



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

CAMILA VILELA DA SILVA SIMÕES

**COBERTURA COMESTÍVEL PROBIÓTICA EM BICAMADA DE
ALGINATO- *Lactobacillus casei* LC03 FL 170-20 - QUITOSANA:
INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE MORANGOS
(*Fragaria x ananassa Duch*).**

RECIFE (PE)

2023

CAMILA VILELA DA SILVA SIMÕES

**COBERTURA COMESTÍVEL PROBIÓTICA EM BICAMADA DE
ALGINATO- *Lactobacillus casei* LC03 FL 170-20 - QUITOSANA:
INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE MORANGOS
(*Fragaria x ananassa Duch*).**

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

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos.

Orientador: Prof. Dr. Marcos Antonio Barbosa de Lima.

Co-orientadora: Prof^o. Dra. Silvana Magalhães Salgado.

RECIFE (PE)

2023

.Catalogação de Publicação na Fonte. UFPE - Biblioteca Central

Simões, Camila Vilela da Silva.

Cobertura comestível probiótica em bicamada de alginato - Lactobacillus casei LC03 FL 170-20 - quitosana: Influência nos parâmetros de qualidade de morangos (Fragaria x ananassa Duch) / Camila Vilela da Silva Simões. - Recife, 2023.
61f.: il.

Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Nutrição, 2023.

Orientação: Marcos Antonio Barbosa de Lima.
Inclui referências.

1. Biopolímeros; 2. Filmes comestíveis; 3. Frutas; 4. Morangos; 5. Padrão de qualidade; 6. Probiótico. I. Lima, Marcos Antonio Barbosa de. II. Título.

UFPE-Biblioteca Central

CAMILA VILELA DA SILVA SIMÕES

**COBERTURA COMESTÍVEL PROBIÓTICA EM BICAMADA DE
ALGINATO- *Lactobacillus casei* LC03 FL 170-20 - QUITOSANA:
INFLUÊNCIA NOS PARÂMETROS DE QUALIDADE DE
MORANGOS (*Fragaria x ananassa* Duch).**

Dissertação aprovada em:

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Thayza Christina Montenegro Stamford
(Programa de Pós-Graduação em Nutrição-PPGN)

Profa. Pós-doc Lúcia Raquel Ramos Berguer
(Universidade Federal do Agreste de Pernambuco – UFAPE)

Prof. Dra Natália Ferrão Castelo Branco Melo
(Universidade Federal de Pernambuco – UFPE)

RECIFE (PE)

2023

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a deus pela minha vida e a oportunidade de poder dar o meu melhor em tudo que faço!

Á meus pais, Ana Cláudia e Chico, meus grandes incentivos diários nessa jornada, que sempre me estimularam a ir além dos meus objetivos. Sem vocês o apoio de vocês, nada disso seria possível. Obrigada por toda dedicação a mim nesses últimos anos.

Á minha irmã, Vitória, que sempre se mostra feliz pelas minhas conquistas e vem vibrando comigo em todas os meus ciclos. Tenho muita sorte e privilégios em ser sua irmã!

Ao meu namorado, Caio Arion, quem vem sido um grande companheiro admirável nesses últimos anos, sempre me escutando, aconselhando e confortando nos momentos em que preciso. Muita gratidão a você, meu amor.

Ao meu avô, Edvaldo, que sempre serviu de inspiração pra mim e estimulou a dar meu melhor em tudo que faço. Voinho é uma pessoa ímpar! Me sinto muito abençoada em ser sua neta e ter o privilégio de receber seus conselhos.

Á minhas grandes incentivadoras acadêmias, Thayza Stamford e Silvana Salgado, por todo empenho, paciência e por ter tornado tudo mais leve nesses últimos anos. Sou só gratidão a vocês duas.

Ao meu orientador, Marcos Antônio, por todo apoio e ajuda nessa fase! Obrigada por aceitar embarcar nessa trajetória junto comigo.

As professoras do LIKA, Mariane Cajubá e Isabella Macário, pela disponibilidade em poder me auxiliar nos experimentos e auxílio técnico.

Á minha amiga, Lúcia Raquel, que tem sido um grande exemplo e inspiração pra mim na pesquisa. Seus conselhos e sua colaboração foram essenciais!

Aos amigos do LAMAp, Alessandra, Thiego, Alberto e Gerlane, por toda ajuda, conselho e palavra amiga nesse processo.

Aos amigos do mestrado: Iasmin, Andressa, Arthur Victor, Regina e Amanda. Tenho muita sorte de ter tido vocês como turma de mestrado! A amizade de vocês são presentes que quero levar em minha vida.

Aos técnicos do CCS e do LEAAL, Mita, Camilo e seu Vivado! Obrigada pela disponibilidade e por toda a colaboração na minha pesquisa.

A professora Jenyffer Medeiros por ter disponibilizado a cepa probiótica e por todo apoio técnico concedido para a finalização do mestrado.

Aos amigos que a vida me concedeu: Wallace, Iasmin, Claudio, Mayara, Mariana Larissa, Letícia Ribeiro, Ullayne, Clarissa Barreto e Vinícius Lima. Obrigada por entenderem todas as minhas ausências nessa fase. Sinto o apoio de vocês mesmo de longe.

À Universidade Federal de Pernambuco e ao Programa de Pós-Graduação em Nutrição pela oportunidade em desenvolver essa pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa concedida nesses dois anos.

Aos membros da banca que se dispuseram a participar e trouxeram grandes sugestões para melhoria deste trabalho desde a qualificação.

Agradeço imensamente a todas as outras pessoas que não citei, mas que guardo em meu coração sua contribuição direta ou indireta para a realização da pesquisa.

RESUMO

Cada vez mais a indústria de alimentos tem desenvolvido produtos com inclusão probiótica, visto as maiores preocupações dos consumidores na ingestão de alimentos funcionais. Frutas são consideradas uma alternativa promissora para a incorporação de probióticos. Morangos são frutas de alto impacto econômico, entretanto, sua alta susceptibilidade a contaminação fúngica dificulta seu processamento e armazenamento. Assim, tem sido cada vez mais relevante o desenvolvimento de técnicas envolvendo revestimentos comestíveis em frutos de alta perecibilidade, visando o aumento de sua vida de prateleira. O trabalho objetivou avaliar a qualidade físico-química de morangos revestidos com cobertura comestível de quitosana e a incorporação de *Lactobacillus Casei* LCO3 FL 170-20 em alginato de sódio na forma livre e microencapsulada. O probiótico foi microencapsulado pela técnica de gelificação iônica e revestido em solução de quitosana de baixo peso molecular (0,5%). A microestrutura e o tamanho das partículas foram observadas por microscopia óptica e eletrônica. Foi aplicado nos morangos o revestimento comestível probiótico, sendo avaliado seus padrões de qualidade a cada 3 dias em temperatura refrigerada (7°C). A eficiência de microencapsulação das microcápsulas de alginato e alginato-quitosana foi de 90,2% e 90,7%, respectivamente. O revestimento de alginato-quitosana tornou a estrutura das micropartículas menos porosa e mais estável em comparação com as microcápsulas de alginato. Foi observada a conservação dos valores de sólidos solúveis, pH e umidade nos grupos de revestimento comestível alginato-quitosana- *L. casei* livre (RCAQL) e no grupo revestimento comestível alginato-quitosana- *L. casei* microencapsulado (RCAQM). Na evolução da cor, houve um aumento no índice de croma e ângulo de Hue, o que aponta cores mais vividas ao fruto e traz que a técnica LBL não afeta na coloração avermelhada do morango. A perda de peso dos frutos foi inferior nos grupos experimentais RCAQL e RCAQM, com 5,5% e 3,3%, respectivamente. A técnica LBL auxiliou na manutenção da qualidade do morango *Fragaria x ananassa duch*, tanto na incorporação com o probiótico livre quanto encapsulado.

Palavras-chave: Biopolímeros, Filmes comestíveis, Fruta, Morangos, Padrão de qualidade, Probiótico.

ABSTRACT

Increasingly, the food industry has been developing products with probiotic inclusion, given the greater concerns of consumers regarding the intake of functional foods. Fruits are considered a promising alternative for the incorporation of probiotics. Strawberries are fruits with a high economic impact, however, their high susceptibility to fungal contamination makes their processing and storage difficult. Thus, the development of techniques involving edible coatings on highly perishable fruits has been increasingly relevant, aiming at increasing shelf life. The objective of this work was to evaluate the physicochemical quality of strawberries with an edible coating of chitosan and the incorporation of *Lactobacillus Casei* LCO3 FL 170-20 in sodium alginate in free form and microencapsulated. The probiotic was microencapsulated by the ionic gelation technique in sodium alginate (3%) and coated in a low molecular weight chitosan solution (0,5%). The microstructure of the particles was observed by optical and electron microscopy, where it was observed that the alginate-chitosan coating made the structure of the microparticles less porous and more stable. For strawberries, the edible alginate-chitose-probiotic coating was applied, and their quality standards were evaluated every 3 days at refrigerated temperature (7°C). The microencapsulation efficiency of alginate and alginate-chitosan microcapsules was 90.2% and 90.7%, respectively. The strawberries were coated with the edible coating using the layer-by-layer (LBL) technique, using alginate and fungal chitosan (0.5%). Conservation of soluble solids, pH and moisture values was observed in the edible coating alginate-chitosan- *L. casei* free (RCAQL) and in the edible alginate-chitosan- *L. casei* microencapsulated coating (RCAQM) groups. In the color evolution, there was an increase in the chroma index and Hue angle, which indicates more vivid colors to the fruit and shows that the LBL technique did not affect the reddish color of the strawberry. Fruit weight loss was lower in the experimental groups RCAQL and RCAQM, with 5,5% and 3,3%, respectively. The LBL technique helped to maintain the quality of the strawberry *Fragaria x ananassa* duch, both in the incorporation with the free and encapsulated probiotic.

Keywords: Biopolymers, Edible films, Fruit, Strawberries, Probiotic, Quality standard.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Estrutura química da quitosana	.17
Figura 2 - Estrutura química alginato de sódio	18
Figura 3 - Esquema para os diferentes tratamentos com os revestimentos comestíveis probióticos	31
Figura 4 - Microscopia óptica das micropartículas com aumento de 10x	35
Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas com aumento de 500x.....	36
Figura 6 - Gráfico do percentual da perda de peso dos morangos do grupo controle e experimental durante o armazenamento refrigerado (7°C).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Contagem (logUFC/mL) de células viáveis antes e após a microencapsulação de <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20 e a eficiência de encapsulação	37
Tabela 2 - Contagem (log UFC/mL) de <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20 microencapsulado durante 28 dias de armazenamento refrigerado (7 °C)	39
Tabela 3 - Média dos valores dos parâmetros físico-químico dos morangos armazenados a temperatura de refrigeração (7° C) por 12 dias.	41
Tabela 4 - Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos durante o armazenamento refrigerado (7° C) nos dias 0 e 12 (final e inicial).....	43

SUMÁRIO

1.	INTRODUÇÃO.....	12
2.	REVISÃO DE LITERATURA	14
2.2	Revestimentos comestíveis a base de polissacarídeos	16
2.3	Revestimento comestível de alginato e quitosana e suas aplicações	18
2.4	Probióticos	20
3.	OBJETIVOS	25
3.1	Objetivo geral.....	25
3.2	Objetivos específicos.....	25
4.	METODOLOGIA.....	26
4.1	Materiais e Métodos.....	26
4.2	Preparo da suspensão de células bacterianas.....	26
4.3	Preparo e caracterização das microcápsulas	27
4.3.1	Técnica de gelificação iônica externa.....	27
4.3.2	Caracterização das microcápsulas.....	27
4.4	Eficiência de encapsulação probiótica do <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20.....	28
4.5	Viabilidade do <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20 microencapsulado durante armazenamento	29
4.6	Preparação da cobertura comestível.....	29
4.7	Aplicação da cobertura comestível alginato- <i>Lactobacillus casei</i> - quitosana nos morangos.....	30
4.8	Análises físico-químicas nos morangos revestidos	32
4.8.1	Umidade	32

4.8.2	pH.....	32
4.8.3	Acidez total e titulável	32
4.8.4	Sólidos solúveis	33
4.8.5	Evolução da cor	33
4.8.6	Perda de peso.....	34
5.	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
5.1	Caracterização das micropartículas probióticas.	35
5.2	Eficiência de encapsulação <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20	37
5.3	Viabilidade de <i>L. casei</i> LC03 FL 170-20 microencapsulado durante o armazenamento refrigerado.....	38
5.4	Efeito nos parâmetros físico-químicos nos morangos revestidos com a cobertura comestível probiótica	40
5.5	Evolução da cor dos morangos revestidos durante o armazenamento.....	42
5.6	Perda de peso dos morangos revestidos durante o armazenamento	44
6.	CONSIDERAÇÕES FINAIS	46
7.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	47



1. INTRODUÇÃO

Os probióticos são um grupo de microrganismos benéficos que, quando consumidos em quantidades adequadas, proporcionam benefícios ao hospedeiro (TRINDADE *et al.*, 2022). Estudos atuais trazem que os lactobacilos são probióticos capazes de prevenir vários tipos de condições, como alergias, disbiose intestinal, infecções por patógenos e, em alguns casos, doenças crônicas não transmissíveis (DCNT), como a obesidade (PONTES *et al.*, 2021), diabetes mellitus (MALLAPPA *et al.*, 2022) e dislipidemia (HENDIJANI & AKBARI 2018).

Cada vez mais a indústria de alimentos tem desenvolvido produtos com inclusão probiótica, tendo em vista a preocupação dos consumidores para ingestão de alimentos funcionais (REQUE *et al.*, 2021). Apesar dos atributos dos probióticos, o processamento de alimentos reduz o número de células viáveis, devido as condições de estresse sofridas (ZHANG *et al.*, 2021). Além disso, o ambiente ácido gástrico tem um efeito negativo na sobrevivência probiótica. Assim, foram criados sistemas carreadores de probióticos em alimentos, que incluem emulsões, microgéis e cápsulas (ZHANG *et al.*, 2021).

