



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

FÁBIO JÚNIOR RODRIGUES

**POLÍMEROS NATURAIS EM MICROENCAPSULAÇÃO POR  
EXTRUSÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE COBERTURAS  
COMESTÍVEIS CARREADORAS DE CULTURA PROBIÓTICA  
PARA YACON MINIMAMENTE PROCESSADO**

FÁBIO JÚNIOR RODRIGUES

**POLÍMEROS NATURAIS EM MICROENCAPSULAÇÃO POR  
EXTRUSÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE COBERTURAS  
COMESTÍVEIS CARREADORAS DE CULTURA PROBIÓTICA  
PARA YACON MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia.

Londrina  
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Rodrigues, Fábio Júnior.

Polímeros naturais em microencapsulação por extrusão e no desenvolvimento de coberturas comestíveis carreadoras de cultura probiótica para yacon minimamente processado / Fábio Júnior Rodrigues. - Londrina, 2017.  
104 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2017.  
Inclui bibliografia.

1. Lactobacillus - Tese. 2. Revestimento comestível - Tese. 3. Alginato de sódio - Tese. 4. Mucilagem - Tese. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

FÁBIO JÚNIOR RODRIGUES

**POLÍMEROS NATURAIS EM MICROENCAPSULAÇÃO POR  
EXTRUSÃO E NO DESENVOLVIMENTO DE COBERTURAS  
COMESTÍVEIS CARREADORAS DE CULTURA PROBIÓTICA PARA  
YACON MINIMAMENTE PROCESSADO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

**BANCA EXAMINADORA**

---

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

---

Profa. Dra. Claudia Dorta  
Faculdade de Tecnologia - FATEC – Marília

---

Profa. Dra. Alice Yoshiko Tanaka  
Faculdade de Tecnologia - FATEC – Marília

Londrina, 31 de janeiro de 2017.

*À minha família,  
Dedico.*

## AGRADECIMENTOS

À Deus pela capacidade para realização desse trabalho, e por colocar pessoas especiais ao longo dessa jornada.

À Profa. Dra. Sandra Garcia, pela orientação, confiança, e cooperação ao longo desse trabalho.

À Universidade Estadual de Londrina pela oportunidade de aprendizado.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (Capes) pela bolsa concedida.

À chefia e coordenação do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, pela atenção e colaboração, em especial, a Profa. Dra. Marta de Toledo Benassi.

À Secretaria de Pós-Graduação, na pessoa de Sandra Rezende.

Aos responsáveis pelos laboratórios do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Patrícia Sambatti, Alessandra Cristina Silva e Rubens Borges Santos.

Ao Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina, na pessoa de Profa. Dra. Aneli Melo Barbosa Dekker, por gentilmente fornecer a Botriosferana utilizado nesse trabalho.

À Clerici-Sacco, a Chr. Hansen e a Beneo-Orafti pelas culturas probióticas e FOS cedidos.

Aos colegas de laboratório pela companhia e colaboração durante esses dois anos.

Aos amigos, William, Kaio, Diego, Dmitri, Heberty, Guilherme e Ilson, pela torcida e momentos de descontração.

À minha namorada Marina, por acreditar em mim, me apoiar e incentivar em todos os momentos, além de sua dedicação para a concretização desse trabalho.

À minha família que mesmo de longe não mediu esforços, me apoiando e permitindo a realização desse trabalho.

E a todos que direta ou indiretamente possibilitaram esse período de aprendizagem, desafios e mudanças.

Muito obrigado.

*“A persistência é o menor caminho do êxito”.*

*Charles Chaplin*

RODRIGUES, Fábio Júnior. **Polímeros naturais em microencapsulação por extrusão e no desenvolvimento de coberturas comestíveis carreadoras de cultura probiótica para yacon minimamente processado**. 2017. 104f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

## RESUMO

No atual cenário científico diversos grupos de pesquisa buscam alternativas na proteção de micro-organismos probióticos, estes, por definição são bactérias ou leveduras que, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Microencapsular essas bactérias em matrizes poliméricas têm proporcionado excelentes resultados tanto na manutenção da viabilidade celular durante a estocagem, quanto na possibilidade de aplicação desses micro-organismos em alimentos. Paralelamente, cresce a demanda por alimentos com propriedades funcionais. Entre as classes emergentes de alimentos com dada alegação, estão os alimentos adicionados de probióticos. Em geral, a adição de probióticos em alimentos é comumente atrelada a produtos lácteos, entretanto, outros veículos provenientes de matérias-primas não-lácteas têm sido estudados para atuarem como suportes destas bactérias. Com finalidade de auxiliar no aumento da vida de prateleira de frutas e hortaliças, coberturas comestíveis à base de polímeros naturais têm sido amplamente utilizadas contribuindo para preservação de características físicas e químicas destes produtos, além de que podem atuar como carreadoras de cultura probiótica. O objetivo deste estudo foi avaliar a influência de polímeros oriundos de mucilagens de quiabo e linhaça, fruto-oligossacarídeos (FOS) e exopolissacarídeo Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana em processo de microencapsulação de probióticos com alginato de sódio, e na elaboração de coberturas comestíveis carreadoras de *L. casei* LC-01 para yacon (*Smallanthus sonchifolius*) minimamente processado. Mucilagens de linhaça e a Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana auxiliaram na estabilidade de probióticos microencapsulados. Em testes de simulação gástrica a mucilagem de linhaça aliada aos FOS demonstrou ser mais efetiva na proteção a células de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsuladas. As coberturas comestíveis à base de alginato de sódio e mucilagem de linhaça utilizadas para revestir yacon minimamente processado demonstraram ser excelente suporte para *L. casei* LC-01, mantendo contagens de viabilidade celular do probiótico por volta de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> durante o período de 15 dias de armazenamento. Apesar de não ser um produto fermentado, o yacon exibiu capacidade para veicular *L. casei* LC-01, visto que em testes de simulação gástrica e entérica a sobrevivência do probiótico foi similar à encontrada em estudos envolvendo produtos fermentados. O uso de coberturas comestíveis em yacon minimamente processado influenciou na diminuição em média de 16,7 % da perda de massa fresca, e também na redução do escurecimento enzimático nas amostras, fatores que são determinantes para comercialização do produto.

**Palavras-chave:** *Lactobacillus*. Revestimento comestível. Alginato de sódio. Mucilagem.

RODRIGUES, Fábio Júnior. **Natural polymers in microencapsulation by extrusion and in the development of edible toppings of probiotic culture for yacon minimally processed.** 2017. 104p. Dissertation (Master in Food Science) - State University of Londrina, Londrina, 2017.

## ABSTRACT

In the current scientific scenario, several research groups seek alternatives in the protection of probiotic microorganisms, which by definition are bacteria or yeasts that, when ingested in adequate amounts, confer benefits to the health of the host. Microencapsulating these bacteria in polymer matrices have provided excellent results both in maintaining cellular viability during storage and in the possibility of applying these microorganisms on food. At the same time, the demand for foods with functional properties increases. Among the emerging classes of foods with a given claim are foods added with probiotics. In general, the addition of probiotics to foods is commonly tied to dairy products; however, other non-dairy raw materials have been studied to act as carriers of these bacteria. In order to help increase the shelf life of fruits and vegetables, edible toppings based on natural polymers have been widely used, contributing to the preservation of physical and chemical characteristics of these products, and can act as probiotic culture carriers. The objective of this study was to evaluate the influence of polymers from okra and linseed mucilages, fructo-oligosaccharides (FOS) and exopolysaccharide of the type  $\beta$ -D-glucan, in the process of microencapsulation of probiotics with sodium alginate, and in the elaboration of edible coating with *L. casei* LC-01 for minimally processed yacon (*Smallanthus sonchifolius*). Linseed mucilages and botryosphaeran  $\beta$ -D-glucan type aided the stability of microencapsulated probiotics. In gastric simulation tests, Linseed mucilage allied to FOS was shown to be more effective in the protection of *L. casei* LC-01 and *L. casei* BGP 93 encapsulated cells. The edible toppings based on sodium alginate and linseed mucilage used to coat minimally processed yacon were shown to be excellent support for *L. casei* LC-01, maintaining probiotic cell viability counts at about 8 log CFU.g<sup>-1</sup> during period of 15 days of storage. Although not be a fermented product, yacon exhibited ability to carry *L. casei* LC-01, since in gastric and enteric simulation tests probiotic survival was similar to that found in studies involving fermented products. The use of edible toppings in yacon minimally processed influenced in the average decrease of 16.7 % of the loss of fresh mass, and also in the reduction of the enzymatic browning in the samples, factors that are determinant for commercialization of the product.

**Keywords:** *Lactobacillus*. Edible coating. Sodium alginate. Mucilage.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Estrutura química dos blocos MM, GG, G / M e M / G presentes no alginato.....33
- Figura 2** – Botriosferana:  $\beta$ -(1 → 3,1 → 6)-D-glucana.....39
- Figura 3** – Fluxograma do processamento mínimo de yacon.....46
- Figura 4** – Efeito das diferentes matrizes encapsulantes sob a contagem de células viáveis do probiótico *L. casei* LC-01 durante a estocagem a 5°C±2°C por 15 dias (log UFC.g-1). (A) log UFC.g-1 de *L. casei* LC-01 em microesferas com adição de FOS (1,5 %). (B) log UFC.g-1 de *L. casei* LC-01 em microesferas sem adição de FOS.....59
- Figura 5** – Efeito das diferentes matrizes encapsulantes sob a contagem de células viáveis do probiótico *L. casei* BGP 93 durante a estocagem a 5 °C ± 2 °C por 15 dias (log UFC.g-1).....62
- Figura 6** – Sobrevivência dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsulados nas diversas matrizes poliméricas antes (0 h) e durante a exposição a simulação gástrica (2 h) e entérica (4 e 6 h).....63
- Figura 7** – Redução no número de células viáveis (log UFC.g-1) dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsulados nas diversas matrizes poliméricas depois da exposição aos sucos gástricos e entéricos simulados .....64
- Figura 8** – Contagem de células viáveis de *L. casei* LC-01 (log UFC.g-1) nas amostras de yacon recobertas com coberturas comestíveis carregadoras de probiótico durante a estocagem a 5 °C ± 2 °C .....67
- Figura 9** – Perda de massa fresca (%) nas amostras de yacon minimamente processado com e sem coberturas comestíveis durante a estocagem a 5°C±2°C.....73
- Figura 10** – Amostras de yacon minimamente processado com (CAP e CLP) e sem cobertura comestível (CAS) em 15 dias de armazenamento a 5 °C ± 2 °C.....78
- Figura 11** – Amostras de yacon minimamente processado com (CAP e CLP) e sem cobertura comestível (C e CAS) em 9 dias de armazenamento a 5 °C ± 2 °C.....79

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b>	– Composição centesimal da mucilagem do quiabo liofilizado.....	36
<b>Tabela 2</b>	– Composição centesimal da mucilagem do grão de linhaça.....	37
<b>Tabela 3</b>	– Composição das soluções poliméricas utilizadas no processo de microencapsulação dos probióticos .....	44
<b>Tabela 4</b>	– Composição das coberturas comestíveis carreadoras de <i>L. casei</i> LC-01 utilizadas para recobrir o yacon minimamente processado.....	48
<b>Tabela 5</b>	– Distribuição dos tratamentos de yacon minimamente processado .....	49
<b>Tabela 6</b>	– Eficiência do processo de encapsulação (EE) dos probióticos <i>L. casei</i> LC-01 e <i>L. casei</i> BGP 93 microencapsulado nas diversas matrizes poliméricas.....	57
<b>Tabela 7</b>	– Sobrevivência do probiótico adicionado nas coberturas comestíveis sob condições gastrointestinais simuladas (log UFC.g-1) .....	69
<b>Tabela 8</b>	– Qualidade microbiológica do yacon minimamente processado segundo o tratamento e tempo de estocagem .....	71
<b>Tabela 9</b>	– Valores médios de umidade (g/g) nas amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante o armazenamento a 5°C ± 2°C.....	75
<b>Tabela 10</b>	– Parâmetro de cor L* das amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante estocagem a 5 °C ± 2 °C .....	77
<b>Tabela 11</b>	– Valores médios de coordenadas do ângulo hue (h*) das amostras de yacon minimamente processado com e sem coberturas comestíveis durante a estocagem a 5°C ± 2°C .....	80
<b>Tabela 12</b>	– Valores médios de sólidos solúveis totais (°Brix) das amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante a estocagem a 5 °C ± 2 °C .....	81
<b>Tabela 13</b>	– Valores médios de pH e acidez total titulável (ATT) das amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante a estocagem a 5°C ± 2°C .....	82

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO .....	13
2	OBJETIVOS .....	16
2.1	OBJETIVO GERAL .....	16
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	16
3	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	17
3.1	ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	17
3.1.1	Probióticos .....	18
3.1.1.2	<i>Gênero <u>Lactobacillus</u></i> .....	19
3.1.1.3	<i><u>Lactobacillus casei</u></i> .....	20
3.1.1.4	<i>Alimentos adicionados de probióticos</i> .....	21
3.1.2	Prebióticos .....	22
3.1.2.1	<i>Prebióticos: Fruto-oligossacarídeos (FOS)</i> .....	23
3.1.2.2	<i>Yacon (<u>Smallanthus sonchifolius</u>)</i> .....	25
3.2	FRUTAS E HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS .....	26
3.3	MICROENCAPSULAÇÃO: PRINCÍPIOS E GELIFICAÇÃO IÔNICA .....	28
3.4	COBERTURAS COMESTÍVEIS .....	30
3.5	POLÍMEROS NATURAIS EM COBERTURAS COMESTÍVEIS .....	31
3.5.1	Alginato .....	32
3.5.2	Mucilagens .....	34
3.5.2.1	<i>Mucilagem de quiabo (<u>Abelmoschus esculentus</u>)</i> .....	35
3.5.2.2	<i>Mucilagem de linhaça (<u>Linum usitatissimum</u>)</i> .....	37
3.5.3	Botriosferana .....	38
3.6	AGENTES PLASTIFICANTES .....	40
3.7	AGENTES SURFACTANTES .....	41
4	MATERIAL E MÉTODOS .....	42
4.1	MATERIAL .....	42
4.1.1	Probióticos: <i>L. casei</i> LC-01 e <i>L. casei</i> BGP 93 .....	42

4.1.2	<b>Materiais encapsulantes e constituintes da cobertura comestível</b> .....	42
4.1.3	<b>Yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)</b> .....	42
4.2	<b>MÉTODOS</b> .....	43
4.2.1	<b>Extração das mucilagens</b> .....	43
4.2.2	<b>Microencapsulação dos probióticos utilizando polímeros naturais</b> .....	43
4.2.3	<b>Processamento mínimo do yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>)</b> .....	45
4.2.4	<b>Coberturas comestíveis</b> .....	47
4.2.5	<b>Distribuição dos tratamentos e aplicação das coberturas comestíveis sobre yacon minimamente processado</b> .....	49
4.2.5.1	<b>Parâmetros físico-químicos</b> .....	50
4.2.5.1.1	<i>Perda de massa fresca</i> .....	50
4.2.5.1.2	<i>Umidade</i> .....	51
4.2.5.1.3	<i>Cor</i> .....	51
4.2.5.1.4	<i>pH</i> .....	51
4.2.5.1.5	<i>Acidez total titulável (ATT)</i> .....	51
4.2.5.1.6	<i>Sólidos solúveis totais (SST)</i> .....	52
4.2.6	<b>Parâmetros microbiológicos</b> .....	52
4.2.6.1	<b>Viabilidade celular do probiótico</b> .....	52
4.2.6.2	<b>Eficiência de encapsulação dos probióticos (EE)</b> .....	52
4.2.6.3	<b>Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas</b> .....	53
4.2.6.4	<b>Análises de contaminantes</b> .....	54
4.2.6.4.1	<i>Coliformes a 45 °C</i> .....	54
4.2.6.4.2	<i>Salmonella spp</i> .....	54
4.2.6.4.3	<i>Aeróbios mesófilos</i> .....	55
4.2.6.4.4	<i>Bolores e leveduras</i> .....	55
4.3	<b>ANÁLISE ESTATÍSTICA</b> .....	55
5	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	56
5.1	<b>MICROENCAPSULAÇÃO DOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO POLÍMEROS NATURAIS</b> .....	56
5.1.1	<b>Eficiência de encapsulação dos probióticos (EE)</b> .....	56

5.1.2	Viabilidade celular dos probióticos encapsulados nas diversas soluções poliméricas durante o armazenamento a 5 °C ± 2 °C .....	58
5.1.3	Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas .....	63
5.2	<b>YACON MINIMAMENTE PROCESSADO COM COBERTURA COMESTÍVEL CARREADORA DE PROBIÓTICO .....</b>	<b>66</b>
5.2.1	Análises microbiológicas .....	66
5.2.1.1	<i>Viabilidade do probiótico <u>L. casei</u> LC-01.....</i>	<i>66</i>
5.2.1.2	<i>Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas.....</i>	<i>69</i>
5.2.1.3	<i>Qualidade microbiológica de yacon minimamente processado .....</i>	<i>70</i>
5.2.2	Análises físico-químicas.....	72
5.2.2.1	<i>Perda de massa fresca e umidade.....</i>	<i>73</i>
5.2.2.2	<i>Cor .....</i>	<i>76</i>
5.2.2.3	<i>pH, acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis totais (SST).....</i>	<i>80</i>
6	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>85</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>86</b>
	<b>ANEXO .....</b>	<b>104</b>
	<b>Anexo 1: Certificado da análise de especificação do FOS .....</b>	<b>104</b>

## 1 INTRODUÇÃO

É crescente a busca por alimentos com alegação funcional por parte dos consumidores. Estes alimentos representam uma alíquota de 27 % do total disponível no mercado e de até 8 % dos lançamentos de novos produtos em alguns países (CALVO et al., 2016).

