



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

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

FORMULAÇÃO DE UMA MATRIZ ALIMENTAR SÓLIDA CONTENDO
PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS

RECIFE

2018

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

**FORMULAÇÃO DE UMA MATRIZ ALIMENTAR SÓLIDA
CONTENDO PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS**

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

Orientadora: Thayza Christina Montenegro Stamford

Co-orientadora: Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud

RECIFE

2018

M488f Medeiros, José Alberto da Costa.
Formulação de uma matriz alimentar sólida contendo probióticos encapsulados / José Alberto da Costa Medeiros. – Recife: o autor, 2018.
71 f.; il.; 30 cm.

Orientadora: Thayza Cristina Montenegro Stamford.
Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Ciências da Saúde. Programa de pós-graduação em Nutrição.
Inclui referências, figuras, e tabelas.

1. *Lactobacillus acidophilus*. 2. Quitosana. 3. Microencapsulação. 4. Mandioca. I. Stamford, Thayza Cristina Montenegro (orientadora). II. Título.

612.3 CDD (23.ed.)
UFPE (CCS 2018 - 141)

JOSÉ ALBERTO DA COSTA MEDEIROS

**FORMULAÇÃO DE UMA MATRIZ ALIMENTAR SÓLIDA CONTENDO
PROBIÓTICOS ENCAPSULADOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição, área de Ciências dos alimentos (Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal de Pernambuco), como parte dos requisitos para obtenção de título de Mestre.

Dissertação aprovada em: 21 / 02 / 2018

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

Prof^a. Dr^a. Lucia Raquel Ramos Berger

Prof^a. Dr^a. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

RECIFE

2018

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos meus pais, irmãos,
familiares e todos aqueles que desejam um
mundo melhor.

AGRADECIMENTOS

Há que ser dito que ainda não acredito estar chegando ao fim do segundo volume da coletânea que foi iniciada ao entrar no curso superior de Nutrição. As noites mal dormidas e os dias de zero convívio social vivenciados na graduação teimam em permanecer em alguns momentos do mestrado, mas cada privação realizada conto como um benefício e conhecimento adquirido ao longo desses 6 anos. Não me arrependo! Tanto que a iniciativa para mais quatro anos de insônia já foi tomada.

Devo frisar que não sou o melhor em escolher as palavras certas. No mais, só posso iniciar esses agradecimentos direcionando-os a minha família, meu verdadeiro bem nessa vida. Nem todo o conhecimento do mundo seria capaz de suprir a necessidade que tenho de vocês. Assim, destaco com o maior prazer minha mãe, Josefa Vilma, e meu pai, Armando Medeiros, eles que são os responsáveis reais de tudo que sou, palavras me faltam ao descrever tudo que já fizeram por mim, no mínimo, devo dizer: **sou feliz e espero lhes dar orgulho!** A essa “reca” de irmãos: Laurindo Medeiros, Ana Villany, Wanilla Medeiros e Amanda Vitória, cada um exercendo influência de maneiras distintas em mim e com espaço reservado no meu coração. Sem esquecer dos sobrinhos Nathalia e Davi. Obrigado!

A cada passo dado me deparo com pessoas diversas, boas, ruins, alegres, tristes, enfim: pessoas! Aos amigos novos e antigos, agradeço. Infelizmente não posso nomear todos, mas algumas dessas merecem citação, como minha amiga de longa data e parceira de estudos Eryka Maria, caminhamos juntos por todo esse percurso e continuaremos assim por mais quatro anos. As melhores cearenses que conheci, Maria Isabel e Winnie Alencar. Aos Ratos do Laboratório: Dona Thaísa Gabriela (não tem ideia do quanto me ajudou) e dona Penha Patrícia, essas que além de parceiras de trabalho, deixam o ambiente com um clima mais agradável e estão presentes nos momentos de descontração e lazer. E aos colegas de mestrado, cada um sabendo que não é fácil, mas é possível.

Pessoas que sempre serão lembradas com um carinho especial: professoras Kataryne Árabe, Isabella Medeiros e Jossana Sousa por tudo que compartilharam nos meus dias de graduando. Ao professor e orientador na graduação Evandro Souza por toda a confiança depositada no início de minha vida no mundo da pesquisa. Demais professores da graduação que contribuíram e não serão esquecidos: Jailane Aquino,

Pamela Martins, Sônia Oliveira e Joelma Souza. E professoras Lúcia Batista e Socorro Branca que marcam os primórdios da minha educação básica.

À família de professores Stamford, minha orientadora Thayza Christina, sua irmã (e co-orientadora) Thatiana e sua mãe Tânia, agradeço por exatamente tudo que para mim representaram nesses dois anos de mestrado e que representarão nesses quatro anos de doutorado que estão por vir. São exemplos vivos que admiro e pretendo seguir.

Aos técnicos responsáveis pelos setores de microbiologia e físico-química do LEAAL do Departamento de Nutrição da UFPE. E aos laboratórios parceiros que ajudaram no desenvolvimento dessa pesquisa.

Agradeço ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento desse projeto.

Meu sincero agradecimento a todas essas pessoas que contribuíram nessa jornada.

Por último e não menos importante, agradeço ao Café, sua presença na minha vida dá alegria ao meu dia e serve de apoio nas noites de estudo sem fim.

A todos vocês: um abraço e uma xícara de café.

RESUMO

A manutenção da viabilidade das bactérias probióticas em alimentos que não tenham origem láctea ainda é um desafio para pesquisadores. Uma das principais formas de contornar esse problema é o emprego da microencapsulação. Assim, o objetivo desse trabalho foi elaborar uma matriz alimentar sólida similar a uma barra de cereais, com base em fécula de mandioca, isenta de produtos lácteos, estável em temperatura ambiente e contendo probióticos *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados em alginato de cálcio-quitosana. Foram testadas diversas formulações para a composição da barra alimentícia utilizada no estudo, sendo escolhida apenas uma para determinação da composição centesimal e testes com as bactérias probióticas. As microcápsulas foram produzidas pela técnica de extrusão. As microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana foram submetidas ao teste da membrana cório-alantóide do ovo (HET-CAM) para determinar o seu potencial citotóxico. A técnica de extrusão utilizada na microencapsulação gerou uma eficiência de encapsulação maior que 83%, sendo considerada ideal para utilização e manutenção da viabilidade celular da cepa probiótica. Os resultados obtidos pelo HET-CAM demonstraram ausência de irritabilidade causada pelas microcápsulas. Nos testes com a barra alimentícia as bactérias foram divididas em dois grupos, um para ser adicionado na forma de células livres e outro na forma microencapsulada. As bactérias que foram adicionadas na forma livre não mantiveram estabilidade durante o tempo de análise, com redução maior que 2 log UFC/g em 3 dias e maior que 4 log UFC/g em 7 dias de armazenamento da barra em temperatura ambiente, perdendo sua viabilidade já no décimo quarto dia de análise. Já as bactérias que foram adicionadas na forma microencapsulada mantiveram suas contagens em valores estatisticamente superiores, se comparadas às células livres, apresentando redução inferior a 2 log UFC/g em 7 dias e de aproximadamente 3,5 log UFC/g em 21 dias. Em simulação do trato gastrointestinal as bactérias microencapsuladas apresentaram maior estabilidade, com redução inferior a 2 log UFC/g, enquanto as que foram adicionadas na forma livre tiveram diminuição superior a 4,5 log UFC/g. Com isso, observa-se que a microencapsulação pelo método de extrusão com alginato de cálcio-quitosana foi eficaz na proteção da viabilidade dos probióticos, não apresenta potencial irritante e que a matriz elaborada pode ser utilizada como agente carreador dessas bactérias.

Palavras-chave: *Lactobacillus acidophilus*. Quitosana. Microencapsulação. Mandioca.

ABSTRACT

The maintenance of probiotic bacteria viability in non-dairy foods is still a challenge for researchers. One of the main ways to overcome this problem is the use of microencapsulation. Thus, the objective of this study was to elaborate a solid food matrix similar to a cereal bar, using cassava starch, free of dairy products, stable at room temperature and containing probiotics *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated in alginate-chitosan. Several percentages of the ingredients were tested to determine the food bar composition used in this study, but only one was chosen to determine the centesimal composition and to be tested with the probiotic bacteria. The microcapsules were produced by the extrusion technique. Tests were performed to characterize the chitosan and the microcapsules formed with chitosan-alginate. The calcium alginate-chitosan capsules were evaluated through Hen's egg chorioallantoic membrane test (HET-CAM) to determine their cytotoxic potential. The extrusion technique used in the microencapsulation generated an encapsulation efficiency (EE) greater than 83%, being considered ideal for the use and maintenance of cell viability of the probiotic strain. The results obtained by HET-CAM test demonstrate the absence of irritability caused by microcapsules. In the tests with food bar the bacteria were divided into two groups, one to be added as free cells and another in microencapsulated form. The bacteria added in free form did not maintain stability during analysis, reducing more than 2 log CFU/g in 3 days and more than 4 log CFU/g in 7 days of bar storage at room temperature. It lost its viability on the fourteenth day of analysis. The bacteria numbers that were added in the microencapsulated form remained statistically higher when compared to free cells, with a reduction of less than 2 log CFU / g in 7 days and approximately 3.5 log CFU / g in 21 days. In the simulation of the gastrointestinal tract the microencapsulated bacteria presented better stability, with a reduction of less than 2 log CFU / g, while those that were added in the free form had a decrease greater than 4.5 log CFU / g. The microencapsulation by extrusion method with alginate-chitosan was effective to protect the viability of probiotics, without irritant potential. The elaborated matrix could be used as carrier agent for these bacteria.

Keywords: *Lactobacillus acidophilus*. Chitosan. Microencapsulation. Cassava starch.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Desacetilação da quitina na obtenção de quitosana.	21
Figura 2 - Fluxograma geral para produção de Farinha Seca (A) e Fécula (B).	31
Figura 3 – Microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana fúngica após serem retiradas da solução de quitosana.	37
Figura 4 - Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos microencapsulados.	43
Figura 5 – Teste do HET-CAM com microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo probióticos.	44
Figura 6 - Formulação A5 definida e utilizada nos testes com probióticos.	45
Figura 7 – Redução das contagens (log UFC/g) de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356) adicionadas nas barras alimentícias durante o armazenamento. (■) Células encapsuladas; (►) Células livres. Limite de detecção: 2,0 log UFC/g.	50
Figura 8 - Redução das contagens (log UFC/g) de células viáveis de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356) adicionadas nas barras alimentícias durante simulação do trato gastrointestinal. (■) Células encapsuladas; (►) Células livres. Limite de detecção: 2,0 log UFC/g.	51

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Ingredientes utilizados na elaboração das barras.....	40
Tabela 2 - Contagem de células viáveis (média $\pm$ desvio padrão) de <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356) antes e depois da encapsulação.	44
Tabela 3 - Ingredientes e proporções que foram utilizadas na elaboração das barras.	45
Tabela 4 - Composição centesimal das formulações das barras alimentícias com base em fécula de mandioca.	47
Tabela 5 - Composição centesimal das barras alimentícias com base em fécula de mandioca contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356) microencapsulados e livres, e sem probióticos.	47
Tabela 6 - Resultados de pH das barras alimentícias contendo <i>Lactobacillus acidophilus</i> (ATCC 4356) durante o armazenamento.	48

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E PROBIÓTICOS	17
2.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	19
2.2 QUITOSANA MICROBIOLÓGICA	20
2.3 ENCAPSULAÇÃO: ALTERNATIVA PARA PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS	23
2.4 BARRAS ALIMENTÍCIAS: INGREDIENTES E ASPECTO NUTRICIONAL	26
2.4.1 Mandioca	28
2.4.1.1 Fécula de mandioca	30
3 HIPÓTESE	34
4 OBJETIVOS	35
4.1 OBJETIVO GERAL	35
4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	35
5 MATERIAIS E MÉTODOS	36
5.1 MATERIA-PRIMA	36
5.2 PREPARO DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	36
5.3 ENCAPSULAÇÃO DOS PROBIÓTICOS	36
5.4 ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE):	38
5.5 TESTE DE POTENCIAL DE IRRITABILIDADE E DE BIOCOMPATIBILIDADE: TESTE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE DO OVO	39
5.6 ELABORAÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR	39
5.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA GOMA DE MANDIOCA E DA BARRA ALIMENTÍCIA	40
5.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MATRIZ ALIMENTAR	41
5.9 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO	42
5.9.1 Teste de viabilidade dos microrganismos microencapsulados adicionados à matriz alimentar durante o período de armazenamento	42
5.9.2 Sobrevivência do probiótico microencapsulado adicionadas à matriz alimentar em simulação do trato gastrointestinal	42
5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
6 RESULTADOS	44

6.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO	44
6.2 TESTE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE DO OVO: HET-CAM	44
6.3 ELABORAÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR.....	45
6.4 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MICROSCÓPICA DA GOMA DE MANDIOCA E DA BARRA ALIMENTÍCIA	46
6.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICAS DA MATRIZ ALIMENTAR	46
6.6 VIABILIDADE DO <i>L. acidophilus</i> DURANTE O ARMAZENAMENTO DA BARRA ALIMENTÍCIA.....	48
6.7 VIABILIDADE DO <i>L. acidophilus</i> DURANTE SIMULAÇÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL	50
7 DISCUSSÃO	52
8 CONCLUSÃO	57
REFERÊNCIAS.....	58

1 INTRODUÇÃO

Um segmento do setor de alimentos que tem ganho destaque nos últimos anos é aquele relativo ao desenvolvimento de produtos funcionais. Esse fenômeno pode estar associado à preocupação da população com a saúde e o estilo de vida, exigindo praticidade durante as atividades diárias, incluindo a alimentação. Assim, há uma demanda crescente por produtos nutritivos, que necessitem de pouco ou nenhum tratamento antes de sua ingestão, que sejam seguros e apresentem propriedades benéficas à saúde do consumidor (FREITAS; MORETTI, 2006; GUTKOSKI et al., 2007; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2012; SIRÓ et al., 2008).

Os alimentos funcionais são aqueles que, além da função básica de nutrir, possuem potencial para promover benefícios à saúde. Auxiliando na melhora das condições gerais do corpo, reduzindo o risco do surgimento de algumas doenças, além de serem usados no tratamento de outras, como a doença inflamatória intestinal, síndrome do cólon irritável e diarreia associada ao uso de antibióticos (MENDES et al., 2015; ROBERTS et al., 2013). Dentro desse conceito de alimentos funcionais, um grupo que recebe destaque é aquele incorporado com microrganismos vivos, os probióticos (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015). A definição de probióticos aceita internacionalmente é a de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001).

Para um microrganismo ser considerado probiótico, além de outras características, deve estar presente naturalmente no trato gastrointestinal humano, sobreviver à passagem pelo estômago e estar viável e ativo no intestino (SAAD, 2006). Os probióticos podem afetar positivamente a saúde humana de várias formas, por exemplo, inibindo microrganismos patogênicos no intestino, modulando a resposta imune, reduzindo a concentração sérica de colesterol, exercendo atividade antioxidante e outras (MINERVINI; ANGELIS, 2016).

Apesar da atividade funcional dos probióticos, estudos apontam que a sobrevivência desses microrganismos livres em alimentos é limitada, pois estão sujeitos às condições que não são favoráveis à sua sobrevivência, como o processamento (temperaturas extremas, adição de sal, substâncias antimicrobianas, etc.), tempo de armazenamento do alimento, constituição do alimento, etc. Assim, necessitam de uma barreira física que os proteja das condições adversas do meio,

como a microencapsulação (BURGAIN et al., 2015; CAVALHEIRO et al., 2015b; VOS et al., 2010).

A microencapsulação de probióticos consiste no englobamento das células por um material encapsulante, formando partículas de diâmetro variado (0,2 µm a 5000 µm). Essas cápsulas devem proteger os microrganismos das condições adversas do meio e, quando atingirem o local para qual foram destinadas, promoverem a liberação das células. Esse processo também protege o alimento, pois pode impedir as bactérias de se desenvolverem no mesmo, alterando suas características sensoriais (SILVA et al., 2015).

Dentre os agentes encapsulantes utilizados, estão o alginato e a quitosana. O alginato é um polissacarídeo linear formado por unidades de ácido manurônico e ácido gulurônico. Obtido, inicialmente, de algas marrons dos gêneros *Laminaria* e *Macrocystis*, mas pode ser produzida por bactérias dos gêneros *Pseudomonas* e *Azotobacter*. O alginato em reação com o cloreto de cálcio, forma o alginato de cálcio que pode ser usado para revestir materiais sensíveis, como bactérias probióticas, protegendo as mesmas e aumentando sua viabilidade. Por se tratar de um aditivo alimentar, seu uso é liberado para introdução em alimentos (GIESE, 2015; PINTO et al., 2015).