A microencapsulação é uma das técnicas mais promissoras para a proteção de probióticos contra condições adversas, baseada no aprisionamento dentro de uma matriz de material biopolimérico, geralmente polissacarídico, como alginato, quitosana, carboximetilcelulose e pectina (XU *et al.*, 2022). Atualmente, os métodos mais comuns de encapsulamento de probióticos são: extrusão, gelificação iônica, coacervação e pulverização (MAHMOUD *et al.*, 2020). A microencapsulação torna possível a liberação em concentrações adequadas de bactérias probióticas no intestino, além de proporcionar um proteção aos estresses gerados durante o processamento de alimentos (REQUE *et al.*, 2021).

Os probióticos foram inicialmente transportados em alimentos lácteos, uma vez que as quantidades de carboidratos, proteínas e lipídios disponíveis nesta matriz alimentar, podem melhorar a sobrevivência desses microrganismos (PONTES *et al.*, 2021). Estudos atuais relatam que microrganismos probióticos têm sido adicionados em diferentes matrizes alimentares, através da sua incorporação em revestimentos comestíveis, tornando possível sua adição em frutas (BAMBACE; ALVAREZ; MOREIRA, 2019), produtos cárneos fermentados e pescados (GOMZES *et al.*, 2018).

Apesar da grande difusão de produtos probióticos lácteos, produtos probióticos não lácteos têm chamado a atenção da indústria de alimentos devido ao crescente interesse em veganismo, bem como ao maior número de consumidores com restrições alimentares, como intolerância à lactose e alergia às proteínas do leite (BAMBACE *et al.*, 2019). Assim, frutas e hortaliças são consideradas uma alternativa promissora para a incorporação de probióticos (GUPTA & ABU- GHANNAM, 2012). Atualmente, o uso de frutas minimamente processadas como portadoras de probióticos já tem sido testada em maçãs (ALEGRE *et al.*, 2009), abacaxi (RUSSO *et al.*, 2014), mirtilos (BAMBACE *et al.*, 2019), e melão (RUSSO *et al.*, 2015).

Morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) são frutos cultivados e apreciados em variadas regiões do mundo, sendo a espécie de maior expressão econômica entre as pequenas frutas. Entretanto, são altamente perecíveis, com alta atividade fisiológica pós-colheita, tornando sua comercialização desafiadora (BARROSO, 2018). Coberturas comestíveis são amplamente estudadas em função de aumentar a vida útil de frutas (ASSIS & BRITO, 2014).

A quitosana, derivada da desacetilação da quitina, é um biopolímero com propriedades antimicrobianas, bioatividade e biodegradabilidade, o que traz um potencial para emprego como revestimento comestível (JIANGLIAN & SHAOYING, 2013). Assim como a quitosana, o alginato apresenta funções que permitem a sua utilização em alimentos. Para as *biopackagings*, o alginato é um dos compostos naturais mais procurados para formação de biofilme. Isso se deve às suas características de biocompatibilidade, biodegradabilidade e perfil não tóxico (CHERMAN *et al.*, 2022).

Diante das propriedades da microencapsulação probiótica e a incorporação desses microrganismos benéficos em alimentos, a pesquisa objetiva avaliar os padrões de qualidade de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) revestidos com dupla camada de cobertura comestível (alginato + quitosana) com a incorporação de *Lactobacillus casei* livre e microencapsulado.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Morangos (*Fragaria x ananassa* Duch)

O morango é uma das frutas mais consumidas do mundo, resultando em um volume de comércio muito alto entre vários países. Fruto rico em vitaminas e minerais, é conhecido pelo seu sabor, formato incomum e atraente aparência visual (YOON *et al.*, 2020; CHIOMENTO *et al.*, 2021).

No Brasil, o morango *Fragaria X ananassa* Duch é a principal espécie cultivada entre os pequenos frutos. Segundo os últimos dados publicados da Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária, o Brasil ocupa a 17ª posição entre os maiores produtores de morango do mundo, sendo relatada uma área de 4.500 hectares (Ha), com produção maior que 200.000 toneladas anualmente de morangos (EMBRAPA, 2021).

Os principais estados brasileiros produtores de morango são Minas Gerais, Rio Grande do Sul, Paraná e São Paulo, que representam 87% de toda produção no Brasil (ANTUNES; REISSER & SCHWENGBER, 2016). Pernambuco (PE) apresenta 0,05% da produção nacional. O favorecimento da floração e frutificação é considerado ótimo em temperaturas abaixo de 15°C. Essas condições climáticas são encontradas em PE nas regiões de Cachoeirinha, Caetés, Garanhuns, Taquaritinga do Norte e Triunfo, com temperaturas mínimas abaixo de 16° C nos meses de julho a agosto (COELHO-JUNIOR, 2013).

Em relação às suas características nutricionais e funcionais, o morango é rico em ácido ascórbico, riboflavina, piridoxina, niacina e minerais (magnésio, manganês, cálcio, ferro, fósforo e potássio). Quando consumido numa refeição balanceada, devido à presença dos ácidos málico, salicílico e cítrico, promove o aumento da absorção de ferro nos vegetais, ovos e carnes. É levemente laxativo e diurético, possui quercetina, que tem a função de neutralizar radicais livres (BARKAOUI *et al.*, 2021; PANOU; KARABAGIAS & RIGANAKOS, 2020).

Cor e aroma são geralmente os principais atributos que atraem os consumidores do fruto, assim como sua textura macia e sabor atrativo. Todavia, o morango é um fruto delicado e tem uma vida pós-colheita muito curta, em razão de sua alta taxa respiratória (ADAY *et al.*, 2013). Estima-se que morango *in natura* têm um prazo de validade entre 1 e 3 dias, havendo após esse período, o crescimento de fungos produtores de micotoxinas, dificultando armazenamento, transporte e comercialização desses frutos (SALEH; ABU-DIEYEH, 2021).

A sua alta susceptibilidade a contaminação em comparação com outros tipos de frutas, ocorre principalmente devido a um baixo pH, uma elevada atividade de água, altos níveis de açúcares, elevada taxa respiratória e a presença de um epicarpo que pode ser facilmente rompido, favorecendo a proliferação de microrganismos deteriorantes, principalmente fungos (LAFARGA *et al.*, 2019).

Por esta razão, diferentes métodos são sugeridos para aumentar a vida útil dos morangos, como tratamento com água quente, embalagem em atmosfera modificada, irradiação ultravioleta (UV). No entanto, essas técnicas podem aumentar o custo de produção e também impor um efeito negativo na cor, sabor, aroma, textura da fruta e composição nutricional (KHODAEI; HAMIDI-ESFAHANI; RAHMATI, 2021). Por essa razão cada vez mais tem se investido e estudado formas de revestimento comestível pra frutos da alta perecibilidade, aumentando seu tempo de prateleira (LIU *et al.*, 2021).

2.2 Revestimentos comestíveis a base de polissacarídeos

Na indústria de alimentos, filmes sintéticos são comumente utilizados, a exemplo do o polietileno e polipropileno. Apesar da eficiência desses polímeros, razões ambientais associadas a novas tendências tecnológicas têm trazido maiores questionamentos e possibilidades mais sustentáveis para a indústria de alimentos (SANTOS; PIZATO; CORTEZ-VEGA, 2021). Mais de 90% das embalagens plásticas são acumuladas no meio ambiente, enquanto menos de 5% dos plásticos são reciclados, o que leva a um grave impacto ambiental (ESPITIA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos, os revestimentos comestíveis e biodegradáveis têm despertado grande interesse em razão da possibilidade do aumento da vida útil de frutas, pois apresentam vantagens de menor impacto ambiental e podem conferir propriedades funcionais aos alimentos (HASAN; FERRENTINO; SCAMPICCHIO, 2020). Além disso, quando produzidos com resíduos industriais, contribuem com a economia circular e preservação do meio ambiente, a citar a milhocina e os resíduos de óleos vegetais (SANTOS; PIZATO; CORTEZ-VEGA, 2021).

Essa técnica sustentável é capaz de estender a vida útil de alimentos em geral, havendo uma vasta gama de pesquisas envolvendo sua utilização em frutas e hortaliças. Os revestimentos comestíveis são capazes de proteger os alimentos da deterioração natural, retardando a perda de umidade, reduzindo a taxa de respiração, preservando os compostos voláteis e reduzindo o crescimento microbiano. Devido à sua cor e sabor neutros, polissacarídeos são os principais componentes para a formulação de revestimentos comestíveis (HASAN; FERRENTINO; SCAMPICCHIO, 2020).

Dentre as matrizes formadas por polissacarídeos, tem-se o revestimento de quitosana, classificada como segura pela Food and Drug Administration (FDA) (FORTUNATI *et al.*, 2017). Os revestimentos à base de quitosana são biocompatíveis, biodegradáveis, formadores de filme, antimicrobianos, antioxidantes e não tóxicos. As vantagens da quitosana inclui seu custo baixo e seu uso como um aditivo alimentar amplamente difundido mundialmente (TEZOTTO-ULIANA *et al.*, 2014).

A quitosana é um heteropolímero natural, amino catiônico, composto por unidades β -1,4 D-glucosamina ligadas a resíduos de N-acetilglucosamina, derivado da N-desacetilação da quitina, denominação usual para o polímero β -(1-4) 2-acetamido-2-deoxi-D-glicose (N-acetilglicosamina) (JIANG *et al.* 2021). Esse biopolímero pode ser obtido a partir da carapaça de caranguejos e cascas de camarão, oriundas de resíduos da indústria pesqueira. Existem limitações quanto a utilização desse tipo de quitosana, tais como: utilização de soluções alcalinas fortes para a desacetilação da quitina, podendo poluir o meio ambiente (AMBAYE *et al.*, 2022). A produção de quitosana com biomassa micelial de fungos é um processo fácil e viável. Além disso, não apresentam contaminação por proteínas alergênicas, diferentemente da quitosana extraída da carapaça de crustáceos, que pode apresentar alto potencial alergênico nos indivíduos (DEY *et al.*, 2021).

Com relação a sua estrutura química, a quitosana é um biopolímero do tipo polissacarídico, com estrutura molecular quimicamente similar a celulose, diferenciando-se somente nos grupos funcionais (AMBAYE *et al.*, 2022). Os grupos hidroxil (OH) estão dispostos na estrutura geral do carboidrato para a celulose e grupos amino (NH₂) para a quitosana. Além disso, a quitosana é um composto solúvel em meio ácido diluído, formando um polímero catiônico, com a protonação (adição de prótons) do grupo amino (NH₃⁺) (JIANG *et al.* 2021) (Figura 1).

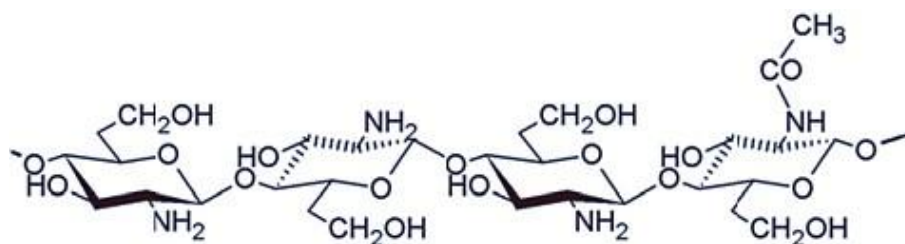


Figura 1 - Estrutura química da quitosana

Comercialmente, a quitosana encontra-se disponível em diferentes graus de pureza, peso molecular e grau de desacetilação (JIANG *et al.* 2021). Além disso, ela pode ser aplicada isoladamente ou combinada com outros biopolímeros, como amido, gelatina e alginatos, na qual possibilita uma atmosfera modificada, proporcionando maior tempo de conservação de

hortifrutículas (ZHANG *et al.*, 2021). Em uma revisão sistemática foi possível observar que o revestimento comestível com quitosana é eficaz no aumento de tempo de vida útil de frutas, tais quais: pêssego, kiwi, goiaba e morangos (KUMARIHAMI *et al.*, 2021).

A quitosana associada ao alginato pode potencializar propriedades antimicrobianas do revestimento comestível (NAIR *et al.*, 2020). Esses revestimentos têm a capacidade combinação com compostos bioativos, produzindo bioembalagens comestíveis com propriedades funcionais (NAIR; SAXENA; KAUR, 2018). A incorporação desses componentes funcionais é uma técnica promissora, influenciando de maneira positiva a comercialização e conservação de produtos alimentícios (ALKAN; YEMENICIOĞLU, 2016).

2.3 Revestimento comestível de alginato e quitosana e suas aplicações

O alginato ou ácido algínico, é um polissacarídeo natural, aniônico, não tóxico e biodegradável (NOOSHKAM; VARIDA; ALKOBEISIS, 2022). Esse polímero é constituído por duas unidades monoméricas, o ácido β -D-Maurônico e ácido α -L-Gulurônico, ligados de forma linear por ligações glicosídicas α (1,4). O ácido algínico pode ser encontrado nas paredes celulares de algas marinhas marrons, sendo observado em todas as espécies de *Phaeophyceae*. Além disso, pode ser sintetizado por bactérias como *Pseudomonas spp.* e *Azotobacter vinelandii*, como uma mucilagem extracelular, diferindo do ácido algínico presente nas algas apenas por ser mais acetilado (LOPES *et al.*, 2020; DU *et al.*, 2021).

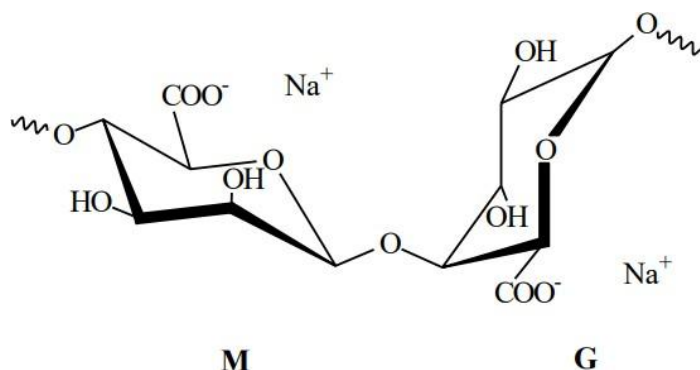


Figura 2- Estrutura química alginato de sódio

Devido à sua capacidade de formar hidrogel, o alginato é conhecido como estabilizador emulsificante desde sua descoberta em 1881, pelo químico britânico Stanford (NOOSHKAM; VARIDA; ALKOBEISIS, 2022). Após a concessão da patente de extração de alginato de algas na década de 1930, o alginato foi extraído em larga escala de algas marrons (*Phaeophyceae sp.*) como *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata*, *Laminaria japonica*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis pyrifera* (KUMAR *et al.*, 2019).