Esses alimentos podem ser classificados de acordo com os componentes bioativos, dentre eles: probióticos, fibras, fitoquímicos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e determinados peptídeos e proteínas (CASEMIRO; RAMOS, 2014).

Segundo Saad, Cruz e Faria (2011) pesquisas relacionadas com a adição de probióticos em alimentos aumentam a cada ano, indicando que do ponto de vista científico é inquestionável a perspectiva positiva para elaboração de alimentos funcionais com essa propriedade.

A Organização Mundial da Saúde (WHO) define probiótico como bactérias e leveduras que, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem um ou mais benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). No Brasil essa definição é difundida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que preconiza probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Quando inseridos em alimentos, estes micro-organismos devem atender critérios, tais como: manter a estabilidade durante toda a vida de prateleira; manutenção da viabilidade adequada para atingir o benefício à saúde; não alteração das propriedades sensoriais do produto (MATIAS, 2011).

Historicamente os alimentos com alegação probiótica estão vinculados a produtos lácteos (ALMEIDA, 2012), dessa forma, o consumo fica limitado, pois estes alimentos não podem ser ingeridos por consumidores intolerantes a lactose ou alérgicos à proteína do leite. Este cenário cria a demanda para desenvolver veículos opcionais que não apresentem essa limitação ao consumo, desta forma, frutas e hortaliças surgem como opção interessante e saudável (ALEGRE et al., 2011).

Paralelamente, é crescente também a demanda dos consumidores por praticidades relacionadas à alimentação, esse fator abre espaço para o mercado dos minimamente processados (OLIVEIRA et al., 2011).

Também denominados “*fresh-cut*”, minimamente processados são por definição, segundo a *International Fresh-Cut Produce Association* (IFPA, 2001) qualquer fruto ou hortaliça ou combinação destes, cuja forma original foi fisicamente alterada, entretanto, mantendo-se no estado fresco, isto é, refere-se a produtos que sofreram modificações nas suas características físicas alterando sua forma original, passando por um ou mais processos, dentre eles: seleção, lavagem, sanitização, descascamento, corte, centrifugação, drenagem, embalagem, armazenamento e comercialização (FONTES et al., 2008; SILVA, 2014).

No entanto, por se tratar de produtos alterados fisicamente tem-se por consequência o aumento da perecibilidade, podendo sofrer ação microbiana, enzimática ou não enzimática, tornando necessário o emprego de cuidados e tecnologias visando o aumento da vida de prateleira desses produtos (ARTÉS; GOMÉZ; ARTÉS-HERNANDEZ, 2007; CAHAN; GOLDSTEIN; FINKELSTEIN, 2002).

Dentre as possíveis hortaliças a serem comercializadas na forma de minimamente processados está o *yacon* (*Smallanthus sonchifolius*), anteriormente denominada na literatura científica de *Polymnia sonchifolius*. É uma planta da família *Asteraceae*, introduzida no Brasil por volta de 1989 por descendentes japoneses, e teve o consumo expandido somente em meados dos anos 2000, sendo conhecida popularmente como batata yacon ou batata *diet* (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015). Esta hortaliça, na forma minimamente processada sofre uma série de estresses e alterações metabólicas indesejáveis, que resultam na redução da vida útil em relação ao produto *in natura*.

A utilização de películas comestíveis surge como alternativa tecnológica interessante, podendo atuar de modo a prolongar a vida de prateleira de frutas e hortaliças minimamente processadas, diminuindo a contaminação microbiana e retardando reações de escurecimento não desejadas nos alimentos (LUVIELMO; LAMAS, 2013).

Vários estudos relatam a aplicação de filmes e coberturas comestíveis à base de polissacarídeos na tecnologia de preservação de frutas e hortaliças. As coberturas formuladas a partir desses polímeros apresentam boa resistência a trocas gasosas, podendo atuar na redução da taxa de escurecimento enzimático que ocorre devido à ação das polifenoloxidasas, comumente presentes nesses alimentos (LUVIELMO; LAMAS, 2013). Para mais, a utilização de revestimentos de polissacarídeos em frutos e hortaliças pode contribuir para uma melhoria no aspecto visual conferindo brilho e transparência (OLIVEIRA; GRDEN; RIBEIRO, 2007).

Alguns desses polissacarídeos são conhecidos ainda por sua capacidade de proteção a probióticos, sendo utilizados amplamente em técnicas de microencapsulação. Essas técnicas são estudadas e aplicadas na preservação e manutenção da viabilidade celular de células probióticas, uma vez que estas podem apresentar dificuldade na sobrevivência frente a meios ácidos, sais biliares, oxigênio, altas temperaturas e tempo de armazenamento (BORGOGNA et al., 2010; FAREEZ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2015).

Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi avaliar a influência da utilização de polímeros naturais oriundos de mucilagens de quiabo e linhaça, fruto-oligossacarídeos, bem como o exopolissacarídeo Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em processo de microencapsulação por extrusão visando a proteção de células probióticas frente ao tempo de armazenamento e em testes de simulação gastrointestinal *in vitro*. Estes polímeros também foram empregados na composição de coberturas comestíveis carreadoras de cultura probiótica para yacon minimamente processado.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar a influência de polímeros naturais, dentre eles, os provenientes de mucilagens de quiabo (*Abelmoschus esculentus*) e linhaça preta (*Linum usitatissimum*), do exopolissacarídeo Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e fruto-oligossacarídeo comercial (FOS), sobre células probióticas (*L. casei* LC 01 e *L. casei* BGP 93) microencapsuladas por extrusão e no desenvolvimento de coberturas comestíveis carreadoras de cultura probiótica para yacon (*Smallanthus sonchifolius*) minimamente processado.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver microesferas à base de polímeros naturais através de microencapsulação por extrusão contendo cultura probiótica (*L. casei* LC 01 ou *L. casei* BGP 93) a fim de avaliar a capacidade na manutenção do número de células viáveis dos probióticos nessas matrizes, bem como, a influência dos polímeros utilizados na resistência das células a testes de simulação gástrica.
- Nas amostras de yacon minimamente processado avaliar parâmetros físico-químicos (Perda de massa; Umidade; pH; Acidez total; Sólidos solúveis totais; Cor) a fim de verificar a influência da cobertura comestível no controle destes parâmetros.
- Avaliar o número de células viáveis do probiótico presente nas amostras de yacon minimamente processado revestido com coberturas comestíveis durante o período de armazenamento.
- Avaliar a qualidade microbiológica de yacon minimamente processado com e sem cobertura comestível durante o período de armazenamento.

### 3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

#### 3.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS

O conceito de alimentos funcionais surgiu no Japão, na década de 1980, e ganhou status legal em 1991, sendo aceita a terminologia FOSHU (*Food for Specified Health Use*) (ALMEIDA, 2012).

A designação “funcional” indica que o alimento possui algum valor identificado para a promoção da saúde, tendo como exemplo a redução ao risco de doenças para quem os consome (BADARÓ et al., 2008). Segundo Abd El-Salam et al. (2011) esses alimentos trazem consigo além dos nutrientes básicos, compostos fisiologicamente ativos que contribuem para redução de doenças crônicas e/ou para manutenção do bem-estar físico e mental. O potencial para promover a saúde é proveniente, portanto, de mecanismos não previstos na nutrição convencional, tornando necessário salientar que esse efeito fica limitado à promoção de saúde e não a cura de doenças (ALMEIDA, 2012).

Atualmente a busca por alimentos com estas propriedades tem aumentado por parte dos consumidores. Estes alimentos representam uma alíquota de 27 % do total disponível no mercado e de até 8 % dos lançamentos de novos produtos em alguns países (CALVO et al., 2016). Segundo Casemiro e Ramos (2014) grande parte dos consumidores brasileiros das classes A e B estão escolhendo seus alimentos influenciados pela relação dos mesmos com a promoção e manutenção da saúde.

Uma maneira de classificar esses alimentos seria de acordo com os componentes bioativos neles presentes, tais como, probióticos, fibras, fitoquímicos, vitaminas, minerais, ácidos graxos e determinados peptídeos e proteínas (CASEMIRO; RAMOS, 2014).

O número de pesquisas com probióticos adicionados a alimentos aumenta a cada ano (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011), indicando que do ponto de vista científico é inquestionável a perspectiva positiva para elaboração de alimentos funcionais com essa propriedade.

### 3.1.1 Probióticos

Em 1907, Elie Metchnikoff, cientista russo, prêmio Nobel, e professor do Instituto Pasteur em Paris, pressupôs que bactérias lácticas ofereciam benefícios à saúde podendo levar à longevidade. Ele preconizou que a “auto-intoxicação intestinal” e o envelhecimento derivado disso, poderiam ser suprimidos modificando a microbiota intestinal, utilizando micro-organismos úteis para substituir os micro-organismos proteolíticos como os *Clostridium spp*, produtores de substâncias tóxicas (WGO, 2011; ANUKAM; REID, 2007).

A definição conceitual para probióticos foi proposta inicialmente por Fuller em 1989, onde o pesquisador sugeria probiótico como sendo um suplemento alimentar, constituído de micro-organismos vivos, capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal (BADARÓ et al., 2008). A Organização Mundial da Saúde (WHO) estabelece probióticos como bactérias e leveduras que, quando ingeridas em quantidades adequadas, conferem um ou mais benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). No Brasil essa definição é difundida pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) que preconiza probióticos como micro-organismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002).

Dentre os diversos benefícios que podem ser atribuídos à saúde do hospedeiro por meio da ingestão de culturas probióticas estão: controle da microbiota intestinal, maior resistência gastrointestinal à colonização por patógenos, estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos, promoção da digestão da lactose, estimulação do sistema imunológico, melhora da constipação e aumento da absorção de minerais e vitaminas (SAAD, 2006).

Estes micro-organismos quando consumidos devem suportar alguns fatores para atestar a capacidade de promover efeitos benéficos ao hospedeiro. Dentre estes fatores destaca-se: a estabilidade frente ao ácido estomacal e sais biliares; a capacidade de aderir à mucosa intestinal; capacidade de colonização do trato gastrointestinal humano; produção de compostos antimicrobianos e a manutenção da atividade metabólica no intestino (COLLINS et al., 1998; SAARELA et al., 2000).

Na elaboração de um produto com alegação probiótica é necessário considerar que para que ocorram os efeitos benéficos, o probiótico deve exibir capacidade de sobrevivência no hospedeiro, e no alimento a concentração de células probióticas viáveis deve ao menos atingir  $10^7$  Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por grama ou mL do produto (BURITI et al., 2005; FAO/WHO, 2002; KASIMOĞLU et al., 2004, MUSHTAQ et al., 2016).

Segundo Antunes et al. (2007) e WGO (2011) os probióticos quando vivos no cólon, se multiplicam afetando o ecossistema intestinal, estimulando os mecanismos imunitários da mucosa e os mecanismos não imunitários através da competição microbiana com os possíveis patógenos.

A periódica descamação e renovação do epitélio intestinal promove o carregamento de grande número de colônias aderidas, devido a isso, recomenda-se que o consumo destes probióticos seja contínuo (ANTUNES et al., 2007).

### **3.1.1.2 Gênero Lactobacillus**

Dentre os gêneros de bactérias consideradas probióticas destaca-se o gênero *Lactobacillus*. Por definição são bactérias Gram-positivas que se apresentam na forma de bacilos ou como cocobacilos. São anaeróbias facultativas ou microaerófilas, catalase-negativas (algumas espécies podem produzir pseudocatalases), possuem ampla faixa de crescimento (2 °C a 53 °C), não formadoras de esporos e produtoras principalmente de ácido láctico a partir da fermentação de carboidratos (FERREIRA, 2012).

Em 1900 foi descrita por Ernest Moro a primeira espécie do gênero *Lactobacillus*, *L. acidophilus*, e devido à escassa quantidade de informações sobre este gênero durante quase sete décadas todos os bacilos Gram-positivos, asporogênicos, isolados da boca, da vagina e do intestino foram identificados como *L. acidophilus*, até que Hansen e Mørcquot no ano de 1970 especificaram de forma mais detalhada esta espécie (FERREIRA, 2012).

Atualmente, de acordo com *List of Prokaryotic names with Standing in Nomenclature* (PARTE, 2014) até o presente momento o gênero *Lactobacillus* compreende 221 espécies e 29 subespécies.

Dentre as espécies de *Lactobacillus* testadas para serem utilizadas como probióticos destacam-se *L. acidophilus*, *L. crispatus*, *L. amylovorus*, *L. gallinarum*, *L. gasseri*, *L. johnsonii* (FERREIRA, 2012), *L. helveticus*, *L. delbrueckii subsp. bulgaricus* (DARILMAZ et al., 2011), *L. salivarius subsp. salivarius* (MESSAOUDI et al., 2013), *L. casei*, *L. paracasei subsp. paracasei*, *L. paracasei subsp. tolerans* (CAPRA et al., 2014), *L. plantarum* (ARIEF et al., 2014), *L. rhamnosus*, *L. fermentum* e *L. reuteri* (SANDERS; KLAENHAMMER, 2001).

### **3.1.1.3 Lactobacillus casei**

Bactérias do grupo *Lactobacillus casei* vem sendo investigadas em relação às propriedades promotoras de saúde. Várias funções benéficas ao organismo humano têm sido atribuídas em função do consumo regular de alimentos contendo bactérias desse grupo.

*Lactobacillus casei* estão presentes em frações significantes na microbiota constituída por *Lactobacillus spp.* na mucosa intestinal humana. Autores atribuem a estes micro-organismos efeitos relacionados à proteção contra agentes infecciosos pela diminuição da colonização intestinal por patógenos (CANO; PERDIGÓN, 2003), ativação das imunidades local e sistêmica (MEDICI; VINDEROLA; PERDIGÓN, 2004; HORI et al., 2002), diminuição dos níveis de triglicérides séricos e de colesterol (HABIB et al., 2011).

Estas bactérias tem crescimento ótimo nas faixas que compreendem 35 °C e 40 °C e pH 5.5 a 6.0. Um grande número de cepas de *L. casei* são oficialmente reconhecidas e juntamente com bactérias do grupo *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* são amplamente utilizadas para fins dietéticos (PIMENTEL; FRANCKI; GOLLÜCKE, 2005; BERNARDEAU et al., 2007).

Dentre as várias características associadas às bactérias lácticas, particularmente ao grupo *Lactobacillus casei*, destaca-se, o fato delas possuírem

atividade antimicrobiana contra micro-organismos patógenos, contaminantes e deteriorantes, em alimentos e no intestino humano (SCHWENNINGER et al., 2005; CALDERÓN et al., 2007; COEURET; GUEGUEN; VERNOUX, 2004).

#### **3.1.1.4 Alimentos adicionados de probióticos**

Historicamente os alimentos com alegação probiótica estão vinculados a produtos lácteos (ALMEIDA, 2012). A indústria deste segmento encontrou em culturas probióticas uma ferramenta para o desenvolvimento de novos produtos fazendo com que este nicho de produção continue em expansão (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

Atualmente outros veículos provenientes de matérias-primas não-lácteas têm sido estudados para serem suporte de probióticos (JAWORSKA et al., 2011). Entretanto, o desenvolvimento de alimentos com potencial probiótico utilizando matrizes não-lácteas ainda é bastante complexo, pois é necessário compreender questões ambientais e tecnológicas que podem influenciar a viabilidade e funcionalidade da linhagem probiótica no produto em que estiver inserida (SOUSA, 2013).

Dentre os critérios para alimentos serem considerados de potencial probiótico estão: manter a estabilidade durante toda a vida de prateleira; manutenção do número de células viáveis para atingir o benefício à saúde; não alteração das propriedades sensoriais do produto (SANDERS et al., 2007).

Alegre et al. (2011) destacam que não há um consenso estabelecido sobre a concentração mínima de ingestão de probióticos para que se atinja os efeitos benéficos no hospedeiro. E apesar dos estudos dose-respostas serem conflitantes, ensaios clínicos apontam para que um consumo adequado de micro-organismos esteja na faixa de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/dia (SZAJEWSKA; WANKE; PATRO, 2011) entretanto, a concentração do probiótico necessária varia ainda em função da linhagem e do efeito benéfico desejado sobre a saúde (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

No Brasil, a legislação estabelece que a alegação de propriedade funcional ou de saúde deve ser proposta e será avaliada, caso a caso, com base nas definições estabelecidas na Resolução n. 18/1999, considerando ainda os requisitos específicos dispostos nos critérios adotados pela ANVISA, na avaliação das alegações de propriedades funcional e de saúde (BRASIL, 2016).

### **3.1.2 Prebióticos**

Os prebióticos são compostos alimentícios não digestíveis capazes de promover alterações específicas no cólon intestinal gerando benefícios ao organismo. Para serem classificados como prebióticos estes ingredientes devem resistir à influência do suco gástrico e à ação de enzimas digestivas presentes no trato gastrointestinal humano. Uma vez não digeridos, estes compostos seletivos desempenham papel de substrato para grupos de bactérias endógenas associadas à promoção da saúde (ROBERFROID, 2007).