A quitosana é um aminopolissacarídeo obtido a partir da quitina, que pode ser extraída do exoesqueleto de crustáceos e da parede celular de alguns fungos (BORDERÍAS; SÁNCHEZ-ALONSO; PÉREZ-MATEOS, 2005). A quitosana apresenta as seguintes características: biodegradável, hipoalergénica, biocompatível, capaz de formar gel, sendo frequentemente utilizada na microencapsulação, como revestimento das microcápsulas, utilizadas em alimentos (AZEVEDO et al., 2007; NEVES et al., 2013).

A maioria dos alimentos contendo probióticos disponíveis no mercado são derivados do leite, como iogurtes, queijos, sorvetes e leites fermentados (SAAD, 2006). No entanto, pessoas alérgicas à proteína do leite, intolerantes à lactose, aqueles que desejam incrementar sua alimentação e os adeptos do vegetarianismo, demandam produtos funcionais adicionados de probióticos que não tenham origem láctea. Com isso, um mercado amplo está disponível, estimulando pesquisas com testes sobre a viabilidade de probióticos em outros alimentos, como derivados de cereais (bebidas fermentadas e barras de cereais), produtos cárneos fermentados, sucos de frutas, azeitonas e outros (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015;

CARDOSO et al., 2015; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; VASUDHA; MISHRA, 2013).

Barras de cereais ou barras alimentícias são produtos que atendem a essas exigências do mercado e que recebem adeptos a cada dia, movimentando anualmente no Brasil mais de 8 milhões de reais (MESQUITA et al., 2012). Trata-se de um produto extrusado com mistura de diversos ingredientes, possui sabor adocicado agradável ao paladar, sendo fonte energética, de fibras, proteínas, carboidratos complexos, vitaminas e minerais (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015).

As barras alimentícias apresentam uma variedade de ingredientes e as empresas estão em constante desenvolvimento de novas combinações. Assim, as barras de cereais consistem num veículo ideal para incorporar ingredientes que agreguem valor nutricional e funcional e reduzam custos de produção (AMORIM et al., 2014; LIMA, A. et al., 2007).

Dos ingredientes que podem ser utilizados na formulação das barras alimentícias, pode-se citar a fécula de mandioca, também chamada de goma de mandioca ou polvilho doce, uma substância amilácea extraída da raiz da mandioca. Esse produto alimentício é consumido em quase todos os estados do Norte e Nordeste, sendo utilizado na alimentação humana de forma variada, como na produção do pão de queijo, tapioca e beiju. As etapas de produção da fécula consistem basicamente em: ralação da raiz, extração da fécula, decantação e moagem, ou pode ser obtida como derivado da produção de farinha de mandioca (ABREU; MATTIETTO, 2014; EMBRAPA, 2003; LIMA, C. et al., 2007).

O beneficiamento da mandioca para obtenção da fécula é de baixo custo e é realizado em todas as regiões do Brasil, gerando milhões de empregos diretamente. No entanto, esse processamento ocorre principalmente de forma artesanal ou semimecanizada, implicando em produtos de composição não padronizada e de qualidade sanitária duvidosa, podendo tornar-se num agente veiculador de doenças. Apesar disso, é um produto com potencial tecnológico diversificado, que pode ser utilizado como substituto ou associado ao trigo como fonte de carboidrato na produção de alimentos, reduzindo os gastos com importação deste cereal, uma vez que a produção interna não é capaz de suprir sua demanda (BRASIL, 2013; SOARES JÚNIOR et al., 2006).

As barras alimentícias constituem uma alternativa alimentar, principalmente nos lanches, de fácil consumo, rápido e não requer preparo. A associação de barras

alimentícias e microrganismos vivos benéficos representa uma abordagem interessante no que diz respeito aos alimentos com características funcionais. A utilização da fécula de mandioca na elaboração da barra alimentícia pode estimular a produção desse derivado da mandioca, elevando o valor cultural e monetário associados ao produto. Portanto, o presente estudo propôs trazer novas informações científicas sobre a viabilidade desses microrganismos nesses alimentos e sua viabilidade quando encapsulados em matriz de alginato de cálcio revestida com quitosana.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS E PROBIÓTICOS

Os alimentos funcionais são aqueles que possuem potencial para promover benefícios a saúde por meio de mecanismos não previstos simplesmente com a nutrição convencional (ROBERTS et al., 2013). A busca crescente por esse tipo de alimento pode ser decorrente do aumento da expectativa de vida, aumento nos gastos com saúde, além do desejo das pessoas que optam por hábitos alimentares que proporcionem uma melhora na sua qualidade de vida (MORAES; COLLA, 2006; SIRÓ et al., 2008). Os alimentos funcionais surgiram na década de 80 no Japão por ação governamental que tinha por objetivo produzir alimentos saudáveis para uma população que apresentava elevada expectativa de vida (ANJO, 2004).

O conhecimento do funcionamento intestinal, da microbiota presente e suas interações levaram pesquisadores a desenvolver estratégias alimentares, com objetivo de manter e estimular as bactérias benéficas colonizadoras do intestino humano, surgindo então os alimentos com probióticos apresentando atividade funcional (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015).

Ao longo do tempo muitas foram as definições de probióticos utilizadas. Atualmente, a definição aceita internacionalmente é a de microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios a saúde do hospedeiro (FAO, 2001). Já a ANVISA define probióticos como “microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (BRASIL, 2002).

Os alimentos probióticos são disponibilizados na forma de alimentos tradicionais e consumidos em dietas convencionais, mas apresentam capacidade de regular funções no organismo, auxiliando na proteção contra doenças como hipertensão, câncer, diabetes, osteoporose e coronariopatias (MORAES; COLLA, 2006).

A ANVISA estabeleceu uma lista com as linhagens bacterianas que podem ser utilizadas como probióticos em humanos, sendo: *Lactobacillus acidophilus* (*L. acidophilus*), *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *ramnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *L. lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium*. Dessa lista foram retiradas

as bactérias *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*), pois ambas são utilizadas na produção de iogurte e não apresentam atividade probiótica cientificamente comprovada (BRASIL, 2008). Apesar dessa lista não contemplar leveduras como microrganismos probióticos, alguns trabalhos relatam o efeito de leveduras na prevenção e tratamento de algumas doenças diarreicas, a citar o subtipo das espécies *Saccharomyces cerevisiae*, conhecido como *S. cerevisiae* Hansen CBS 5926, antigamente conhecida por *S. boulardii* (esta última não é aceita oficialmente, no entanto, é frequentemente encontrada em trabalhos e produtos terapêuticos) (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015; PINTO et al., 2007).

Dentre os efeitos que os probióticos podem exercer sobre o organismo estão: controle da microbiota intestinal, estabilização da microbiota intestinal após antibioticoterapia, aumento na resistência gastrointestinal à patógenos, produção de bacteriocinas e outros compostos antimicrobianos, promoção da digestão de lactose em indivíduos com intolerância à lactose, efeito imunoestimulatório benéfico, redução de efeitos da constipação e aumento da absorção de micronutrientes (ARAÚJO et al., 2015; LI et al., 2010; MORAES; COLLA, 2006; VASUDHA; MISHRA, 2013).

Na seleção de microrganismos probióticos para uso em alimentos, deve-se obedecer critérios, sendo que alguns podem ser considerados mais importantes, como: serem de origem humana, serem estáveis frente ao ácido clorídrico e à bile, não serem patogênicos, terem capacidade de produção de compostos antimicrobianos, sobreviverem aos processos tecnológicos, permanecerem viáveis durante o armazenamento do produto e terem benefícios à saúde comprovados (MORAES; COLLA, 2006; SAAD, 2006).

Para apresentar efeito fisiológico ao consumidor, o alimento incorporado com probióticos deve apresentar populações suficientemente elevadas, normalmente acima de 10^6 UFC/g ou mL do produto, resistindo as etapas de processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal. Entretanto, alguns autores propõem que a dose mínima de cultura probiótica por dia capaz de exercer atividade fisiológica benéfica seja de 10^8 e 10^9 UFC/g, correspondendo ao consumo de 100g do alimento contendo 10^6 a 10^7 UFC/g (SAAD, 2006). Já a ANVISA estabelece a quantidade mínima na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Podendo aceitar valores menores na condição da empresa comprovar sua eficácia (BRASIL, 2008).

O uso de probióticos em alimentos geralmente é feito em iogurtes e outros derivados lácteos, como queijos (Gouda, Cheddar, Crescenza, Caciocavallo Pugliese, Árzúa-Ulloa e queijos frescos, como o Minas frescal), leites fermentados, sorvetes e leite em pó destinados à recém-nascidos (SAAD, 2006). No entanto, há uma demanda crescente, por parte de consumidores vegetarianos restritos, alérgicos à proteína do leite, intolerantes à lactose e aqueles que desejam diversificar sua alimentação, por produtos contendo probióticos que não tenham origem láctea, estimulando pesquisas com testes sobre a viabilidade de probióticos em muitos produtos derivados de cereais, como bebidas fermentadas e barras de cereais, produtos cárneos fermentados, sucos de frutas e azeitonas, por exemplo (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010; VASUDHA; MISHRA, 2013).

2.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

Dentre os microrganismos probióticos mais estudados estão as bactérias da espécie *L. acidophilus*, são bastonetes gram-positivos isolados ou em cadeias curtas (dimensões de 0,5 – 1 x 2 – 10 µm), tendo as extremidades arredondadas, não flagelados, não formadores de esporos, homofermentativo, microaerófilos, capazes de crescimento em cultura sem agitação. Algumas linhagens são capazes de produzir bacteriocinas e peróxido de hidrogênio (H₂O₂). Temperatura ótima de crescimento na faixa entre 37 °C e 41 °C, com taxa de crescimento reduzida na faixa de 25 °C a 28 °C. O pH ideal para seu desenvolvimento está na faixa de 6 e 7, sendo inibida em pH superior a 9,5 e inferior a 4,5. Condições anaeróbias são preferíveis e o crescimento é favorecido em caldo ou ágar sob mistura padrão de gases contendo 5% de dióxido de carbono, 10% de hidrogênio e 85% de nitrogênio (JOHNSON et al., 1980; SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

L. acidophilus foi isolada pela primeira vez em 1900 por Ernst Moro a partir de fezes infantis, nomeando-a *Bacillus acidophilus*, desde então, realizaram-se alterações quanto aos seus metabólitos, taxonomia e características funcionais. Essa bactéria é encontrada no trato gastrointestinal humano e de outros animais, podendo também ser isolada em fezes de bebês em aleitamento exclusivo e de fezes de idosos com alimentação rica em leite, lactose ou dextrina. É a espécie de *Lactobacillus* mais

frequentemente associada a atividade probiótica (SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

Inicialmente foi classificada como uma bactéria termotolerante com base no seu metabolismo homofermentativo e capacidade de se desenvolver a 45 °C. Apenas em 1980, com estudos sobre hibridização de DNA, foi descoberto que se trata de um grupo heterogêneo, em que as bactérias não podem ser diferenciadas apenas com critérios fenotípicos, eventualmente sendo classificadas no que se conhece como complexo *Lactobacillus acidophilus*, composto por seis espécies distintas: *L. acidophilus* (ATCC 4356), *L. crispatus* (ATCC 33820), *L. amylovorus* (ATCC 33620), *L. gallinarum* (ATCC 33199), *L. gasseri* (ATCC 33323) e *L. johnsonii* (ATCC 33200) (JOHNSON et al., 1980; POT et al., 1993; SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

Uma característica importante dessas bactérias é a produção de ácido láctico, H₂O₂ e bacteriocinas, substâncias que atuam diretamente inibindo o desenvolvimento de outras formas microbianas, principalmente patógenos ao homem, esse é um dos motivos para que diversos estudos tenham interesse na aplicação de probióticos como *L. acidophilus* em alimentos (SELLE; KLAENHAMMER; RUSSELL, 2014).

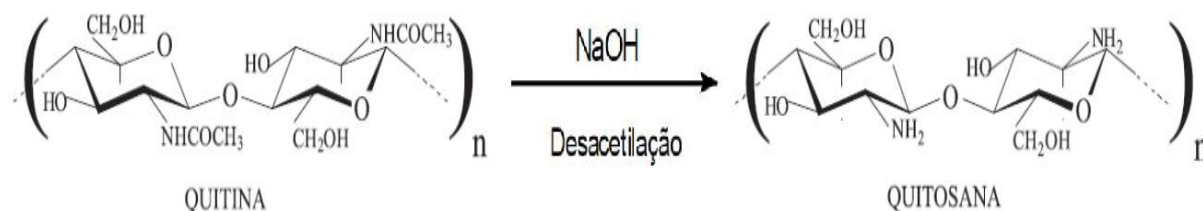
L. acidophilus já foram adicionados com sucesso em grande variedade de alimentos, principalmente aqueles derivados do leite, armazenados sob baixa temperatura, com elevada atividade de água, como iogurtes, bebidas fermentadas, sorvetes e queijos. Estes produtos geralmente apresentam vida de prateleira reduzida, no entanto, há possibilidade de aplicação desses microrganismos em matérias secas, com baixa atividade de água e maior vida de prateleira, como as barras de cereais (ALVES et al., 2011; BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2014, 2015; RIBEIRO et al., 2012).

2.2 QUITOSANA MICROBIOLÓGICA

A quitosana é um aminopolissacarídeo derivado da desacetilação alcalina da quitina, um dos polissacarídeos mais abundantes na natureza (Figura 1). A quitina é constituída por uma sequência linear de N-acetilglicosamina (2-acetamido-2-deoxi-D-glicose) unidas por ligações do tipo β -(1-4), estrutura semelhante à das fibras de celulose. Esses dois polissacarídeos são distintos estruturalmente pelo radical ligado

no carbono dois, onde na celulose é uma hidroxila e na quitina um grupo acetamino (MANFRINI et al., 2008; NEVES et al., 2013).

Figura 1 - Desacetilação da quitina na obtenção de quitosana.



Fonte: Adaptado de PEROBELLI et al., 2015.

A principal fonte de quitina é a carapaça de crustáceos (caranguejos, camarões, lagostas e siris), mas pode ser encontrada em insetos, moluscos e na parede celular de fungos. Existem limitações quanto à viabilidade na obtenção da quitina e quitosana de crustáceos, tais como: adaptação dos crustáceos ao clima, local de confinamento, sazonalidade, extração termoquímica que pode alterar a qualidade final do produto, resultando em biopolímeros com características heterogêneas, propriedades físico-químicas inconsistentes, o que demonstra uma desvantagem econômica e prejudicial ao meio ambiente (BERGER et al., 2014; LOPES et al., 2017; SOUZA et al., 2015).

Por outro lado, a utilização da massa micelial de fungos para obtenção de quitosana apresenta vantagens, a citar: extração simultânea de quitina e quitosana; independência de fatores sazonais; ausência de metais pesados contaminantes; maior grau de pureza; menor custo de produção, com o reaproveitamento de resíduos agroindustriais no cultivo dos microrganismos em substituição aos meios sintéticos; melhor padronização do grau de desacetilação, e peso molecular (AMORIM et al., 2006; FAI et al., 2011; KERCH et al., 2017).

Para obtenção da quitina de crustáceos deve-se separá-la dos outros componentes da carapaça por um processo químico que envolve a desmineralização e desproteinização das carapaças com, por exemplo, soluções de HCl (ácido clorídrico) e NaOH (hidróxido de sódio), seguida de desodorização e descoloração com KMnO_4 (permanganato de potássio) e $\text{H}_2\text{C}_2\text{O}_4$ (ácido oxálico) (AZEVEDO et al., 2007; SOARES et al., 2003).

A quitosana é composta por ligações do tipo β -(1 $\rightarrow$ 4) de N-acetil-D-glicosamina, pode ser encontrada naturalmente em pequenas quantidades na parede celular de fungos (ordem *Mucorales*, classe *Zygomycetes*), ou pode ser obtida por remoção parcial dos grupos acetamida da quitina, numa reação de desacetilação. Quando a desacetilação da quitina para produção de quitosana ultrapassa 50%, o biopolímero torna-se solúvel em soluções aquosas de ácidos inorgânicos e pode ser diluída em ácidos orgânicos com pH menor que 6, apresenta ainda insolubilidade em água, ácidos concentrados, álcalis, álcool e acetona, e se comporta como um polieletrólito catiônico, devido a protonação dos grupos amina em presença de íons H^+ , sendo caracterizado como quitosana e não mais quitina (SANTOS et al., 2015; TOLAIMATE et al., 2003).