Empresas em todo o mundo, como China Seaweed Industrial Association, Degussa Texturant Systems (Alemanha), FMC Bio Polymer (EUA) e Kimitsu Chemical Industries Co. Ltda (Japão) têm extraído o alginato em grande escala (RAUS; NAWAWI; NASARUDDIN, 2021). Em razão das suas propriedades tecnológicas únicas, houve um grande interesse na exploração desse biopolímero para o desenvolvimento de produtos alimentícios funcionais, graças as suas propriedades de espessamento, gelificação e formação de biofilme (CHING; BANSAL; BHANDARI, 2018).

A propriedade de formar biofilmes com alginato traz uma alternativa sustentável para o desenvolvimento de revestimentos comestíveis (NAIR *et al.*, 2020). Esses revestimentos têm menor permeabilidade para gorduras, óleos e oxigênio, que favorece a manutenção dos compostos aromáticos e aumenta o tempo de prateleira de alimentos como frutas e vegetais (SINGH; BAISTHAKUR; YEMUL; SYNTHESIS, 2020). O desenvolvimento de revestimentos vem sendo explorado por alguns estudos (BAMBACE *et al.*, 2021; KUMAR, B. V.; VIJAYENDRA, S. V. N; REDDY, 2015).

Apesar das vantagens de utilização do alginato na formação de biofilmes funcionais, sua baixa estabilidade mecânica pode ocasionar a distorção da estrutura do arcabouço da substância revestida (NAIR *et al.*, 2020). Estudos relatam que a utilização apenas do alginato de sódio sem aditivos apresenta isolamento bacteriano deficiente, em razão da sua alta porosidade (FRAKOLAKI *et al.*, 2021; BAMBACE *et al.*, 2019).

A capacidade do alginato de gelificar após ter contato com íons divalentes, como o cloreto de cálcio, permite a associação cadeia-cadeia que constitui o chamado “modelo de caixa de ovo” entre quatro resíduos de L-glucônico. Isto causa o aprisionamento de substâncias, tornando o alginato apropriado para a microencapsulação de bactérias probióticas, reduzindo a sua porosidade para conservação da substância estudada (RATHER *et al.*, 2017).

A quitosana, por outro lado, pode proporcionar uma melhoria nas propriedades mecânicas quando associada ao alginato, ao mesmo tempo em que confere propriedades antibacterianas adicionais (NAIR *et al.*, 2020). As interações eletrostáticas entre o alginato de sódio polianiónico e quitosana policatiônica os tornam altamente biocompatíveis para a produção de filmes poliméricos estáveis. Essa interação eletrostática é causada por $-NH_3^+$ na quitosana e $-COO^-$ no alginato de sódio, formando um polímero branco e insolúvel (ARNON-RIPS; POVERENOV, 2018).

Tendo em vista as diversas aplicabilidades do alginato e quitosana em alimentos, nos tópicos seguintes serão abordados a utilização de probióticos nessa matriz alimentar, proporcionando resultados ainda mais promissores no aumento de vida útil de alimentos e na incorporação de compostos funcionais (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

2.4 Probióticos

A palavra 'probiótico' é derivada do latim 'pro' (para) e da palavra grega 'bios' (vida), portanto, significando 'para a vida'. Em 2001, a Organização Mundial da Saúde e a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (OMS/FAO) trouxeram modificações na definição de probióticos, definindo-os como "microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde dos hospedeiros" (FAO/OMS, 2002).

De acordo com a Associação Científica Internacional de Probióticos e Prebióticos (ISAPP, 2020), os probióticos devem atender critérios mínimos para serem incluídos nesta categoria, tais como: informações suficientes sobre gênero, espécie e identidade de linhagem; ser nomeado usando uma nomenclatura cientificamente aceita; propriedades benéficas e coleção internacional de cultura; saúde validadas por pelo menos um estudo em humanos (SWANSON *et al.*, 2020). Além disso, um produto contendo probióticos deve fornecer nível suficiente de microrganismos vivos para trazer um benefício de saúde até sua data de validade (PLAZA-DIAZ *et al.*, 2019).

Ao longo dos anos, foi se reconhecendo que a interação simbiótica entre os probióticos e o Homem é de natureza complexa e tem impacto na fisiologia humana (BUTEL, 2014). Por essa razão, a utilização de microrganismos vivos para manutenção da saúde tem conduzido a um interesse crescente, tanto no domínio da prevenção como no tratamento de

doenças específicas, agindo em conjunto para produzir processos e efeitos fisiológicos benéficos para ambas as partes (BUTLER; CRYAN; DINAN, 2019).

Os probióticos atuam na manutenção da integridade intestinal, através da capacidade de produção de muco, aumento da expressão de genes codificadores das proteínas de junção e a estímulo à produção de defensinas. Todas estas ações dificultam a disrupção da barreira intestinal, promovendo a sua integridade e trofismo (LANGDON *et al.*, 2016). Também são capazes de proteger o hospedeiro de agentes patogênicos por exclusão competitiva e produção de substâncias antimicrobianas (SANDERS *et al.*, 2010; LAU; CHAMBERLAIN, 2016).

A literatura também relata propriedades anticâncer aos probióticos, particularmente os lactobacilos e bifidobactérias, capazes de induzir ao aumento da apoptose das células cancerosas e produção de substâncias protetoras contra o estresse oxidativo (ORLANDO; LINSALATA; RUSSO, 2016). Essa ação anticancerosa é vista com maior frequência na redução do risco de câncer colorretal, porque esses microrganismos benéficos influenciam diretamente o intestino e a área do cólon, podendo regular a formação do tumor, com atividades antiproliferativas e apoptóticas nas células intestinais (BADGELEY *et al.*, 2020).

Efeitos metabólicos também podem ser proporcionados com a suplementação probiótica, tornando possível melhorar fatores de risco cardiovascular, como a redução do colesterol total (CT), redução do colesterol LDL (LDL) e os triglicerídeos (TAG) (GADALHA *et al.*, 2019). Durante a suplementação de probióticos, ocorrem mecanismos de menor absorção de gordura e maior excreção do colesterol nas fezes (AHN *et al.*, 2015).

Dentre os principais gêneros de bactérias com atividades funcionais comprovadas, tem-se as bactérias ácido lácticas (BAL), que já são bastante difundidas na indústria alimentícia (REQUE *et al.*, 2021). A ANVISA (2018) considera lactobacilos com atividade probiótica as espécies: *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus helveticus*, *Lactobacillus reuteri*, reconhecidos como linhagens autorizadas para a suplementação em indivíduos. Seu uso em alimentos tem sido bastante documentado na literatura, em virtude dos seus benefícios associados a saúde (GARCÍA *et al.*, 2019 ; SHAO *et al.*, 2021).

O uso de alimentos como transportadores de probióticos ajudam a proteger o probiótico das condições de estresse do TGI. Por esse motivo, a incorporação de probióticos a produtos alimentícios tem aumentado significativamente (SHIGEMATSU *et al.*, 2018). Microrganismos com atividade funcional podem ser veiculados dentro de matrizes comestíveis usadas na indústria de alimentos. O desenvolvimento de revestimentos comestíveis como veículos de probióticos destinados a embalagens de alimentos com atividade funcional se apresenta como uma tecnologia emergente (SIROLI *et al.*, 2015).

A incorporação de probióticos em matrizes poliméricas para desenvolver revestimentos com propriedades bioativas é uma medida alternativa para controlar microorganismos patogênicos e aumentar a segurança alimentar (ESPITIA *et al.*, 2016). Embora os filmes e revestimentos comestíveis com propriedades probióticas não substituam uma embalagem externa, a função protetora dos revestimentos reduz as taxas de transferência de umidade, além das propriedades antimicrobianas produzidas pelo probiótico, impactando de maneira positiva no produto (PEREIRA *et al.*, 2016a).

Revestimentos funcionais contendo compostos probióticos e prebióticos foram aplicados com sucesso em mirtilos *in natura* (BAMBACE *et al.*, 2019) maçãs minimamente processadas (MOREIRA *et al.*, 2015) para o desenvolvimento de produtos não lácteos. No entanto, não foram encontrados na literatura relatos descrevendo o impacto no processo de digestão gastrointestinal nos componentes funcionais de frutas revestidas enriquecidas com probióticos, além das suas alterações nos parâmetros de qualidade desses produtos.

2.5 Microencapsulação probiótica

A microencapsulação é um processo no qual compostos funcionais são incorporados em uma matriz encapsulante que tem como objetivo principal protegê-los da degradação por fatores de estresse ambiental, além de liberá-los em taxas controladas sob condições particulares no trato gastrointestinal (RADDATZ *et al.*, 2022). A finalidade da técnica de microencapsulação de probióticos é protegê-los do baixo pH gástrico, sais biliares e demais constituintes encontrados no trato gastrointestinal (TGI). Além disso, traz vantagens no processamento térmico realizado, tornando viável a cepa probiótica por maiores períodos (SHORI, 2017b; VIVEK *et al.*, 2011).

Uma microcápsula compreende uma membrana semipermeável ou não permeável, esférica, fina e forte envolvendo um núcleo sólido e líquido, com diâmetro muito pequeno variando entre alguns microns e 1 mm (RADDATZ *et al.*; ELVAN, 2022). Materiais de encapsulamento são geralmente reconhecidos como ingredientes seguros que podem ser usados em aplicações alimentícias. Polímeros de qualidade alimentar, como alginato, quitosana, carboximetilcelulose, goma xantana, amido, carragenina, gelatina e pectina, são largamente aplicadas usando diferentes técnicas de microencapsulação, preservando compostos bioativos (ELVAN *et al.*, 2022)

Várias técnicas de encapsulação, como secagem por pulverização, emulsificação, extrusão, eletrospray, liofilização e gelificação iônica são atualmente usadas para produzir formulações probióticas (RADDATZ *et al.*, 2022). Antes da implementação, é necessário selecionar a estratégia de encapsulamento apropriada com base nas espécies probióticas, pois diferentes espécies têm diferentes níveis de sensibilidade às condições ambientais (HASHIM *et al.*, 2022; ELVAN *et al.*, 2022). As técnicas devem consistir num processo não agressivo com a utilização de solventes não tóxicos para manter a viabilidade durante o processo de encapsulamento (ELVAN *et al.*, 2022).

O alginato é um polímero natural aplicado com sucesso na microencapsulação de bactérias probióticas (POPOVIĆ *et al.*, 2021). No entanto, para atender a muitas demandas de um encapsulamento de probióticos mais eficaz, diferentes técnicas são aplicadas para aumentar a resistência desses microrganismos sensíveis contra condições gastrointestinais, incluindo a incorporação na matriz polimérica de quitosana (POPOVIĆ *et al.*; HASHIM *et al.*, 2022). Quando o alginato de sódio contendo suspensão

de células probióticas é derramada em uma solução de cloreto de cálcio, os íons interagem entre si para formar um complexo que leva à formação das microcápsulas por gelificação iônica (SHORI, 2017; LI *et al.*, 2023).

Polímeros catiônicos como a quitosana podem formar géis com alginato de sódio (contraíons aniônicos multivalentes não tóxicos) por reticulação iônica (REQUE *et al.*, 2021; SHORI, 2017b). O revestimento de microcápsulas de alginato com quitosana tem um efeito significativo na estabilidade dos grânulos de alginato e, portanto, aumenta a taxa de sobrevivência probiótica, diminuindo a porosidade dos grânulos de alginato e reduzindo o vazamento dos probióticos encapsulados (REQUE *et al.*, 2021).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Avaliar os padrões de qualidade de morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) revestidos com cobertura comestível de quitosana fúngica comercial com a incorporação de *Lactobacillus casei* em alginato de cálcio de forma livre e microencapsulada.

3.2 Objetivos específicos

- Produzir microcápsulas probióticas de *Lactobacillus casei* em alginato de cálcio e quitosana fúngica;
- Verificar a eficiência e a viabilidade probiótica das microcápsulas de *L. casei* durante o armazenamento;
- Caracterizar estruturalmente as microcápsulas probióticas de *L. casei*;
- Desenvolver revestimentos comestíveis a base de quitosana com a incorporação de *L. casei* livre e microencapsulado;
- Aplicar revestimentos comestíveis probióticos em morangos (*Fragaria x ananassa* Duch) e realizar análises de qualidade físico-química durante o período de armazenamento.

4. METODOLOGIA

4.1 Materiais e Métodos

A quitosana fúngica utilizada foi extraída de *Aspergillus niger* não modificado geneticamente, cedida pela Chibio® (China), com grau de desacetilação de 85 ± 5 % e baixo peso molar (80 ± 10 KDa). A cepa de *Lactobacillus casei* LC03 FL 170-20 (DSM 27537, PROBIOTICAL®) foi gentilmente cedida pelo departamento de engenharia de alimentos (UFPE/Recife). As demais substâncias utilizadas foram adquiridas através de fontes comerciais.

Os morangos utilizados foram adquiridos no Centro de abastecimento e logística de Pernambuco (CEASA/PE) e transportados para o Laboratório de Microbiologia Aplicada, Centro de Ciências da Saúde, Campus Recife, onde será realizado seu processamento. Os frutos foram selecionados quanto à ausência de defeitos fisiológicos, tamanho e cor (>75% da superfície de coloração vermelha). A sépala e o pedicelo foram cortados para a lavagem e higienização foi realizada com hipoclorito de sódio(1% v/v) durante 15 minutos, com posterior lavagem com água potável (BARROSO, 2018).