São considerados prebióticos os carboidratos resistentes de cadeia curta e pouco digeríveis, conhecidos como oligossacarídeos e outros polissacarídeos. A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) são os carboidratos mais difundidos em pesquisas relacionadas a esses compostos alimentícios (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). Outros carboidratos considerados prebióticos são: lactulose, lactitol, galacto-oligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos da soja, xilo-oligossacarídeos (XOS), amido resistente, isomalto-oligossacarídeos, lactossacarídeo, palatinose, dentre outros (FERREIRA, 2012).

Gibson e Rastall (2006) descrevem que o potencial prebiótico destes carboidratos está estritamente relacionado com o fato de estimularem seletivamente bactérias no cólon intestinal, como as bifidobactérias e lactobacilos. Estes compostos devem ser de baixa energia (< 9 KJ/g), aumentar o volume do bolo fecal e ao estimular o crescimento de bactérias benéficas, estas, por sua vez, podem inibir bactérias indesejáveis. O autor destaca que o consumo de alimentos prebióticos pode promover a saúde, atuando na prevenção de infecções, na modulação da resposta imune, na prevenção do câncer colorretal, na redução dos níveis séricos do colesterol e na melhora da biodisponibilidade de alguns alimentos.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda a ingestão diária de prebióticos entre 2,5 a 5 g para atingir a ação funcional (BRASIL, 2016). Gibson e Rastall (2006) alertam que no caso de consumo em doses muito elevadas efeitos indesejáveis podem ocorrer, tais como flatulência, inchaço, dor abdominal e diarreia.

### **3.1.2.1 Prebióticos: Fruto-oligossacarídeos (FOS)**

É inegável a necessidade do consumo de fibras na alimentação humana, de modo que sua presença favorece o metabolismo agindo em diversos aspectos, seja na motilidade intestinal e até mesmo na absorção de nutrientes. Em vista disso, as fibras alimentares são divididas conforme suas características de solubilidade: fibras solúveis e fibras insolúveis (ASP et al., 1992).

As fibras pertencentes ao grupo das insolúveis são os polissacarídeos estruturais que estão relacionados à estrutura da parede celular dos vegetais, que incluem a lignina, celulose e algumas hemiceluloses. Ao serem consumidas as fibras insolúveis permanecem intactas através de todo o trato gastrointestinal e exemplos de seus atributos funcionais são: incremento do bolo fecal, estímulo da motilidade intestinal, e retenção de substâncias tóxicas ingeridas ou produzidas no trato gastrointestinal durante o processo digestivo (KAY; STRASBERG, 1978; RODRIGUEZ; MEGÍAS; BAENA, 2003).

Entre as fibras solúveis estão as pectinas, gomas, mucilagens, hemiceluloses específicas, e os frutanos. Estas fibras além de permanecerem intactas ao longo do processo digestivo são consideradas carboidratos fermentáveis, uma vez que estes podem ser utilizados por bactérias presentes no trato intestinal, modulando a microbiota do hospedeiro (WONG; JENKINS, 2007).

Para que um carboidrato fermentável seja considerado não só uma fibra dietética e sim um prebiótico, ou seja, que seu consumo traga benefícios à microbiota de forma a promover o crescimento de bactérias benéficas e limitar a população patogênica, é necessário cumprir requisitos, dentre eles estão: os prebióticos não podem ser hidrolisados ou absorvidos no trato gastrointestinal superior, devem alterar a microbiota a favor de uma composição mais adequada

para a saúde do hospedeiro, devem induzir efeito luminal ou sistêmico que seja benéfico para a saúde do indivíduo, devem ser fermentados por bactérias no intestino grosso, devem melhorar as condições de constipação intestinal, e por fim, devem resistir ao pH e as condições enzimáticas encontradas no trato gastrointestinal humano (BARRETEAU; DELATTRE; MICHAUD, 2006; CHONG, 2014; FAI; PASTORE, 2015; GIBSON; PROBERT; LOO, 2004;).

Entre os principais prebióticos encontramos os fruto-oligossacarídeos (FOS). Estes são carboidratos complexos de configuração molecular resistente à ação hidrolítica de enzimas salivares e intestinais, atingindo o cólon intactos, onde se tornam disponíveis para a fermentação por probióticos. Sua estrutura é formada a partir da hidrólise da inulina pela enzima inulinase, e estes são constituídos por moléculas de sacarose com adição de uma ou mais moléculas de frutose por ligações  $\beta$  (2 $\rightarrow$ 1) (CUMMINGS; MACFARLANE; ENGLIST, 2001; WATZL; GIRRBACCH; ROLLER, 2005).

Na natureza os fruto-oligossacarídeos são encontrados em vegetais e plantas como alcachofra, raiz de chicória, yacon, entre outros. Para que FOS sejam efetivos é necessário o consumo frequente e elevado desses alimentos naturais, no entanto, FOS podem também ser extraídos dos alimentos e concentrados para posterior acréscimo em alimentos formulados como aditivo funcional (KAUR; GUPTA, 2002).

Com o consumo de FOS e dos demais prebióticos, efeitos benéficos podem ser conferidos ao organismo, dentre eles, a modulação de funções fisiológicas, melhora da biodisponibilidade de minerais, redução de metabólitos tóxicos, modulação de microbiota benéfica, redução do colesterol plasmático e da hipertriglicerimias, sendo que estes fatores auxiliam na prevenção de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002; BENGMARK; LORENZO; CULEBRAS, 2001; CUMMINGS; MACFARLANE, 2002).

Os fruto-oligossacarídeos são amplamente empregados na indústria alimentícia devido suas características de solubilidade, estabilidade ao aquecimento, dulçor e por não serem metabolizados são seguros para o consumo, até mesmo, por diabéticos (BORNET, 1994; YUN, 1996; MACFARLANE; STEED; MACFARLANE, 2008; WANG, 2009). Diante disso, sua aplicação juntamente com matrizes

encapsulantes em microesferas e em revestimentos comestíveis tem se tornado importante na ciência de alimentos (CORCORAN et al., 2004; ANANTA et al., 2005; CHEN et al., 2005; FRITZEN-FREIRE et al., 2012) expandindo o cenário de novos produtos com alegação prebiótica e proporcionando aplicações simbióticas que são aquelas que aliam probióticos e prebióticos em conjunto, estimulando o desenvolvimento e atividade metabólica dos probióticos, potencializando os efeitos (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

### 3.1.2.2 Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

O yacon originário da região andina do Peru e da Bolívia teve seu cultivo direcionado ao longo dos Andes de norte a sul, anteriormente, denominada na literatura científica de *Polymnia sonchifolius*, é uma planta da família *Asteraceae*, introduzida no Brasil por volta de 1989 por descendentes japoneses, tendo seu consumo expandido somente em meados dos anos 2000, sendo conhecida popularmente como batata yacon ou batata *diet* (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015).

Esta tuberosa têm recebido diversos nomes na linguagem andina, como *Aricoma* e *Aricuma*, como é conhecida na Bolívia. Já a palavra yacon, com algumas diferenças regionais de pronúncia é utilizada desde o Peru até o norte da Argentina, e em algumas linguagens europeias esta raiz é conhecida como *Poire de terre* e *Yacon strawberry* (KOTOVICZ, 2011).

O yacon é uma planta herbácea que mede entre 1 e 2,5 metros de altura, apresentando um sistema de raiz composto de 4 a 20 tubérculos. Cada planta produz em média 2 a 4 Kg de raízes de reserva, e a sua colheita para consumo é realizada por volta de 10 a 12 meses após o plantio (GUSSO; MATTANNA; RICHARDS, 2015). Estas plantas apresentam dois tipos de órgãos subterrâneos de reserva, os caules rizomatosos, que são responsáveis pela reprodução vegetativa da espécie e os tubérculos, nesses são armazenados carboidratos solúveis, na sua maioria frutanos (GRAEFE et al., 2004; CONTADO, 2009).

Os frutanos do tipo inulina e FOS são amplamente distribuídos na natureza (CARPITA; KAMABUS; HOUSLEY, 1989), sendo o yacon uma das

principais fontes. Os carboidratos presentes nas raízes de yacon foram caracterizados em 34-55 % de FOS, 7-9 % de glicose, 13-14 % de frutose e 10-13 % de sacarose, indicando seu potencial prebiótico (DELGADO et al., 2012; DELGADO et al., 2013).

Além da considerável concentração de prébioticos, as raízes de yacon apresentam compostos fenólicos (2030 mg/kg), estes, possuem importante atividade antioxidante. Desta forma, o consumo de yacon pode promover a saúde frente a fatores de estresse para o organismo, corroborando a prevenção do câncer e de doenças cardiovasculares, além de atuar sobre o envelhecimento celular (SIMONOVSKA et al., 2003; VALENTOVÁ; ULRICHOVÁ, 2003).

Segundo Kotovicz (2011) o yacon é considerado fonte da enzima fenoloxidase, capaz de catalisar a oxigenação de compostos fenólicos a quinonas, apresentando pigmentos marrons ou pretos, fenômeno conhecido como oxidação enzimática em frutas e vegetais. Ao passar por descascamento ou processamento a raiz de yacon tem as membranas celulares rompidas e os polifenóis e taninos ficam disponíveis para reagir com outros compostos, tornando-a susceptível à reação de escurecimento enzimático causado pela ação das enzimas peroxidases e polifenoloxidases, como consequência a epiderme fica rapidamente escura quando exposta ao ar.

Dentre as alternativas para minimizar essas reações adversas de oxidação da raiz de yacon, tratamentos químicos são utilizados, tais como os tratamentos ácidos, onde por exemplo, a aplicação do ácido ascórbico tem a capacidade inibir a ação de enzimas oxidativas e de reduzir as quinonas formadas por ação das oxidases, atuando de forma a impedir a formação de pigmentos escuros (VASCONCELOS et al., 2015). Ou ainda a eliminação ou diminuição do oxigênio do meio em que se encontra a raiz, uma vez que reações de oxidação necessitam de O<sub>2</sub>.

### **3.2 FRUTAS E HORTALIÇAS MINIMAMENTE PROCESSADAS**

O processamento mínimo de frutas e hortaliças é uma tecnologia que surgiu em meados da década de 70 nos Estados Unidos da América. No Brasil

apareceu somente no início da década de 90 a fim de atender ao novo perfil e demanda dos consumidores (ALVARENGA; TOLEDO; PAULILLO, 2014).

Definidos pela *International Fresh-Cut Produce Association* (IFPA, 2001) minimamente processados são qualquer fruto ou hortaliça ou combinação destes, cuja forma original foi fisicamente alterada, mantendo-se, entretanto no estado fresco, desta forma trata-se de produtos que através de um ou mais processos sofreram modificações em suas características físicas alterando sua forma original. Dentre os processos aplicados para elaboração de minimamente processados estão: seleção, lavagem, sanitização, descascamento, corte, centrifugação, drenagem, embalagem, armazenamento e comercialização (FONTES et al., 2008; SILVA, 2014).

O objetivo principal do processamento mínimo é tornar frutas e hortaliças convenientes para os consumidores, proporcionando maior praticidade ao consumo, maior período de vida útil e com frescor e valores nutricionais o mais próximo possível do produto *in natura* (ALVARENGA; TOLEDO; PAULILLO, 2014).

No entanto, por se tratar de produtos alterados fisicamente ocorre por consequência o aumento da perecibilidade, podendo sofrer ação microbiana, enzimática ou não enzimática, tornando necessário o emprego de cuidados e tecnologias visando o aumento da vida de prateleira desses produtos (ARTÉS; GOMÉZ; ARTÉS-HERNANDEZ, 2007; CAHAN; GOLDSTEIN; FINKELSTEIN, 2002).

Com a intenção de maior controle microbiológico sobre esses produtos, a Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001 recomenda ausência de *Salmonella spp* (em 25 gramas de amostra) e limita a  $10^2$  NMP/g o número de coliformes a 45 °C para que hortaliças frescas, *in natura*, preparadas, sanitizadas, refrigeradas ou congeladas sejam consideradas aptas ao consumo (BRASIL, 2001).

Frutas e hortaliças inteiras são menos susceptíveis à contaminação microbiana, fato esse atribuído à presença da casca que atua como barreira física contra os micro-organismos. Uma vez que hortaliças minimamente processadas passam por processos mecânicos (corte e/ou descascamento), essas sofrem maior exposição a micro-organismos (CHITARRA 2000; CHITARRA, 2001). Portanto,

torna-se imprescindível um controle rigoroso dos processos envolvidos na elaboração de produtos na forma de minimamente processados.

Oms-Oliu et al. (2008) destacam o escurecimento enzimático ou não enzimático como uma alteração que aparece em produtos minimamente processados, dentre os motivos que podem potencializar o escurecimento estão a presença de oxigênio, o armazenamento prolongado, a umidade relativa, altas temperaturas e injúria pelo frio.

A utilização de películas comestíveis surge como alternativa tecnológica interessante, podendo atuar de modo a prolongar a vida de prateleira de frutas e hortaliças minimamente processadas, diminuindo a contaminação microbiana e retardando reações de escurecimento não desejadas nos alimentos (LUVIELMO; LAMAS, 2013).

### **3.3 MICROENCAPSULAÇÃO: PRINCÍPIOS E TÉCNICA DE EXTRUSÃO**

O processo de microencapsulação foi idealizado partindo do modelo celular, onde o núcleo é envolto por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo controlando a entrada e a saída de substâncias na célula (JIZOMOTO et al., 1993).

Deste modo, esta técnica consiste em um processo mecânico ou físico-químico que imobiliza e aprisiona componentes, como pigmentos, aromas, acidulantes, fármacos e micro-organismos, em um material encapsulante com objetivo de protegê-lo das condições adversas do meio em que se encontra, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, e, conseqüentemente, aumentando sua vida útil (BORGOGNA et al., 2010; SHAHIDI; HAN, 1993).

Através das diversas técnicas de microencapsulação é possível distinguir duas categorias de micropartículas obtidas: as microcápsulas, partículas esféricas constituídas por um revestimento sólido que possui em seu interior a substância encapsulada, e as microesferas, partículas esféricas constituídas por uma rede

continua de material suporte, onde a substância encapsulada se encontra dispersa (GIUNCHEDI; CONTE, 1995).

Atualmente, técnicas de microencapsulação são estudadas e aplicadas na preservação e manutenção da viabilidade celular de células probióticas, uma vez que estas podem apresentar dificuldade na sobrevivência frente a meios ácidos, sais biliares, oxigênio, altas temperaturas e tempo de armazenamento (BORGOGNA et al., 2010; FAREEZ et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2007; SOUSA et al., 2015).

Para que o processo de microencapsulação seja efetivo e eficiente é necessário a escolha correta do material encapsulante bem como, a escolha da técnica mais adequada para o processo. Uma das técnicas mais utilizadas em microencapsulação de probióticos é técnica de extrusão, que utiliza hidrocolóides para a formação de microesferas: geralmente alginato, pectina, carragena, amido, quitosana, gelatina e proteínas (BURGAIN et al., 2011; COOK et al., 2012). Destaca-se a aplicação do alginato de sódio devido sua alta solubilidade e instantânea transição de solução para gel quando em contato com íons de cálcio (RACOVITĂ et al., 2009).

Deste modo, a utilização do alginato de sódio é amplamente difundida em técnicas de microencapsulação por gelificação iônica por extrusão, no entanto a utilização deste polissacarídeo condiz com formação de poros na superfície das cápsulas e esferas, uma desvantagem desta matriz encapsulante (MORTAZAVIAN; SOHRABVANDI, 2007). Para remediar esse problema, alguns pesquisadores têm utilizado combinações de outros compostos poliméricos aliados ao alginato de sódio, a fim de proporcionar maior proteção aos micro-organismos (CHÁVARRI et al., 2010; GBASSI et al., 2009; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

A gelificação iônica do alginato de sódio ocorre quando o polímero entra em contato com íons, estabelecendo uma ligação entre os cátions dos íons bivalentes e as cargas negativas do polissacarídeo. Dessa maneira, polieletrólitos de cargas opostas interagem, formando um complexo que resulta, quando efetivo, em uma estrutura de matriz impermeável para certos compostos orgânicos, apresentando ainda relativa impermeabilidade para o oxigênio (BUREY et al., 2008; THIES, 1995).

Gombotz e Wee (1998) destacam que a gelificação do alginato só ocorre após a ligação dos íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato formando uma rede tridimensional, resultando no modelo denominado “caixa de ovos”.

A técnica de extrusão, por ocorrer através da gelificação iônica, resulta em processo mais brando e sem utilização de solventes orgânicos, dessa forma, é especialmente utilizada para a encapsulação de células vivas imobilizadas (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA, AMINABHAVI, 2004; PATIL et al., 2010).

As esferas produzidas por extrusão, de modo geral apresentam diâmetros que variam entre 500 µm a 3 mm, sendo que o tamanho das partículas obtidas depende dos parâmetros da solução de alginato, como, viscosidade e concentração. O tamanho do diâmetro da agulha usada ao gotear a solução, e a distância entre a seringa e a solução de cloreto de cálcio são fatores que também exercem influência no tamanho das esferas (BUREY et al., 2008; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990). Deste modo, segundo Gacesa (1988) a utilização de agulhas com diâmetro maior, soluções de maior viscosidade e de elevadas concentrações produzirão, conseqüentemente, partículas maiores.

### **3.4 COBERTURAS COMESTÍVEIS**

Filmes e coberturas comestíveis têm sido utilizados a fim de auxiliar no aumento da vida de prateleira dos alimentos, além disso, destacam-se por proporcionar maior liberdade de manuseio e comercialização dos alimentos revestidos (LUVIELMO; LAMAS, 2013).