Considerada um produto natural, a quitosana é abundante, renovável, de baixo custo, biodegradável, biocompatível, capaz de forma gel e microesferas, e tem sido empregado nos mais diversos ramos industriais, a citar os setores de produção de alimentos, na confecção de embalagens biodegradáveis e comestíveis para frutas e queijos, conservante para molhos, fungicida, bactericida, no tratamento de água, como defensivo agrícola e adubo, além de outras aplicações (AZEVEDO et al., 2007; NEVES et al., 2013; SHAHIDI; ARACHCHI; JEON, 1999).

A quitosana apresenta toxicidade inferior se comparada à sacarose ou glicose, uma vez que a dose letal de glicose em mamíferos está entre 8 e 12 g/Kg e para quitosana uma dose de 16 g/Kg de peso corpóreo (FAI; STAMFORD; STAMFORD, 2008; YADAV; BHISE, 2004). Estudos demonstram que a quitosana é benéfica e segura ao consumo humano, no entanto, é importante lembrar que, como qualquer outra substância, o excesso e/ou uso inadequado pode ser nocivo ao organismo. A toxicidade da quitosana só é evidenciada quando esta é utilizada como suplemento por longo tempo e os efeitos observados são o bloqueio da absorção de cálcio e vitaminas lipossolúveis, podendo acarretar disfunções ósseas, hipovitaminose e retardo do crescimento. A quitosana pode ser hidrolisada por enzimas, como a lisozima, gerando compostos atóxicos, não carcinogênicos e não imunogênicos, que são totalmente eliminados do organismo (BALDRICK, 2010; BERGER et al., 2004; KEAN; THANOU, 2010; QIN et al., 2006; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006).

A relação entre a quitosana extraída da carapaça de crustáceos e alergias alimentares ainda não está totalmente estabelecida. Considerando que para obtenção da quitosana há um processo de purificação que retira as proteínas, lipídeos e outras

substâncias presentes na matéria bruta, reduzindo ou até mesmo extinguindo o risco alergênico (MUZZARELLI, 2010).

Um segmento de pesquisa com quitosana é seu uso como agente formador de microesferas/microcápsulas para os mais diversos produtos, sejam eles fármacos (CAVALCANTE et al., 2007; SILVA; SANTOS; FERREIRA, 2006), enzimas (MENDES et al., 2011) ou probióticos (MENEZES et al., 2013). Com a formação dessas cápsulas os agentes encapsulados podem ser protegidos das condições adversas impostas pelo ambiente, como ar, armazenamento, temperatura, acidez estomacal e outras, até serem liberados no local destinado (CAVALHEIRO et al., 2015b; SILVA et al., 2015).

Em estudo realizado por Liserre, Ré e Franco (2007), observou-se que há viabilidade tecnológica na aplicação de alginato de cálcio e quitosana na encapsulação de probióticos *Bifidobacterium lactis*, não sendo dissolvidas em simulação de passagem pelo trato gastrointestinal.

Foi observado que a adição de quitosana (carregada positivamente) em cápsulas de alginato de cálcio (carregada negativamente), forma uma membrana semipermeável, que não se dissolve na presença de agentes antigelificantes ou quelantes de Ca^{2+} , aumentando a estabilidade do gel e formando uma barreira contra a liberação das células probióticas. A utilização de soluções de quitosana de baixa massa molar se difunde mais facilmente pela matriz das cápsulas de alginato de cálcio resultando em uma membrana mais densa se comparada ao uso de quitosana de alta massa molar (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

2.3 ENCAPSULAÇÃO: ALTERNATIVA PARA PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS

A encapsulação pode ser definida como uma tecnologia de englobamento de substâncias sólidas, líquidas ou gasosas que, sob determinadas condições específicas, são capazes de liberar seu conteúdo (CAVALHEIRO et al., 2015b). Um dos objetivos da encapsulação é a proteção do material, que está no seu núcleo, da degradação, uma vez que reduz sua capacidade de reação com o meio externo. Isso é conseguido principalmente pelo controle de transferência de massa entre o centro da cápsula e o meio externo através do material que serve como invólucro, funcionando como uma barreira física (FRITZEN-FREIRE et al., 2013; HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2012).

Os compostos utilizados na formação das cápsulas devem apresentar algumas características essenciais, como a capacidade de formar partículas, serem atóxicos e moduláveis a ponto de se obter cápsulas com tamanho, estrutura, carga, permeabilidade e estabilidade desejados (ETCHEPARE et al., 2015).

De acordo com o tamanho elas podem ser classificadas em: macrocápsulas (> 5000 μm) e microcápsulas (0,2 μm a 5000 μm). O que determina o tamanho da cápsula é, basicamente, o material da parede/revestimento e a técnica utilizada para a encapsulação. Existem diversas técnicas para encapsulação, sendo que as mais utilizadas são atomização (*spray-drying*), extrusão e emulsificação (CAVALHEIRO et al., 2015b).

Atomização (*Spray-drying*): essa técnica de encapsulação já é utilizada desde 1950 em vitaminas, minerais, óleos de pescados e probióticos. Nessa técnica, a solução homogeneizada do agente encapsulante com o material que será revestido é atomizada em uma câmara com ar quente circulante, onde o contato das gotículas com o ar quente causa a evaporação da água, conseqüentemente, secando e formando as microcápsulas. É uma técnica de fácil implantação a nível industrial, baixo custo operacional e pode operar continuamente. Entretanto, as altas temperaturas utilizadas limitam seu uso a materiais que apresentem determinada resistência térmica. Mesmo sendo utilizada na encapsulação de probióticos, alguns estudos não recomendam seu uso devido à redução na viabilidade dos microrganismos durante o processo. Essa perda de viabilidade das bactérias pode ser atenuada através de ajustes na temperatura e na escolha dos materiais encapsulantes (CAVALHEIRO et al., 2015b; KAILASAPATHY, 2002).

Extrusão: trata-se de um método de encapsulação simples, barato e que não usa condições extremas garantindo boa viabilidade probiótica. É uma técnica física que utiliza hidrocolóides como agentes encapsulantes. O material que será encapsulado é totalmente homogeneizado no material encapsulante, após esse processo, a mistura é gotejada através de um bico em uma solução solidificante, formando as cápsulas. Geralmente essas cápsulas possuem tamanho variado de 2 mm a 5 mm, no entanto, pode-se usar um sistema com pressão reduzindo consideravelmente o tamanho das cápsulas. Por fim, as cápsulas formadas devem ser separadas da solução solidificante e podem ser secas ou usadas *in natura* (ETCHEPARE et al., 2015).

Na extrusão, um dos materiais mais utilizados como agente encapsulante é o alginato, um polissacarídeo extraído de diversas algas, composto pelos ácidos β -D-manurônico e α -L-gulurônico. As cápsulas formadas por esse composto são porosas, consistindo em uma desvantagem tecnológica quando o objetivo é a proteção de microrganismos probióticos. No entanto, este problema pode ser compensado com a associação do alginato com outras substâncias, como gelatina, amido, carragena, proteínas do soro do leite, inulina, pectina e quitosana, formando cápsulas mais densas e resistentes as condições ambientais (CAVALHEIRO et al., 2015a, 2015b; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; SOUSA et al., 2015).

Emulsificação: trata-se de uma técnica química também muito utilizada na encapsulação de probióticos. Consiste na dispersão de um volume pequeno da solução contendo os microrganismos e o agente encapsulante (fase dispersa) em um volume maior de óleo (fase contínua). Esta mistura é submetida à agitação formando uma emulsão do tipo água-em-óleo (W/O), que pode ser permanente ou temporária. Nessa mistura pode ser usado um agente solidificante (ex.: cloreto de cálcio) que faz a separação de fases e liberação das cápsulas. As cápsulas formadas por esse método geralmente apresentam tamanhos irregulares. Na utilização em probióticos, pode-se obter cápsulas com tamanhos inferiores a 100 μ m (HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2012; ZHANG; LIN; ZHONG, 2015).

Na técnica de emulsificação, como materiais da fase dispersa pode-se utilizar alginato, carragenas, quitosana, e gelatina. Já como agente da fase contínua, para aplicação em alimentos, óleos vegetais como soja, canola, oliva e arroz são geralmente utilizados (CAVALHEIRO et al., 2015b). As cápsulas formadas nessa técnica podem não ser adequadas para utilização em alimentos com baixo teor de gordura devido ao óleo residual incorporado as cápsulas (KAILASAPATHY, 2002).

Recentemente foram desenvolvidas técnicas de encapsulação por emulsões duplas ou múltiplas. São sistemas compartimentados onde coexistem uma emulsão de água-em-óleo (W/O) e uma óleo-em-água (O/W). Formando as emulsões água-em-óleo-em-água (W/O/W) ou óleo-em-água-em-óleo (O/W/O) (CAVALHEIRO et al., 2015b).

Cavalheiro et al, (2015a) observaram que células livres do probiótico *Lactobacillus plantarum* sob temperatura de 70 °C por 20 minutos, reduziram suas contagens de 10,23 log UFC/g para valores inferiores a 6 log UFC/g. Já as células desse mesmo probiótico sob encapsulação (em alginato, inulina, leite em pó e

trealose) mantiveram sua contagem em 7,37 log UFC/g após 30 minutos de tratamento térmico à 70 °C.

Um estudo monitorou a viabilidade de *L. acidophilus* LA-5 e *B. bifidum* BB-12 microencapsulados por extrusão e emulsificação adicionados em queijo branco (white-brined cheese). Os autores concluíram que ambas as técnicas foram capazes de manter a contagem das duas cepas probióticas acima do limite mínimo para exercerem ação benéfica no organismo ($\geq 10^7$ UFC/g do queijo) (ÖZER et al., 2009).

Diversos estudos têm comprovado a eficácia da encapsulação na proteção de probióticos, no entanto, mais dados são necessários sobre a proteção dessas células frente aos obstáculos tecnológicos (como temperaturas extremas, alto teor de sal, baixa atividade de água, substâncias antimicrobianas, etc.) que normalmente são empregadas no processamento e preservação dos alimentos. Desse modo, tem-se uma lacuna para estudos que visam expandir os tipos de produtos incorporados com probióticos (DE PRISCO et al., 2015; MENEZES; DRUNKLER, 2014; ÖZER et al., 2009).

2.4 BARRAS ALIMENTÍCIAS: INGREDIENTES E ASPECTO NUTRICIONAL

As mudanças no estilo de vida e nos hábitos alimentares individuais tem feito com que ocorra uma busca crescente por alimentos nutritivos, seguros e com pouco ou nenhum tratamento antes de sua ingestão, estimulando as indústrias de alimentos a diversificar sua produção para assim suprir as exigências dos mais variados consumidores. As barras de cereais atendem esta demanda e são confeccionadas com massa de cereais de sabor adocicado e agradável, sendo fonte de vitaminas, minerais, proteínas, polissacarídeos digeríveis e fibras (FREITAS; MORETTI, 2006; MENDES et al., 2013; SILVEIRA et al., 2014).

Os cereais em barra podem ser classificados como produtos de confeitaria, na categoria dos chamados “snacks” ou “snack foods”, com formato retangular e comercializados em embalagens individuais. Esse produto foi introduzido no Brasil em 1992, pela empresa Nutrimental, não sendo bem aceito inicialmente, contudo, apresenta hoje taxa de crescimento no mercado de 20% ao ano (BARBOSA, 2003; CARDOSO et al., 2015; GUTKOSKI et al., 2007; SANTANA et al., 2014).

As barras de cereais surgiram como uma alternativa saudável em substituição aos confeitos, pois ocorria um crescimento expressivo da preocupação com a saúde.

Sendo destinada inicialmente a praticantes de atividade física, não demorando muito para surgirem mais adeptos do produto. Atualmente é componente da dieta de jovens e adultos (entre 15-24 anos) esportistas ou não (CARVALHO, 2014; FREITAS; MORETTI, 2006).

No Brasil, as barras geralmente são caracterizadas pelo termo “barra de cereais”, associação feita devido a matéria-prima majoritária utilizada na confecção do produto. Contudo, o aprimoramento do segmento de produtos compactados em barras alimentícias é tão diversificado que alguns não apresentam cereais ou contém apenas um tipo de cereal em sua composição (BRIZOLA; BAMPI, 2014; GASPAR; FURTADO, 2016).

O processamento das barras de cereais (Figura 2) ocorre em duas etapas: a fase sólida, onde há compactação e mistura dos cereais, castanhas e frutas secas em uma variedade de combinações de acordo com o sabor predominante desejado; e a fase contínua, onde ocorre a adição da matéria ligante, tais como: mel, melaço, sacarose, xarope de glicose, açúcar mascavo, açúcar invertido, lecitina de soja, glicerina, óleos e outros. Podem, ainda, receber adição de vitaminas, minerais, antioxidantes e proteínas, enriquecendo o produto (MENDES et al., 2013; RINALDI et al., 2016).

Na composição da barra podem ser utilizados os mais diversos ingredientes que ao final do processo devem apresentar equilíbrio nas características de sabor, textura e propriedades físicas. Os ingredientes mais utilizados na confecção são os cereais (principalmente aveia, trigo, soja, milho e arroz), frutas secas ou cristalizadas, oleaginosas e chocolate, mas, a introdução deste último prejudicou a imagem saudável do produto. Então, a escolha dos cereais, do carboidrato apropriado (com o objetivo de manter o equilíbrio entre sabor e a vida de prateleira) e dos demais ingredientes são aspectos importantes a serem considerados para confecção do produto (CARDOSO et al., 2015; GUTKOSKI et al., 2007).

As barras de cereais ou barras alimentícias apresentam características importantes como estabilidade física, sensorial e microbiológica, além de equilíbrio entre maciez e crocância. Apresentam atividade de água (A_w) inferior a 0,6, sendo classificadas como alimentos de baixa umidade e podem ser armazenadas em temperatura ambiente (CARDOSO et al. 2015; FREITAS; MORETTI, 2006).

Outro ponto que merece atenção é o valor nutricional e benefícios associados ao produto, as barras alimentícias que possuem maior teor de fibras, baixo teor lipídico

e alto teor energético ganham destaque nesse mercado. Assim, a associação entre barra de cereais e atributos nutricionais/funcionais tem feito com que muitas empresas e instituições de pesquisa invistam no desenvolvimento de novas formulações para barras de cereais, diferenciando seu produto dos demais, ofertando produtos com benefícios à saúde, atraindo novos consumidores e estimulando a competição no mercado (FREITAS; MORETTI, 2006; SILVEIRA et al., 2014).

Dentre os diversos ingredientes que podem ser utilizados na composição de barras de cereais tem-se a goma/fécula de mandioca em substituição ao trigo como fonte de carboidrato, uma vez que a produção interna deste cereal não é capaz de suprir sua demanda, elevando os gastos com importação (BRASIL, 2013; EMBRAPA, 2003; SOARES JÚNIOR et al., 2006) e microrganismos probióticos (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015), juntos podem melhorar o produto, atribuindo valor nutricional, sabor, praticidade e funcionalidade às barras alimentícias.

2.4.1 Mandioca

A mandioca (*Manihot esculenta* Crantz) é a principal fonte de carboidrato para mais de 600 milhões de pessoas nas regiões da África tropical e subtropical, Ásia e América Latina. O cultivo da mandioca ocorre em todo território brasileiro, representando uma das culturas de maior importância socioeconômica. O Brasil está em quarto lugar entre os maiores produtores com uma rendimento anual acima de 21 milhões de toneladas, ficando atrás da Nigéria, Tailândia e Indonésia (COUTO, 2013; EMBRAPA, 2003; FAO, 2015; FERREIRA FILHO et al., 2013). Em levantamento de dados pelo IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística), o Estado de Pernambuco produziu em 2016 aproximadamente 179 mil toneladas, e tinha estimativa para 2017 de 289.469 toneladas de mandioca (IBGE, 2017).

A mandioca, também conhecida por aipim, macaxeira e vários outros nomes, é uma planta perene, arbustiva, pertencente à família Euphorbiaceae. Toda a planta pode ser aproveitada, suas folhas podem ser utilizadas na alimentação humana, animal e para extração de proteínas; seu caule pode ser usado na alimentação animal, no plantio e gerar energia através da sua queima. A raiz é a parte de maior importância na planta, rica em amido, que pode ser utilizada, a depender do cultivar, *in natura* na alimentação humana e animal ou como matéria prima para diversas indústrias, como

a alcooleira, têxtil e de produção de amido (BEZERRA, 2006; FERREIRA FILHO et al., 2013).