4.2 Preparo da suspensão de células bacterianas

As células probióticas foram inoculadas em 9 mL de caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Oxoid, Melbourne, Austrália) e incubadas a 37°C por 24 horas sob condições anaeróbicas. Passado as 24h, as células foram centrifugadas a 6000g por 15 minuto e o pellet foi lavado duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). Por fim, as células foram suspensas em 5mL de solução salina estéril para obtenção da suspensão celular padrão. A padronização foi por leitura em densidade óptica (DO) a 660 nm da suspensão das células para 1,8 que equivale a uma contagem de células viáveis de aproximadamente 10^9 UFC/mL (LOPES *et al.*, 2020). As suspensões de células foram usadas nos ensaios como células livres ou submetidas a microencapsulação.

4.3 Preparo e caracterização das microcápsulas

4.3.1 Técnica de gelificação iônica externa

As microcápsulas foram elaboradas seguindo a metodologia de Lopes *et al.* (2020), com adaptações. Vale ressaltar que as microcápsulas foram divididas em 2 grupos: Microcápsula alginato- *L. casei* (MALG) (grupo controle) e microcápsulas alginato-*L. Casei*- quitosana fúngica (MAQF) (grupo experimental). Inicialmente, as células suspensas foram misturadas com 55 mL de solução estéril de alginato de sódio (3% p/v) por 5 minutos, em agitador magnético na velocidade 2000 rpm. Em seguida, Essas suspensões foram colocadas em um encapsulador e injetadas em uma solução de CaCl_2 0,5mol/mL e agitadas por 40 minutos e posterior repouso de 30 minutos para sedimentação. Após esse período, as microcápsulas foram filtradas com papel filtro estéril, lavadas com água destilada estéril e armazenadas com adição de água destilada estéril para que permaneçam úmidas.

Para o grupo MAQF, as microcápsulas foram adicionadas a uma solução de quitosana fúngica diluída em ácido láctico estéril (1%), ajustada em pH 5,7- 6 com hidróxido de sódio (0,1mol/L). As microcápsulas foram adicionadas a solução de quitosana, onde para cada 1g de microcápsulas foi adicionada 10mL de solução de quitosana, ficando sob agitação de 2000 rpm durante 15 minutos. Após término da agitação, as microcápsulas foram novamente filtradas, lavadas e secas em papel filtro, sendo armazenadas em tubos do tipo Falcon com água destilada esterelizada.

4.3.2 Caracterização das microcápsulas

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia óptica Leica DM 500 microscope (Leica, Heerbrugg, Switzerland) com câmera Leica ICC50 acoplada, com aumento de 10x. A microestrutura das micropartículas probióticas foram avaliadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As micropartículas (0,1g) foram liofilizadas em criotubos contendo 1mL de uma solução do crioprotetor Skimmed Milk estéril (Acumedia, EUA) na concentração de 10%. As amostras foram congeladas no mesmo dia em que foram produzidas a -80 °C por 24 h. Os criotubos foram submetidos ao processo de liofilização (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brazil) e retirados 48 horas depois. As amostras de MALG e MAQF foram embaladas a vácuo e armazenadas (LOPES *et al.*, 2020).

Para realização do MEV, as microcápsulas foram depositadas sobre uma fita adesiva comercial com revestimento duplo e fixadas a um *stub*. Em seguida, as amostras foram revestidas com ouro em um Sputter Coater (SCD 050, Bal-Tec, Wetzlar, Alemanha). Antes da secagem em ponto crítico, as amostras foram transferidas para cápsulas microporosas. As amostras foram visualizadas com um MEV (Quanta 250, Thermo FisherScientific-FEI, Waltham, MA, EUA) a uma tensão de aceleração de 15 kV (BERGER *et al.*, 2020).

4.4 Eficiência de encapsulação probiótica do *L. casei* LC03 FL 170-20

A eficiência de encapsulação (EE) foi realizada conforme proposto por Apiwattanasiri *et al.* (2022). Para isso, 1g de micropartículas probióticas (MALG, MAQF), separadamente, foram adicionadas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e agitadas com solução de citrato de sódio (1%) em agitador magnético por 10 minutos para quebra das micropartículas. Em seguida, as amostras foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril. Posteriormente, 100 µL de cada diluição foi plaqueada em duplicata sobre ágar MRS. As placas foram incubadas por 48h a 37 °C em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e submetidas à contagem do número de colônias formadas.

Os resultados foram expressos em log UFC/mL. Esta metodologia foi utilizada para todas as análises subsequentes de viabilidade de *L. casei*. A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada como segue:

$$EE = (N/N_0) \times 100.$$

Onde, N é o número de células aprisionadas e libertadas das micropartículas, e N₀ é o número de células adicionadas à solução de alginato de sódio durante a produção das micropartículas.

4.5 Viabilidade do *L. casei* LC03 FL 170-20 microencapsulado durante armazenamento

A avaliação da viabilidade de *L. casei* LC03 FL 170-20 livres e em micropartículas úmidas foram realizadas de acordo com Lopes (2020). As células livres, MALG e MAQF foram armazenadas de forma individualizada em tubos falcon contendo água destilada estéril a 7 °C e a viabilidade celular foi avaliada nos dias 0, 7, 14, 21 e 28.

Para determinar a contagem de células viáveis, foi utilizado 100 µL das células livres padronizadas (DO:1,8) em água destilada; e 1g das MALG e MAQF que foram separadas e filtradas para posterior quebra.

As micropartículas foram agitadas em agitador magnético com solução de citrato de sódio (1%) por 10 minutos para quebra das micropartículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril e a contagem de células viáveis foi realizada de acordo com metodologia descrita anteriormente, no início do tópico. Os resultados foram expressos em log UFC/mL.

4.6 Preparação da cobertura comestível

Para melhor aproveitamento e proteção dos probióticos, além do aprimoramento na conservação dos produtos desenvolvidos, foi produzido um revestimento comestível em dupla camada, conhecido como *layer-by-layer* (LBL), baseado na metodologia de Hiraet *al.* (2022), com modificações.

A cepa de *L. casei* LC03 FL 170-20 foi adicionada no revestimento comestível de forma livre e microencapsulada. No caso da cepa livre, o inóculo foi padronizado em uma concentração celular de 10^9 UFC /mL. Para isso, as células bacterianas foram centrifugadas a 6000g por 15 minutos a 4°C e o *pellet* foi lavado duas vezes com solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v). As microcápsulas probióticas seguiram a mesma metodologia de produção por gelificação iônica citadas no tópico 4.1.1, sendo subdivididas em MALG (microcápsulas alginato) e MAQF (microcápsulas alginato + quitosana fúngica).

A suspensão celular livre (100 µL) e as microcápsulas (1g) foram incorporadas, separadamente, em 50 mL de uma solução estéril (121 °C por 15 min) de alginato de sódio a 3%, previamente diluído em água destilada (p/v) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA), que irá consistir no primeiro revestimento do fruto.

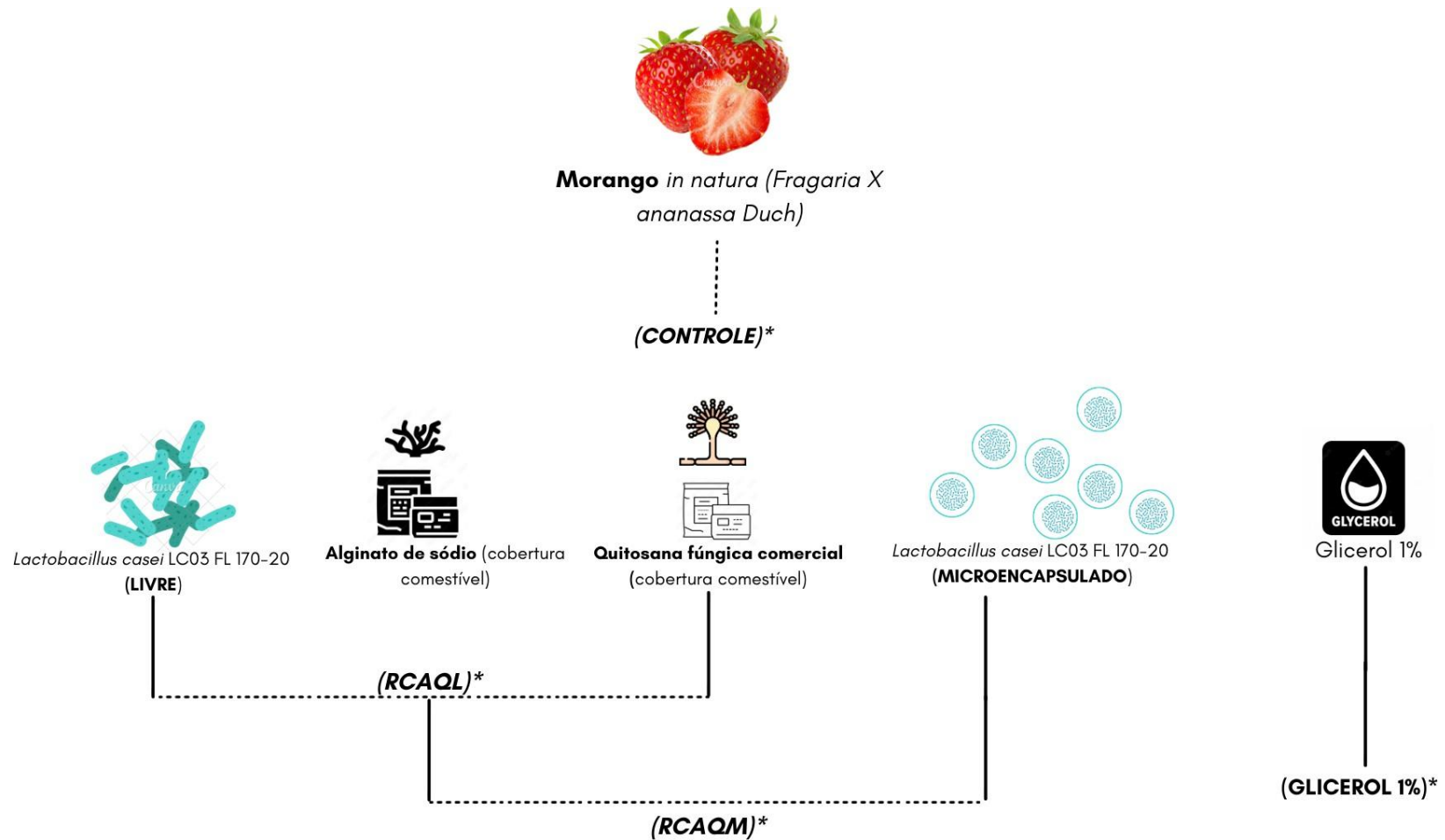
A quitosana foi diluída em ácido láctico (1%) em uma concentração de 5 mg/ml, mantida sob agitação por 12 horas. O pH final da solução foi ajustado para 6, utilizando NaOH (3%) (SHAHBAZI *et al.*, 2018). Vale ressaltar que a quitosana será a 2º camada da cobertura comestível, que seguirá a metodologia *layer-by-layer*.

4.7 Aplicação da cobertura comestível alginato-*Lactobacillus casei*-quitosana nos morangos

Para melhor aproveitamento e proteção dos probióticos, foi realizada aplicação de dupla camada de cobertura comestível nos morangos. A primeira camada consistiu na solução de alginato de sódio-*L. casei* LC03 FL 170-20, onde os morangos ficaram imersos por 3 minutos na solução e secos por 30 minutos em temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$. Vale ressaltar que o alginato de sódio foi diluído a 3% em água destilada estéril (BAMBACE *et al.*, 2019; WANG *et al.*, 2019). Para os morangos que tiveram duas camadas de revestimento, a segunda camada consistiu no gel de quitosana (5 mg/ml), em que os morangos foram imersos durante 3 minutos e deixados para secar por 30 minutos na temperatura de $25 \pm 3^{\circ}\text{C}$ (SHAHBAZI *et al.*, 2018).

Foram realizados no total 4 tratamentos. **RCAQL** : revestimento comestível alginato-quitosana e *L. casei* livre; **RCAQM**: revestimento comestível alginato-quitosana e *L. casei* microencapsulado; **Glicerol 1%**: revestimento comestível de glicerol 1%; **Controle**, em que não foi realizada aplicação de revestimento comestível nos morangos (Figura 3). Para cada grupo, foram utilizados 20 morangos, totalizando 80 morangos ao final do experimento. Os morangos foram armazenados por 12 dias sob temperatura refrigerada controlada (7°C), utilizando uma B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand).

Figura 3 - Esquema para os diferentes tratamentos com os revestimentos comestíveis probióticos.



* **RCAQL**: Morangos com revestimento comestível alginato quitosana *L. casei* livre * **RCAQM**: Morangos com revestimento comestível alginato quitosana *L. casei* microencapsulado * **Controle**: Morangos sem revestimento * **Glicerol**: Morangos revestidos com glicerol 1%.

4.8 Análises físico-químicas nos morangos revestidos

Durante o período de armazenamento, foram realizadas análises físico-químicas a cada 3 dias (0, 3, 6, 9,12) nos moragos, de acordo com normas preconizadas pela AOAC (2012). Cabe ressaltar que a análise de cor foi realizada no D0 e D14.

4.8.1 Umidade

O teor de umidade foi determinado por aquecimento dos frutos em estufa à 70° C por 24 horas até a obtenção de massa seca (Método 934.06).

4.8.2 pH

A amostra foi diluída em água destilada e o pH foi determinado por pHmetro digital da marca MICRONAL B474 (Método 981.12).

4.8.3 Acidez total e titulável

A amostra diluída em água destilada foi acrescida do indicador fenoftaleína. A acidez total titulável foi determinada por meio da titulação com solução de NaOH 0,1N, seguida da determinação do ponto de viragem em pH 8,2 utilizando um pHmetro digital (MICRONAL B474) (Método 920.149). Os resultados foram expressos em percentual de ácido cítrico.

4.8.4 Sólidos solúveis

Foram determinados por meio da leitura em refratômetro de bancada modelo MODEI laus JENA, com os resultados expressos em °Brix (Método932.12).