Difundidas amplamente em frutas e hortaliças, inteiras ou na forma minimamente processada, essas coberturas atuam de forma a contribuir para a preservação da textura e do valor nutricional, reduzindo as trocas gasosas superficiais e a perda ou ganho excessivo de água (ASSIS; BRITTO, 2014; WONG; CAMIRAND; PAVLATH, 1994), atuando também como carreadores de compostos antimicrobianos e antioxidantes (LUVIELMO; LAMAS, 2013), ou até mesmo como carreadores de culturas probióticas (LACEY et al., 2012; TAPIA et al., 2007).

De acordo com a composição da cobertura são obtidas diferentes funcionalidades e propriedades mecânicas (ASSIS; BRITTO, 2014; TAVARES et al., 2014), e uma vez aplicadas ou formadas sobre superfície de frutas ou hortaliças esses revestimentos comestíveis não devem alterar as características sensoriais e possuir boa aderência. Dentre os compostos mais utilizados na elaboração desses revestimentos comestíveis estão as proteínas, lipídios, polissacarídeos ou a combinação dos mesmos (VICENTINO et al., 2011; WONG; CAMIRAND; PAVLATH, 1994). Para tanto, Assis e Britto (2014) determinam que a escolha da matéria-prima utilizada para confecção da cobertura depende das características do produto revestido e do principal objetivo pretendido com o revestimento aplicado.

No Brasil, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) não descreve uma legislação específica para revestimentos comestíveis. Assim, Luvielmo e Lamas (2013) embasados no Decreto 55.871, de 26 de março de 1965; Portaria nº 540 – SVS/MS, de 27 de outubro de 1997 e na Resolução CNS/MS nº 04, de 24 de novembro de 1998, definem que esses revestimentos são considerados ingredientes quando melhoram a qualidade nutricional do produto, ou aditivos, quando não incrementam o seu valor nutricional. Em contrapartida, segundo o *Food and Drug Administration* essas coberturas passam a fazer parte do alimento, e os materiais utilizados para sua formação devem ser considerados GRAS (*Generally Recognized as Safe*), não apresentando toxicidade e seguros para o uso em alimentos (FDA, 2015).

### **3.5 POLÍMEROS NATURAIS EM COBERTURAS COMESTÍVEIS**

Segundo Luvielmo e Lamas (2013), polissacarídeos são materiais naturalmente hidrofílicos e a afinidade desses polímeros por água está associada à predominância de grupos altamente polares, como hidroxilas.

Este caráter hidrofílico é elucidado por Assis e Britto (2014) onde os autores destacam que estes polímeros possuem materiais com estruturas nas quais há a predominância de grupos amino ou hidroxila e carboxila (OH, COO<sup>-</sup>, NH<sub>3</sub>) caracterizados por ligações covalentes polares. Devido às características desses grupos, a cadeia carbônica apresenta sítios parcialmente carregados positivamente

e outros carregados negativamente. Estas particularidades favorecem o acúmulo e o rearranjo de moléculas polares, principalmente da água em torno desses sítios. Dentre os polissacarídeos com tal estrutura estão: celulose, quitina, gomas, pectina, amido, carboximetilcelulose, quitosana, alginato, dentre outros. Em geral, estes materiais hidrofílicos apresentam boa solubilidade em meio aquoso, favorecendo a dispersão do soluto e a formação mais homogênea do filme, ainda de acordo com sua estrutura química podem formar géis ou até mesmo requerer alterações químicas para uma completa solubilização (ASSIS; BRITTO, 2014).

Presentemente, inúmeros estudos relatam a aplicação de filmes e coberturas comestíveis à base de polissacarídeos na tecnologia de preservação de frutas e hortaliças. As coberturas formuladas a partir desses polímeros apresentam boa resistência a trocas gasosas, podendo atuar na redução da taxa de escurecimento enzimático que ocorre devido à ação das polifenoloxidasas, comumente presentes nesses alimentos (LUVIELMO; LAMAS, 2013). Para mais, a utilização de revestimentos de polissacarídeos em frutos e hortaliças pode contribuir para uma melhoria no aspecto visual conferindo brilho e transparência (OLIVEIRA; GRDEN; RIBEIRO, 2007).

Estes polímeros são conhecidos ainda por sua capacidade de proteção aos probióticos, sendo utilizados amplamente em técnicas de microencapsulação, melhorando a sobrevivência celular de micro-organismos encapsulados (LAURENTI; GARCIA, 2013; RATHORE et al., 2013; SATHYABAMA et al., 2014). Esta propriedade proporciona que polissacarídeos sejam utilizados na elaboração de coberturas comestíveis adicionadas de cepas probióticas, a fim de que a cobertura atue como veículo e suporte destes micro-organismos, como evidenciado por Tapia et al. (2007).

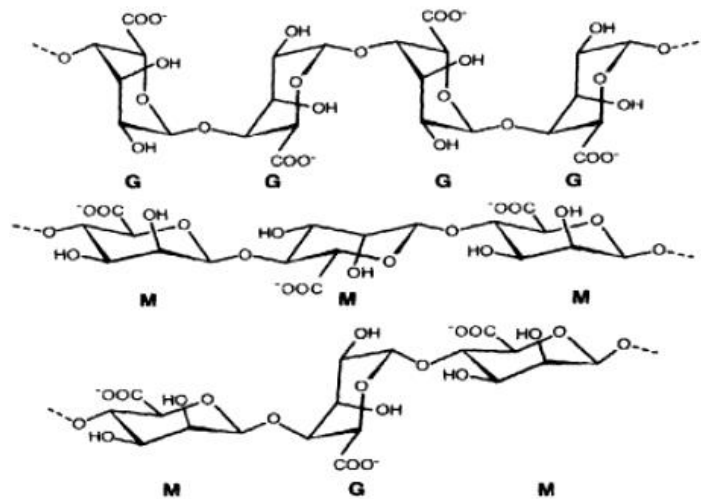
### **3.5.1 Alginato**

Comercialmente disponíveis na forma de sais de sódio do ácido algínico (GLICKSMAN, 1982), alginatos são polímeros lineares de alto peso molecular encontrados na parede celular e espaço intracelular de algas marrons (DAMODARAN; KIRK; FENNEMA, 2010). A extração desse polissacarídeo ocorre

através de tratamento com solução alcalina, usualmente hidróxido de sódio, onde o alginato é convertido em alginato de sódio, que por sua vez, tem como uma das principais propriedades a formação de gel (GACESA, 1988; QIN, 2008).

O alginato apresenta estrutura química na forma de um ácido polimérico linear composto por ligações do tipo  $\alpha - 1,4$  constituído por três tipos de segmentos de polímeros: poli- $\beta$ -D-ácido manurônico, poli- $\alpha$ -L-ácido gulurônico e segmentos com resíduos alternados de ácido  $\beta$ -D-manurônico (M) e  $\alpha$ -L-gulurônico (G), que podem estar em blocos únicos (M) ou (G), ou alternados (MG) (Figura 1) (GACESA, 1988; KING, 1983; ONSOYEN, 1997; QIN, 2008).

**Figura 1** – Estrutura química dos blocos MM, GG, G/M e M/G presentes no alginato.



Fonte: QIN, 2008.

Um dos fatores que determina a razão entre as unidades M:G e a quantidade dos três segmentos poliméricos é a fonte de obtenção do polímero, que conseqüentemente pode apresentar propriedades diferentes. Os alginatos com maior porcentagem de blocos-G, formam géis mais rígidos, no entanto quebradiços. Já os de maior percentual de blocos-M são menos rígidos e apresentam maior flexibilidade (GACESA, 1988).

A oscilação na força do gel é dependente também da concentração do polímero, da temperatura, do pH e da presença de cátions di ou multivalentes que

formam ligações iônicas intermoleculares com os blocos polianiônicos (GACESA, 1988). Os íons de cálcio são considerados os de maior eficácia na gelificação dos revestimentos à base de alginato, porém, ainda podem ser utilizados íons de magnésio, manganês, alumínio e ferro.

Atualmente, os estudos sobre coberturas à base de alginato de sódio utilizando a metodologia de gelificação com cálcio continuam em destaque. Nesse método ocorre a imersão do alimento em solução de cálcio bivalente, ou a pulverização dessa solução, sobre a camada de alginato previamente formada no alimento (MASTROMATTEO; CONTE; DEL NOBILE, 2012; TAPIA et al., 2007; TRIGO et al., 2012).

No Brasil a Resolução nº 386 de 05 de agosto de 1999, embasada na avaliação toxicológica da FAO (*Food and Agriculture Organization of the United Nations*) que indicou valores de Ingestão Diária Recomendada (IDA) como “não especificada” para inúmeros aditivos, incluindo o alginato, estabelece que este polímero pode ser utilizado em quantidades “*quantum satis*”, ou seja, quantidades suficientes para que se obtenha o efeito tecnológico necessário (BRASIL, 1999).

### 3.5.2 Mucilagens

Largamente encontradas na natureza, as mucilagens podem ser de origem vegetal, animal ou microbiana, e a composição de cada mucilagem é diferente, tendo em sua constituição diversos tipos de polissacarídeos que lhes atribuem diversas funções (RENARD et al., 2012).

Quando de origem vegetal, as mucilagens são polímeros complexos hidrofílicos oriundos da fração polissacarídica das plantas, de alto peso molecular e utilizados como ingredientes funcionais na indústria de alimentos (CONCEIÇÃO, 2013).

A distinção entre mucilagens e gomas não está completamente elucidada, porém, Araujo et al. (2009) sugerem que as mucilagens são polissacarídeos pouco ramificados que compõem a parede das células vegetais, sendo normalmente encontrados no interior de sementes e nas algas. Os autores apontam que a

provável diferença entre gomas e mucilagens está nas suas características de solubilidade, onde gomas se dissolvem rapidamente e mucilagens formam massas viscosas.

Segundo Jani et al. (2009) mucilagem pode ser definida ainda como substância translúcida, amorfa e polimérica, formada por unidades de polissacarídeos. Visto que são compostos heterogêneos, a hidrólise da mucilagem libera uma mistura de açúcares dentre eles, arabinose, galactose, glicose, manose, xilose, além de ácidos urônicos; em consequência de seus grupos hidrofílicos estas mucilagens podem combinar com a água e formar géis. Cárdenas, Higuera-Ciapara e Goycoolea (1997) sugerem que a fração solúvel presente nas mucilagens tem a capacidade de formar géis na presença de sais de cálcio e magnésio, técnica semelhante a utilizada no processo de extrusão de revestimentos comestíveis à base de alginato de cálcio.

No âmbito de ciências de alimentos, mucilagens têm sido utilizadas em técnicas de microencapsulação, com função de proteção e liberação controlada de probióticos (LAURENTI; GARCIA, 2013; YING et al., 2007). Paralelamente existem pesquisas que envolvem mucilagens na elaboração de filmes comestíveis ou biodegradáveis, visando aumentar a vida de prateleira dos produtos revestidos (DEL-VALLE et al., 2005; DICK, 2014).

### **3.5.2.1 Mucilagem de quiabo (*Abelmoschus esculentus*)**

O quiabo (*Abelmoschus esculentus*), da família das Malváceas, é originário da Etiópia (África oriental) e típico de clima tropical. Atualmente o quiabo apresenta grande importância comercial e devido a isso é cultivado em praticamente todas as áreas tropicais e subtropicais ao redor do mundo (SEYFRIED, 2014; SILVA, 2006).

Quanto à composição de macro-componentes a mucilagem do quiabo apresenta quantidade de açúcares totais superior a 50 % (Tabela 1).

**Tabela 1** – Composição centesimal\* da mucilagem do quiabo liofilizado.

Macro-componente	Valores (g/100g de amostra)
Proteína	17,63
Lipídio	4,31
Cinzas	7,53
Fibra Alimentar Solúvel	20,45
Açúcares Totais	50,08

\*Resultados expressos em base seca

Fonte: Silva (2006).

Em 1954, Whistler e Conrad realizaram uma das primeiras caracterizações de polissacarídeos presentes na mucilagem do quiabo. O produto obtido através de extrações aquosas foi caracterizado como uma molécula ácida, composta D-galactose, L-rhamnose, D-ácido galacturônico. E através da hidrólise ácida parcial, obtiveram D-galactobiose (1→4) ligadas e 2-O-(D-ácido galacturônico)-L-rhamnose (SEYFRIED, 2014).

Em estudos datados mais recentemente, foi sugerido que a mucilagem presente no quiabo é um polissacarídeo composto por unidades de rhamnose, ácido galacturônico, galactose, glucose e ácido glucurônico, todos na forma piranosídica (DETERS; LENGSELD; HENSEL, 2005; LENGSELD et al., 2004).

Na ciência de alimentos a mucilagem do quiabo vem sendo aplicada como emulsificante e agente anti-espumante (MISHRA, 2007). Recentemente, este polímero foi explorado como agente encapsulante de probióticos (LAURENTI; GARCIA, 2013).

Silva (2006) relata a efetividade da mucilagem do quiabo sobre o crescimento de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-5, uma vez que estes foram inoculados em meio de cultura enriquecido com mucilagem. Para tanto, a composição destas mucilagens pode favorecer a adaptação e crescimento de probióticos.

### 3.5.2.2 Mucilagem de linhaça (*Linum usitatissimum*)

A linhaça (*Linum usitatissimum*) pertence à família das Lináceas sendo utilizada para consumo humano e animal. Os primeiros registros históricos da linhaça relatam seu aparecimento em 9000-8000 a.C. no Irã, Turquia, Síria e na Jordânia (NOVELLO; POLLONIO, 2011).

Atualmente o Canadá destaca-se como um dos maiores produtores mundiais de linhaça, seguido por Estados Unidos, Índia, China, Ucrânia, Rússia, Bélgica, França e Alemanha. No Brasil, a linhaça é produzida, principalmente, no noroeste gaúcho (NOVELLO; POLLONIO, 2011).

A linhaça possui em sua composição elevado teor de fibra alimentar solúvel (6 a 11g/100g) e devido à sua alta capacidade de hidratação, esta fibra é denominada mucilagem (MONEGO, 2009; NOVELLO; POLLONIO, 2011). A composição centesimal da mucilagem obtida a partir do grão de linhaça está descrita na Tabela 2.

**Tabela 2** – Composição centesimal\* da mucilagem do grão de linhaça.

Macro-componente	Valores (%)
Fibra Total	85,7
<i>Fibra Solúvel</i>	73,21
<i>Fibra Insolúvel</i>	11,67
Umidade	7,23
Cinzas	6,24
Gordura	0,18
Proteína	6,22
Carboidratos	6,88

\*Resultados expressos em base seca

Fonte: Monego (2009).

Segundo Wannerberger, Nylander e Nyman (1991) estão presentes na linhaça polissacarídeos neutros e ácidos, dentre eles ácido galacturônico (21-36 %), xilose (19-38 %), rhamnose (11-16 %), galactose (12-16 %), arabinose (8-13 %) e glicose (4-6 %).

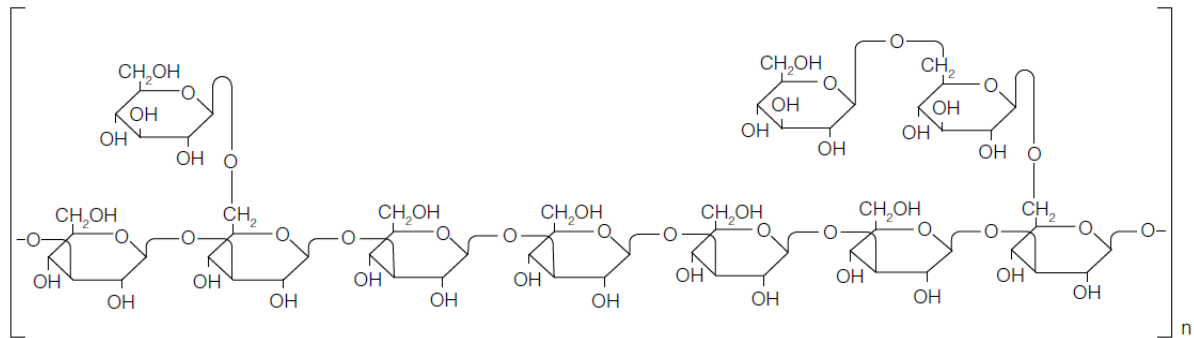
Monego (2009) destaca que a goma do grão possui alta capacidade de hidratação e viscosidade estável na faixa de pH 4 a 6, tornando possível sua aplicação como agente hidrocolóide em alimentos. Essa capacidade ainda possibilita o emprego da mucilagem de linhaça na formação de géis. Segundo Chen, Xu e Wang (2006) a incorporação de pequenas quantidades de  $\text{CaCl}_2$  (<0,3 % p/v) pode aumentar a força dos géis formados.

Laurenti e Garcia (2013) investigaram a capacidade da mucilagem de linhaça como material encapsulante na manutenção e liberação controlada de células probióticas em testes de digestão *in vitro*. Os autores evidenciaram que as cápsulas à base de mucilagem de linhaça demonstraram ser um eficiente material encapsulante, mantendo 27 % do material encapsulado no interior da matriz.