É uma planta genuinamente brasileira. Estudos em sítios arqueológicos apontam o sudoeste da Amazônia como o centro de origem e dispersão da planta, inicialmente para Guatemala e império Maia, e depois chegou à Europa através dos conquistadores espanhóis que viram na mandioca um meio mais fácil de se obter farinha se comparado ao trigo (BRASIL, 2013; EMBRAPA, 2003).

A raiz da mandioca é constituída basicamente por três estruturas: a casca (epiderme), a entrecasca (córtex) e a polpa (parênquima de armazenamento do amido). Todas apresentando composição química diferentes. A composição química média da mandioca é de 60% a 65% de umidade, 30% a 35% de carboidrato (majoritariamente amido), 1% a 2% de proteínas, 0,5% correspondendo aos minerais e vitaminas (EMBRAPA, 2003).

A mandioca possui glicosídeos cianogênicos, sendo os principais a linamarina e lotaustralina que, ao passarem por hidrólise ácida ou enzimática (linamarase ou β -glicosidase) podem liberar ácido cianídrico (HCN) (ABREU; MATTIETTO, 2014; SILVA et al., 2004). O HCN está distribuído por todas as partes da planta (OLIVEIRA et al., 2012); considerando a raiz, a casca é responsável pela maior concentração do HCN se comparada a polpa (CORREIA, 1947; SILVA et al., 2004).

O HCN é um produto tóxico para homens, plantas e animais. No homem, a depender da quantidade ingerida ou acumulada no organismo, pode causar bócio, neuropatia atáxica tropical, cretinismo, diabetes e outras, podendo resultar em morte (ABREU; MATTIETTO, 2014; SILVA et al., 2004). Apesar da preocupação com a intoxicação, o processamento adequado elimina esse risco, tornando os derivados da mandioca seguros ao consumo humano (BORGES; FUKUDA; ROSSETTI, 2002). Assim, deve ser dado um tratamento e destino adequado aos efluentes do processamento das raízes (BEZERRA, 2006).

Os diferentes cultivares de mandioca podem ser classificadas e diferenciados pela cor do caule, formato das folhas, conformação e cor das raízes. Essas diferentes espécies também são classificadas de acordo com o seu teor HCN, sendo os cultivares com teor de HCN inferior a 100 mg/Kg classificados como mansos ou doces ou de mesa, e aqueles com concentração superior a 100 mg/Kg classificados como bravos ou amargos (FIALHO et al., 2002; SANTOS et al., 2008).

Por sua diversidade de aplicação, desde itens alimentares, industriais e siderúrgicos, há um aumento no interesse pela cultura. Essa variedade de aplicações da mandioca faz crer que, num futuro próximo, a mandioca será item essencial na formulação de pães, com vistas a reduzir os custos com importação de trigo (BEZERRA, 2006).

2.4.1.1 Fécula de mandioca

A fécula pode ser definida como substância amilácia extraída de raízes e tubérculos (BRASIL, 2005; SEBRAE, 2009). A fécula de mandioca, também chamada de goma ou polvilho, geralmente é obtida como derivado na produção de farinha (Figura 3). O líquido drenado durante a prensagem da massa (raízes moídas) decanta naturalmente formando a fécula (ABREU; MATTIETTO, 2014; LIMA, C. et al., 2007).

A fécula tem característica branca, insípida e insolúvel em água fria. Apesar de insolúvel em água fria, quando em contato com esta, o amido (fécula) forma suspensões leitosas que separam-se por decantação após algum tempo de descanso. Em temperatura de 60 °C ou mais, o amido gelatiniza (gomifica) recebendo a denominação de goma de amido. A tapioca é o principal produto elaborado com a goma, outros também conhecidos são o pão de queijo e o beiju (LIMA, C. et al., 2007; SEBRAE, 2009). A constituição média da fécula de mandioca é 18% de amilose e 82% de amilopectina (VIEIRA et al, 2010).

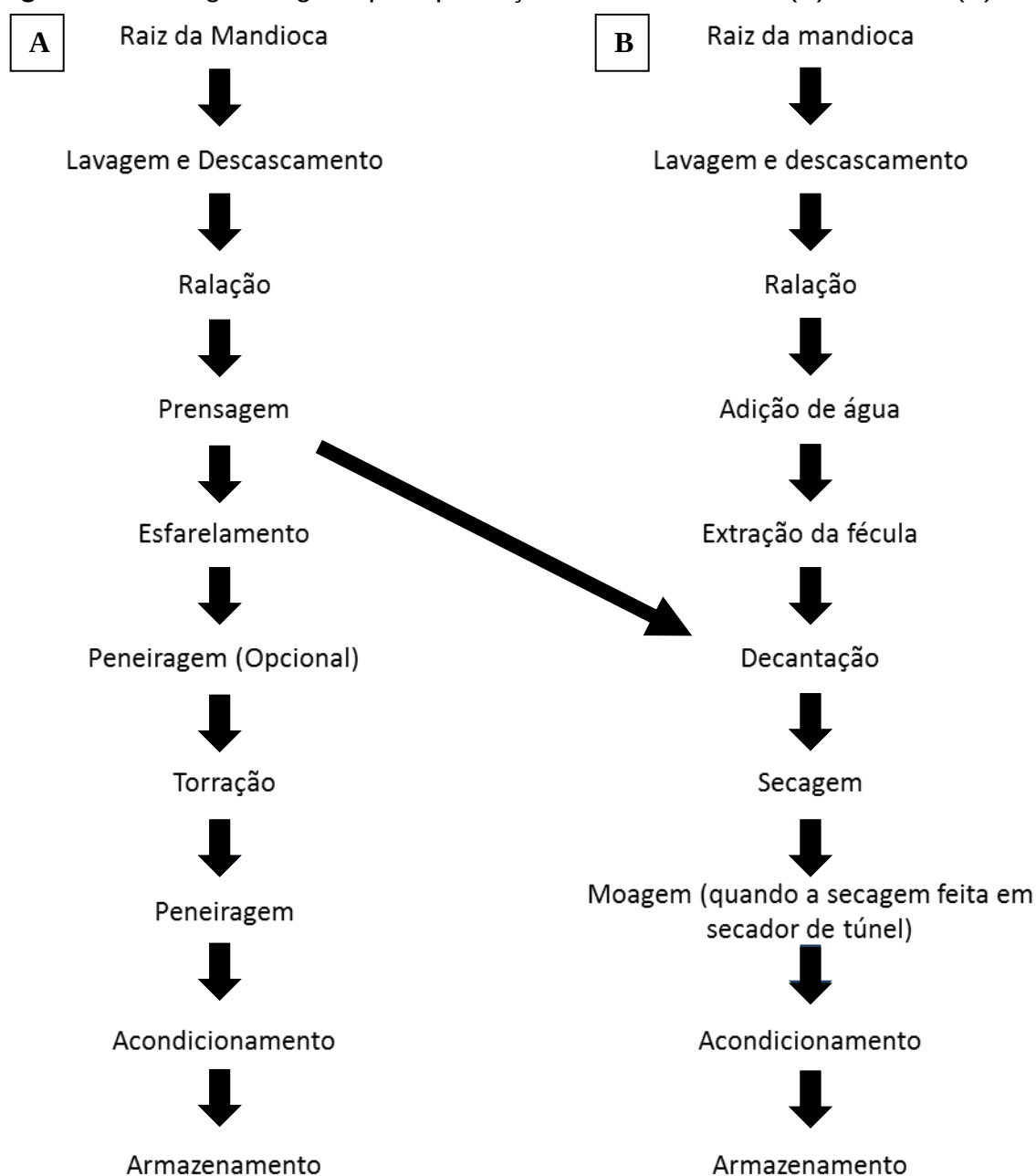
A Instrução Normativa nº 23 de 2005 do MAPA (Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento) determina que os diferentes subtipos da fécula de mandioca devem apresentar-se limpos, secos e isentos de odores estranhos impróprios ao produto, com teor de amido na faixa acima de 80% e abaixo de 84%, teor de cinzas inferior a 0,75%, pH entre 6,5 e 7, e umidade inferior a 14% (BRASIL, 2005). De acordo com o teor de acidez, o polvilho ou fécula de mandioca pode ser classificado como polvilho doce ou polvilho azedo (BRASIL, 1978).

Quando o processamento das raízes de mandioca é feito com o objetivo principal de se produzir a fécula, esta é obtida por sucessivas lavagens da massa com posterior decantação em tanques ou com extratores automáticos. A etapa de decantação é um ponto importante que irá influenciar significativamente na qualidade da fécula, por apresentar teor de umidade elevado, favorecendo o desenvolvimento

microbiano, e para evitar isto, os tanques de decantação devem ser limpos e sanitizados antes e após o processo (EMBRAPA, 2003; SEBRAE, 2009).

Nas pequenas unidades de beneficiamento, a fécula é seca ao sol, disposta em camadas finas sobre tecidos de algodão ou lona preta, em jiraus (espécie de grade que serve de apoio para manter algo suspenso). Neste tipo de secagem é difícil evitar a contaminação da fécula com partículas trazidas pelo ar. Já a secagem artificial pode ser feita em túneis secadores ou em secadores pneumáticos (SEBRAE, 2009).

Figura 2 - Fluxograma geral para produção de Farinha Seca (A) e Fécula (B).



Fonte: Adaptado de EMBRAPA (2003).

Apesar da farinha de mandioca ser o derivado mais conhecido, a fécula é o produto mais nobre extraído da raiz, com amplo espectro de aproveitamento a nível industrial, sendo valorizado por seu emprego na formulação de outros alimentos e produtos (SILVA et al., 2013), como na elaboração de envoltórios para frutas no pós-colheita (THOMAS et al., 2016), substituindo gordura na formulação de hambúrgueres (SEABRA et al., 2002), na fase de engomagem na indústria têxtil (MORAIS, 2014), no desenvolvimento de barra de cereais (CARVALHO, 2014). E os custos relacionados a produção da fécula são baixos e seu beneficiamento ocorre em todas as regiões do Brasil, gerando milhões de empregos diretamente e, conseqüentemente, renda (BRASIL, 2013; SOARES JÚNIOR et al., 2006).

A fécula de mandioca apresenta característica de gelatinização em temperaturas na faixa de 65 a 70 °C, fator que pode ser aproveitado tecnologicamente em aplicações com temperaturas mais baixas (VIEIRA et al., 2010), como no desenvolvimento de barras de cereais que não passam pela etapa de forneamento.

O processamento da mandioca para obtenção da fécula em muitas regiões ainda é artesanal ou semimecanizado o que implica em produtos não uniformes que não atingem os padrões de identidade e qualidade estabelecidos, com presença residual de HCN acima do valor permitido e, em muitos casos, em condições higiênico-sanitárias insatisfatórias, consistindo em risco à saúde dos consumidores. O uso de matéria-prima de má qualidade, água não-potável e manipulação inadequada consistem nos principais problemas encontrados em unidades de beneficiamento da mandioca para produção de seus derivados destinados ao consumo humano (ABREU; MATTIETTO, 2014; LIMA, C. et al., 2007; PRADO et al., 2005).

A fécula apresentar teor de umidade mais elevado que a farinha de mandioca (inferior a 13%), sendo um produto susceptível ao desenvolvimento microbiano, com conseqüente vida de prateleira reduzida. Além disso, a farinha passa pela etapa de torração reduzindo nesse processo sua carga microbiana total. Aliando esses fatores às condições higiênicas precárias, a fécula de mandioca é um potencial agente veiculador de doenças (DÓSEA et al., 2010; LIMA, C. et al., 2007).

A implantação das Boas Práticas de Fabricação (BPF) é um ponto essencial à melhoria dos produtos, e recomenda que as empresas estejam de acordo com a Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997 da então Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde (SVS-MS) (ABREU; MATTIETTO, 2014; BRASIL, 1997).

O padrão microbiológico exigido para fécula de mandioca pela RDC (Resolução da Diretoria Colegiada) nº 12, de janeiro de 2001 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), enquadra o produto no grupo: “farinhas, massas alimentícias, produtos para e de panificação, (industrializados e embalados) e similares” e no subgrupo “amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados”, preconizando análises para determinação de *Bacillus cereus*, com limite máximo tolerado de 3×10^3 UFC/g (Unidades Formadoras de Colônias por grama), coliformes à 45 °C (termotolerantes), com tolerância máxima de 10^2 UFC/g, e *Salmonella sp.* ausente em amostra de 25 g (BRASIL, 2001).

O estudo realizado por Lima C. et al. (2007) avaliou a qualidade microbiológica de farinha e goma de mandioca comercializadas no Estado da Paraíba, sendo observada a presença de microrganismos indicadores acima dos valores permitidos pela legislação vigente (RDC nº 12 de 2001) e maiores contagens microbianas na goma/fécula se comparada à farinha. Os autores indicam a implantação das BPF, do sistema APPCC (Análise de Perigos e Pontos Críticos de Controle) e capacitação dos manipuladores envolvidos no beneficiamento da mandioca como mecanismos para melhoria na qualidade dos produtos ofertados e prevenção de riscos à saúde humana.

Em pesquisa realizada com farinha de mandioca, polvilho azedo (obtido pela fermentação da fécula de mandioca) e outros produtos farináceos, a farinha e o polvilho azedo apresentaram os maiores níveis de contaminação com pelos de roedores, ovos de parasitas, fragmentos de insetos e outros contaminantes. Sendo isto atribuído ao fato da fécula de mandioca ser extraída majoritariamente de forma artesanal, nas chamadas “casas de farinha”, locais que apresentam espaço físico favorável à presença de roedores e outros animais de pequeno porte e, consequentemente, o surgimento de pelos, ou até mesmo urina e fezes, na farinha e polvilho azedo (PRADO et al., 2005).

3 HIPÓTESE

O probiótico em microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana quando aplicado na barra alimentícia estará viável durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal e em contagem suficiente capaz de exercer atividade funcional.

4 OBJETIVOS

4.1 OBJETIVO GERAL

Formular matriz alimentar funcional sólida a base de fécula de mandioca contendo probiótico microencapsulado em alginato de cálcio-quitosana.

4.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a qualidade microbiológica das féculas de mandioca comercializadas no Recife - PE;
- Caracterizar os parâmetros físico-químicos e microbiológicos da matriz alimentar elaborada;
- Avaliar a eficiência da microencapsulação do probiótico;
- Avaliar a sobrevivência do probiótico na matriz alimentar;
- Avaliar a viabilidade do probiótico em cada etapa da simulação do trato gastrointestinal;

5 MATERIAIS E MÉTODOS

5.1 MATERIA-PRIMA

Os ingredientes utilizados na formulação das barras alimentícias foram obtidos de mercados varejistas localizados no Recife – PE, que atenderam aos critérios mínimos de higiene prezados por lei (BRASIL, 1993; 1997).

As bactérias probióticas da espécie *L. acidophilus* (ATCC 4356) foram fornecidas pelo Laboratório de Experimentação e Análise de Alimentos Nonete Barbosa Guerra da Universidade Federal de Pernambuco - LEAAL/UFPE. Os microrganismos permaneceram estocados em ágar MRS (DeMan, Rogosa and Sharpe - HiMedia Laboratories (Mumbai, Índia) a -20°C.

A quitosana (Kiofine®) de origem fúngica (*Aspergillus niger*) de média massa molar foi gentilmente fornecida pela empresa KitoZyme® S. A. (Herstal, Bélgica).

5.2 PREPARO DAS BACTÉRIAS PROBIÓTICAS

Seguindo a metodologia proposta por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth, (2006), a bactéria *L. acidophilus* foi inoculada em 10 mL de caldo MRS e incubada a 37 °C por 3 dias sob condição aeróbica. Então transferida para 95 mL de caldo MRS e incubada sob a mesma condição. As células foram colhidas por centrifugação (Fanem® Modelo Baby I 206 BL) durante 15 min a 3600 rpm e lavadas 2 vezes com solução de peptona (0,1 g / 100 mL) estéril. A suspensão das células probióticas foi dividida em duas partes, uma para microencapsulação e a outra para ser usada como células livres (controle positivo) na matriz alimentar.

5.3 ENCAPSULAÇÃO DOS PROBIÓTICOS

A produção das microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana fúngica (Figura 4) para encapsulação da bactéria probiótica *L. acidophilus*, foi de acordo com a metodologia proposta por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2006).

Após a lavagem das células com solução de peptona (0,1 g / 100 mL) estéril, estas foram suspensas em 5 mL de solução salina, obtendo um inóculo padrão de 10^8

UFC/mL, acrescentando 20 mL de solução de alginato de sódio (20g/L) esterilizado a 121°C por 15 min.