4.8.5 Evolução da cor

A cor dos morangos foi medida em 3 diferentes posições da fruta com o SistemaCIELab (L^* , a^* e b^*), utilizando um colorímetro (MINOLTA Co., Osaka, Japão) que calcula a cor do espectro de reflectância. O parâmetro L^* está associado à luminosidade das amostras, a coordenada cromática a^* está associada à dimensão verde-vermelho e a coordenada cromática b^* está associada à dimensão azul-amarelo. Tais valores foram utilizados para calcular o ângulo Hue ou tonalidade ($h^\circ = \arctan [b^*/a^*]$), onde 0° = vermelho-roxo; 90° = amarelo; 180° = verde-azulado e 270° = azul e o Croma ($C^* = [a^{*2} + b^{*2}]^{1/2}$), indicando a intensidade ou saturação da coloração (CONTI;MINAMI;TAVARES, 2002).

4.8.6 Perda de peso

A perda de peso foi medida durante todo o intervalo de tempo de armazenamento dos morangos e calculada de acordo com o preconizado por Meng *et al.* (2008). Os morangos serão pesados no dia da aplicação das coberturas e a cada 3 dias, seguindo o mesmo período determinado para as demais análises físico-químicas. O resultado foi calculado com a base nopercentual de perda de peso em relação ao peso inicial das frutas (peso referente ao dia da aplicação da cobertura).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização das micropartículas probióticas

As imagens de microscopia óptica mostram as micropartículas (MALG e MAQF) íntegras, esféricas e uniformes, bem como dispersas sem aglomeração (Figura 4). O revestimento de quitosana na micropartícula de alginato-quitosana (MAQF) resultou em uma estrutura menos porosa e mais estável em comparação a MALG. As microcápsulas, que foram observadas em sua forma úmida, apresentaram diâmetros em 500-800µm, o que se demonstra semelhante aos diâmetros observados na literatura (LOPES *et al.*; WANG *et al.* 2022b, TA *et al.*, 2021; TARIFA *et al.*, 2021).

Com relação a média de diâmetros das micropartículas, para MALG, foi visualizado uma média de 526µm ± 29,69 e para MAQF 795 µm ± 19. O revestimento de quitosana (MAQF) aumentou em 51% o tamanho da microcápsula, pois ocorreu a complexação de polieletrólitos de uma fina camada de quitosana nas microcápsulas, resultando numa faixa de tamanho micrométrico estimada e sem aumentos expressivos (TA *et al.*, 2021).

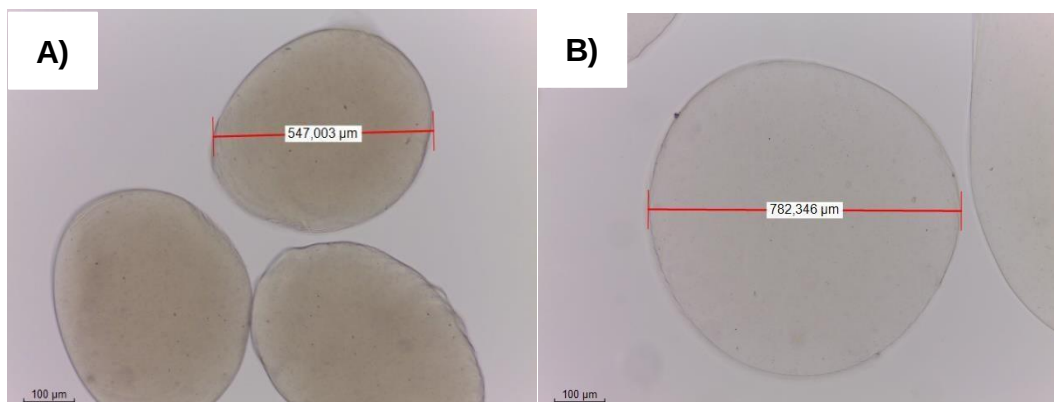
Deve-se notar que houve um maior diâmetro das partículas MAQF quando comparadas a MALG, que pode ter ocorrido enquanto as micropartículas de alginato foram agitadas na solução de quitosana fúngica para o processo de revestimento; isso pode ser atribuído às condições de pH da solução de quitosana (pH 5,6–6), que foi observado semelhantemente em Ta *et al.* (2021), em que as microcápsulas revestidas com quitosana se apresentaram com tamanhos maiores.

O revestimento de quitosana diminuiu a permeabilidade do alginato, fornecendo uma superfície uniforme e espessa, resultando em uma micropartícula mais compacta e mais densa (VAZIRI; ALEMZADEH; VOSSOUGH, 2018). Portanto, a quitosana foi capaz de cobrir as porosidades da cápsula de alginato, o que pode ter aumentado a proteção da cultura probiótica (LOPES *et al.*, 2020).

A microestrutura das microcápsulas probióticas foram observadas pela microscopia eletrônica de varredura, com as micropartículas liofilizadas conforme figura 5. As micrografias demonstram que as microcápsulas apresentaram formatos e ultraestrutura superficial diferentes. Na figura 5A, pode-se observar uma microcápsula com morfologia bacilar e com superfície muito enrugada. Por outro lado, na figura 5B observa-se uma microcápsula circular e superfície lisa.

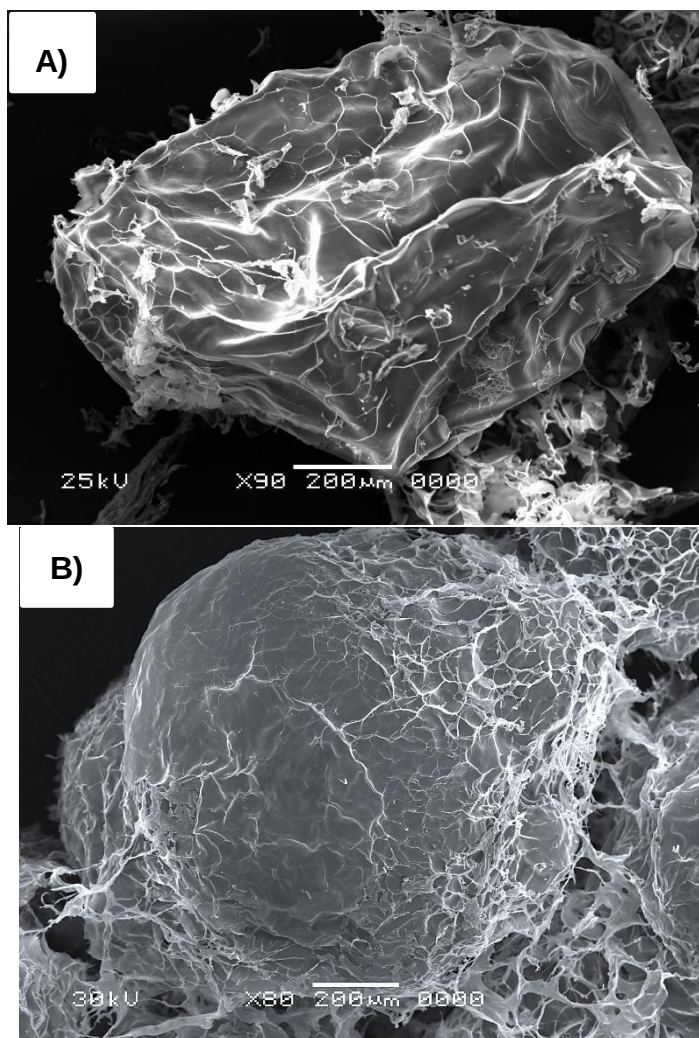
Em um estudo de Zaeim *et al.* (2020), em que foi realizado a microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* com alginato de sódio e quitosana, observou-se uma leve rugosidade da rede alginato de cálcio e probiótico, o que foi diferente quando adicionado a quitosana na rede, tornando as microcápsulas com estrutura mais lisa na superfície. Esse fato foi atribuído a uma competição entre as moléculas de quitosana e os íons Ca^{2+} para se ligarem às moléculas de alginato na solução coletora do procedimento de estágio único, igualmente visto por Lopes *et al.* (2020).

Figura 4 - Microscopia óptica das micropartículas com aumento de 10x. Sendo foto 1 (a) o grupo MALG e foto 2 (b) grupo MAQF.



Fonte: Própria autora

Figura 5 - Microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas com aumento de 500x: a) micropartículas de alginato liofilizadas (MALG) b) micropartículas de alginato revestidas de quitosana fúngica liofilizadas (MAQF).



Fonte: Própria autora

5.2 Eficiência de encapsulação *L. casei* LC03 FL 170-20

Os resultados da média de eficiência de microencapsulação probiótica foi resultante de três ensaios realizados e encontra-se na tabela 1, onde, MALG e MAQF apresentaram contagens antes do encapsulamento (probiótico livre) de 8,89 logUFC/mL. Após a encapsulação, esse resultado reduziu pra 8,02 UFC/mL (MALG) e 8,07 UFC/mL (MAQF), com reduções de células probióticas muito semelhantes.

As microcápsulas revestidas com quitosana tiveram uma redução de células probióticas muito próximas quando comparadas as microcápsulas apenas com alginato. Desta forma, a cobertura de quitosana fúngica não trouxe uma influência negativa na sobrevivência o *L. casei* LC03 FL 170-20. Para os valores médios da eficiência de microencapsulação, foi observada uma média de eficiência de 90,2% e 90,7% para MALG e MAQF, respectivamente.

Tabela 1 - Contagem (logUFC/mL) de células viáveis antes e após a microencapsulação de *L. casei* LC03 FL 170-20 e a eficiência de encapsulação

Tipos de micropartículas	<u>Contagem de células viáveis (log UFC/mL)</u>		EE%
	Nº de células iniciais	Nº de células microencapsuladas	
MALG	8,89 ($\pm 0,41$)	8,02 ($\pm 0,28$)	90,2
MAQF	8,89 ($\pm 0,41$)	8,07 ($\pm 0,21$)	90,7

MALG: micropartículas de alginato; **MAQF**: micropartículas de alginato revestida de quitosana fúngica com concentração de 0,5%; **EE%**: eficiência de microencapsulação. Os valores expressos foram calculados através da média e desvio padrão resultantes de três ensaios realizados independentes

A técnica de gelificação iônica não contribuiu para grandes perdas probióticas durante a microencapsulação. Uma revisão sistemática atual concluiu que a técnica de extrusão diminuiu a destruição celular e aumentou a eficiência do encapsulamento, porém, a formação lenta e o tamanho grande das microcápsulas não as torna viáveis para o uso na indústria alimentícia (NEZAMDOOST-SANI *et al.*, 2023).

A inclusão de compostos polissacarídicos na matriz de revestimento da encapsulação leva a uma maior eficiência de encapsulamento, segundo (WANG *et al.*, 2022a). Em geral, é possível verificar resultados benéficos na microencapsulação quando se considera uma seleção adequada da cepa probiótica, devendo ocorrer a observação dos fatores estressores que afetam a capacidade de sobrevivência dos probióticos e a seleção de um hidrogel adequado para realização do encapsulamento (TARIFA *et al.*, 2021).

Um estudo realizado com o *Lactobacillus plantarum* PTCC 1058 evidenciou que a produção de microcápsulas probióticas com alginato-quitosana-tripolifosfato de sódio contribuiu para maior eficiência de encapsulação, estimada em 97% (DEHKORDI *et al.*, 2020). Além disso, a pesquisa também trouxe que a quitosana foi capaz de prolongar a viabilidade probiótica, gerando uma microcápsula menos porosa (DEHKORDI *et al.*, 2020).

5.3 Viabilidade de *L. casei* LC03 FL 170-20 microencapsulado durante o armazenamento refrigerado

A Tabela 2 apresenta a viabilidade de *L. casei* LC03 FL 170-20 livre e microencapsulado (MALG e MAQF) durante o armazenamento refrigerado (7 °C) por 28 dias. A cepa em sua forma livre apresentou ao final de 28 dias de armazenamento uma redução de 1,65 log UFC/mL. No mesmo período, *L. casei* microencapsulado mostrou uma menor sobrevivência, com uma redução de 2,07 log UFC/mL para MALG até o fim do armazenamento. Para MAQF, houve uma redução de 1,94 log UFC/mL, notando uma viabilidade durante o armazenamento superior quando comparada MALG.

Apesar da técnica de microencapsulação ser adequada para fabricação de um sistema de nano/microcapsulação com aumento da preservabilidade e a liberação controlada de probióticos, durante o processamento, as cepas livres ficam sujeitas a fatores estressantes, como a agitação mecânica e mudanças de temperaturas durante o tratamento (VIVEK *et al.*, 2022). As microcápsulas criadas por coacervação têm excelentes propriedades de liberação controlada (retardo da taxa de liberação), que são modificadas por mudanças na força iônica, pH e temperatura (YONG *et al.*, 2020)

O revestimento de quitosana na micropartícula de alginato-quitosana (MAQF) promoveu uma maior proteção ao probiótico durante os 28 dias de armazenamento, mostrado-se positivo para o armazenamento em maiores períodos. Além disso, estudos trazem que as microcápsulas revestidas com quitosana apresentam maior eficiência de encapsulamento do que aquelas sem revestimento com quitosana, de acordo com Shori (2017) e Yong *et al.* (2020).

Um das grandes razões para melhorar a viabilidade probiótica é que o revestimento de quitosana reduz os espaços disponíveis nas porosidade das esferas de alginato e, portanto, minimiza o vazamento de células probióticas encapsuladas, contendo um maior número de bactérias aprisionadas na matriz polissacarídica (PARSANA *et al.*, 2023). Adicionando a isso, a microflora colônica degrada a quitosana e solubiliza a estrutura do gel de alginato sequestrando íons de cálcio, o que resulta na liberação das células probióticas aprisionadas no cólon (CALINOIU *et al.*, 2019).

Tabela 2 - Contagem ($\log_{10}$ UFC/mL) de *L. casei* LC03 FL 170-20 microencapsulado durante 28 dias de armazenamento refrigerado (7 °C).

AMOSTRAS	Tempo (dias)				
	0	7	14	21	28
Células livres	8,89 ($\pm 0,41$)	8,77 ($\pm 0,66$)	8,69 ($\pm 0,52$)	8,13 ($\pm 0,21$)	7,24 ($\pm 0,21$)
MALG	8,02 ($\pm 0,24$)	7,28 ($\pm 0,22$)	6,82 ($\pm 0,55$)	6,63 ($\pm 0,71$)	5,95 ($\pm 0,61$)
MAQF	7,99 ($\pm 0,21$)	7,07 ($\pm 0,31$)	6,43 ($\pm 0,19$)	6,31 ($\pm 0,14$)	6,05 ($\pm 0,40$)

MALG: micropartículas de alginato; **MAQF:** micropartículas de alginato revestidas de quitosana com concentração de 0,5%. Os valores expressos foram calculados através da média e desvio padrão resultantes de três ensaios realizados independentes.