### 3.5.3 Botriosferana

O botriosferana é um exopolissacarídeo (EPS) produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 relatado pela primeira vez por Dekker e Barbosa (2001). Através de caracterização química, este EPS teve sua estrutura determinada como (1→3, 1→6)- $\beta$ -D-glucana com aproximadamente 22 % de ramificação em C-6 por resíduos glucosídicos e gentiobiosídicos (Figura 2), ocorrendo desta forma quando o micro-organismo é cultivado em glucose como única fonte de carbono (BARBOSA et al., 2003). Em contrapartida, Steluti et al. (2004) e Corradi da Silva et al. (2005) salientam que essa  $\beta$ -D-glucana pode ser produzida pelo mesmo micro-organismo em outras fontes de carbono de forma que embora a cadeia principal seja a mesma, o grau de ramificação sofre variações que podem influenciar diretamente em alterações na viscosidade das soluções formadas pelo EPS.

**Figura 2** – Botriosferana:  $\beta$ -(1  $\rightarrow$  3,1  $\rightarrow$  6)-D-glucana.



Fonte: Bongiovanni et al. (2009).

No segmento biotecnológico a aplicação de moléculas produzidas por micro-organismos (EPS) desperta o interesse de pesquisadores de diversas áreas, uma vez que estes EPS apresentam uma variedade de aplicações nas indústrias farmacêuticas, alimentícias e de cosméticos (MAHAPATRA; BANERJEE, 2013).

EPS microbianos são conhecidos por suas propriedades espessantes, estabilizantes, emulsificantes, além da capacidade de formar géis (ROBERTS; KIMMEL; ZIEGLER, 1998). Um exemplo de aplicabilidade destes EPS é a pululana, uma  $\alpha$ -glucana produzida pelo *Aerobasidium pullulans*, que segundo Sutherland (1998) forma filmes solúveis em água e com baixa permeabilidade ao oxigênio, possibilitando sua aplicação com finalidade de revestir alimentos, retendo o sabor e aparência.

É inegável, segundo suas propriedades, que soluções filmogênicas à base de EPS podem apresentar capacidade de suporte a fármacos e também probióticos. Para probióticos estes filmes além de suporte, podem apresentar capacidade de proteção às células. Entretanto, ao se tratar de EPS botriosferana produzido pelo fungo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 a literatura apresenta carência de pesquisas relacionadas com a aplicação deste EPS na elaboração de filmes, ou ainda de microesferas carreadores de células probióticas, abrindo possibilidades para pesquisas deste segmento.

### 3.6 AGENTES PLASTIFICANTES

Os plastificantes são utilizados na confecção de revestimentos comestíveis a fim de melhorar suas propriedades. A influência desses aditivos nessas propriedades depende de fatores como concentração, grau de dispersão e interação com o polímero do revestimento (KESTER; FENNEMA, 1986).

Revestimentos comestíveis por vezes são desenvolvidos e aplicados em frutas e hortaliças, que por serem matrizes vivas, são susceptíveis de sofrerem processos fisiológicos que acarretam pequenas alterações de volume e textura, portanto é de interesse que os revestimentos apresentem uma flexibilidade mínima suficiente para adaptarem-se a essas alterações sem geração de danos estruturais (ASSIS; BRITTO, 2014).

Dick (2014) destaca que os agentes plastificantes podem modificar benéficamente as propriedades dos revestimentos como, por exemplo, as propriedades mecânicas, sensoriais e de proteção. Estes plastificantes podem reduzir as forças intra-moleculares, suavizar a rigidez estrutural do revestimento e aumentar a mobilidade entre as cadeias biopoliméricas.

Dentre os plastificantes mais usualmente utilizados estão os polióis, como o glicerol, o polietilenoglicol e o sorbitol (ASSIS; BRITTO, 2014). O glicerol é líquido, possui caráter hidrofílico devido à presença de grupos hidroxila em sua composição, e possibilita uma maior interação com polímeros tipicamente utilizados no desenvolvimento de revestimentos (DICK, 2014).

Assis e Britto (2014) destacam que a utilização de agentes plastificantes deve ser feita de maneira controlada, considerando que a presença desses agentes na matriz polimérica pode não apenas alterar propriedades mecânicas, mas também interferir na molhabilidade e na permeação do revestimento. Os autores justificam que a redução das forças intra-moleculares facilita o movimento relativo das cadeias, e em grandes quantidades, os agentes plastificantes promovem a elevação do espaço entre as cadeias e a difusão facilitada de gases. Estes espaços ainda proporcionam a penetração de moléculas de água para o interior dos revestimentos, o que ocasiona solvatação em alguns sítios polares, provocando o aumento da cobertura. Portanto, estas alterações reduzem as propriedades de barreira e

aderência, podendo ainda favorecer a multiplicação de fungos, inviabilizando o uso da formulação como cobertura protetora.

### **3.7 AGENTES SURFACTANTES**

Surfactantes são substâncias anfífilas, ou seja, tem caráter hidrofílico e hidrofóbico. Usualmente são aplicados na elaboração de filmes e revestimentos hidrofílicos com a intenção de melhorar as propriedades de barreira e de umidade dos revestimentos (CHEN; KUO; LAI, 2009).

Dentro da gama de agentes surfactantes está o Polissorbato 80, conhecido como *tween* 80 (polioxietileno sorbitano monooleato), que é um importante surfactante hidrofílico, não iônico, que apresenta em sua estrutura um ácido graxo monoinsaturado (TAOKA et al., 2011).

A utilização do *tween* 80 tem sido amplamente difundida. Sendo principalmente utilizado como aditivo alimentício e na indústria farmacêutica, onde atua como emulsificante, agente dispersante e estabilizante. As emulsões produzidas com *tween* 80 apresentam boa estabilidade, fina textura e resistência às mudanças de pH (DAHER; BAROODY; HOWLAND, 2003).

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 MATERIAL

#### 4.1.1 Probióticos: *Lactobacillus casei* LC-01 e *Lactobacillus casei* BGP 93

Foram utilizadas culturas probióticas liofilizadas de *Lactobacillus casei* LC-01 e *Lactobacillus casei* BGP 93 cedidas pela Chr. Hansen e Sacco Brasil, respectivamente.

#### 4.1.2 Materiais encapsulantes e constituintes da cobertura comestível

Dentre os polímeros naturais, foram utilizadas soluções de mucilagens provenientes de quiabo adquirido diretamente com o produtor local no CEASA (Unidade de Londrina – PR) da variedade Santa Cruz 47 e linhaça preta adquirida em farmácia de manipulação local. Também foi utilizado, alginato de sódio (Dinâmica, Brasil), solução contendo o exopolissacarídeo (EPS) Botriosferana (0,82 mg/L) do tipo  $\beta$ -D-glucana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 e fruto-oligossacarídeo (Anexo 1) gentilmente cedidos pelo Departamento de Química da Universidade Estadual de Londrina e Orafiti Chile S.A, respectivamente.

Como agentes plastificantes e surfactantes foram utilizados glicerol (Sigma, Alemanha) e *tween* 80 (Vetec, Brasil).

#### 4.1.3 Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)

Foram utilizados tubérculos de yacon (*Smallanthus sonchifolius*), adquiridos diretamente no CEASA (Unidade de Londrina – PR).

## 4.2 MÉTODOS

### 4.2.1 Extração das mucilagens

As mucilagens de quiabo e linhaça foram extraídas segundo adaptação da metodologia proposta por Lima (2007). O quiabo foi cortado em fatias finas e processado em liquidificador doméstico por 15 segundos.

Cem gramas de cada produto foram mantidos em água destilada a temperatura ambiente durante 2 horas. Decorrido este período o volume foi corrigido para 1 litro removendo-se os resíduos presentes com auxílio de peneira (Mesh 100) para obtenção da mucilagem. Os teores de sólidos solúveis dessas mucilagens foram padronizados para 0,3 °Brix através de processo de diálise contra água destilada.

As mucilagens foram armazenadas à temperatura de  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o momento de uso, sendo utilizadas em um período não superior a 24 horas.

### 4.2.2 Microencapsulação dos probióticos utilizando polímeros naturais

A técnica de microencapsulação utilizada para a produção das microesferas de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 foi a de extrusão em cloreto de cálcio (Fmaia, Brasil) adaptada de Krasaekoopt e Watcharapoka (2014).

Os probióticos liofilizados *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 foram encapsulados em diversas combinações de matrizes poliméricas de acordo com a Tabela 3.

**Tabela 3** – Composição das soluções poliméricas utilizadas no processo de microencapsulação dos probióticos.

Trat.	Alginato de Sódio	Mucilagem de Quiabo	Mucilagem de Linhaça	Botriosferana	FOS	<i>L. casei</i> LC-01	<i>L. casei</i> BGP 93
<b>M1</b>	X	X			X	X	
<b>M2</b>	X		X		X	X	
<b>M3</b>	X			X	X	X	
<b>M4</b>	X				X	X	
<b>M5</b>	X	X				X	
<b>M6</b>	X		X			X	
<b>M7</b>	X			X		X	
<b>M8</b>	X					X	
<b>M9</b>	X	X			X		X
<b>M10</b>	X		X		X		X
<b>M11</b>	X			X	X		X
<b>M12</b>	X				X		X

\*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %); glicerol (0,5 %).

\*\*Soluções de mucilagens utilizadas foram padronizadas para 0,3 °Brix.

\*\*\*Solução de Botriosferana 0,82 mg/L.

Fonte: o próprio autor.

O método de elaboração das soluções destinadas para o processo de microencapsulação foi similar para todos os tratamentos.

O alginato de sódio 2 % (m/v) foi dissolvido de acordo com a composição de cada tratamento, em água destilada, em solução de mucilagem (quiabo ou linhaça) ou em solução do EPS botriosferana, todas previamente aquecidas a 70 °C, e levadas ao agitador mecânico (MA 102, Marconi, Brasil) a 1820 xg para completa dissolução. Posteriormente em todos os tratamentos foi adicionado o glicerol 0,5 % (m/v) e *tween* 80 0,1 % (m/v). Os tratamentos M1, M2, M3, M4, M9, M10, M11 e M12 contaram também com adição de FOS 1,5 % (m/v).

As soluções foram novamente homogeneizadas em agitador mecânico (MA 102, Marconi, Brasil) a 1820 xg por 2 minutos e submetidas ao processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos (MOAYEDNIA et al., 2010).

Ao final do processo de esterilização e posterior resfriamento das soluções poliméricas a 42 °C, as culturas probióticas foram adicionadas de maneira asséptica e em quantidades conhecidas 1 % (m/v), e as soluções brevemente

homogeneizadas com auxílio de espátulas estéreis. Todas as soluções poliméricas foram carreadoras de bactérias probióticas.

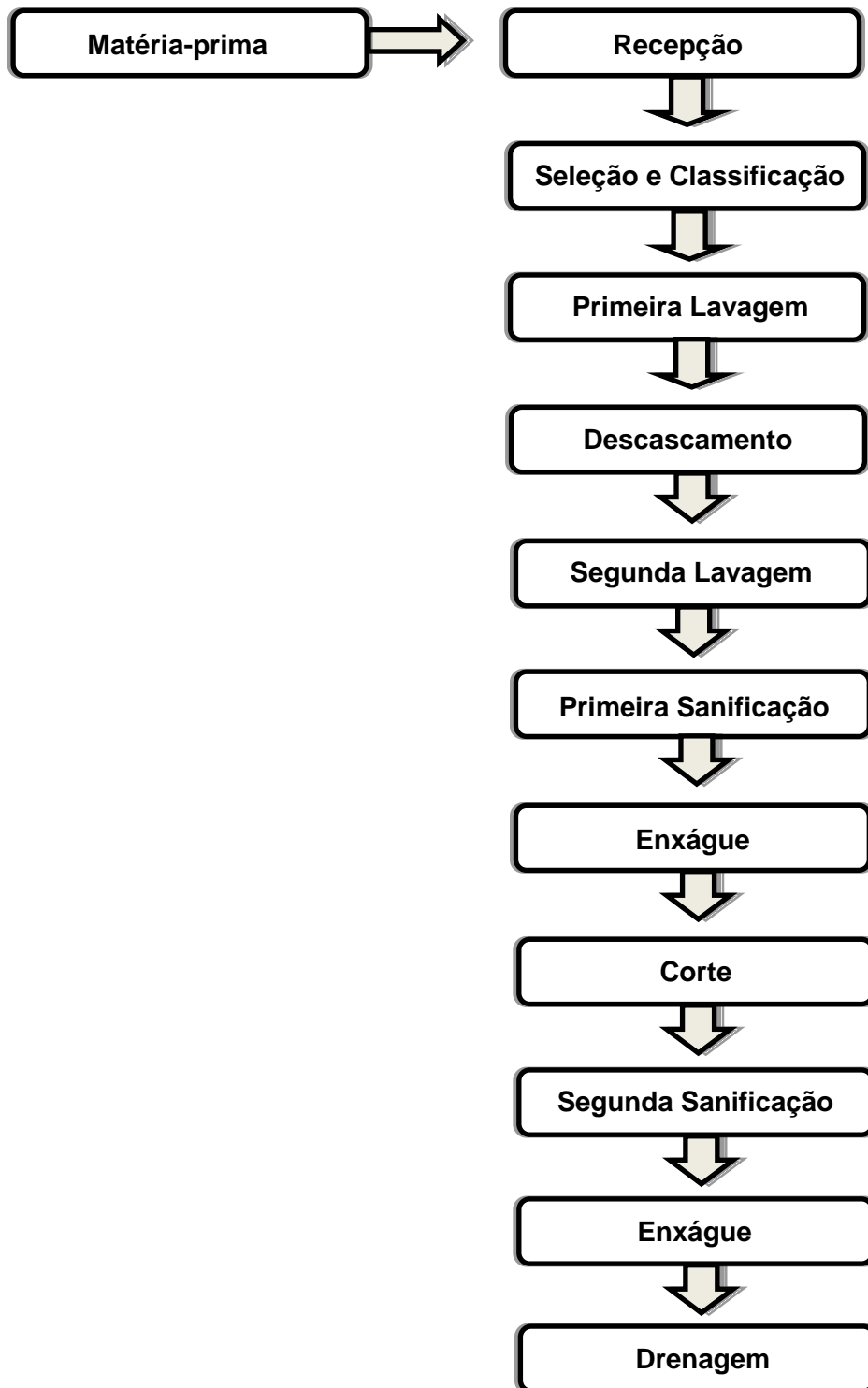
Após a inoculação, as soluções foram acondicionadas em seringas estéreis com diâmetro de 1 mm e gotejadas em solução também estéril de cloreto de cálcio (2 % m/v), onde permaneceram por 10 minutos, para obtenção de microesferas pelo processo de extrusão (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014). As microesferas obtidas foram armazenadas sob refrigeração a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  em solução estéril de água peptonada (0,1 % m/v) e submetidas à análise de viabilidade celular, de determinação do tamanho médio através de análise com paquímetro e simulação gastrointestinal *in vitro*.

#### **4.2.3 Processamento mínimo do yacon (*Smallanthus sonchifolius*)**

Os tubérculos de yacon foram encaminhados para o Laboratório de Processamento e Análise Sensorial de Alimentos da Universidade Estadual de Londrina – UEL, onde foram acondicionados sob refrigeração a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$  até o processamento.

O processamento mínimo constitui-se das etapas descritas por Silva et al. (2011) com adaptações, conforme o esquema ilustrado na Figura 3.

**Figura 3** – Fluxograma do processamento mínimo de yacon.



Fonte: Adaptado de Silva et al. 2011.

Após o recebimento, a matéria-prima passou por processo de primeira lavagem com detergente neutro e água corrente.

A etapa do descascamento foi realizada com o auxílio de descascador manual e facas de aço-inoxidável, a fim de que fosse removida toda a casca do tubérculo, posteriormente, o yacon foi submetido à segunda lavagem em água corrente e em seguida ao primeiro processo de sanificação através da imersão do tubérculo descascado em água gelada e clorada (200 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total) por um período de 10 minutos.

Em seguida, o yacon descascado e higienizado foi para etapa do corte, utilizando cortador *Perfect Dicer Advanced* (Polishop, Brasil) e facas de aço-inoxidável, com a finalidade de produzir cubos de yacon com medidas de 1 cm X 1 cm. Estes cubos seguiram para um segundo processo de sanificação, onde foram mergulhados em água gelada e clorada (100 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total) por um período de 10 minutos; e, posteriormente, imersos novamente em água gelada e clorada (3 mg.L<sup>-1</sup> de cloro residual total) por mais 5 minutos (enxágue) para a retirada do excesso de cloro (SILVA et al.; 2011). Ao final destas etapas, com exceção do controle amostral (C), os cubos de yacon foram imersos em solução estéril de ácido ascórbico 1,5 % (m/v) (Dinâmica, Brasil) por 5 minutos.

Posteriormente, a drenagem foi realizada com auxílio de peneiras de aço-inoxidável previamente sanificadas. Todo o procedimento ocorreu em ambiente higienizado e seguindo as boas práticas de fabricação.

#### **4.2.4 Coberturas comestíveis**

Com as condições previamente estabelecidas e selecionadas a partir do item 4.2.2, foram elaboradas duas soluções filmogênicas com a finalidade de produzir coberturas comestíveis para serem aplicadas nos tubérculos de yacon minimamente processados de acordo com a Tabela 4.

**Tabela 4** – Composição das coberturas comestíveis carreadoras de *L. casei* LC-01 utilizadas para recobrir o yacon minimamente processado.

TRATAMENTO	Alginato de Sódio	Mucilagem de Linhaça
CAP <sup>1</sup>	X	
CLP <sup>2</sup>	X	X

\*Em todos os tratamentos foi adicionado alginato de sódio (2 % m/v), glicerol (0,5 % m/v), tween 80 (0,1 % m/v), FOS (1,5 % m/v) e cultura probiótica *L. casei* LC-01 (1 %).