A suspensão de células probióticas em alginato de sódio foi colocada numa seringa com agulha estéril de 0,11 milímetros, e gotejada manualmente em solução de CaCl_2 (0,05 mol/L) estéril contendo 0,1 g/100 g de Tween 80. Após 30 min de gelificação em 0,05 mol/L de CaCl_2 , as microcápsulas foram lavadas com solução de peptona (0,1 g/ 100 g) estéril e mantidas a 4°C também em solução de peptona estéril na mesma concentração.

Figura 3 – Microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana fúngica após serem retiradas da solução de quitosana.



Fonte: acervo do autor.

A quitosana de média massa molecular (0,4g) foi dissolvida em 90 mL de água destilada acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial, com o pH ajustado entre $5,8 \pm 0,1$ pela adição de 1 mol/L de NaOH. A solução de quitosana foi então filtrada em papel de filtro Whatman #4 e o volume ajustado para 100 mL, obtendo concentração final de 4g/L, antes de ser autoclavada a 121 °C por 15 min. Em seguida, 15 g de microcápsulas de alginato de cálcio foram imersas em 100 mL da solução de

quitosana, com agitação suave a 100 rpm durante 40 minutos num agitador orbital, para ocorrer o revestimento das microcápsulas. As microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana foram lavadas e mantidas em solução de peptona a 0,1 g/100 g a 4 °C, 1 hora. Essas microcápsulas foram adicionadas às barras de cereal no mesmo dia.

5.4 ENSAIO DE EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO (EE):

A eficiência de encapsulação é uma forma de avaliar a taxa de sobrevivência dos probióticos após o procedimento de encapsulação. O cálculo é realizado como uma razão das células viáveis pós-encapsuladas pelo número inicial dessas bactérias antes do revestimento, sendo expresso em porcentagem (CHÁVARRI et al., 2010).

As bactérias aprisionadas em microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana foram liberadas por homogeneização de 1 g de microcápsulas suspensas em 9 mL de solução peptonada salina (0,1 g/100 g; 0,9%) pré-aquecida a 37 °C e submetida a 10.000 rpm durante 10 s no homogeneizador Polytron ® (Kinematica) (ZOU et al., 2011).

As amostras homogenizadas foram diluídas em concentrações apropriadas e as inoculações feitas pela técnica de semeadura por profundidade (*Pour-plate*) em placas de Petri com meio MRS agar. Então incubadas por 2 dias a 37 °C e as bactérias que estavam encapsuladas nas microcápsulas enumeradas como UFC/mL. A eficiência de encapsulação (EE), que é uma medida combinada da eficácia de aprisionamento e sobrevivência de células viáveis durante o processo de microencapsulação foi calculado do seguinte modo:

$$EE = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

Onde N é o número de células viáveis aprisionadas libertadas das microcápsulas, e N₀ é o número de células livres adicionadas à mistura do biopolímero durante a produção das microesferas (CHÁVARRI et al., 2010).

5.5 TESTE DE POTENCIAL DE IRRITABILIDADE E DE BIOCOMPATIBILIDADE: TESTE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE DO OVO

Foram utilizados ovos no décimo dia após a fertilização. Foi então removido o reservatório acima do espaço aéreo do ovo para expor a membrana cório-alantóide, logo em seguida essa membrana foi umedecida com solução salina fisiológica a 0,9%. Uma alíquota de 200µl das microcápsulas contendo os probióticos foi aplicada na membrana cório-alantóide, e observada durante 5 minutos para verificar a ocorrência ou ausência de efeitos irritantes, tais como: vasoconstrição, hemorragia e coagulação. O tempo (em segundo) que os processos iniciaram foram posteriormente inseridos na fórmula abaixo:

$$\frac{(301 - \text{Hemorragia}) \times 5}{300} + \frac{(301 - \text{Lise}) \times 7}{300} + \frac{(301 - \text{Coagulação}) \times 9}{300}$$

Onde:

Hemorragia: tempo quando primeiro apareceu a hemorragia sanguínea.

Lise: tempo quando primeiro surgiu a lise dos vasos.

Coagulação: tempo quando primeiro apareceu à coagulação.

Após aplicação da fórmula e análise as microcápsulas foram classificadas em: não irritante (0-0,9); ligeiramente irritante (1-4,7); irritação moderada (5- 8,9); irritação grave/severa (9-21) (LUEPKE; KEMPER, 1986).

5.6 ELABORAÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR

Foram realizados testes com duas formulações da barra alimentícia com variações nas concentrações de ingredientes até a escolha da formulação para estudo. Após os testes preliminares foi escolhida para estudo apenas a formulação que apresentou aparência semelhante a uma barra de cereais. Os ingredientes testados na formulação da barra alimentícia estão na Tabela 1.

Tabela 1 - Ingredientes utilizados na elaboração das barras.

INGREDIENTES SECOS	XAROPE DE AGLUTINAÇÃO
Fécula de mandioca	Melado de cana
Quinoa	Açúcar mascavo
Castanha-de-caju	
Castanha-do-Pará	
Gergelim	
Amendoim	
Flocos de arroz	

Fonte: Elaborada pelo autor.

Os ingredientes foram pesados individualmente, inicialmente obedecendo uma proporção de ingredientes secos e xarope de aglutinação de 65:35, mas para adequação da formulação, essas proporções foram alteradas. Para o preparo do xarope de aglutinação, os ingredientes foram adicionados e, sob agitação, aquecidos a uma temperatura aproximada de 100 °C, até formar um xarope com teor de sólidos solúveis totais entre 85 e 89 °Brix, que foi medido com um refratômetro de bancada.

Adicionou-se as microcápsulas contendo os probióticos aos ingredientes secos na proporção de 1:9, respectivamente. Então, essa matéria seca recebeu o xarope de aglutinação e realizou-se a mistura, em seguida, a massa foi distribuída em forma de aço inoxidável e laminada em formatos retangulares de 10 x 3 x 1 cm, formando as barras com peso aproximado de 20g cada unidade. As barras foram armazenadas em filme de policloreto de vinila (PVC) e papel laminado a temperatura ambiente (aproximadamente 25°C), até o momento das análises seguintes.

5.7 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DA GOMA DE MANDIOCA E DA BARRA ALIMENTÍCIA

Foram obtidas três féculas de mandiocas de marcas comerciais distintas e realizadas análises microbiológicas e microscópicas das mesmas para determinação da qualidade sanitária geral e escolha de qual seria utilizada durante o trabalho e formulação das barras alimentícias. Essas féculas foram identificadas pelas letras A, B e C.

As análises microbiológicas realizadas foram aquelas preconizadas pela RDC nº 12, de 2 de janeiro de 2001 (BRASIL, 2001). A goma de mandioca e a barra alimentícia foram enquadradas no grupo de alimentos nº 10: FARINHAS, MASSAS ALIMENTÍCIAS, PRODUTOS PARA E DE PANIFICAÇÃO, (INDUSTRIALIZADOS E EMBALADOS) E SIMILARES. A goma classificada no subgrupo “A” (amidos, farinhas, féculas e fubá, em pó ou flocados) e a barra alimentícia pôde ser classificada no subgrupo “J” (produtos à base de amidos, farinhas, féculas e fubá, semi elaborados, estáveis à temperatura). Foram realizadas análises de *Bacillus cereus*, Coliformes a 45°C e *Salmonella sp*, para a goma, e análises de Coliformes a 45°C, *Salmonella sp*, *Staphylococcus coagulase positiva* (esta última não é preconizada por lei, mas deve-se ter controle nas condições higiênicas empregadas na manipulação do produto) e bolores e leveduras (devido a presença das oleaginosas) para a barra alimentícia, seguindo as metodologias da APHA (2001).

Além dessas análises, a goma foi avaliada pela presença de sujidades leves: matéria estranha, ovos de parasitas, material histológico e outros, seguindo o método da peneiragem AOAC n. 972.35 (2000).

5.8 ANÁLISES FÍSICO-QUÍMICAS DA MATRIZ ALIMENTAR

As análises físico-químicas foram realizadas inicialmente com as formulações A5 e B5 da barra alimentícia para determinar qual seria utilizada no estudo. Após escolha da formulação com as melhores características, seguiu-se com determinação físico-química dos três grupos: barra alimentícia contendo as bactérias probióticas microencapsuladas em alginato de cálcio-quitosana; barra alimentícia contendo células livres (controle positivo); e barra alimentícia sem adição de bactérias (controle negativo). As análises realizadas foram:

- Umidade: realizada em estufa a 105 °C por 24h, conforme método descrito pela AOAC (AOAC, 1995).

- Lipídios: A determinação do teor de gordura foi conduzida pelo método de Soxhlet (IUPAC, 1979).

- Proteínas: determinadas pelo método de Kjeldahl, empregando-se o fator 6,25 para a conversão do nitrogênio em proteína bruta (AOAC, 1995).

- Resíduo Mineral Fixo (RMF): realizado por gravimetria, compreendendo a carbonização da amostra, seguida de incineração em forno mufla a 550 °C (AOAC, 1995).
- Carboidratos: estimados por diferença.
- pH: foi avaliado em triplicata, de acordo com o método da AOAC 945.42 (1995), utilizando um pHmetro digital.

5.9 TESTES DE AVALIAÇÃO DO POTENCIAL PROBIÓTICO

5.9.1 Teste de viabilidade dos microrganismos microencapsulados adicionados à matriz alimentar durante o período de armazenamento

Alíquotas do produto das barras alimentícias inoculadas com cultura das cepas microencapsuladas com alginato de cálcio-quitosana foram submetidas à contagem do número de células viáveis em diferentes intervalos ao longo do armazenamento (1,3,5,7,14 e 21 dias) (NUALKAEKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011).

5.9.2 Sobrevivência do probiótico microencapsulado adicionadas à matriz alimentar em simulação do trato gastrointestinal

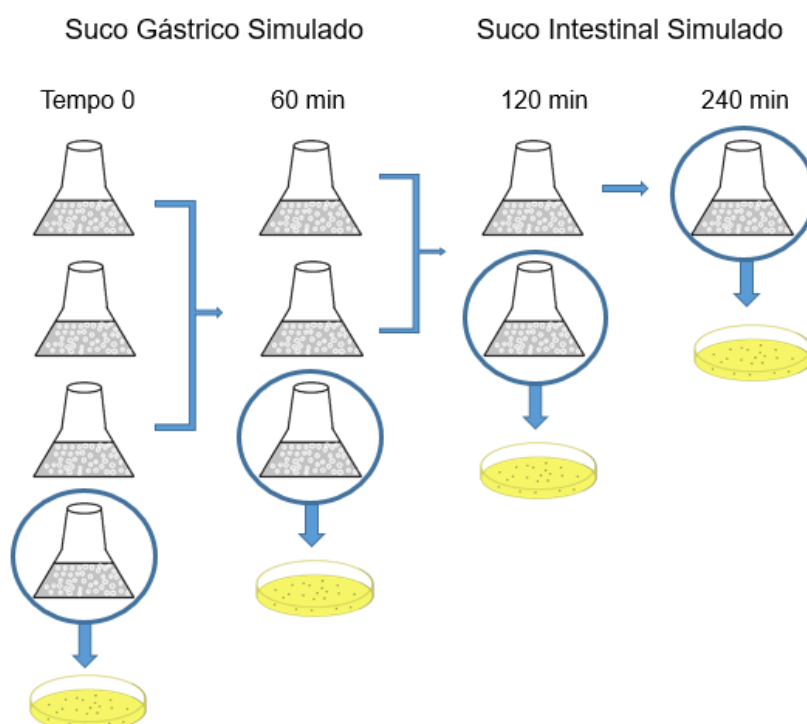
As bactérias probióticas microencapsuladas em alginato de cálcio-quitosana e livres adicionadas na barra alimentícia foram submetidas a teste de simulação do trato gastrointestinal. A figura 5 mostra o esquema da análise. Foram preparados 8 tubos para simulação gastrointestinal (4 tubos para as bactérias encapsuladas e 4 para as bactérias adicionadas na forma livre), nos tempos de leitura predeterminados, um tubo de cada grupo foi coletado para ser realizada a contagem do número de células viáveis.

Os tubos receberam 2 g da barra alimentícia contendo os probióticos encapsulados e na forma livre, e 10 mL do suco gástrico simulado estéril (9 g/L de cloreto de sódio contendo 25 mg/mL de pepsina, pH ajustado para 2,0 com HCl e tempo de exposição de 90 minutos). Em seguida, o suco intestinal simulado foi adicionado (10 mL com 2 g/L de pancreatina, 12 g/L de sais biliares bovino e pH ajustado para 6,5 com NaOH), de acordo com a metodologia descrita por Madureira

et al. (2011) e Chávarri et al. (2010). Foi utilizado sistema de agitação mecânica a 50 rpm para simular os movimentos peristálticos e o sistema incubado a 37 °C.

As leituras foram realizadas nos tempos 0, 60, 120 e 240 minutos. A liberação das células encapsuladas para posterior plaqueamento e contagem seguiu o descrito no item 5.6.

Figura 4 - Simulação das condições gastrointestinais com os probióticos microencapsulados.



Fonte: Elaborado pelo autor.

5.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados expressos como uma média dos ensaios. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial (teste de Tukey) para determinação de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados obtidos. Para o tratamento estatístico foi utilizado o software Origin Pro 8.

6 RESULTADOS

6.1 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A Tabela 2 apresenta a eficiência de encapsulação obtida com a técnica de extrusão para a bactéria *L. acidophilus*, que apresentou redução de 1,6 log UFC/g após o procedimento de encapsulação.

Tabela 2 - Contagem de células viáveis (média $\pm$ desvio padrão) de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) antes e depois da encapsulação.

Bactéria	log UFC/g		EE %
	Antes	Depois	
<i>L. acidophilus</i>	9.68 $\pm$ 0,03	8.08 $\pm$ 0,02	83.47

Fonte: Elaborada pelo autor.

6.2 TESTE DA MEMBRANA CÓRIO-ALANTÓIDE DO OVO: HET-CAM

O ensaio foi realizado para avaliar os possíveis efeitos inflamatórios e vasculares causados pelas microcápsulas de alginato de cálcio (contendo probióticos *L. acidophilus*) revestidas com quitosana. Os resultados obtidos (Figura 6) mostram que a presença das cápsulas contendo os probióticos não apresentaram efeitos irritantes no teste da membrana cório-alantóide do ovo de galinha, ou seja, ausência de vasoconstricção, hemorragia e coagulação durante o período avaliado (5 min para cada repetição).

Figura 5 – Teste do HET-CAM com microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo probióticos.



Fonte: acervo do autor.

6.3 ELABORAÇÃO DA MATRIZ ALIMENTAR

Após os testes pilotos, as formulações dos ingredientes que apresentaram características semelhantes à uma barra de cereal foram as Formulações **A5** e **B5**. As proporções dos ingredientes nos testes iniciais estão presentes na tabela 3. A figura 7 apresenta a formulação A5 usada nos experimentos seguintes, escolhida após as análises microbiológicas e físico-químicas.

Tabela 3 - Ingredientes e proporções que foram utilizadas na elaboração das barras.

INGREDIENTES	FORMULAÇÃO A					FORMULAÇÃO B				
	1	2	3	4	5	1	2	3	4	5
XAROPE DE										
AGLUTINAÇÃO										
Melado de cana	20	15	10	10	5	25	15	10	5	5
Açúcar mascavo	15	25	15	18	20	10	20	25	20	20
INGREDIENTES										
SECOS										
Goma de mandioca	30	33	33	27	25	25	30	30	25	30
Quinoa	10	8	-	-	-	20	15	10	12	5
Castanha-de-caju	8	5	8	10	10	4	4	8	10	10
Castanha-do-pará	5	3	4	5	7	3	3	5	8	5
Amendoim	-	-	-	-	-	3	3	4	10	10
Gergelim	5	6	15	15	15	-	-	-	-	-
Flocos de arroz	7	5	15	15	18	10	10	8	10	15
TOTAL g ou %	100	100	100	100	100	100	100	100	100	100

Fonte: Elaborada pelo autor.

Figura 6 - Formulação A5 definida e utilizada nos testes com probióticos.



Fonte: acervo do autor.

6.4 AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA E MICROSCÓPICA DA GOMA DE MANDIOCA E DA BARRA ALIMENTÍCIA

Os resultados das análises microbiológicas e microscópicas das gomas evidenciaram que as três marcas estão de acordo com os parâmetros microbiológicos exigidos pela legislação vigente (RDC nº 12, 2001) e não apresentaram matéria de origem estranha na análise microscópica.