5.4 Efeito nos parâmetros físico-químicos nos morangos revestidos com a cobertura comestível probiótica

Os resultados dos parâmetros físico-químicos dos morangos revestidos estão dispostos na tabela 3. Para os sólidos solúveis, as amostras praticamente não variaram, entretanto, o grupo controle e o grupo glicerol apresentou um aumento nos sólidos solúveis ao fim do período de armazenamento. Segundo Oregel-Zamudio *et al.* (2017), os valores de sólidos solúveis durante o amadurecimento dos morangos podem variar entre 4,6% e 11,9%. Na presente pesquisa, todos os morangos apresentaram teor de sólidos solúveis dentro da faixa recomenda acima.

Um estudo de Melo *et al.* (2020) verificou que os sólidos solúveis apresentaram um aumento significativo em morangos sem cobertura comestível (controle). Isso ocorreu porque a amostra controle continua com seu metabolismo ativo, favorecendo a conversão do amido em ácido e açúcar, o que contribuiu para o aumento do °Brix (LAGO *et al.*, 2023).

Desta forma, o revestimento comestível *layer-by-layer* do presente estudo auxiliou na redução da velocidade de amadurecimento dos frutos *in natura*. Os morangos com as coberturas comestíveis apresentaram menores valores de sólidos solúveis ao final do experimento porque a dupla camada de revestimento comestível modificou a atmosfera interna da fruta, ocasionando redução no nível de O₂ e/ou aumento no nível de CO₂, o que reduz a taxa de respiração e a atividade metabólica da fruta (LAGO *et al.*, 2023).

Para os valores de pH, houve uma tendência para a diminuição do pH das amostras em relação aos valores do início e do final do período de armazenamento. Resultado semelhante ao encontrado por Melo *et al.* (2020), em que os morangos cobertos com o revestimento comestível de quitosana tiveram redução do pH conforme o aumento do tempo de armazenamento. Segundo Tosetti *et al.* (2020), durante o amadurecimento ocorre um aumento de ácidos orgânicos, se destacando no morango o ácido cítrico e o málico.

A redução do pH ao final do armazenamento pode levar a uma redução da velocidade de escurecimento enzimático de vegetais e frutas, pois provoca uma redução na atividade enzimática de polifenoloxidase (COSTA *et al.*, 2023). Em contrapartida, para todos os grupos, houve um redução da acidez total e titulável. Esse resultado se mostrou diferente quando comparado ao estudo de Melo *et al.* (2020) e LAGO *et al.* (2023), em que foi conseguido preservar a acidez até o final do período de armazenamento.

No que tange ao percentual de umidade, os morangos recobertos com a dupla camada de cobertura comestível probiótica apresentaram maiores valores de umidade ao final do armazenamento, com valores de aproximadamente de 93%. Já os morangos controle e glicerol 1% apresentaram umidade entre 90-91% ao fim do experimento. As coberturas comestíveis *layer-by-layer* podem agir formando uma barreira entre a fruta e o ambiente externo, evitando dessa forma a perda de água durante o armazenamento em refrigeração e temperatura ambiente (OLIVEIRA-FILHO *et al.*, 2022).

Tabela 3 - Média dos valores dos parâmetros físico-químicos dos morangos armazenados a temperatura de refrigeração (7° C) por 12 dias.

Tratamentos	Dias de armazenamento			
	0	3	6	12
Sólidos solúveis (%)				
Controle	6 (±0)	6 (±0)	7 (±0,1)	7(±0)
Glicerol 1%	6 (0±)	6 (±0,5)	6 (±0)	7 (±0)
RCAQL	6 (±1)	6 (±0)	6 (±0)	6 (±1)
RCAQM	6 (±0)	6 (±0)	6 (±0)	6 (±0)
pH				
Controle	3,123 (±0,25)	3,126 (±0,02)	3,108 (±3,6)	3,032 (±0,1)
Glicerol 1%	3,241 (±0,28)	3,202 (±1,58)	3,102 (±0,02)	3,219 (±0,28)
RCAQL	3,193 (±0,01)	3,306 (±0,07)	3,205 (±0,25)	3,204 (±2,58)
RCAQM	3,275 (±2,48)	3,323 (±0,2)	3,144 (±0,38)	3,017 (±4,2)
Ac. total e titulável (% ácido cítrico)				
Controle	1,245 (± 0,07)	1,175 (±0,21)	1,03 (±1,41)	0,95 (±0,07)
Glicerol 1%	1,220 (±0,01)	1,18 (±0,01)	0,98 (±0,72)	1,06 (±1)
RCAQL	1,300 (±0,05)	1,19 (±0,09)	1,01 (±1,82)	0,91 (±0,7)
RCAQM	1,50 (±0,02)	1,27 (±0,07)	1,015 (±0,03)	1,05 (±1)
Umidade				
Controle	92,46 (±0,8)	92,19 (±2,1)	91,98 (±0,20)	91,1 (±0,18)
Glicerol 1%	91,90 (±0,07)	91,67 (±3,2)	91,35 (±0,25)	90,03 (±0,12)
RCAQL	93,30 (±1,54)	92,45 (±0,25)	92,32 (±1,78)	93,06 (±1)
RCAQM	91,82 (±0,01)	93,17 (±0,1)	93,11 (±0,24)	93,08 (±0,12)

RCAQL: revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* livre; **RCAQM:** revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* microencapsulado. Os valores expressos foram calculados através da média e desvio padrão resultantes de ensaio único realizado em duplicata.

5.5 Evolução da cor dos morangos revestidos durante o armazenamento

A coloração de frutas é uma variável de qualidade mais atrativa para o consumidor, variando entre cultivares, tratos culturais e características da região (CAIRONE *et al.*, 2020). Os parâmetros L^* , a^* e b^* representam as medidas objetivas de cor avaliadas pelo olho humano (Minolta corp, 1994).

Outros valores de cores representativos são o índice de saturação croma e ângulo de cor Hue, em que o croma (C) expressa a intensidade da cor, ou seja, a saturação em termos de pigmentos desta cor (GOISSER *et al.*, 2020; CAIRONE *et al.*, 2020). Assim, quando se admite valores próximos a zero representam cores neutras (cinzas), enquanto valores maiores, próximos de 60 expressam cores mais vívidas; já o ângulo de tonalidade ou $^{\circ}\text{Hue}$, assume valor zero para a cor vermelha, 90° para amarela, 180° para verde e 270° para azul (CAIRONE *et al.*, 2020).

À vista disso, os resultados da tabela 4 demonstram a evolução da cor no D_0 e o D_{12} (final e inicial), onde pôde-se observar um aumento do índice de croma e do ângulo de Hue, o que aponta cores mais vívidas ao fruto e traz que a dupla cobertura comestível não afetou na coloração avermelhada do morango (MELO *et al.*, 2020). Para os valores de L^* , houve um aumento nos grupos experimentais RCQAL e RCQM, trazendo cores mais vívidas aos morangos ao longo do armazenamento.

Em dois estudos de Khodaei & Hamidi-Esfahani (2019) e Kodaei & Hamidi-Esfahani (2021), realizados com morangos (*Fragária* × *ananassa*), a adição do revestimento comestível de quitosana não influenciou de maneira significativa no valor de L^* dos frutos, mantendo-se constante durante todo o período de armazenamento. Isso implicou que a superfície dos morangos não foi influenciada pelo tempo ou pela presença de revestimento com probióticos. a^* e b^* também não mudaram com os diferentes tratamentos e foram relativamente estáveis ao longo do tempo de armazenamento.

Tabela 4 - Efeito das coberturas comestíveis sobre a cor dos morangos durante o armazenamento refrigerado (7° C) nos dias 0 e 12 (final e inicial).

Tratamentos	Dias de armazenamento	
	0	12
<i>L*</i>		
Controle	33,5 (±0,7)	39 (±0,21)
Glicerol 1%	31,59 (±1,4)	36,77 (±0,85)
RCAQL	32,29 (±0,15)	38,95 (±0,03)
RCAQM	38,68 (± 0,19)	49,29 (±1,02)
<i>h*</i>		
Controle	24,15 (±0,90)	39,83 (±0,79)
Glicerol 1%	23,46 (±0,94)	39,40 (±1,39)
RCAQL	29,57 (±0,7)	31,57 (±0,07)
RCAQM	31,11 (±0,19)	40,30 (±6,1)
<i>C*</i>		
Controle	49,37 (±0,61)	80,5 (±0,85)
Glicerol 1%	46,92 (±0,88)	78,80 (±2,58)
RCAQL	59,14 (±0,7)	63,15 (±0,15)
RCAQM	62,22 (0,58)	80,61 (±4,2)

RCAQL: revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* livre; **RCAQM:** revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* microencapsulado. Os valores expressos foram calculados através da média e desvio padrão resultantes de ensaio único realizado em triplicata.

5.6 Perda de peso dos morangos revestidos durante o armazenamento

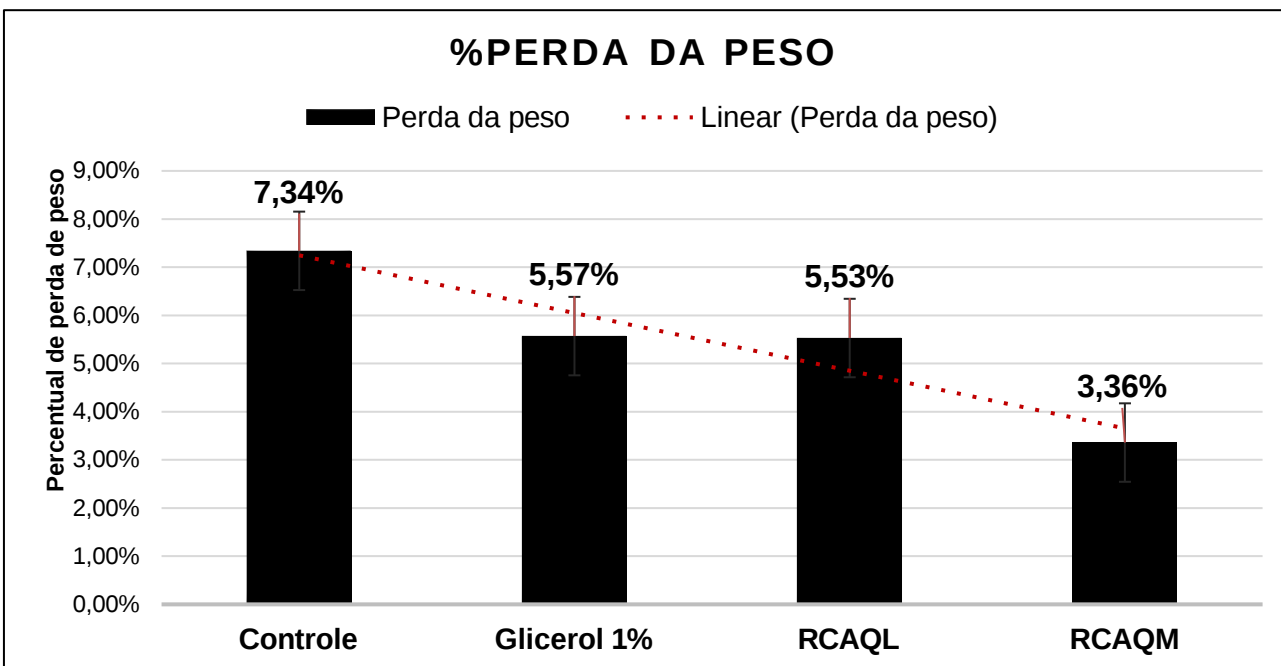
Na Figura 6 foi possível observar que o grupo controle e glicerol (1%) apresentou perda de peso superior aos grupos RCAQL e RCAQM, sendo de 5,53% para RCAQL e 3,36% para RCAQM. As perdas de massa maiores que 6% são suficientes para causar prejuízos na qualidade de morangos (GARCIA *et al.*, 1998). SALEEM *et al.* (2021) observou que houve uma maior conservação do peso dos frutos quando utilizada a cobertura de quitosana e demonstrou que a cobertura comestível combinada com alginato foi significativamente eficiente em suprimir a perda de peso dos morangos durante armazenamento a temperatura ambiente e refrigerada.

Naturalmente, morangos perdem peso após a colheita, durante seu transporte, manipulação e armazenamento. Os processos responsáveis por essa perda de massa são a transpiração e a respiração dos frutos (SALEEM *et al.*, 2021; NGUYEN *et al.*, 2020). A perda de peso reflete em sua textura, provocando amolecimento, fazendo com que a superfície do fruto fique rugosa, afetando de forma negativa sua vida útil e nos aspectos sensoriais do morango (NGUYEN *et al.*, 2020; QUINTANA *et al.*, 2021).

Os revestimentos comestíveis, como a quitosana, atuam como barreira, formando uma camada semipermeável na superfície do fruto, reduzindo as perdas por transpiração (QUINTANA *et al.*, 2021). Foi comprovado que o tratamento com revestimento de quitosana atua como uma barreira contra a perda de peso em frutas, sendo observado em várias frutas: mamão (GONZÁLEZ-AGUILAR *et al.*, 2019), pêra (MENG *et al.*, 2010), morango (QUINTANA *et al.*, 2021) e e goiaba (AZAM *et al.*, 2020).

De acordo com Melo *et al.* (2020), a quitosana é capaz de diminuir a perda de peso em frutas devido a sua propriedade filmogênica, na qual esse polímero age como uma barreira ao vapor de água e as trocas gasosas entre a fruta e o ambiente externo, reduzindo também a taxa de respiração do morangos e conservando seus atributos sensoriais.

Figura 6 - Gráfico do percentual da perda de peso dos morangos do grupo controle e experimental durante o armazenamento refrigerado (7°C).



