZIELIŃSKA, D.; KOŁOŻYN-KRAJEWSKA, D.; SALEHI, B.; PRABU S. M.; SCHUTZ, F.; DOCEA, A. O.; MARTINS, N.; CALINA, D. Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. **Medicina**, v. 56, n. 9, p. 433, 2020.

SHI, L. E.; LI, Z. H.; LI, D. T.; XU, M.; CHEN, H. Y.; ZHANG, Z. L.; TANG, Z. X. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 1, p. 99-104, 2013.

SHISHIR, M. R. I.; XIE, L.; SUN, C.; ZHENG, X.; CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 34-60, 2018.

SIANG, S. C.; WAI, L. K.; LIN, N. K.; PHING, P. L. Effect of added prebiotic (Isomalto-oligosaccharide) and coating of beads on the survival of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 601-609, 2019.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; MARTINS, E.; PENNING, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; PONCELET, D. Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. **LWT-Food Science and Technology**, v. 89, p. 392-399, 2018.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; RIBAS, M. M.; PENNING, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; PONCELET, D. Microcapsules loaded with the probiotic *Lactobacillus paracasei* BGP-1 produced by co-extrusion technology using alginate/shellac as wall material: Characterization and evaluation of drying processes. **Food Research International**, v. 89, p. 582-590, 2016.

SIMÓ, G.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; VILA-CRESPO, J.; RUIPÉREZ, V.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 1-14, 2017.

ŠIPAILIENĖ, A.; PETRAITYTĖ, S. Encapsulation of Probiotics: Proper Selection of the Probiotic Strain and the Influence of Encapsulation Technology and Materials on the Viability of Encapsulated Microorganisms. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 1, 2018.

SOLIMAN, G. A. Dietary fiber, atherosclerosis, and cardiovascular disease. **Nutrients**, v. 11, n. 5, p. 1155, 2019.

TA, L. P.; BUJNA, E.; ANTAL, O.; LADÁNYI, M.; JUHÁSZ, R.; SZÉCSI, A.; KUN, S.; SUDHEER, S.; GUPTA, V. K.; NGUYEN, Q. D. Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1136-1144, 2021.

TRABELSI, I.; BEJAR, W.; AYADI, D.; CHOUAYEKH, H.; KAMMOUN, R., BEJAR, S.; SALAH, R. B. 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.

VON MARTELS, J. Z.; SADABAD, M. S.; BOURGONJE, A. R.; BLOKZIJL, T.; DIJKSTRA, G.; FABER, K. N.; HARMSEN, H. J. The role of gut microbiota in health and disease: In vitro modeling of host-microbe interactions at the aerobe-anaerobe interphase of the human gut. **Anaerobe**, v. 44, p. 3-12, 2017.

WILLIAMS, B. A.; GRANT, L. J.; GIDLEY, M. J.; MIKKELSEN, D. Gut fermentation of dietary fibres: physico-chemistry of plant cell walls and implications for health. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 10, p. 2203, 2017.

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

YANG, Y. Y.; MA, S.; WANG, X. X.; ZHENG, X. L. Modification and application of dietary fiber in foods. **Journal of Chemistry**, v. 2017, 2017.

ZAEIM, D.; SARABI-JAMAB, M.; GHORANI, B.; KADKHODAEI, R. Double layer co-encapsulation of probiotics and prebiotics by electro-hydrodynamic atomization. **LWT-Food science and Technology**, v. 110, p. 102-109, 2019.

ZANDONADI, R. P.; BOTELHO, R. B. A.; GANDOLFI, L.; GINANI, J. S.; MONTENEGRO, F. M.; PRATESI, R. Green Banana Pasta: An Alternative for Gluten-Free Diets. **Journal of the Academy of Nutrition and Dietetics**, v. 112, n. 7, p. 1068–1072, 2012.

ZENDEBOODI, F.; KHORSHIDIAN, N.; MORTAZAVIAN, A. M.; DA CRUZ, A. G. Probiotic: conceptualization from a new approach. **Current Opinion in Food Science**, v. 32, p. 103-123, 2020.