Levando em consideração os resultados obtidos nos aspectos microbiológicos e microscópicos, a goma da marca A foi escolhida para ser utilizada na formulação das barras alimentícias.

Nas análises microbiológicas das duas formulações das barras alimentícias, foi observado que ambas atendem aos parâmetros exigidos por lei, contagem de coliformes à 45 °C abaixo do limite mínimo tolerado e ausência de *Salmonella sp* em 25g do produto. Nas análises para detecção de *Staphylococcus* coagulase positiva a contagem foi inferior à sua dose infectante que é de 10^5 UFC/g. Em relação aos bolores e leveduras, a formulação A5 não apresentou contagem desse grupo microbiano, já a formulação B5 apresentou contagem em nível aceitável.

6.5 PARÂMETROS FÍSICO-QUÍMICAS DA MATRIZ ALIMENTAR

A Tabela 4 apresenta os resultados da determinação da composição centesimal das duas formulações elaboradas. Considerando que o produto em questão (barra alimentícia) seria armazenado em temperatura ambiente e que, geralmente, produtos com alta umidade, apresentam atividade de água elevada o que os tornaria mais susceptíveis ao desenvolvimento microbiano. A umidade foi considerada uma das principais variáveis para determinar a escolha da formulação utilizada nos testes com os probióticos microencapsulados.

Comparando a umidade obtida nas formulações A5 e B5 (13,02% e 15,2%, respectivamente) e os dados obtidos nos parâmetros microbiológicos, a formulação A5 das barras foi escolhida para utilização durante o desenvolvimento do estudo.

A tabela 5 dispõe a composição centesimal das barras alimentícias da formulação A5 contendo as bactérias microencapsuladas, na forma livre (controle positivo) e sem os probióticos (controle negativo). Todos os grupos apresentaram

composição diferente estatisticamente. Os únicos parâmetros que não diferiram estatisticamente foram a umidade e o resíduo mineral fixo (cinzas) do grupo contendo as células livres (controle positivo) e controle negativo.

O grupo que recebeu as microcápsulas apresentou o maior valor de umidade, isso se deve a presença das microcápsulas que não foram liofilizadas e continham elevada umidade.

Tabela 4 - Composição centesimal das formulações das barras alimentícias com base em fécula de mandioca.

Composição centesimal	Barras	
	A5	B5
Proteínas	8.28	8.9
Carboidratos	59.12	56.97
Lipídios	18.14	17.32
Cinzas	1.44	1.57
Umidade	13.02	15.24
TOTAL (%)	100	100
VET (Kcal)	432.86	419.36

VET: valor energético total.

Fonte: elaborada pelo autor.

Tabela 5 - Composição centesimal das barras alimentícias com base em fécula de mandioca contendo *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) microencapsulados e livres, e sem probióticos.

Barras Alimentícias – Formulação A5			
Composição		Células Livres	
Centesimal	Microcápsulas	(Controle Positivo)	Controle Negativo
Proteínas	7.27 (± 0.02) ^A	8.02 (± 0.03) ^B	8.19 (± 0.01) ^C
Carboidratos	58.11 (± 0.04) ^A	59.95 (± 0.07) ^C	59.01 (± 0.09) ^B
Lipídios	17.05 (± 0.08) ^C	15.85 (± 0.06) ^A	16.75 (± 0.08) ^B
Cinzas	1.50 (± 0.02) ^A	1.56 (± 0.01) ^B	1.57 (± 0.03) ^{BC}
Umidade	16.08 (± 0.04) ^C	14.63 (± 0.12) ^B	14.48 (± 0.12) ^{AB}
TOTAL (%)	100	100	100

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) com ^{A-C} presentes na mesma linha com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes ($p < 0,05$) de acordo com o teste de Tukey.

Fonte: elaborada pelo autor.

Na tabela 6 estão os resultados do pH das barras alimentícias da formulação A5 contendo os probióticos adicionados na forma microencapsulada com alginato de cálcio-quitosana, na forma livre (controle positivo) e sem as bactérias (controle negativo) durante o armazenamento (21 dias). Durante o período de análise foram identificadas algumas variações estatísticas ($p < 0,05$) entre os grupos, no entanto, não houve diferença no próprio grupo. O grupo contendo as bactérias microencapsuladas apresentou a menor média geral de pH, sendo diferente estatisticamente dos demais. É possível que esse menor valor de pH se deva ao preparo da solução de quitosana, a qual recebe adição de ácido acético glacial.

Tabela 6 - Resultados de pH das barras alimentícias contendo *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) durante o armazenamento.

Tempo (dias)	Parâmetro	Microcápsulas	Células Livres (Controle Positivo)	Controle Negativo
1	pH	6.31 ($\pm 0,03$) ^{Ca}	6.45 ($\pm 0,04$) ^{BCa}	6.58 ($\pm 0,02$) ^{ABa}
3		6.3 ($\pm 0,05$) ^{Aa}	6.39 ($\pm 0,06$) ^{Aa}	6.57 ($\pm 0,05$) ^{Aa}
5		6.24 ($\pm 0,01$) ^{Ba}	6.37 ($\pm 0,02$) ^{Ba}	6.59 ($\pm 0,04$) ^{Aa}
7		6.29 ($\pm 0,04$) ^{Aa}	6.3 ($\pm 0,03$) ^{Aa}	6.58 ($\pm 0,08$) ^{Aa}
14		6.26 ($\pm 0,03$) ^{Aa}	6.28 ($\pm 0,03$) ^{Aa}	6.56 ($\pm 0,09$) ^{Aa}
21		6.24 ($\pm 0,09$) ^{Aa}	6.3 ($\pm 0,04$) ^{Aa}	6.55 ($\pm 0,05$) ^{Aa}
Média		6,27 ($\pm 0,03$) ^{A*}	6,35 ($\pm 0,07$) ^{B*}	6,57 ($\pm 0,02$) ^{C*}

Valores (médias $\pm$ desvio padrão) com ^{A-C} presentes na mesma linha com diferentes letras maiúsculas são significativamente diferentes ($p < 0,05$); ^{a-b} Presentes na mesma coluna com diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($p < 0,05$); Ambos de acordo com o teste Tukey. *Não realizada teste para diferença estatística na coluna.

Fonte: elaborada pelo autor.

6.6 VIABILIDADE DO *L. acidophilus* DURANTE O ARMAZENAMENTO DA BARRA ALIMENTÍCIA

A figura 8 apresenta a redução em ciclos log das contagens de células viáveis de *L. acidophilus* quando adicionadas na matriz alimentar, tanto na forma microencapsulada com alginato de cálcio-quitosana, quanto na forma de células livres avaliadas durante o armazenamento do produto.

As bactérias encapsuladas na matriz de alginato de cálcio-quitosana possuíam inóculo inicial de 8,78 ($\pm 0,08$) log UFC/g antes da adição do xarope de aglutinação

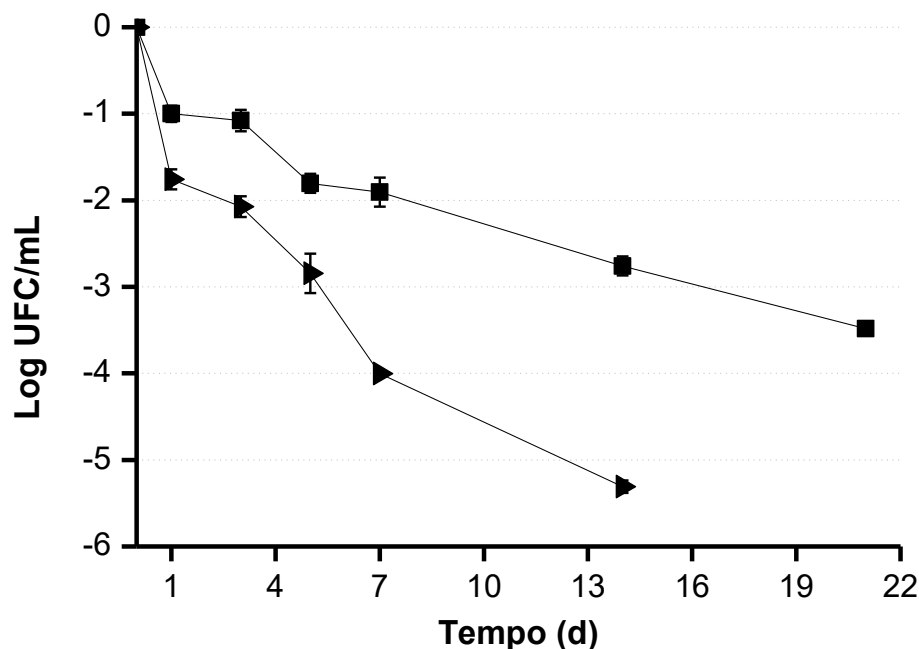
(numa temperatura de aproximadamente 100 °C), após a adição esse inóculo caiu para 7,78 ($\pm 0,05$) log UFC/g, causando a redução de 1 log, esse valor é estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do encontrado nas bactérias que foram adicionadas na forma livre na barra alimentícia, onde o inóculo inicial era de 8,32 ($\pm 0,02$) log UFC/g e após a adição do xarope o inóculo encontrado foi de 6,57 ($\pm 0,09$) log UFC/g, uma redução de 1,76 log. Demonstrando que as cápsulas foram efetivas na proteção das bactérias contra a temperatura elevada do xarope de aglutinação.

Pelo gráfico é possível observar que as células microencapsuladas apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) na manutenção das suas contagens durante o período de armazenamento se comparadas as células que foram adicionadas na forma livre na barra alimentícia em todos os tempos de análise. As células microencapsuladas apresentaram redução inferior a 2 ciclos log no sétimo dia de experimento e uma redução de aproximadamente 3,5 ciclos log no vigésimo primeiro dia. Já o experimento com as células livres apresentou uma redução maior que 2 ciclos log ainda no terceiro dia de experimento e uma redução superior a 5,3 ciclos log no décimo quarto dia, não apresentando crescimento no tempo de análise posterior. A redução nas contagens das bactérias adicionadas na forma livre foi quase o dobro da que ocorreu nas bactérias microencapsuladas na maioria dos tempos de análise.

A encapsulação prolongou por 7 dias a viabilidade das células na matriz alimentar. Ao final do experimento as bactérias encapsuladas possuíam uma contagem de 5,3 ($\pm 0,04$) log UFC/g e as bactérias que foram adicionadas na forma livre já não foram identificadas (atingiram o limite de detecção do teste: 2,0 log) no décimo quarto dia.

As análises microbiológicas durante o armazenamento confirmam que as barras mantiveram-se nos padrões legais e estáveis microbiologicamente ao longo dos 21 dias de experimentos. Nos ensaios para detecção de coliformes termotolerantes (45 °C) pela técnica do Número Mais Provável (NMP) todos os tubos estiveram negativos para produção de gás, e *Salmonella sp* ausente em 25g da amostra em todos os testes. Após o vigésimo primeiro dia, foi identificado crescimento fúngico visível, sendo então encerrado o experimento.

Figura 7 – Redução das contagens (log UFC/g) de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) adicionadas nas barras alimentícias durante o armazenamento. (■) Células encapsuladas; (►) Células livres. Limite de detecção: 2,0 log UFC/g.



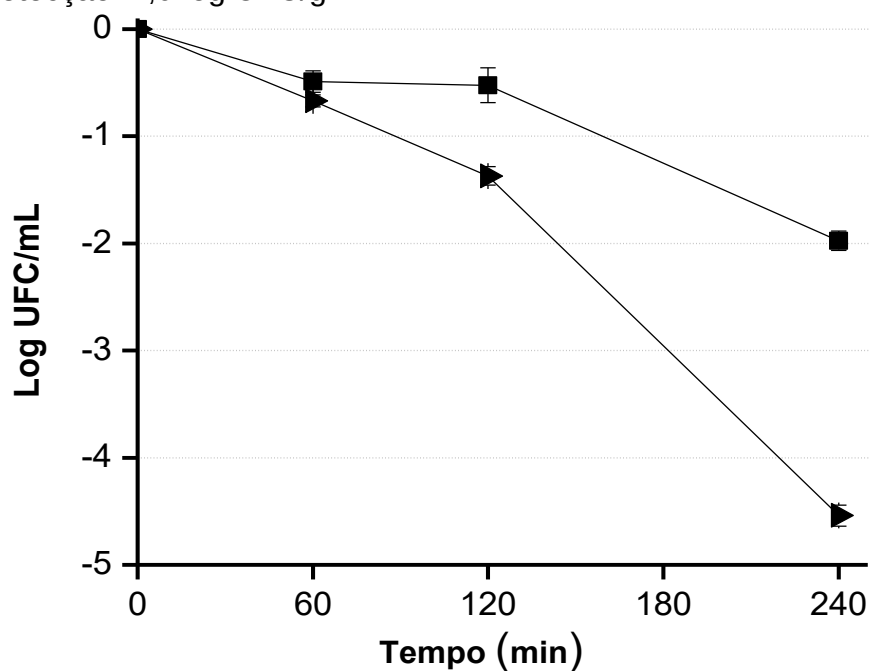
6.7 VIABILIDADE DO *L. acidophilus* DURANTE SIMULAÇÃO DO TRATO GASTROINTESTINAL

Na figura 9 está representada a redução das contagens de células viáveis de *L. acidophilus* quando adicionadas na matriz alimentar, tanto na forma microencapsulada com alginato de cálcio-quitosana, quanto na forma de células livres avaliadas durante a simulação do trato gastrointestinal.

As bactérias encapsuladas em matriz de alginato de cálcio-quitosana apresentaram no tempo 0 (zero) inóculo de 8,17 ($\pm 0,04$) log UFC/g e, ao final do experimento (240 min), contagem de 6,2 ($\pm 0,13$) log UFC/g. Já as bactérias que foram adicionadas à barra alimentícia na forma livre possuíam um número de células viáveis de 7,93 ($\pm 0,07$) log UFC/g no tempo inicial e um valor de 3,39 ($\pm 0,16$) após 240 minutos. Assim, durante a simulação das condições gastrointestinais humanas, as bactérias encapsuladas apresentaram redução inferior a 2 log UFC/g, valor estatisticamente diferente ($p < 0,05$) do obtido das bactérias adicionadas na forma livre, que expressaram redução superior a 4,5 log UFC/g (mais que o dobro do que ocorreu no outro grupo), demonstrando que a encapsulação foi efetiva na proteção das bactérias contra as condições gastrointestinais simuladas.

Após 60 minutos de experimento, as bactérias encapsuladas e livres apresentaram redução semelhante em suas células viáveis, não diferindo estatisticamente ($p > 0,05$) entre si. Já nos demais tempos os resultados foram estatisticamente distintos ($p < 0,05$).

Figura 8 - Redução das contagens (log UFC/g) de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* (ATCC 4356) adicionadas nas barras alimentícias durante simulação do trato gastrointestinal. (■) Células encapsuladas; (►) Células livres. Limite de detecção: 2,0 log UFC/g.



7 DISCUSSÃO

A bactéria *L. acidophilus* utilizada apresentou uma taxa de eficiência de encapsulação superior a 83%. O valor obtido no presente estudo foi superior àquele encontrado por Chávarri et al. (2010), onde os pesquisadores utilizaram a técnica de extrusão com alginato de cálcio e quitosana na encapsulação de *L. gasseri* e *B. bifidum* com e sem quercetina. Os valores da eficiência de encapsulação variaram de 19,5% a 40,2%. Os autores observaram que as menores taxas foram dos grupos que tiveram associação com a quercetina.

A matriz utilizada e a técnica de encapsulação influenciam diretamente na eficiência de encapsulação. Em estudo realizado por Ashwar et al. (2018) foi realizada a encapsulação com amido resistente de arroz associando os métodos de emulsão e extrusão. A taxa de encapsulação foi de 48,46% para *L. casei*, 43,01% para *L. brevis* e 43,85% para *L. plantarum*. Apesar de baixa eficiência, a técnica foi eficaz em manter a viabilidade das bactérias durante simulação do trato gastrointestinal.

A eficiência de encapsulação do presente estudo foi inferior a encontrada no estudo realizado por Mathews (2017), onde obteve-se uma eficiência de encapsulação de 97,38% de *L. acidophilus* quando encapsulada em matriz de alginato-gelatina contendo lactulose como fonte prebiótica, e uma taxa de 97,18% quando a fonte prebiótica foi a inulina. A autora conclui que a adição de agentes prebióticos pode melhorar não só a eficiência de encapsulação, como também a viabilidade da bactéria quando em simulação do trato gastrointestinal.