<sup>1</sup> O alginato de sódio e os demais constituintes foram dissolvidos em água destilada aquecida a 70 °C.

<sup>2</sup> O alginato de sódio e os demais constituintes foram dissolvidos em solução de mucilagem de linhaça preta padronizada para 0,3 °Brix aquecida a 70 °C.

Fonte: o próprio autor.

O método de preparo das soluções filmogênicas foi igual ao aplicado para produzir as soluções utilizadas nas técnicas de microencapsulação por extrusão descritas no item 4.2.2

A solução 1 (CAP) foi formulada à base de alginato de sódio 2 % (m/v), glicerol 0,5 % (m/v), *tween* 80 0,1 % (m/v) e FOS 1,5 % (m/v). O alginato de sódio previamente dissolvido em água destilada aquecida a 70 °C e levado ao agitador mecânico (MA 102, Marconi, Brasil) a 1820 xg para completa dissolução. Posteriormente foi adicionado o glicerol, *tween* 80 e FOS quando a solução foi novamente homogeneizada por 2 minutos.

A solução 2 (CLP) foi preparada de maneira similar à solução 1. Entretanto, o alginato de sódio foi dissolvido em solução de mucilagem de linhaça preta com teor de sólidos solúveis totais padronizado para 0,3 °Brix previamente aquecida a 70 °C e levado ao agitador mecânico (MA 102, Marconi, Brasil) a 1820 xg para completa dissolução. Glicerol, *tween* 80 e FOS, foram posteriormente adicionados e a solução homogeneizada novamente por 2 minutos.

Todas as soluções foram submetidas ao processo de esterilização em autoclave a 121 °C por 15 minutos (MOAYEDNIA et al., 2010). Após o resfriamento a 42 °C a cultura probiótica liofilizada de *L. casei* LC-01 foi inoculada na concentração de 1 % (m/v) de maneira asséptica.

#### 4.2.5 Distribuição dos tratamentos e aplicação das coberturas comestíveis sobre yacon minimamente processado

Yacon minimamente processado preparado de acordo com metodologia descrita no item 4.2.4 foi distribuído em quatro tratamentos distintos de acordo com a Tabela 5.

**Tabela 5** – Distribuição dos tratamentos de yacon minimamente processado.

TRATAMENTO	Yacon	Alginato 2 % (m/v)	Mucilagem de Linhaça 0,3 °Brix	Tratamento com Ácido Ascórbico
<b>C</b>	X			
<b>CAS</b>	X			X
<b>CAP</b>	X	X		X
<b>CLP</b>	X	X	X	X

\*Os tratamentos de cobertura comestível (CAP e CLP) contaram com adição em sua formulação de *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %), FOS (1,5 %) e cultura probiótica 1 % (*L. casei* LC-01).

Fonte: o próprio autor.

O método de aplicação de cobertura comestível (amostras CAP e CLP), consistiu em uma primeira imersão dos cubos de yacon minimamente processados (1 cm x 1 cm) nas soluções poliméricas por 2 minutos, e em seguida uma segunda imersão em solução de cloreto de cálcio (2 %) por 10 minutos a fim de promover o *crosslinking*, fortalecendo o gel e conseqüentemente proporcionando a formação da cobertura comestível sobre o yacon minimamente processado. Decorrido o período na solução do agente *crosslinking* o vegetal minimamente processado foi depositado em peneiras de aço inoxidável previamente higienizadas com a finalidade de retirada do excesso de água adquirido no processo. Posteriormente o produto já revestido foi acondicionado em embalagens de polipropileno (PP) com tampa perfurada (Copobras, Brasil), que tinham finalidade de atuar apenas como proteção, e não interagir com o produto.

As embalagens foram acondicionadas em estufa B.O.D (MA 415 15, Marconi, Brasil) 5 °C ± 2 °C por um período de 15 dias e submetidas às análises físico-químicas e microbiológicas. Imediatamente antes da embalagem foi determinada a espessura do revestimento medindo-se com paquímetro (n = 30) e posteriormente calculadas as médias.

Foram armazenadas nas mesmas condições amostras de yacon minimamente processado tratadas apenas com ácido ascórbico (CAS) e amostras sem nenhum tratamento, estas, utilizadas como controle amostral (C).

#### 4.2.5.1 *Parâmetros físico-químicos*

Foram executadas análises de perda de massa fresca, umidade, cor, pH, acidez total e sólidos solúveis totais nas amostras de yacon minimamente processado. Estas, conduzidas no Laboratório de Físico-Química da Universidade Estadual de Londrina (UEL).

As amostras foram trituradas utilizando triturador do tipo mixer (DHB 200-11, Carrefour Discont, Brasil). Todas as análises foram feitas em triplicata nos períodos 1, 3, 6, 9, 12 e 15 de armazenamento (exceto perda de massa fresca que foi realizada diariamente).

##### 4.2.5.1.1 *Perda de massa fresca*

Bandejas previamente taradas foram utilizadas para estocagem das amostras, e submetidas à pesagem no período 1 de armazenamento. O controle deste parâmetro foi efetuado diariamente durante todo o período de estocagem. As amostras foram pesadas em balança semi-analítica (M1702, Bel. Engineering, Brasil). As bandejas foram previamente taradas para serem utilizadas na estocagem das amostras.

A porcentagem de perda de massa fresca devido à possível respiração e transpiração do yacon minimamente processado foi calculada pela seguinte equação (Eq.1):

$$Perda\ de\ massa\ fresca = \left[ 1 - \left( \frac{Massa\ final}{Massa\ inicial} \right) \right] \times 100 \quad Eq. 1$$

#### 4.2.5.1.2 *Umidade*

O controle da umidade foi determinado por adaptação do método gravimétrico: Sólidos totais em Frutas e Produtos de Frutas, segundo normas oficiais da AOAC (2005) n° 920.151. Foi utilizado estufa de secagem (311 CG, Fanem, Brasil) a 70 °C para secagem de aproximadamente 5 gramas de amostra até o peso constante (BIERHALS, 2010).

#### 4.2.5.1.3 *Cor*

Para o controle do parâmetro de cor foi utilizado colorímetro (Chromameter CR-400 Sensing, Konica Minolta, Japão) operando no sistema CIELab, previamente calibrado em superfície branca.

A luminosidade ( $L^*$ ) é um parâmetro que pode variar de zero (preto) a cem (branco), e as leituras dos parâmetros  $a^*$  e  $b^*$  permitem calcular o ângulo Hue, ou seja, tonalidade ou matiz da cor através da equação 2 (CHIUMARELLI et al., 2011; TRIGO et al., 2012), além de indicar possível escurecimento nas amostras de yacon minimamente processado.

$$h^* = \arctan\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad \text{Eq. 2}$$

#### 4.2.5.1.4 *pH*

A determinação foi realizada segundo o método n° 981.12 da AOAC (HORWITZ, 2005).

#### 4.2.5.1.5 *Acidez total titulável (ATT)*

A acidez total titulável foi determinada segundo o método n° 942.15 da AOAC (HORWITZ, 2005). E os resultados expressos em % de ácido málico, que é predominante na yacon (PEREIRA et al., 2013).

#### 4.2.5.1.6 *Sólidos solúveis totais (SST)*

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por leitura direta em refratômetro digital (PAL-BX/RI, ATAGO, JAPÃO) de acordo com o método nº 932.12 da AOAC (HORWITZ, 2005).

### 4.2.6 **Parâmetros microbiológicos**

#### 4.2.6.1 ***Viabilidade celular do probiótico***

Foram realizadas em triplicata análises a fim de determinar o número de células viáveis dos probióticos nos períodos 0, 5, 10 e 15 dias de estocagem nas microesferas obtidas pelo processo de microencapsulação por extrusão, bem como, nas amostras de yacon minimamente processado revestido com coberturas comestíveis carreadoras de cultura probiótica, nestas, nos períodos 1, 5, 10 e 15 dias de estocagem.

Estas análises foram conduzidas de forma que 5 gramas de microesferas ou de yacon minimamente processado revestido com cobertura comestível foram homogeneizados e diluídos em 45 mL de solução estéril de 2 % de citrato de sódio (Fmaia, Brasil) em pH 6.0 aquecida a 45 °C em banho-maria (MA 127, Marconi, Brasil) por 10 minutos, seguido de diluição seriada e posterior plaqueamento em profundidade em meio *MRS Agar* (Acumedia, EUA). As amostras foram incubadas em estufa incubadora (NT 525, Novatecnica, Brasil) a 37 °C por até 72 horas sob condições aeróbias (MOAYEDNIA et al., 2009). Todas as análises foram realizadas em triplicata de maneira asséptica no Laboratório de Microbiologia da Universidade Estadual de Londrina.

#### 4.2.6.2 ***Eficiência de encapsulação dos probióticos (EE)***

A eficiência de encapsulação foi determinada por método direto, através das contagens de células viáveis presentes nas soluções formuladas antes e após a microencapsulação das células. Os dados obtidos foram aplicados na equação 3 e

assim obteve-se a porcentagem do rendimento do processo de encapsulação, onde  $X_t$  é o número de células presentes nas microesferas, e  $X_i$  representa o número de células inicialmente adicionadas nas soluções (AYAMA; SUMPAPOL; CHANTHACHUM, 2014).

$$EE (\%) = \frac{X_t}{X_i} \times 100 \quad \text{Eq. 3}$$

#### **4.2.6.3 Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas**

A fim de simular os sucos entéricos e gástricos presentes no trato gastrointestinal humano foi utilizada uma adaptação da metodologia Bedani et al. (2014).

Foi avaliada em duplicata a sobrevivência dos probióticos presentes nas microesferas obtidas pelo processo de microencapsulação por extrusão, tal como, nas amostras de yacon minimamente processado revestidas com cobertura comestível em diferentes soluções tampão e em tempos de avaliação pré-determinados.

Deste modo, 3 gramas de microesferas ou yacon minimamente processado revestidos com cobertura comestível, ambos carreadores de culturas probióticas, foram acondicionados em tubos falcon contendo 30 mL de suco gástrico simulado (Solução salina 0,85 % com pH ajustado para 2.3 – 2.6 com HCl 1N) com adição de pepsina (de mucosa estomacal suína, Sigma-Aldrich, EUA) e lipase (de *Rhizopus oryzae*, Sigma-Aldrich, EUA) nas concentrações de 3 g/L e 0,9 mg/L, respectivamente. Os tubos foram incubados a 37 °C durante 2 horas, simulando a fase gástrica. Na etapa seguinte o pH das amostras foi ajustado para 5.4 – 5.7 usando uma solução alcalina (150 mL de NaOH 1N e 14g de  $\text{PO}_4\text{H}_2\text{Na} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  para 1 litro de água destilada). Bile (Sigma-Aldrich, EUA) e pancreatina (de pâncreas suíno, Sigma-Aldrich, Nova Zelândia) foram adicionadas para atingir a concentração de 10 g/L e 1 g/L, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37 °C por mais duas horas simulando a fase entérica 1. Decorrido o período o pH das amostras foi ajustado para 6.8 – 7.2 usando a mesma solução alcalina utilizada na fase entérica 1 mantendo as concentrações de bile e pancreatina, então, as

amostras foram novamente incubadas por mais 2 horas a 37 °C, esta fase recebeu o nome de fase entérica 2, finalizando as 6 horas de ensaio *in vitro*.

A contagem de células viáveis do probiótico foi realizada com alíquotas das diluições das amostras após 0, 2, 4 e 6 horas de digestão *in vitro*, que em seguida foram semeadas em profundidade no meio *MRS ágar* (Acumedia, EUA) e incubadas a 37° C por 72 horas. Desta forma, foi possível calcular o número de células sobreviventes nas fases de simulação *in vitro*.

#### **4.2.6.4 Análises de contaminantes**

Foram realizadas a fim de atestar a qualidade microbiológica e aptidão ao consumo análises microbiológicas nos períodos inicial e final de armazenamento nas amostras de yacon minimamente processado com ou sem cobertura comestível.

##### **4.2.6.4.1 Coliformes a 45 °C**

A contagem de coliformes a 45 °C foi realizada pelo método do número mais provável (NMP) segundo metodologia da *American Public Health Association* de 2001 (DOWNES; ITO, 2001).

##### **4.2.6.4.2 Salmonella spp**

Para análise de presença ou ausência de *Salmonella spp* foi utilizado o método tradicional de identificação descrito pela *International Organization for Standardization 6579:2007* (ISO, 2007), o qual incluiu as etapas de pré-enriquecimento da amostra em água peptonada, enriquecimento seletivo em Caldo Tetratoato e Caldo Rappaport Vassiliadis, esgotamento por estrias em meios seletivos diferenciais, isolamento em Ágar Nutriente, seguida de provas bioquímicas e sorológica.

#### 4.2.6.4.3 *Aeróbios mesófilos*

A Contagem total de aeróbios mesófilos em placas foi realizada por plaqueamento em superfície de meio PCA (Himedia, Índia) seguindo metodologia da *American Public Health Association* de 2001 (MORTON, 2001).

#### 4.2.6.4.4 *Bolores e leveduras*

A Contagem total de bolores e leveduras foi realizada através de plaqueamento em superfície em meio BDA (Himedia, Índia) acidificado com ácido tartárico (Fmaia, Brasil) 10 %, seguindo metodologia da *American Public Health Association* de 2001 (TANIWAKI; IAMANAKA; BANHE, 1999).

### **4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

As amostragens e seus dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as médias comparadas pelo teste de Tukey através do programa ASSISTAT 7.7 (SILVA; AZEVEDO, 2009). O Teste-t foi aplicado havendo necessidade de comparar médias entre dois grupos amostrais. Os resultados foram considerados significativos para  $p < 0,05$ .

## **5 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.1 MICROENCAPSULAÇÃO DOS PROBIÓTICOS UTILIZANDO POLÍMEROS NATURAIS**

A técnica de microencapsulação aplicada nos experimentos realizados no presente estudo foi a de microencapsulação por extrusão em solução estéril de cloreto de cálcio (2 %). Esta, apresenta vantagens, tais como, baixo custo, relativa facilidade de aplicação, ser branda e não envolver altas temperaturas, o que poderia implicar diretamente sobre a viabilidade celular dos probióticos utilizados (*L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93), além de que, possibilita a aplicação de uma grande gama de polímeros naturais (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

#### **5.1.1 Eficiência de encapsulação dos probióticos (EE)**

Neste estudo as microesferas carreadoras de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 foram avaliadas quanto a sua EE, e os resultados obtidos estão descritos na Tabela 6.

**Tabela 6** – Eficiência do processo de encapsulação (EE) dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 microencapsulados nas diversas matrizes poliméricas.

TRATAMENTO	Diamêtro (mm) (n = 30)	(log UFC.g <sup>-1</sup> ) depois da encapsulação	EE (%)
M1	2,95	8,91 <sup>AB</sup> ± 0,02	95,09
M2	2,85	8,80 <sup>B</sup> ± 0,16	93,92
M3	2,95	9,23 <sup>A</sup> ± 0,13	98,50
M4	2,90	8,03 <sup>C</sup> ± 0,12	85,70
M5	2,85	8,86 <sup>B</sup> ± 0,05	94,55
M6	2,75	8,77 <sup>B</sup> ± 0,15	93,60
M7	2,90	8,79 <sup>B</sup> ± 0,06	93,81
M8	2,85	7,93 <sup>CD</sup> ± 0,09	84,63
M9	2,85	7,98 <sup>C</sup> ± 0,19	86,74
M10	2,80	8,19 <sup>C</sup> ± 0,15	89,02
M11	3,00	8,01 <sup>C</sup> ± 0,07	87,06
M12	2,95	7,59 <sup>D</sup> ± 0,06	82,50

M1 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M2 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M3 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M4 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %). M5 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix). M6 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix). M7 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L). M8 = Microesferas de alginato de sódio (2 %). M9 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M10 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M11 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M12 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %).

\*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %) e cultura liofilizada (1 %), sendo *L. casei* LC-01 em M1 a M8, e *L. casei* BGP 93 em M9 a M12.

\*\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

Fonte: o próprio autor.

Nas mesmas condições amostrais microesferas carreadoras de *L. casei* LC-01 demonstraram índices de eficiência de encapsulação (EE) superiores aos de microesferas de *L. casei* BGP 93. Desta forma, sugere-se que o probiótico *L. casei* LC-01 adaptou-se melhor à técnica de microencapsulação utilizada. Considerando todos os tratamentos, a amostra M3, que alia aplicação do EPS Botriosferana a FOS apresentou a maior eficiência de encapsulação, atingindo índices de 98,50 %.

Para microesferas de *L. casei* LC-01 com exceção dos tratamentos M4 e M8 (formuladas à base de alginato de sódio dissolvido em água destilada) os índices de EE encontrados foram superiores a 93 %, indicando que a aplicação de outros polímeros em conjunto com o alginato de sódio pode favorecer o aprisionamento das células na matriz polimérica. Em contrapartida, microesferas de *L. casei* BGP 93 apresentaram EE inferior a 90 %, entretanto, da mesma maneira essas microesferas

quando formuladas com maiores concentrações poliméricas (adição de mucilagens ou EPS) apresentam valores de EE superiores quando comparadas àquelas formuladas apenas com alginato de sódio dissolvido em água destilada.