RCAQL: revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* livre; **RCAQM:** revestimento comestível alginato-quitosana-*L. casei* microencapsulado. Os valores expressos foram calculados através da média e desvio padrão resultantes de ensaio único realizado em triplicata.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

- As microcápsulas de alginato *L. casei* LC03 FL 170-20 apresentaram morfologia uniforme e com redução da porosidade quando adicionada a camada de quitosana fúngica a 0,5%;
- As microcápsulas *L. casei* LC03 FL 170-20 produzidas por gelificação iônica contendo alginato e quitosana fúngica promoveram maior proteção probiótica durante o armazenamento, tornando-as viáveis para adição em alimentos;
- O revestimento comestível probiótico de alginato-quitosana com adição probiótica na forma livre e microencapsulada auxiliou na manutenção da qualidade do morango *Fragaria x ananassa duch*;
- Testes com contaminantes fúngicos poderiam trazer resultados pertinentes sobre os efeitos de microrganismos no morango, possibilitando uma visão da preservação dos padrões de qualidade do fruto.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADAY, Mehmet Seçkin *et al.* An innovative technique for extending shelf life of strawberry: Ultrasound. **LWT-Food Science and Technology**, v. 52, n. 2, p. 93-101, 2013.

AHN, H. Y. *et al.* Supplementation with two probiotic strains, *Lactobacillus curvatus* HY7601 and *Lactobacillus plantarum* KY1032, reduces fasting triglycerides and enhances apolipoprotein AV levels in non-diabetic subjects with hypertriglyceridemia. **Atherosclerosis**, v. 241, n. 2, p. 649-656, 2015.

ALEGRE, I.; VIÑAS, I.; USALL, J.; ANGUERA, M.; & ABADIAS, M. Microbiological and Potential application of natural phenolic antimicrobials and edible film against bacterial plant pathogens. **Food Hydrocolloids**, v. 55, p. 1-10, 2016.

ÁLVAREZ, A. *et al.* Use of an exopolysaccharide-based edible coating and lactic acid bacteria with antifungal activity to preserve the postharvest quality of cherry tomato. **LWT**, v. 151, p. 112225, 2021.

AMBAYE, T. G. *et al.* Preparation and applications of chitosan and cellulose composite materials. **Journal of Environmental Management**, v. 301, p. 113850, 2022.

ANTUNES, LEC; REISSER JUNIOR, C.; BONOW, S. Morango: produção aumenta ano a ano. **Embrapa Clima Temperado-Artigo em periódico indexado (ALICE)**, 2021.

APIWATTANASIRI, P. *et al.* Co-encapsulation efficiency of silk sericin-alginate-prebiotics and the effectiveness of silk sericin coating layer on the survival of probiotic *Lactobacillus casei*. **Food Bioscience**, v. 46, p. 101576, 2022.

ARNON-RIPS, H.; POVERENOV, E. Improving food products' quality and storability by using Layer by Layer edible coatings. **Trends in Food Science & Technology**, v. 75, p. 81-92, 2018.

ASSIS, O. B. G.; & BRITTO, D. D. Revisão: Coberturas comestíveis protetoras em frutas: fundamentos e aplicações. **Bra. Journal of Food Technology**, v. 17, n. 2, p. 87-97, 2014.

Association of Official Analytical Chemists International (AOAC), 2012. **Official methods of analysis, of AOAC international**. Method 932.12, Method 920.149, Method 981.12, Method 934.06, Method 932.09.

AZAM, M. *et al.* Postharvest ascorbic acid application maintained physiological and antioxidant responses of Guava (*Psidium guajava* L.) at ambient storage. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 748-754, 2020.

AZEREDO, H. M. C.; BRITTO, D. De; ASSIS, Odílio BG. Chitosan edible films and coatings-a review. **Embrapa Agroindústria Tropical-Capítulo em livro científico (ALICE)**, 2011.

BADGELEY, A. *et al.* Effect of probiotics and gut microbiota on anti-cancer drugs: Mechanistic perspectives. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Reviews on Cancer**, p. 188494, 2020.

BAMBACE, M. F.; ALVAREZ, M. V.; & DEL ROSARIO MOREIRA, M. Novel functional blueberries: Fructo-oligosaccharides and probiotic lactobacilli incorporated into alginate edible coatings. **Food Research International**, v. 122, p. 653-660, 2019.

BARKAOUI, S. *et al.* E-beam irradiation of strawberries: Investigation of microbiological, physicochemical, sensory acceptance properties and bioactive content. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 73, p. 102769, 2021.

BARROSO, D. L. B. **Mercado e rendibilidade da cultura do morango**. Tese de Doutorado, Universidade de Lisboa, 2018.

BERISTAIN-BAUZA, S. *et al.* Antimicrobial activity of whey protein films supplemented with *Lactobacillus sakei* cell-free supernatant on fresh beef. **Food microbiology**, v. 62, p. 207-211, 2017.

BERGER, Lucia Raquel Ramos *et al.* Agroindustrial waste as ecofriendly and low-cost alternative to production of chitosan from Mucorales fungi and antagonist effect against *Fusarium solani* (Mart.) Sacco and *Scytalidium lignicola* Pesante. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 161, p. 101-108, 2020.

BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et maladies infectieuses**, v. 44, n. 1, p. 1-8, 2014.

BUTLER, M. I.; CRYAN, J. F.; DINAN, T. G. Man and the microbiome: a new theory of everything?. **Annual review of clinical psychology**, v. 15, p. 371-398, 2019.

CAIRONE, F. *et al.* Reflectance colorimetry: A mirror for food quality A mini review. **European Food Research and Technology**, v. 246, n. 2, p. 259-272, 2020.

CALINOIU, Lavinia-Florina *et al.* Chitosan coating applications in probiotic microencapsulation. **Coatings**, v. 9, n. 3, p. 194, 2019.

CAZÓN, Patricia *et al.* Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. **Food Hydrocolloids**, v. 68, p. 136-148, 2017.

CHEN, H. *et al.* Application of protein-based films and coatings for food packaging: A Review. **Polymers**, v. 11, n. 2039, p. 1-32, 2019.

CHING, Su Hung; BANSAL, Nidhi; BHANDARI, Bhesh. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133-1152, 2017.

CHIOMENTO, J. L. T. *et al.* Horticultural potential of nine strawberry cultivars by greenhouse production in Brazil: A view through multivariate analysis. **Scientia Horticulturae**, v. 279, p. 109738, 2021.

CONTI, J. H.; MINAMI, K.; TAVARES, F. C. A. Produção e qualidade de frutos de diferentes cultivares de morangueiro em ensaios conduzidos em Atibaia e Piracicaba. **Hortic. bras.**, Brasília, v. 20, n. 1, mar. 2002.

COSTA, B. P. *et al.* Bioactive coatings from non-conventional loquat (*Eriobotrya japonica* Lindl.) seed starch to extend strawberries shelf-life: An antioxidant packaging. **Progress in Organic Coatings**, v. 175, p. 107320, 2023.

DE OLIVEIRA FILHO, J. G. *et al.* Bio-nanocomposite edible coatings based on arrowroot starch/cellulose nanocrystals/carnauba wax nanoemulsion containing essential oils to preserve quality and improve shelf life of strawberry. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 219, p. 812-823, 2022.

DEHKORDI, S. S. *et al.* Optimization of alginate-whey protein isolate microcapsules for survivability and release behavior of probiotic bacteria. **Applied biochemistry and biotechnology**, v. 190, p. 182-196, 2020.

DENG, Z. *et al.* Carboxymethylpachymaran/alginate gel entrapping of natural pollen capsules for the encapsulation, protection and delivery of probiotics with enhanced viability. **Food Hydrocolloids**, p. 106855, 2021.

DEY, D. *et al.* Physical, antifungal, and biodegradable properties of cellulose nanocrystals and chitosan nanoparticles for food packaging application. **Materials Today: Proceedings**, v. 38, p. 860-869, 2021.

DOS SANTOS, B. M. M.; PIZATO, S.; CORTEZ-VEGA, W. R. Filmes e revestimentos naturais comestíveis aplicados em alimentos: uma revisão bibliográfica Natural edible films and coatings applied in food: a bibliographic review Películas y recubrimientos comestibles naturales aplicados en alimentos: una revisión bibliográfica. **Research, Society and Development**, v. 9, n. 9, p. e578997613, 2020.

DU, Yuhang *et al.* Fabrication of novel self-healing edible coating for fruits preservation and its performance maintenance mechanism. **Food Chemistry**, v. 351, p. 129284, 2021.

ELVAN, Menşure; BAYSAL, Ayşe Handan; HARSA, Sebnem. Microencapsulation of a potential probiotic *Lactiplantibacillus pentosus* and its impregnation onto table olives. **LWT**, v. 156, p. 112975, 2022.

ESLAMI, M.; BAHAR, A.; KEIKHA, M.; KARBALAEI, M.; KOBLYIAK, N. M.; & YOUSEFI, ESPITIA, P. J. P. *et al.* Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. **Food Research International**, v. 90, p. 42-52, 2016.

ESTER, B. *et al.* Probiotic survival and in vitro digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix. **LWT**, v. 111, p. 883-888, 2019.

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

FARIAS, T. G. S.; LADISLAU, H. F. L.; STAMFORD, T. C. M.; MEDEIROS, J. A. C.; FORTUNATI, E. *et al.* Effective postharvest preservation of kiwifruit and romaine lettuce with a chitosan hydrochloride coating. **Coatings**, v. 7, n. 11, p. 196, 2017.

FRAKOLAKI, Georgia *et al.* Effect of various encapsulating agents on the beads' morphology and the viability of cells during BB-12 encapsulation through extrusion. **Journal of Food Engineering**, v. 294, p. 110423, 2021.

GALLO, M. *et al.* Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional startercultures. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 9, p. 2092- 2100, 2014.

GARCÍA, E. A. *et al.* New insights into the molecular effects and probiotic properties of *Lactobacillus pentosus* to edible oils. **LWT**, v. 109, p. 153-162, 2019.

GARCÍA, J. M.; MEDINA, R. J.; OLÍAS, J. M. Quality of strawberries automatically packed in different plastic films. **Journal of Food Science**, v. 63, n. 6, p. 1037-1041, 1998.

GOISSER, Simon *et al.* Comparison of colorimeter and different portable food-scanners for non-destructive prediction of lycopene content in tomato fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 167, p. 111232, 2020.

GOL, N.B.; PATEL, P.R.; RAO, R. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan. **Postharvest Biology and Technology**, v. 85, p. 185-195, 2013.

GÓMEZ, Belén *et al.* Microencapsulation of antioxidant compounds through innovative technologies and its specific application in meat processing. **Trends in Food Science &**

Technology, v. 82, p. 135-147, 2018.

GONZÁLEZ-AGUILAR, G. A. *et al.* Effect of chitosan coating in preventing deterioration and preserving the quality of fresh-cut papaya 'Maradol'. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 89, n. 1, p. 15-23, 2019.

GUARNER, F. *et al.* World gastroenterology organisation global guidelines: probiotics and prebiotics 2011. **J. of Clin gastroenterology**, v. 46, n. 6, p. 468-481, 2017.

GUPTA, SHILPI; ABU-GHANNAM, NISSREEN. Probiotic fermentation of plant based products: possibilities and opportunities. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 52, n. 2, p. 183-199, 2012.

HASAN, K. S. M.; FERRENTINO, G.; SCAMPICCHIO, M. Nanoemulsion as advanced edible coatings to preserve the quality of fresh-cut fruits and vegetables: A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 55, p. 1 - 10, 2020.

HASHIM, A. F.; ABD-RABOU, A. A.; EL-SAYED, H. S. Functional nanoemulsion and nanocomposite microparticles as an anticololectal cancer and antimicrobial agent: applied in yogurt. **Biomass Conversion and Biorefinery**, p. 1-17, 2022.

HENDIJANI, F.; AKBARI, V. Probiotic supplementation for management of cardiovascular risk factors in adults with type II diabetes: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Nutrition**, v. 37, n. 2, p. 532-541, 2018.

HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P. *et al.* Effect of chitosan coating combined with postharvest calcium treatment on strawberry (*Fragaria* × *ananassa*) quality during refrigerated storage. **Food chemistry**, v. 110, n. 2, p. 428-435, 2008.

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

HIRA, N. *et al.* The effect of layer-by-layer edible coating on the shelf life and transcriptome of 'Kosui' Japanese pear fruit. **Postharvest Biology and Technology**, v. 185, p. 111787, 2022.

JIANG, Y. *et al.* Electrostatic spraying of chitosan coating with different deacetylation degree for strawberry preservation. **International journal of biological macromolecules**, v. 139, p. 1232-1238, 2019.

JIANGLIAN, D.; SHAOYING, Z. Application of chitosan-based coating in fruit and vegetable preservation: a review. **Journal Food Technology**, v. 4, n. 5, p. 227, 2013.

JÚNIOR, J. M. C. *et al.* ZONING OF CLIMATE FITNESS OF STRAWBERRY CROPS IN PERNAMBUCO STATE-BRAZIL. **Revista de Geografia (Recife)**, v. 33, n. 3, 2016.

JUNG, J. H. *et al.* Multifunctional properties of *Lactobacillus plantarum* strains WiKim83 and WiKim87 as a starter culture for fermented food. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 8, p. 2505-2516, 2019.

KHODAEI, D.; HAMIDI-ESFAHANI, Z. Influence of bioactive edible coatings loaded with *Lactobacillus plantarum* on physicochemical properties of fresh strawberries. **Postharvest Biology and Technology**, v. 156, p. 110944, 2019.

KHODAEI, D.; HAMIDI-ESFAHANI, Z.; RAHMATI, Edris. Effect of edible coatings on the shelf-life of fresh strawberries: A comparative study using TOPSIS-Shannon entropy method. **NFS Journal**, v. 23, p. 17-23, 2021.

KUMAR, B. V.; VIJAYENDRA, S. V. N; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products-a review. **Journal of food science and technology**, v. 52, n. 10, p. 6112-6124, 2015.

KUMARIHAMI, H. M. C. *et al.* Application of chitosan as edible coating to enhance storability and fruit quality of Kiwifruit: A Review. **Scientia Horticulturae**, v. 292, p. 110647, 2021.