Em estudo realizado por De Prisco et al. (2015), os autores obtiveram uma eficiência de encapsulação de 97% de *L. reuteri*. Eles utilizaram a técnica de extrusão em encapsulador automático para formação de cápsulas de alginato de cálcio-quitosana. Os autores evidenciaram manutenção da viabilidade dessa bactéria em simulação do trato gastrointestinal.

A técnica de extrusão utilizada no presente trabalho foi realizada manualmente, isso pode explicar a menor taxa na encapsulação quando comparado ao de De Prisco et al. (2015), considerando que possa haver um possível erro do manipulador e melhor aproveitamento sem desperdícios pelo equipamento automatizado.

Fareez et al. (2015) realizaram a encapsulação, pela técnica de extrusão, de *L. plantarum* em quatro grupos: alginato; alginato-quitosana; alginato-goma xantana e

alginato-quitosana-goma xantana. Nos ensaios realizados os pesquisadores observaram maior resistência térmica a 90 °C das cápsulas formadas pela união do alginato-quitosana-goma xantana, mantendo viáveis as células de *L. plantarum*. Demonstrando que a microencapsulação pode ser eficaz na manutenção da sobrevivência de probióticos adicionados em alimentos tratados termicamente, como o xarope de aglutinação adicionado para formar a barra alimentícia do atual estudo.

O ensaio com as microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana contendo os probióticos não apresentaram efeitos tóxicos de acordo com o teste da membrana cório-alantóide do ovo (HET-CAM), sendo classificado como não irritante, viabilizando sua utilização em alimentos. O teste HET-CAM é caracterizado como um experimento que fornece resultados sobre citotoxicidade, relativamente simples, de baixo custo, efetividade, rapidez se comparado a outros ensaios e dispensa procedimentos para solicitação de aprovação pelo Comitê de Ética em Experimentação Animal. Os efeitos agudos induzidos pelo agentes testados nos vasos e proteínas da membrana cório-alantóide são similares aos resultados expressos no teste do olho de coelho, com a vantagem de não ser considerado um teste animal, uma vez que os embriões no décimo dia de fecundação ainda não são considerados animais (RIBATTI, 2017; YAN; PITERSKI; NITKA, 2007).

A avaliação toxicológica dessas cápsulas serve como medida de controle e conhecimento dos produtos que serão adicionados na alimentação humana. Os principais agentes utilizados na encapsulação (alginato e quitosana) já foram testados em outros estudos quanto seus aspectos tóxicos, sendo ambos considerados não tóxicos (SIMEONI et al., 2014; YADAV; BHISE, 2004). Além disso, a bactéria *L. acidophilus* utilizada no estudo é um probiótico, ou seja, sua presença no alimento de forma controlada não implica em risco à saúde do consumidor.

Em sua grande maioria, os alimentos estudados e disponíveis no mercado contendo probióticos são aqueles derivados do leite e/ou armazenados em temperatura de refrigeração ou congelamento, como no caso dos sorvetes, quefir, leites fermentados, queijos e outros (GALLINA et al., 2015; LIMA et al., 2014; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015), pois a maioria das bactérias probióticas já estão adaptadas às condições desses alimentos e o produto em si é de fácil aceitação pelo consumidor (WENDLING; WESCHENFER, 2013). Assim, demais produtos que se proponham a carrear probióticos são desafios tecnológicos, como no caso das barras alimentícias propostas no presente estudo.

As barras de cereais ou barras alimentícias têm sido consumidas principalmente como lanches entre as principais refeições, tanto por aqueles que as utilizam como fonte de nutrientes no pré e pós-treino quanto por adultos-jovens que veem no produto uma alternativa prática para consumo (CARVALHO, 2014; GUTKOSKI et al., 2007). Além de serem diversificados na composição podendo receber alegação de alimento funcional pela adição de bactérias probióticas (CARDOSO et al., 2015).

O estudo realizado por Bastos, Paulo e Chiaradia (2015), avaliou a viabilidade de aplicação de *S. boulardii* e *L. acidophilus* liofilizados e microencapsulados em alginato de cálcio durante a vida de prateleira (*shelf life*) de barras de cereais. Os autores observaram que as cápsulas de alginato de cálcio apresentaram eficácia limitada na proteção *L. acidophilus*. Apesar disso, concluíram que é possível incorporar microrganismos probióticos em alimentos que não tenham origem láctea. Em estudo associado, os mesmos pesquisadores avaliaram as implicações da presença desses probióticos microencapsulados nas barras de cereais em relação ao consumidor. Concluindo que essa técnica não interfere na qualidade sensorial do produto, tendo aceitabilidade satisfatória (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2014).

Diferindo dos resultados apresentados por Bastos, Paulo e Chiaradia (2015), no presente estudo foi evidenciado estatisticamente decréscimo na viabilidade das bactérias que foram adicionadas nas barras alimentícias na forma de células livres se comparadas com as encapsuladas e revestidas com quitosana. Isso pode ter ocorrido graças ao revestimento com o gel de quitosana que pode proporcionar maior efeito protetor das bactérias, uma vez que as cápsulas formadas apenas pelo alginato são porosas em sua superfície favorecendo interações entre os microrganismos e o meio em que foram adicionados (CHÁVARRI et al., 2010).

Ouwehand, Kurvinen e Rissanen (2004) estudaram o potencial de aplicação de *B. lactis* liofilizados em uma barra de cereais à base de aveia, avaliando a presença dessa bactéria nas fezes de indivíduos saudáveis que consumiram estas barras e então compararam com estudos em que os probióticos foram incorporados em derivados lácteos. Os autores ressaltam que existem diferenças nas metodologias para identificação das bactérias, nos limites de detecção e precisão, além das doses e tempo de administração dos probióticos. Apesar disso, os resultados foram semelhantes nesses estudos. Os autores concluem que os alimentos secos de origem

não-láctea também oferecem um meio favorável à administração de probióticos, ampliando o uso e a aplicação dos mesmos em alimentos.

As cepas probióticas *L. acidophilus* e *B. animalis* subsp. *lactis* liofilizadas e encapsuladas por *spray chilling* foram adicionadas em barras de cereais salgados e avaliadas em estudo realizado por Bampi et al. (2016), os autores identificaram que as bactérias encapsuladas estiveram ativas por pelo menos 90 dias, já aquelas que foram adicionadas na forma livre não apresentaram viabilidade após 30 dias de armazenamento. Os autores identificaram que a metodologia utilizada para encapsulação apresentou melhor viabilidade se comparada a outras técnicas para introdução dessas bactérias em alimentos, além de apresentar resultados satisfatórios no aspecto sensorial do produto.

No presente estudo as barras alimentícias foram armazenadas à temperatura ambiente, não receberam conservantes químicos e apresentaram crescimento fúngico após o 21º dia de experimento. O mesmo ocorreu no estudo realizado por Bampi et al. (2016), ainda que os pesquisadores tenham feito aplicação de propionato de cálcio como agente antifúngico, foi evidenciado crescimento fúngico no 30º dia de análise. Como forma de contornar esse problema os autores realizaram um segundo experimento com adição do conservante e armazenamento refrigerado a 4 °C, onde as barras permaneceram isentas de crescimento fúngico por 120 dias.

A presença desses microrganismos no produto pode ser explicada pela quantidade elevada de nutrientes presentes, principalmente os carboidratos (59,12%), que favorecem o crescimento fúngico pelo aumento da pressão osmótica. Por tratar-se de um produto manufaturado que pode sofrer contaminação nas etapas de mistura, embalagem e armazenamento. Além disso, a utilização das castanhas de caju e do Pará já apresenta um potencial risco de contaminação, uma vez que são produtos reconhecidos pela presença de fungos, sendo os *Aspergillus sp.* os mais frequentes (BAMPI et al., 2016; MOREIRA et al., 2016; SREBERNICH; MEIRELES; LOURENÇÃO, 2011).

O crescimento microbiano pode ter sido favorecido considerando que o produto não passou pela etapa de forneamento, uma vez que a elevada temperatura envolvida no processo poderia inviabilizar as bactérias mesmo encapsuladas. Caracterizando-se um desafio tecnológico que deve ser contornado para atender os critérios microbiológicos legais e a manutenção da viabilidade das culturas probióticas no produto (BASTOS; PAULO; CHIARADIA, 2015; CAVALHEIRO et al, 2015b). A

embalagem utilizada (filme PVC e papel alumínio) também pode favorecer a contaminação, uma vez que não continha lacre que impedisse o contato com o ar.

Um estudo realizado por Raddatz et al. (2014) avaliou a viabilidade de *L. acidophilus* encapsulado em matriz de alginato pelo método de extrusão durante simulação do trato gastrointestinal. Ao final do experimento, as bactérias apresentaram redução superior à 3,6 log UFC/g. O que difere do encontrado no atual estudo, onde a redução na contagem das células viáveis das bactérias encapsuladas foi inferior à 2 log UFC/g. É provável que essa diferença se deva ao revestimento das microcápsulas com a quitosana de origem fúngica, em que estudos indicam uma maior proteção das bactérias quando co-encapsuladas com outros agentes, como a quitosana (CHÁVARRI et al., 2010; DE PRISCO et al., 2014; LI et al., 2011; RAJAM et al., 2012).

Como visto nos estudos acima citados, e nos resultados obtidos, é possível utilizar uma matriz alimentar sólida e de origem não láctea como agente carreador de bactérias probióticas tanto na forma de células livres quanto na forma encapsulada. Existem também técnicas e diversos materiais que podem ser utilizados como encapsulantes melhorando assim a viabilidade da bactéria. Além disso, a presença de microcápsulas nas barras de cereais não impacta negativamente no aspecto sensorial do produto, como identificado por Bastos, Paulo e Chiaradia (2014) e Bampi et al. (2016).

8 CONCLUSÃO

A avaliação da qualidade das féculas de mandioca comercializadas em Recife - PE, mostrou que os produtos encontram-se dentro dos padrões legais vigentes.

Foi observado que a técnica utilizada para elaboração das microcápsulas de alginato de cálcio-quitosana apresentou eficiência superior a 80%, considerado um bom rendimento. As bactérias que foram adicionadas na barra alimentícia na forma microencapsulada apresentaram maiores contagens de células viáveis se comparadas aquelas que foram adicionadas na forma livre durante o armazenamento. As bactérias microencapsuladas expressaram maior resistência quando expostas às condições gastrointestinais simuladas.

No presente estudo foi desenvolvido um produto similar a uma barra de cereais que se apresentou como um bom veículo para os probióticos microencapsulados, gerando a possibilidade de aumentar o número de alimentos funcionais contendo probióticos que não tenham origem láctea, favorecendo uma parcela da comunidade que demanda esses produtos. Apesar disso, faz-se necessário estudos que possam aumentar a estabilidade das bactérias encapsuladas e a vida de prateleira do produto.

REFERÊNCIAS

ABREU, L. F.; MATTIETTO, R. A. Procedimentos de fabricação dos derivados de mandioca – Recomendações para obtenção de produtos seguros e de qualidade. In: MODESTO JÚNIOR, M. S. (Ed); ALVES, R. N. B. (Ed). **Cultura da mandioca: apostila**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. p. 165-182.

ALVES, C. C. et al. Utilização de *Lactobacillus acidophilus* e de acidificação direta na fabricação de queijo de minas frescal. **Arquivo Brasileiro de Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 63, n. 6, p. 1559-1566, 2011.

AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington, DC, 2001.

AMORIM, M. et al. Formulation and consumer acceptance of cereal bars with functional properties by the incorporation of peptides and β -glucans from Spent Brewer's Yeast. In: **1ST Congress on Food Structure Design**. Porto, Portugal, 2014.

AMORIM, R. V. S. et al. Alternative carbon sources from sugar cane process for submerged cultivation of *Cunninghamella bertholletiae* to produce chitosan. **Food Technology & Biotechnology**, v. 44, n. 4, 2006.

ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Jornal Vascular Brasileiro**, v. 3, n. 2, p. 145-154, 2004.

ARAUJO, G. V. et al. Probióticos no tratamento das infecções do trato respiratório superior e inferior nas crianças: revisão sistemática baseada em ensaios clínicos randomizados. **Jornal de Pediatria**, v. 91, n. 5, p. 413-427, 2015.

ASHWAR, B. A et al. Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. **Food chemistry**, v. 239, p. 287-294, 2018.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the AOAC International**. 16. ed. Arlington, 1995.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis of the AOAC International**. 17. ed. Gaithersburg, 2000.

AZEVEDO, V. V. C. et al. Quitina e quitosana: aplicações como biomateriais. **Revista eletrônica de Materiais e processos**, v. 2, n. 3, p. 27-34, 2007.

BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 56, n. 3, p. 290-299, 2010.

BAMPI, G. B. et al. Spray chilling microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and its use in the preparation of savory probiotic cereal bars. **Food and Bioprocess Technology**, v. 9, n. 8, p. 1422-1428, 2016.

BARBOSA, C. E. M. Barras de Cereais: lucre com esse mercado que cresce 20% ao ano. **Padaria Moderna**, ano 6, v. 68, n. 8, p. 16-18, agosto. 2003.

BASTOS, G. A.; PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Aceitabilidade de barra de cereais potencialmente probiótica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 113, 2014.

BASTOS, G. A.; PAULO, E. M.; CHIARADIA, A. C. N. Estabilidade de micro-organismos potencialmente probióticos em barra de cereais-efeito da técnica de incorporação. **Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 2, p. 311-317, 2015.

BERGER, J. et al. Structure and interactions in chitosan hydrogels formed by complexation or aggregation for biomedical applications. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 57, n. 1, p. 35-52, 2004.

BERGER, L. R. R. et al. Effect of corn steep liquor (CSL) and cassava wastewater (CW) on chitin and chitosan production by *Cunninghamella elegans* and their physicochemical characteristics and cytotoxicity. **Molecules**, v. 19, n. 3, p. 2771-2792, 2014.

BEZERRA, V. S. **Farinhas de mandioca seca e mista** - Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2006.

BORDERÍAS, A. J.; SÁNCHEZ-ALONSO, I.; PÉREZ-MATEOS, M. New applications of fibres in foods: addition to fishery products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 16, n. 10, p. 458-465, 2005.

BORGES, M. F.; FUKUDA, W. M. G.; ROSSETTI, A. G. Avaliação de variedades de mandioca para consumo humano. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 37, n. 11, p. 1559-1565, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. RDC – Resolução da Diretoria Colegiada. Resolução nº 12, de 02 de janeiro de 2001. **Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos**. Brasília, DF, 2001.

_____. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 2, de 7 de janeiro de 2002. **Regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde**. Diário Oficial da União, Poder Executivo, Brasília, DF, 2002.

_____. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 23, de 15 de dezembro de 2005. **Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade dos Produtos Amiláceos derivados da raiz da mandioca**. Diário Oficial da União. Brasília, 2005.

_____. Ministério da Saúde. Agência nacional de vigilância sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: **IX - lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Atualizado em julho, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 28 ago 2016.

_____. Ministério da Saúde. Comissão Nacional de Normas e Padrões para Alimentos. Resolução nº 12, de março de 1978. **Normas Técnicas Especiais**. Diário Oficial da União, Brasília, 24 de julho de 1978.

_____. Ministério da Saúde. Portaria nº 1.428, de 26 de novembro de 1993. **Regulamento técnico para inspeção sanitária de alimentos cod - 100 à 001.0001**. Brasília, DF, 1993.

_____. Projeto de lei nº 5433, de 2013. **Institui o Dia Nacional da Mandioca**. Diário da Câmara dos Deputados, 2013.

_____. SVS/MS (Secretaria de Vigilância Sanitária do Ministério da Saúde). Portaria nº 326, de 30 de julho de 1997. **Regulamento técnico sobre condições higiênico-- sanitárias e de boas práticas de fabricação para estabelecimentos produtores/industrializadores de alimentos**. Diário Oficial da União, Brasília, DF. 1997.

BRIZOLA, R.; BAMPI, G. B. Desenvolvimento de barras alimentícias com adição de farinha de banana verde. **Unoesc & Ciência-ACBS**, v. 5, n. 1, p. 63-68, 2014.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotics in milk protein microcapsules. In: SAGIS, L. M C. (Ed). **Microencapsulation and microspheres for food applications**. 1 Ed. Academic Press, 2015. p. 391-406.

CARDOSO, B. V. S. et al. Prospecção tecnológica e científica de alimentos probióticos funcionais na forma de barra de cereais. **GEINTEC-Gestão, Inovação e Tecnologias**, v. 5, n. 3, p. 2273-2283, 2015.

CARVALHO, A. V. Desenvolvimento de produtos e agregação de valor à mandioca. In: MODESTO JÚNIOR, M. S.; ALVES, R. N. B. (Eds). **Cultura da mandioca: apostila**. Belém, PA: Embrapa Amazônia Oriental, 2014. p. 183-197.