Ao encapsular bactérias é necessário minimizar perdas no número de células encapsuladas objetivando o êxito na eficiência de encapsulação (EE), esta por sua vez, relaciona o número de células bacterianas viáveis aprisionadas na matriz encapsulante com o número de células bacterianas viáveis antes da encapsulação. Haghshenas et al. (2015) obtiveram índices de EE superiores a 98 % utilizando *blends* poliméricos a base de alginato de sódio, gel de psílio e gel de fenogrego para encapsular *Lactobacillus plantarum* 15HN através da técnica de extrusão em cálcio. Em contrapartida, Chávarri et al. (2010), atingiram índices máximos de 40,2 % de EE ao encapsularem *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium bifidum* em matrizes à base de alginato de sódio e quitosana por extrusão em cloreto de cálcio.

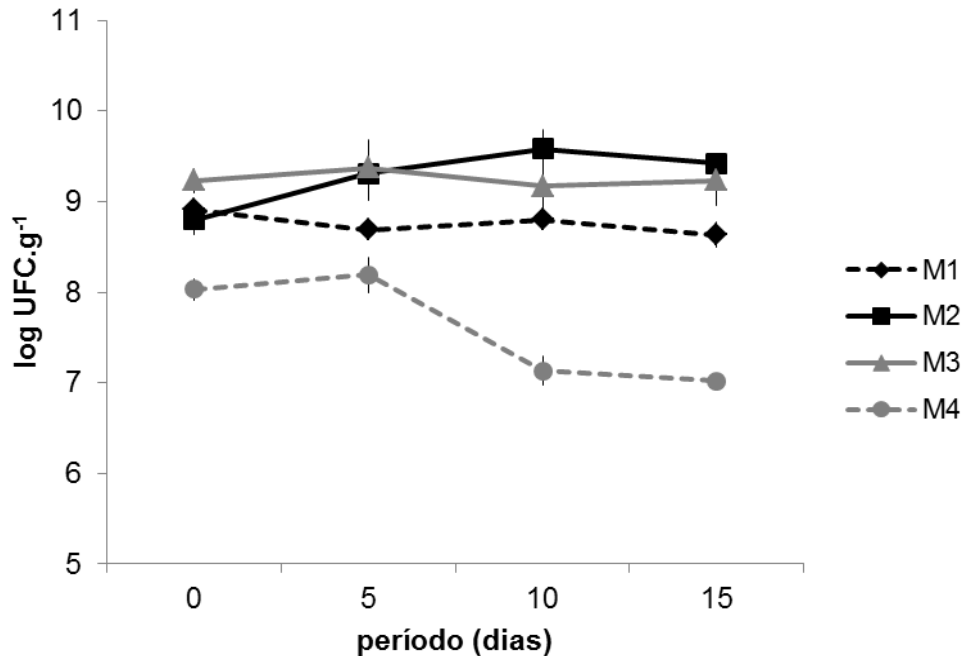
Krasaekoopt e Watcharapoka (2014) ao encapsularem células probióticas de *Lactobacillus acidophilus* LA 5 e *Lactobacillus casei* LC-01 em esferas à base de alginato de sódio, quitosana com ou sem adição de inulina e galactooligosacarídeos obtiveram resultados de redução no número de células viáveis do probiótico que variaram de 0,1 até 2,6 logs. No presente estudo, a redução no número de células probióticas após a encapsulação variou de 0,14 até 1,61 log. Rajam e Anandharamakrishnan (2015) ao encapsularem por *spray drying* *L. plantarum* (MTCC 5422) utilizando FOS como material de parede obtiveram EE entre 70 e 73 %.

### **5.1.2 Viabilidade celular dos probióticos encapsulados nas diversas soluções poliméricas durante o armazenamento a 5 °C ± 2 °C**

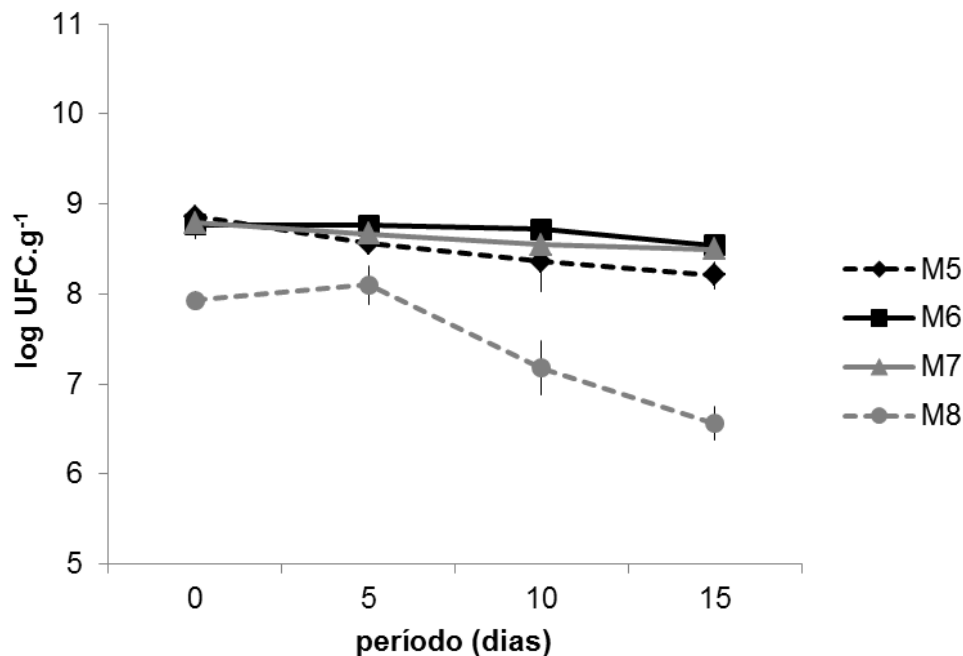
A viabilidade celular de *L. casei* LC-01 encapsulado nas diversas matrizes poliméricas com e sem adição de FOS durante todo o período de estocagem está apresentada na Figura 4 (a) e (b), respectivamente.

**Figura 4** – Efeito das diferentes matrizes encapsulantes sob a contagem de células viáveis do probiótico *L. casei* LC-01 durante a estocagem a  $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  por 15 dias ( $\log\text{ UFC.g}^{-1}$ ). (A)  $\log\text{ UFC.g}^{-1}$  de *L. casei* LC-01 em microesferas com adição de FOS (1,5 %). (B)  $\log\text{ UFC.g}^{-1}$  de *L. casei* LC-01 em microesferas sem adição de FOS.

(A)



(B)



M1 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M2 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M3 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M4 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %). M5 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix). M6 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix). M7 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L). M8 = Microesferas de alginato de sódio (2 %).

\*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %) e cultura liofilizada *L. casei* LC-01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

As amostras M4 e M8 apresentaram maior redução no número de células viáveis de *L. casei* LC-01 ao longo da estocagem (1,01 e 1,37 log, respectivamente). Esse resultado era esperado, uma vez que essas amostras eram formuladas apenas com alginato de sódio (M4) e FOS (M8) como principais agentes encapsulantes.

Em contrapartida, microesferas formuladas com adição de mucilagem de linhaça e o EPS botriosferana apresentaram menores índices de redução do probiótico durante a estocagem, ao mesmo passo, a adição de FOS nestas formulações (M2 e M3) contribuiu de forma a evitar redução no número de células viáveis de *L. casei* LC-01 ao final de quinze dias de armazenamento, indicando que adição de FOS pode inclusive estimular o crescimento dos micro-organismos. Krasaekoopt e Watcharapoka (2014), ao microencapsular *L. casei* LC-01 em alginato e quitosana com e sem adição de galacto-oligossacarídeo, relataram que a adição do prebiótico exerceu influência positiva na manutenção do número de células viáveis do micro-organismo ao final de um período de 4 semanas a 4 °C, sendo essa redução inferior em 1,1 log quando comparada ao tratamento sem adição de prebiótico. Rajam e Anandharamakrishnan (2015) em testes de microencapsulação de *L. plantarum* (MTCC 5422) utilizando FOS como material de parede por *spray drying* observaram menor taxa na perda de viabilidade celular do probiótico durante a estocagem (60 dias) em relação ao controle (células livres), entretanto ao combinar FOS com isolado proteico em pó (*Whey Protein*) e isolado proteico desnaturado por aquecimento (*Whey Protein*) os autores destacam que os resultados foram ainda superiores.

De modo geral, a mucilagem de linhaça que é uma mistura de polissacarídeos constituídos por ramnogalacturonano I de baixa massa molar e arabinoxilano de alta massa molar, este último apresentando propriedades prebióticas (NARAN; CHEN; CARPITA, 2008), auxiliou na maior preservação do número de células viáveis de *L. casei* LC-01 encapsuladas no presente estudo (Figura 4).

Microesferas formuladas com essa mucilagem (M2 e M6) apresentaram menores índices de redução da população microbiana aprisionada (log UFC.g<sup>-1</sup>) ao final do período de estocagem ( $p \leq 0,05$ ), quando comparadas com microesferas formuladas com outros polímeros (M1; M4 e M5; M8, respectivamente) resultado

semelhante encontrado por Bustamante et al. (2017) em testes na preservação de células probióticas de *Bifidobacterium infantis* e *Lactobacillus plantarum* encapsulados com maltodextrina (15 % m/v) e mucilagem de linhaça (0,2 % m/v) por *spray drying*, onde a viabilidade dos micro-organismos encapsulados manteve-se inalterada ao longo de 45 dias de armazenamento.

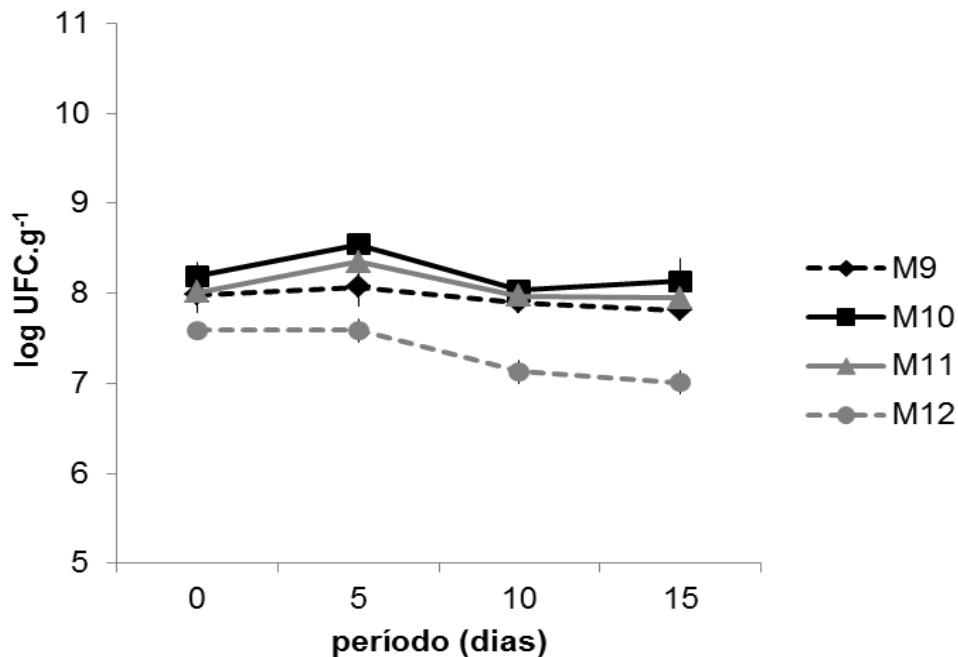
Entretanto, os resultados obtidos apontam que a aplicação do EPS utilizado (Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana, produzido pelo fungo ascomiceto *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05) e mucilagem de quiabo (essa última apenas quando consideradas microesferas sem adição de FOS) foi tão eficiente quanto a aplicação de mucilagem de linhaça na preservação do número de células viáveis de *L. casei* LC-01 durante o período de armazenamento ( $p > 0,05$ ) (Figura 4).

A utilização de exopolissacarídeos (EPS) em microencapsulação de bactérias probióticas ainda é uma alternativa pouco explorada, porém, pode se tornar promissora. Shah et al. (2016) ao encapsularem *L. casei*, *L. brevis* e *L. plantarum* utilizando  $\beta$ -glucana de cevada como agente encapsulante através de técnica de emulsão observaram que as bactérias imobilizadas apresentavam menor perda de viabilidade comparadas às células livres durante um período de armazenamento de 60 dias. Os mesmos autores atribuem ao processo de encapsulação a proteção a diversas tensões ambientais a que estão expostas as células. Já D’Orazio et al. (2015) em estudos de microencapsulação de cepas de *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em microesferas de alginato, glicose e  $\beta$ -1,3-D-glucana comercial isolada de *Pleurotus ostreatus*, reportam maiores valores de viabilidade celular dos micro-organismos quando comparado ao de microesferas a base de alginato de sódio e glicose.

Laurenti e Garcia (2013) ao encapsularem células de *Saccharomyces cerevisiae* em cubos compostos de ágar-ágar em solução de mucilagem de quiabo, destacam que a mucilagem foi mais eficiente na retenção do micro-organismo encapsulado quando comparada a gomas comerciais, como arábica e carragena e salientaram que grandes quantidades de fissuras nas matrizes poliméricas podem influenciar na capacidade de retenção dos micro-organismos.

No presente estudo também foi avaliada a viabilidade celular de *L. casei* BGP 93 encapsulados em diversas matrizes poliméricas, os resultados estão expressos na Figura 5.

**Figura 5** – Efeito das diferentes matrizes encapsulantes sob a contagem de células viáveis do probiótico *L. casei* BGP 93 durante a estocagem a  $5\text{ °C} \pm 2\text{ °C}$  por 15 dias ( $\log\text{ UFC}\cdot\text{g}^{-1}$ ).



M9 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M10 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M11 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M12 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %).

\*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %) e cultura liofilizada *L. casei* BGP 93 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

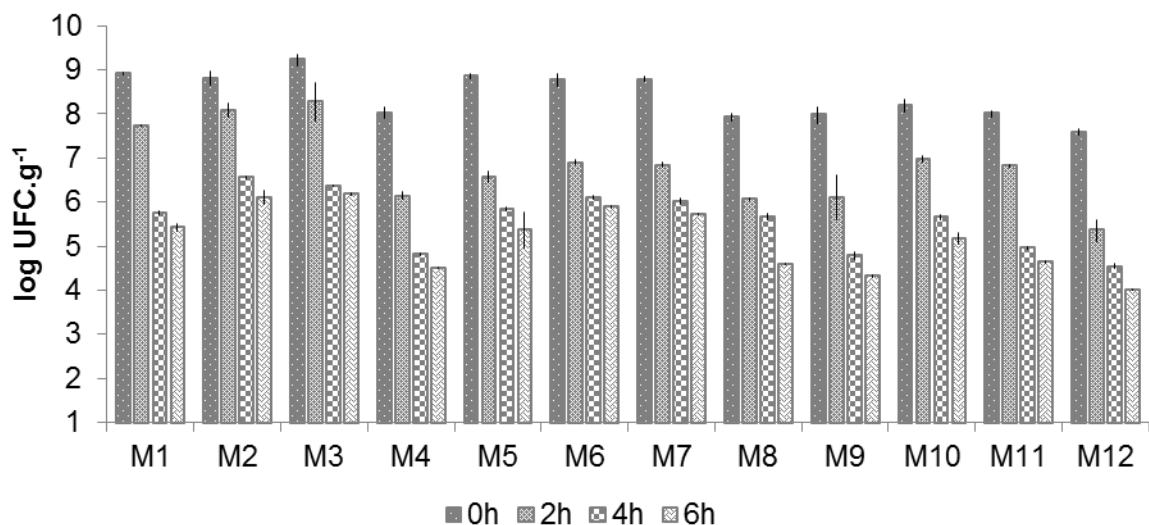
Microesferas carregadoras de *L. casei* BGP 93 tiveram comportamento similar ao de microesferas de *L. casei* LC-01. Os tratamentos contendo mucilagens de quiabo (M9), linhaça (M10) ou EPS botriosferana (M11), não apresentaram diferenças significativas no número de células viáveis do probiótico ao final do período de estocagem ( $p > 0,05$ ). Em contrapartida, microesferas formuladas com alginato de sódio como principal agente encapsulante (M12) apresentaram diminuição acentuada na viabilidade celular do micro-organismo quando comparada aos demais tratamentos ( $p \leq 0,05$ ).

### 5.1.3 Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas

Cepas de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 quando encapsuladas podem ser utilizadas como ingredientes funcionais probióticos. Contudo, a Organização Mundial da Saúde salienta que a qualidade de probiótico só deve ser atribuída uma vez que quando ingeridas, essas bactérias apresentem capacidade de sobrevivência ao ambiente estomacal de maneira que mantenham-se em número suficientemente viável para colonizar o intestino (FAO/WHO, 2002).

O comportamento dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsulados nas diversas matrizes poliméricas antes (0 h) e durante a exposição a simulação gástrica (2 h) e entérica (4 e 6 h) está descrito na Figura 6.

**Figura 6** – Sobrevivência dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsulados nas diversas matrizes poliméricas antes (0 h) e durante a exposição a simulação gástrica (2 h) e entérica (4 e 6 h).



M1 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M2 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M3 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M4 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %). M5 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix). M6 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix). M7 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L). M8 = Microesferas de alginato de sódio (2 %). M9 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de quiabo (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M10 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de FOS (1,5 %). M11 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) e Botriosferana (0,820 mg/L) com adição de FOS (1,5 %). M12 = Microesferas de alginato de sódio (2 %) com adição de FOS (1,5 %).