LAFARGA, T.; COLÁS-MEDÀ, P.; ABADÍAS, M.; AGUILÓ-AGUAYO, I.; BOBO, G.; LAGO, Rafael Carvalho *et al.* Effect of coating with co-product-based bionanocomposites on the quality of strawberries under refrigerated storage. **Scientia Horticulturae**, v. 309, p. 111668, 2023.

LANGDON, A.; CROOK, N.; DANTAS, G. The effects of antibiotics on the microbiome throughout development and alternative approaches for therapeutic modulation. **Genome medicine**, v. 8, n. 1, p. 1-16, 2016.

LAU, CHRISTINE S. M.; CHAMBERLAIN, R. S. Probiotics are effective at preventing Clostridium difficile-associated diarrhea: a systematic review and meta- analysis. **International journal of general medicine**, v. 9, p. 27, 2016.

LI, P.; GU, Q.; ZHOU, Q. Complete genome sequence of Lactobacillus plantarum LZ206, a potential probiotic strain with antimicrobial activity against food-borne pathogenic microorganisms. **Journal of biotechnology**, v. 238, p. 52-55, 2016.

LI, Q. *et al.* Improving probiotic (Lactobacillus casei) viability by encapsulation in alginate-based microgels: Impact of polymeric and colloidal fillers. **Food Hydrocolloids**, v. 134, p. 108028, 2023.

LIEU, M. D.; DANG, T. K. T. Improvement of shelf-life of mangoes by chitosan coating enriched with cinnamon oil dissolved in Tween 80 combined with ethanol. **Food Bioscience**, p. 101341, 2021.

LIN, CHUAN-SHENG *et al.* Impact of the gut microbiota, prebiotics, and probiotics on human health and disease. **Biomedical journal**, v. 37, n. 5, 2014.

LIU, C. *et al.* Effects of hydroxyethyl cellulose and sodium alginate edible coating containing asparagus waste extract on postharvest quality of strawberry fruit. **LWT**, p. 111770, 2021.

LOPES, L. A. A. *et al.* Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 135, p. 109295, 2020.

MAHMOUD, M. *et al.* Survivability of alginate-microencapsulated Lactobacillus plantarum during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v. 6, n. 3, p. e03541, 2020.

MALLAPPA, R. H. *et al.* Role of probiotics in the prevention and management of diabetes and obesity. In: **Probiotics in the Prevention and Management of Human Diseases**. Academic Press, 2022. p. 321-336.

MELO, N. F. C. B. *et al.* In vivo and in vitro antifungal effect of fungal chitosan nanocomposite edible coating against strawberry phytopathogenic fungi. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 55, n. 11, p. 3381-3391, 2020.

MENG, X.; LI, B.; LIU, J.; TIAN, S. Physiological responses and quality attributes of table grapes fruit to chitosan preharvest spray and postharvest coating during storage. **Food Chem.**, v. 106, p. 501-508, 2008.

MENG, X. *et al.* Effects of chitosan and oligochitosan on growth of fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. **Carbohydrate Polymers**, v. 81, n. 1, p. 70-75, 2010.

MO, R.; ZHANG, X.; YANG, Y. Effect of probiotics on lipid profiles in hypercholesterolaemic adults: A meta-analysis of randomized controlled trials. **Medicina Clínica (English Edition)**, v. 152, n. 12, p. 473-481, 2019.

MOREIRA, María R. *et al.* Preservation of fresh-cut apple quality attributes by pulsed light in combination with gellan gum-based prebiotic edible coatings. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1130-1137, 2015.

NAIR, M. S. *et al.* Enhancing the functionality of chitosan-and alginate-based active edible coatings/films for the preservation of fruits and vegetables: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

NAIR, M. S.; SAXENA, A.; KAUR, C. Characterization and antifungal activity of pomegranate peel extract and its use in polysaccharide-based edible coatings to extend the shelf-life of capsicum (*Capsicum annuum* L.). **Food and bioprocess technology**, v. 11, n. 7, p. 1317-1327, 2018.

NEZAMDOOST-SANI, N. *et al.* Alginate and derivatives hydrogels in encapsulation of probiotic bacteria: An updated review. **Food Bioscience**, p. 102433, 2023.

NGUYEN, V. T.; NGUYEN, D. H. H.; NGUYEN, H. V. Combination effects of calcium chloride and nano-chitosan on the postharvest quality of strawberry (*Fragaria x ananassa Duch.*). **Postharvest Biology and Technology**, v. 162, p. 111103, 2020.

NIKOLAOU, A. *et al.* Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. **Food chemistry**, v. 272, p. 39-48, 2019.

NOOSHKAM, M.; VARIDI, M.; ALKOBELSI, F. Bioactive food foams stabilized by licorice extract/whey protein isolate/sodium alginate ternary complexes. **Food Hydrocolloids**, v. 126, p. 107488, 2022.

OREGEL-ZAMUDIO, E. *et al.* Effect of candelilla wax edible coatings combined with biocontrol bacteria on strawberry quality during the shelf-life. **Scientia Horticulturae**, v. 214, p. 273-279, 2017.

ORLANDO, A.; LINSALATA, M.; RUSSO, F. Antiproliferative effects on colon adenocarcinoma cells induced by co-administration of vitamin K1 and Lactobacillus rhamnosus GG. **International journal of oncology**, v. 48, n. 6, p. 2629-2638, 2016.

PANOU, A. A.; KARABAGIAS, L. K.; RIGANAKOS, K. A. Effect of gamma-irradiation on sensory characteristics, physicochemical parameters, and shelf life of strawberries stored under refrigeration. **International Journal of Fruit Science**, v. 20, n. 2, p. 191-206, 2020.

PARSANA, Yash; YADAV, Manish; KUMAR, Sachin. Microencapsulation in the chitosan-coated alginate-inulin matrix of Limosilactobacillus reuteri SW23 and Lactobacillus salivarius RBL50 and their characterization. **Carbohydrate Polymer Technologies and Applications**, p. 100285, 2023.

PEREIRA, E. P. R. *et al.* Oxidative stress in probiotic Petit Suisse: Is the jabuticaba skin extract a potential option?. **Food Research International**, v. 81, p. 149-156, 2016a.

PEREIRA, J. O.; SOARES, J.; SOUSA, S.; MADUREIRA, A. R.; GOMES, A.; & PINTADO, physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain Lactobacillus rhamnosus GG. **Food Microbiology**, v. 28, n. 1, p. 59-66., 2009.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v. 10, n. suppl_1, p. S49-S66, 2019.

PONTES, K. S. *et al.* Effects of probiotics on body adiposity and cardiovascular risk markers in individuals with overweight and obesity: a systematic review and meta-analysis controlled trials. **Clinical Nutrition**, v. 40, n. 8, p. 4915-4931, 2021.

POPOVIĆ, M. *et al.* Characterization of potential probiotic strain, *L. reuteri* B2, and its microencapsulation using alginate-based biopolymers. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 423-434, 2021.

QUINTANA, S. E. *et al.* Comparison between essential oils and supercritical extracts into chitosan-based edible coatings on strawberry quality during cold storage. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 171, p. 105198, 2021.

potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. **Food Research International**, v. 123, p. 286-297, 2019.

properties of *Lactobacillus plantarum* strains WiKim83 and WiKim87 as a starter culture for fermented food. **Food science & nutrition**, v. 7, n. 8, p. 2505-2516, 2019.

RADDATZ, Greice Carine *et al.* Use of red onion (*Allium cepa* L.) residue extract in the co-microencapsulation of probiotics added to a vegan product. **Food Research International**, v. 161, p. 111854, 2022.

RAHMAN. Alginate and alginate composites for biomedical applications. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 16, n. 3, p. 280-306, 2021.

RAJOKA, M. S. R. *et al.* Anti-tumor potential of cell free culture supernatant of *Lactobacillus rhamnosus* strains isolated from human breast milk. **Food Research International**, v. 123, p. 286-297, 2019.

RAMOS-GARCÍA, M. *et al.* Use of chitosan-based edible coatings in combination with other natural compounds, to control *Rhizopus stolonifer* and *Escherichia coli* DH5 α in fresh tomatoes. **Crop Protection**, v. 38, p. 1-6, 2012.

- RATHER, S. A.; AKHTER, R.; MASOODI, F. A.; GANI, A.; WANI, S. M. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT — Food Science and Technology**, v. 83, p. 50-58, 2017.
- RAUS, RAHA AHMAD; NAWAWI, WAN MOHD FAZLI WAN; NASARUDDIN, RICCA REQUE, P. M.; BRANDELLI, A. Encapsulation of probiotics and nutraceuticals: Applications in functional food industry. **Trends in Food Science & Technology**, 2021.
- RÖßLE, C. *et al.* Evaluation of fresh cut apple enriched with probiotic bacteria. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 11, n. 1, p. 203-209, 2010.
- RUSSO, P. *et al.* Fresh-cut pineapple as a new carrier of probiotic lactic acid bacteria. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014.
- RUSSO, P. *et al.* Probiotic lactic acid bacteria for the production of multifunctional fresh-cut cantaloupe. **Food Research International**, v. 77, p. 762-772, 2015.
- DIEYEH, M. Novel *Prosopis juliflora* leaf ethanolic extract coating for extending postharvest shelf-life of strawberries. **Food Control**, p. 108641, 2021.
- SANDERS, M. E. *et al.* Safety assessment of probiotics for human use. **Gut microbes**, v. 1, n. 3, p. 164-185, 2010.
- SANTOS, J.E.; SOARES, J.P.; DOCKAL, S.E. Caracterização de quitosanas comerciais de diferentes origens. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, vol.13, n. 4, p. 242-249, 2003.
- SHAHBAZI Y. Application of carboxymethyl cellulose and chitosan coatings containing *Mentha spicata* essential oil in fresh strawberries. **J. of Biol. Macromolecules**, 112:264-272, 2018.
- SHAO, X. *et al.* Insight into the mechanism of decreasing N-nitrosodimethylamine by *Lactobacillus pentosus* R3 in a model system. **Food Control**, v. 121, p. 107534, 2021.
- SHIGEMATSU, E. *et al.* Edible coating with probiotic as a quality factor for minimally processed carrots. **J. of food science and technology**, v. 55, n. 9, p. 3712-3720, 2018.

SHORI, A. B. The effect of encapsulating materials on the survival of probiotics during intestinal digestion: a review. **Ciência & Tecnologia dos Materiais**, v. 27, n. 1, p. 73-77, 2015.

SHORI, A. B. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. **HAYATI journal of biosciences**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2017.

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

SINGH, P.; BAISTHAKUR, P.; YEMUL, O. S.; SYNTHESIS, characterization and application of crosslinked alginate as green packaging material. **Heliyon**, v. 6, n. 1, p. e03026, 2020.

SIROLI, L. *et al.* Lactic acid bacteria and natural antimicrobials to improve the safety and shelf-life of minimally processed sliced apples and lamb's lettuce. **Food microbiology**, v. 47, p. 74-84, 2015.

SOARES, B. L. M.; ARNAUD, T. M. S.; & STAMFORD, T. L. M. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in mombin ice cream. **LWT**, v. 100, p. 391-396, 2019.

SPERANZA, B. *et al.* Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. **Frontiers in microbiology**, v. 9, p. 2538, 2018.

SWANSON, K. S. *et al.* Declaração de consenso da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) sobre a definição e o escopo dos simbióticos. **Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol**, v. 17, p. 687–701, 2020.

TA, L. P. *et al.* Electrospayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, p. 120342, 2021.

TARIFA, M. C. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus rhamnosus* in pectin and pectin-inulin microgel particles: Effect on bacterial survival under storage conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 179, p. 457-465, 2021.

TEZOTTO-ULIANA, J. V. *et al.* Chitosan applications pre-or postharvest prolong raspberry shelf-life quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 91, p. 72-77, 2014.

TOSETTI, R. *et al.* Continuous exposure to ethylene differentially affects senescence in receptacle and achene tissues in strawberry fruit. **Frontiers in plant science**, v. 11, p. 174, 2020.

TRINDADE, D. P. *et al.* Isolation and identification of lactic acid bacteria in fruit processing residues from the Brazilian Cerrado and its probiotic potential. **Food Bioscience**, v. 48, p. 101739, 2022.

VAZIRI, A. S. *et al.* Co-microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* and DHA fatty acid in alginate-pectin-gelatin biocomposites. **Carbohydrate Polymers**, v. 199, p. 266-275, 2018.

VIVEK, Kambhampati *et al.* A Comprehensive Review Microencapsulation of probiotics: Technology, Carriers and Current trends. **Applied Food Research**, p. 100248, 2022.

WANG, Mengwei *et al.* Enhanced viability of layer-by-layer encapsulated *Lactobacillus pentosus* using chitosan and sodium phytate. **Food chemistry**, v. 285, p. 260-265, 2019.

WANG, Xiaochen *et al.* Microencapsulating alginate-based polymers for probiotics delivery systems and their application. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, p. 644, 2022a.

WANG, Kuiyou *et al.* Survivability of probiotics encapsulated in kelp nanocellulose/alginate microcapsules on microfluidic device. **Food Research International**, v. 160, p. 111723, 2022b.

XU, C. *et al.* Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. **Journal of Controlled Release**, v. 349, p. 184-205, 2022.

YONG, A. K. L. *et al.* Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 with mannitol. **Asia-Pacific journal of molecular biology and biotechnology**, v. 28, n. 2, p. 32-42, 2020.

YOON, Y. *et al.* Effects of X-ray irradiation on the postharvest quality characteristics of 'Maehyang'strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). **Food chemistry**, v. 325, p. 126817, 2020.

ZAEIM, D. *et al.* Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. **Food Structure**, v. 25, p. 100147, 2020.

ZHANG, Y. L. *et al.* Effect of carboxymethyl chitosan-gelatin-based edible coatings on the quality and antioxidant properties of sweet cherry during postharvest storage. **Scientia Horticulturae**, v. 289, p. 110462, 2021.

ZONG, X. *et al.* Novel emulsion film based on gelatin/polydextrose/camellia oil incorporated with *Lactobacillus pentosus*: Physical, structural, and antibacterial properties. **Food Hydrocolloids**, v. 121, p. 107063, 2021.