CAVALCANTE, I. M. et al. Microesferas de quitosana/pluronic® F127 por spray-drying: um novo sistema para encapsulamento da troxerrutina. In: **9º Congresso Brasileiro de Polímeros**, Campina Grande. 2007.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Alginate beads to improve viability of *Lactobacillus plantarum* to heat stress. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 6, n. 5, p. 126, 2015a.

CAVALHEIRO, C. P. et al. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciencia & Natura**, v. 37, p. 65-74, 2015b.

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

CORREIA, F. A. Ácido cianídrico em algumas variedades de mandioca. **Bragantia**, v. 7, n. 1, p. 15-22, 1947.

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

DÓSEA. R. R. et al. Qualidade microbiológica na obtenção de farinha e fécula de mandioca em unidades tradicionais e modelo. **Ciência Rural**, v.40, n.2, p.441-446, 2010.

EMBRAPA - Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária. **Iniciando um pequeno grande negócio agroindustrial: processamento da mandioca.** Embrapa Mandioca e Fruticultura. Serviço Brasileiro de Apoio às Micro e Pequenas Empresas. - Brasília: Embrapa Informação Tecnológica, 2003.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas. **Ciência & Natura**, v. 37, p. 75-86, 2015.

FAI, A. E. C. et al. Physico-chemical characteristics and functional properties of chitin and chitosan produced by *Mucor circinelloides* using yam bean as substrate. **Molecules**, v. 16, n. 8, p. 7143-7154, 2011.

FAI, A. E. C.; STAMFORD, T. C. M.; STAMFORD, T. L. M. Potencial biotecnológico de quitosana em sistemas de conservação de alimentos. **Revista iberoamericana de polímeros**, v. 9, n. 5, p. 435-451, 2008.

FAREEZ, I. M. et al. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International journal of biological macromolecules**, v. 72, p. 1419-1428, 2015.

FERREIRA FILHO, J. R. et al. **Cultivo, processamento e uso da mandioca: instruções práticas.** Cruz das Almas, Embrapa Mandioca e Fruticultura-Folderes/Folhetos/Cartilhas (INFOTECA-E), 2013.

FIALHO, J. F. et al. Avaliação de variedades de mandioca de mesa nas condições de cerrado do Distrito Federal. **Embrapa Cerrados. Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento.** Planaltina, DF, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS (FAO). **Statistics Division – FAOSTAT.** Production, crops, 2015. Disponível em: <http://faostat3.fao.org/browse/Q/QC/E>, acesso: 18 ago 2016.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION (FAO/WHO). **Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria.** 2001.

FREITAS, D. G. C.; MORETTI, R. H. Barra de cereais de elevado teor protéico e vitamínico: estabilidade enzimática e das vitaminas C e E durante armazenamento. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 56, n. 3, p. 269-274, 2006.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT-Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 39-44, 2013.

GALLINA, D. A. et al. Caracterização de leites fermentados com e sem adição de probióticos e prebióticos e avaliação da viabilidade de bactérias lácticas e probióticas durante a vida-de-prateleira. **Journal of Health Sciences**, v. 13, n. 4, 2015.

GASPAR, B. C. P.; FURTADO, S. C. Desenvolvimento de barra nutritiva à base de castanha do brasil, batata doce e linhaça dourada. **Nanbiquara**, v. 5, n. 1, 2016.

GIESE, E. C. Potencial biotecnológico de uso de micro-organismos imobilizados em gel de alginato de cálcio. **Série Tecnologia Ambiental**, CETEM/MCT, Rio de Janeiro, 2015.

GUTKOSKI, L. C. et al. Desenvolvimento de barras de cereais à base de aveia com alto teor de fibra alimentar. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 355-363, 2007.

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.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Levantamento Sistemático da Produção Agrícola (LSPA). Pesquisa Mensal de Previsão e Acompanhamento das Safras Agrícolas no Ano Civil. Abril 2017**. p. 62, 2017.

INTERNATIONAL UNION OF PURE AND APPLIED CHEMISTRY (IUPAC). **Standard Methods for the Analysis of Oils, Fats and Derivatives**. 6 ed., Pergamon Press: Oxford, 1979.

JOHNSON, J. L. et al. Taxonomy of the *Lactobacillus acidophilus* group. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 53-68, 1980.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39-48, 2002.

KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced drug delivery reviews**, v. 62, n. 1, p. 3-11, 2010.

KERCH, G. et al. Heparin-like polyelectrolyte multilayer coatings based on fungal sulfated chitosan decrease platelet adhesion due to the increased hydration and reduced stiffness. **Biomater Tissue Technol**, v. 1, 2017.

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

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT-and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 177-183, 2006.

LI, J. et al. *Lactococcus lactis* expressing food-grade β -galactosidase alleviates lactose intolerance symptoms in post-weaning Balb/c mice. **Applied microbiology and biotechnology**, v. 96, n. 6, p. 1499-1506, 2012.

LI, X. Y. et al. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 4, p. 1479-1485, 2011.

LIMA, A. C. et al. **Barra de cereal de caju**. 1ª ed, Brasília, DF. Embrapa Informação Tecnológica, 2007.

LIMA, C. P. S. et al. Presença de microrganismos indicadores de qualidade em farinha e goma de mandioca (*Manihot esculenta*, Crantz). **Revista APS**, v. 10, n. 1, p. 14-19, 2007.

LIMA, M. S. F. et al. Características Microbiológicas e Antioxidantes de um Novo Alimento Funcional Probiótico: Leite de Ovelha Fermentado por Kefir. In: **XX congresso Brasileiro de Engenharia Química. COBEQ: Florianópolis/SC**. 2014.

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

LOPES, J. C. et al. Biomassa e extração de quitina e quitosana a partir de isolados de *Cunninghamella* sp. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 38, n. 1, p. 25-34, 2017.

LUEPKE, N. P.; KEMPER, F. H. The HET-CAM test: an alternative to the Draize eye test. **Food and Chemical Toxicology**, v. 24, n. 6-7, p. 495-496, 1986.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011.

MANFRINI, R. M. et al. Síntese de β -N-acetilglicosaminídeos de arila modificados em C-6 como potenciais agentes antimicrobianos. **Química Nova**, v. 31, n. 2, p. 326-329, 2008.

MATHEWS, S. Microencapsulation of probiotics by calcium alginate and gelatin and evaluation of its survival in simulated human gastro-intestinal condition. **International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences**, v. 6, n. 4, p. 2080-2087, 2017.

MENDES, A. A. et al. Aplicação de quitosana como suporte para a imobilização de enzimas de interesse industrial. **Química Nova**, v. 34, n. 5, p. 831-840, 2011.

MENDES, H. B. et al. Prospecção tecnológica sobre probióticos oriundos de microrganismos presentes no leite humano. **Cadernos de Prospecção**, v. 8, n. 3, p. 488-494, 2015.

MENDES, N. S. R. et al. Oxidative stability of cereal bars made with fruit peels and baru nuts packaged in different types of packaging. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 33, n. 4, p. 730-736, 2013.

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

MENEZES, L. A. A.; DRUNKLER, D. A. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado por proteína de soja durante armazenamento: efeito do pré-tratamento da cultura. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 593-594, 2014.

MESQUITA, E. C. M. et al. Processamento de barras de cereais enriquecidos com ferro a partir de sementes de quiabo (*A. esculentus*). In: **VII Congresso Norte Nordeste de Pesquisa e Inovação**. Palmas, TO, 2012.

MINERVINI, F.; ANGELIS, M. Editorial: Microorganisms for Functional Food. **Frontiers in microbiology**, v. 7, 2016.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 109-122, 2006.

MORAIS, M. S. et al. Epidemiologia das doenças da parte aérea da mandioca no Município de Alagoa Nova, Paraíba. **Summa Phytopathologica**, v. 40, n. 3, p. 264-269, 2014.

MOREIRA, M. F. et al. Occurrence of fungi and aflatoxins B in nuts and products marketed the Brazilian northeastern regions. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 75, p. 01-06, 2016.

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carriers. **Marine Drugs**, v. 8, n. 2, p. 292-312, 2010.

NEVES A. C. et al. Otimização de processos de obtenção de quitosana a partir de resíduo da carcinicultura para aplicações ambientais. **Revista Brasileira de Energias Renováveis**, v. 2, p. 34-47, 2013.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, n. 2, p. 111-117, 2011.

OLIVEIRA, N. T. et al. Ácido cianídrico em tecidos de mandioca em função da idade da planta e adubação nitrogenada. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, n. 10, p. 1436-1442, 2012.

OUWEHAND, A. C.; KURVINEN, T.; RISSANEN, P. Use of a probiotic *Bifidobacterium* in a dry food matrix, an in vivo study. **International journal of food microbiology**, v. 95, n. 1, p. 103-106, 2004.

ÖZER, B. et al. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by microencapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 1, p. 22-29, 2009.

PEROBELLI, G. et al. Esferas de quitosana: produção de bases de schiff. **Blucher Chemistry Proceedings**, v. 3, n. 1, p. 402-409, 2015.

PINTO, C. P. et al. Agentes microbianos reguladores da microbiota intestinal humana e animal: uma abordagem geral. **Sitientibus - Série Ciências Biológicas**. v. 7, n. 4, p. 416-423, 2007.

PINTO, L. A. M. et al. Avaliação do efeito da secagem na viabilidade de microrganismos probióticos microencapsulados em alginato. **Revista Uningá Review**, v. 23, n. 1, p. 11-14, 2015.

POT, B. et al. Identification and classification of *Lactobacillus acidophilus*, *L. gasseri* and *L. johnsonii* strains by SDS-PAGE and rRNA-targeted oligonucleotide probe hybridization. **Journal of General Microbiology**, v. 139, n. 3, p. 513-517, 1993.

PRADO, S. P. T. et al. Contaminação por matérias estranhas e microrganismos em farináceos comercializados em Ribeirão Preto, SP. **Revista do Instituto Adolfo Lutz**, v. 64, n. 2, p. 237-244, 2005.

QIN, C. et al. Water-solubility of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate polymers**, v. 63, n. 3, p. 367-374, 2006.

RADDATZ, G. C. et al. Viabilidade gastrointestinal simulada de micropartículas com *Lactobacillus Acidophilus* obtidas por gelificação iônica. **Blucher Food Science Proceedings**, v. 1, n. 1, p. 327-328, 2014.

RAJAM, R. et al. Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 891-898, 2012.

RIBATTI, D. The chick embryo chorioallantoic membrane (CAM) assay. **Reproductive Toxicology**. v. 70, p. 97-101, 2017

RIBEIRO, K. M. et al. Comportamento de cepas distintas de *Lactobacillus acidophilus* em queijo petit-suisse. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 62, n. 4, p. 347, 2012.

RINALDI, Maria Madalena et al. Desenvolvimento, vida útil e custo de produção de barra de cereal formulada à base de baru (*Dypterix alata* Vog.). **Embrapa Cerrados-Boletim de Pesquisa e Desenvolvimento (INFOTECA-E)**, 2016.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1-11, 2010.

ROBERTS, L. M. et al. A randomised controlled trial of a probiotic 'functional food' in the management of irritable bowel syndrome. **BMC gastroenterology**, v. 13, n. 1, p. 1, 2013.

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

SANTANA, L. R. R. et al. Barras de cereais elaboradas com subprodutos de soja (*Glycine max* L. Merr.) e de feijão caupi (*Vigna unguiculata* L. Walp): aspectos nutricionais e sensoriais. **Magistra**, V. 26, n. especial III CBPH, p. 620-625. 2014.

SANTOS, H. R. et al. Teor de ácido cianídrico (HCN) como parâmetro para seleção de possíveis acessos de mandioca resistentes ao percevejo-de-renda. In: **IX Simpósio Nacional, Cerrado. II Simpósio Internacional, Savanas Tropicais**. Brasília, DF, 2008.

SANTOS, J. A. et al. Comparativo entre diferentes solubilizadores usados na produção de filmes de quitosana. **Blucher Chemical Engineering Proceedings**, v. 1, n. 2, p. 13230-13237, 2015.

SEABRA, L. M. J. et al. Fécula de mandioca e farinha de aveia como substitutos de gordura na formulação de hambúrguer de carne ovina. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 22, n. 3, p. 244-248, 2002.

SELLE, K. M.; KLAENHAMMER, T. R.; RUSSELL. *Lactobacillus acidophilus*. In: BATT, C. A.; TORTORELLO, M. L. Ed(s). **Encyclopedia of Food Microbiology**, San Diego, USA: Academic Press, 2014. p. 412-417.

SERVIÇO DE APOIO ÀS MICRO E PEQUENAS EMPRESAS (SEBRAE). **Mandiocultura: derivados da mandioca**. Salvador, BA: SEBRAE BAHIA, 2009.

SHAHIDI, F.; ARACHCHI, J. K. V.; JEON, Y. J. Food applications of chitin and chitosans. **Trends in food science & technology**, v. 10, n. 2, p. 37-51, 1999.

SILVA, G. G. C. et al. Toxicidade cianogênica em partes da planta de cultivares de mandioca cultivados em Mossoró-RN. **Revista Ceres**, v. 51, n. 293, p. 57-66, 2004.

SILVA, H. S. R. C.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. Quitosana: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 776, 2006.

SILVA, P. A. et al. Caracterização de farinhas de tapioca produzidas no estado do Pará. **Ciência Rural**, v. 43, n. 1, p. 185-191, 2013.

SILVA, T. M. et al. Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciencia & Natura**, v. 37, p. 49-55, 2015.

SILVEIRA, P. T. S. et al. Barra de cereal com farinha da casca da berinjela (*Solanum melongena*, L.): análise microbiológica, caracterização química e aceitação sensorial. **Magistra**, V. 26, n. especial III CBPH, p. 614-619. 2014.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Electronic Journal of Management, Education and Environmental Technology (REGET)**, v. 18, p. 66-75, 2014.

SIRO, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456-467, 2008.

SOARES JÚNIOR, M. S. et al. Otimização da formulação de pães de forma preparados com diferentes proporções de farinha de trigo, fécula de mandioca e okara. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 24, n. 1, p. 221-248 2006.

SOARES, N. M. et al. Obtenção e purificação de quitosana a partir de resíduos de camarão em escala piloto. **Revista Univap**, v. 10, n. 18, p. 88-92, 2003.

SOUSA, S. et al. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, v. 93, p. 90-97, 2015.

SOUZA, E. L. et al. Efficacy of a coating composed of chitosan from *Mucor circinelloides* and carvacrol to control *Aspergillus flavus* and the quality of cherry tomato fruits. **Frontiers in microbiology**, v. 6, 2015.

SREBERNICH, S. M.; MEIRELES, F.; LOURENÇÃO, G. Avaliação microbiológica de barras de cereais diet por meio de agente ligante colágeno hidrolisado e goma acácia. **Revista de Ciências Médicas**, v. 20, n. 1/2, p. 5-13 2012.

THOMAS, A. B. et al. Cassava starch edible coating incorporated with propolis on bioactive compounds in strawberries. **Ciência e Agrotecnologia**, v. 40, n. 1, p. 87-96, 2016.

TOLAIMATE, A. et al. Contribution to the preparation of chitins and chitosans with controlled physico-chemical properties. **Polymer**, v. 44, n. 26, p. 7939-7952, 2003.

VANDENPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: an update. **Jornal de Pediatria**. v. 91, n. 1, p. 6-21, 2015.

VASUDHA, S.; MISHIRA, H. H. Non dairy probiotic beverages. **International Food Research Journal**, v. 20, n. 1, p. 7-15, 2013.

VIEIRA, J. C. et al. Influência da adição de fécula de mandioca nas características do pão tipo chá. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 28, n. 1, p. 37-48, 2010.

VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

WENDLING, L. K.; WESCHENFER, S. Probióticos e alimentos lácteos fermentados-uma revisão. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v. 68, n. 395, p. 49-57, 2013.

YADAV, A. V.; BHISE, S. B. Chitosan: a potential biomaterial effective against typhoid. **Current Science**, v. 87, n.9, p.1176-1178, 2004.

YAN, X.; PETERSKI, C.; NITKA, S. Evaluation of the Hen's egg test–chorioallantoic membrane (CAM) method in prediction of the eye irritation potential formulated personal wash products. **Cutaneous and ocular toxicology**, v. 26, n. 1, p. 25-36, 2007.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. **Food Research International**, v. 71, p. 9-15, 2015.

ZOU, Q. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International journal of food science & technology**, v. 46, n. 8, p. 1672-1678, 2011.