\*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %) e cultura liofilizada (1 %), sendo *L. casei* LC-01 em M1 a M8, e *L. casei* BGP 93 em M9 a M12.

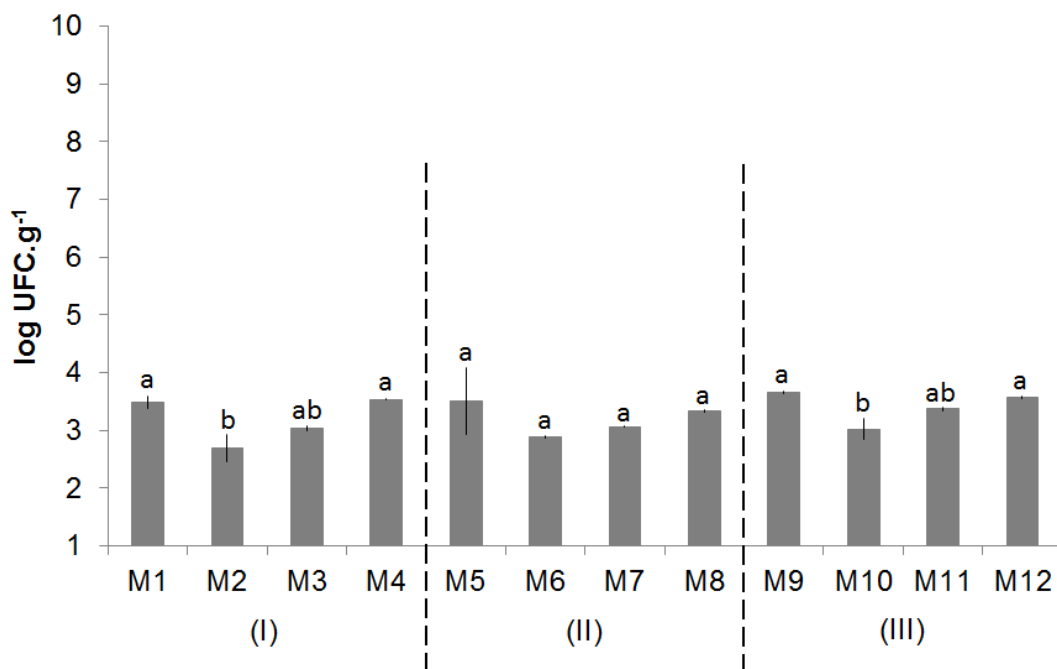
Fonte: o próprio autor.

Chen et al. (2005) reportam que a adição de prebióticos em processos de microencapsulação pode promover a proteção a micro-organismos probióticos frente

a sucos gástricos simulados. Este comportamento é observado no presente estudo, microesferas de *L. casei* LC-01 M1, M2 e M3 (contendo 1,5 % (m/v) de FOS) quando comparadas a M5, M6 e M7 (sem adição de FOS) apresentam perdas inferiores em 1,13, 1,16, e 1,01 log, respectivamente após a fase gástrica. No entanto, o comportamento das mesmas amostras é inverso quando comparado a fase entérica I onde microesferas contendo 1,5 % de FOS (M1, M2, M3 e M4) perdem em média 1,00 log a mais quando confrontadas com microesferas sem adição de FOS (M5, M6, M7 e M8). A partir de então o comportamento tende a ser similar para essas amostras.

Com base no comportamento celular dos probióticos encapsulados foi calculada a redução total no número de células viáveis de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 após a exposição aos sucos gástricos e entéricos simulados (Figura 7).

**Figura 7** – Redução no número de células viáveis (log UFC.g<sup>-1</sup>) dos probióticos *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93 encapsulados nas diversas matrizes poliméricas depois da exposição aos sucos gástricos e entéricos simulados.



\* Médias seguidas de mesma letra minúscula dentro de cada grupo I, II, III não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ). M1 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de quiabo (0,3ºBrix) com adição de FOS (1,5%). M2 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de linhaça (0,3ºBrix) com adição de FOS (1,5%). M3 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e Botriosferana (0,820mg/L) com adição de FOS (1,5%). M4 = Microesferas de alginato de sódio (2%) com adição de FOS (1,5%). M5 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de quiabo (0,3ºBrix). M6 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de linhaça (0,3ºBrix). M7 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e Botriosferana (0,820mg/L). M8 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de quiabo (0,3ºBrix) com adição de FOS (1,5%). M9 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de quiabo (0,3ºBrix) com adição de FOS (1,5%). M10 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e mucilagem de linhaça (0,3ºBrix) com adição de FOS (1,5%). M11 = Microesferas de alginato de sódio (2%) e Botriosferana (0,820mg/L) com adição de FOS (1,5%). M12 = Microesferas de alginato de sódio (2%) com adição de FOS (1,5%). \*Em todos os tratamentos foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %) e cultura liofilizada (1 %), sendo *L. casei* LC-01 em M1 a M8, e *L. casei* BGP 93 em M9 a M12.

**Fonte:** o próprio autor.

Os tratamentos de microesferas foram divididos em 3 grupos amostrais.

Considerando o grupo amostral I e III, a adição de mucilagem de linhaça nas microesferas de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93, proporcionou maior proteção aos micro-organismos após todo o período de simulação gastrointestinal.

No grupo I microesferas contendo mucilagem de linhaça (M2) apresentaram valor de redução no número de células viáveis decorrido a simulação gastrointestinal na ordem de  $2,69 \pm 0,23 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , resultado estaticamente inferior ( $p \leq 0,05$ ) ao de microesferas formuladas com mucilagem de quiabo (M1) e alginato de sódio sem mucilagem (M4), essas amostras perderam em média  $3,48 \pm 0,11$  e  $3,53 \pm 0,01 \log \text{UFC.g}^{-1}$ , respectivamente. Contudo, M2 não apresentou diferença estatística quando comparada a microesferas formuladas com o exopolissacarídeo Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana (M3), entretanto M3 não apresenta diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparada a M1 e M4. D'Orazio et al. (2015) ao encapsularem *L. plantarum*, *L. rhamnosus* e *B. lactis* em microesferas de alginato, glicose e  $\beta$ -1,3-D-glucana comercial isolada de *Pleurotus ostreatus* e submeterem as microesferas a testes de simulação em sucos gástricos e entéricos reportam que a  $\beta$ -1,3-D-glucana comercial não influenciou na resistência dos probióticos encapsulados em condições ácidas.

Bustamante et al. (2017) ao encapsularem cepas de *Bifidobacterium infantis* em complexos de maltodextrina, mucilagem de linhaça e proteínas solúveis de linhaça, reportam índices de redução no número de células viáveis do micro-organismo de 31 % após 6 horas de exposição a suco gástrico simulado. Resultado semelhante é encontrado no presente estudo, onde após exposição à simulação gastrointestinal (6 h), microesferas formuladas com adição de mucilagem de linhaça (M2) carreadoras de *L. casei* LC-01 apresentam decréscimo de viabilidade do probiótico na ordem de 30,56 %.

O grupo amostral II era similar ao grupo I, entretanto, não continha em sua formulação a adição de FOS. Neste grupo não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ). Possivelmente a adição de FOS pode contribuir de forma a preservar a viabilidade de células encapsuladas frente a simulação gastrointestinal, uma vez que essa situação foi encontrada no grupo amostral I na amostra M2. Krasaekoopt e Watcharapoka (2014) destacam que a

adição de prebióticos na microencapsulação de probióticos pode aumentar a resistência dos micro-organismos a baixos valores de pH e a presença de sais biliares. Os mesmos autores ao microencapsular *L. casei* LC-01 em alginato e quitosana com galacto-oligossacarídeo, salientam que além de proteção, os prebióticos estimulam o crescimento no sistema digestivo simulado. Chen et al. (2005) testaram a sobrevivência de *Lactobacillus* sp. encapsulados em microesferas de alginato e FOS após 4 semanas de estocagem seguido de digestão gastrointestinal *in vitro*, os autores reportaram que a adição do prebiótico proporcionou uma sobrevivência 100 vezes superior quando comparadas com *Lactobacillus* sp. encapsulados somente em alginato.

Ding e Shah (2009) destacam que a escolha do agente encapsulante pode influenciar na eficácia da proteção de células probióticas frente a condições adversas. Chávarri et al. (2010) reportam que a aplicação de alginato e quitosana na microencapsulação de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri* aponta para índices de sobrevivência superiores a  $10^7$  UFC/ml em simulação gástrica e 96 % em simulação entérica. No presente trabalho, os maiores índices de sobrevivência após simulação gastrointestinal foram obtidos nas microesferas M2 e M3 atingindo valores de  $6,11 \pm 0,16$  e  $6,19 \pm 0,03$  log UFC.g<sup>-1</sup>, respectivamente.

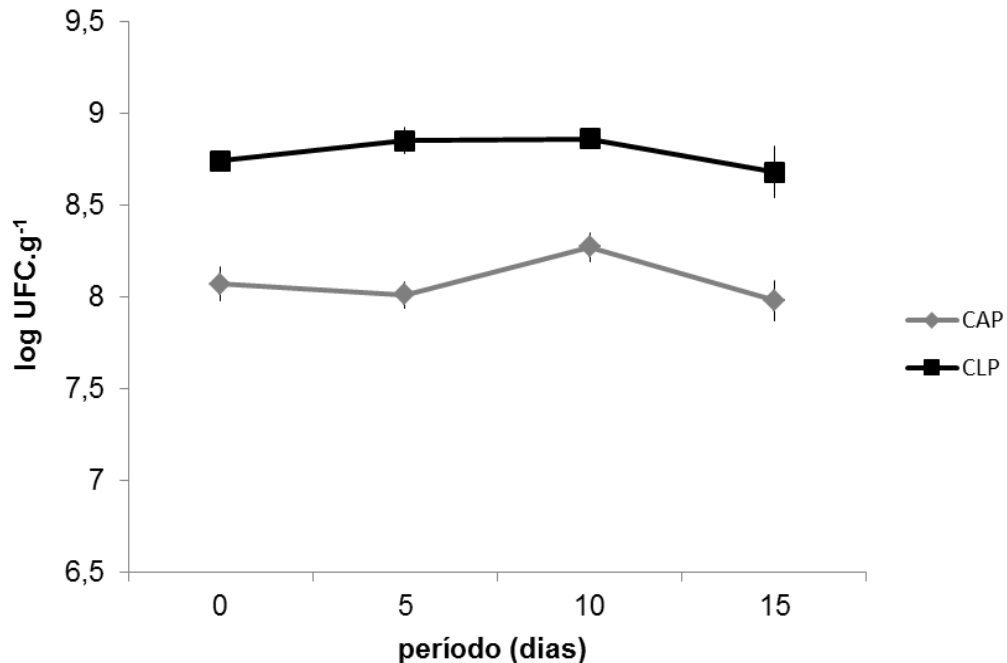
## **5.2 YACON MINIMAMENTE PROCESSADO COM COBERTURA COMESTÍVEL CARREADORA DE PROBIÓTICO**

### **5.2.1 Análises microbiológicas**

#### **5.2.1.1 Viabilidade do probiótico *L. casei* LC-01**

Os resultados da contagem de células viáveis de *L. casei* LC-01 nas amostras de yacon revestidas com coberturas comestíveis carreadoras de probiótico durante a estocagem estão descritos na Figura 8.

**Figura 8** - Contagem de células viáveis de *L. casei* LC-01 (log UFC.g<sup>-1</sup>) nas amostras de yacon recobertas com coberturas comestíveis carreadoras de probiótico durante a estocagem a 5 °C ± 2 °C.



CAP = Yacon minimamente processado com cobertura de alginato de sódio (2 %). CLP = Yacon minimamente processado com cobertura de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 % Brix).

\*Antes da aplicação da cobertura o yacon minimamente processado foi imerso em solução estéril de ácido ascórbico (1,5 % m/v) por 5 minutos.

\*\*Em todas as coberturas foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %), FOS (1,5 %) e cultura liofilizada *L. casei* LC-01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

A amostra CLP apresenta valores de número de células viáveis de *L. casei* LC-01 significativamente superiores ( $p \leq 0,05$ ) aos obtidos na amostra CAP durante todo o período de estocagem do yacon minimamente processado revestido com as coberturas carreadoras do probiótico.

Assim como observado em testes de microencapsulação de probióticos, a utilização da mucilagem de linhaça associada ao alginato de sódio proporcionou uma maior retenção dos micro-organismos na cobertura comestível (CLP) após a aplicação da mesma sobre o yacon minimamente processado (Período 1). De acordo com Mortazavian e Sohrabvandi (2007) géis formados a base de alginato através de interações com íons  $\text{Ca}^{2+}$  condizem com formação de poros na superfície, uma desvantagem, e a utilização de outros compostos poliméricos aliados ao alginato de sódio pode auxiliar o aprisionamento das células na matriz

polimérica (HAGHSHENAS et al., 2015; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

Ao final do período de armazenamento CAP e CLP apresentavam  $7,98 \pm 0,11$  e  $8,68 \pm 0,14$  log UFC.g<sup>-1</sup> de *L. casei* LC-01, respectivamente. Em ambos os tratamentos o probiótico utilizado demonstrou um comportamento de manutenção do número de células viáveis durante a estocagem, indicando que as coberturas comestíveis não exerceram influência negativa sobre os micro-organismos. Resultado semelhante encontrado por Tapia et al. (2007), ao adicionar *Bifidobacterium lactis* Bb-12 em coberturas de alginato de sódio e goma gelana aplicadas em mamão e maçã minimamente processados armazenados a 2 °C por 10 dias.

É importante salientar que em ambas as amostras houve adição de FOS nas formulações. Tang et al. (2015) reportam que a adição de prebióticos em películas comestíveis a base de amido de milho atuou de modo a promover o crescimento de cepas de *Bifidobacterium infantis* e *Lactobacillus fermentum*.

Rößle et al. (2010) ao revestirem fatias de maçã carreadoras de *Lactobacillus rhamnosus* GG com cobertura de alginato de sódio, fruto-oligossacarídeo e inulina, destacaram que a adição de prebióticos exerceu influência significativa no número de células viáveis quando comparado ao controle (fatias de maçã mergulhadas apenas em solução de *Lactobacillus rhamnosus* GG) durante um período de estocagem de 14 dias a 2–4 °C. Entretanto, os mesmos autores salientam que em termos práticos a diferença era pequena entre as amostras.

No cenário científico é amplamente aceito que para promover benefícios a saúde é necessário que a quantidade de bactérias probióticas atinja um nível mínimo de 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> UFC por grama ou mL de produto (FAO/WHO, 2002, BURITI et al., 2005, KASIMOĞLU et al., 2004, MUSHTAQ et al., 2016).

Durante todo o período de armazenamento as contagens de células viáveis do probiótico *L. casei* LC-01 ficaram por volta de 8 log UFC.g<sup>-1</sup> de yacon minimamente processado revestido com as coberturas comestíveis CAP e CLP, valores que apontam para um potencial probiótico deste produto.

### 5.2.1.2 Sobrevivência do probiótico sob condições gastrointestinais simuladas

A fim de garantir a alegação de funcionalidade de um produto adicionado de micro-organismo probiótico é necessário considerar a capacidade da sobrevivência do micro-organismo na matriz alimentar durante o processamento, bem como, nas condições de estresse gastrointestinal. Desta forma testes *in vitro* são amplamente utilizados para identificar essas características (VINDEROLA et al., 2011).

Ranadheera et al. (2010) destacam que a matriz alimentar pode proporcionar proteção aos micro-organismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal. No presente estudo foi avaliado a capacidade de sobrevivência do probiótico adicionado nas coberturas comestíveis CAP e CLP utilizadas para revestir yacon minimamente processado. Os resultados obtidos estão descritos na Tabela 7.

**Tabela 7** – Sobrevivência do probiótico adicionado nas coberturas comestíveis sob condições gastrointestinais simuladas (log UFC.g<sup>-1</sup>).

TRATAMENTO	Período (horas)				Redução Logarítmica
	0	2	4	6	
<b>CAP</b>	8,07 ± 0,09	6,90 ± 0,02	5,68 ± 0,12	5,07 ± 0,07	3,00 <sup>A</sup> ± 0,10
<b>CLP</b>	8,74 ± 0,03	7,35 ± 0,08	6,05 ± 0,09	5,82 ± 0,04	2,92 <sup>A</sup> ± 0,50

\* Médias seguidas de mesma letra maiúscula na coluna não diferem entre si pelo teste t (p>0,05).

CAP = Yacon minimamente processado com cobertura de alginato de sódio (2 %). CLP = Yacon minimamente processado com cobertura de alginato de sódio (2 %) e mucilagem de linhaça (0,3 °Brix).

\*\*Antes da aplicação da cobertura o yacon minimamente processado foi imerso em solução estéril de ácido ascórbico (1,5 % m/v) por 5 minutos.

\*\*\*Em todas as coberturas foi adicionado *tween* 80 (0,1 %), glicerol (0,5 %), FOS (1,5 %) e cultura liofilizada *L. casei* LC-01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

Não foi observada diferença significativa entre as amostras considerando os valores de redução logarítmica de *L. casei* LC-01 após 6 horas de digestão *in vitro*. Esse resultado contrasta com o obtido em microesferas de *L. casei* LC-01 formuladas com mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) apresentadas neste mesmo trabalho. Desta forma, é possível que a matriz alimentar (yacon) possa ter influenciado na proteção aos probióticos durante a digestão *in vitro*.

Até o presente momento não foram encontrados na literatura estudos que avaliam a sobrevivência a digestão *in vitro* de probióticos em coberturas comestíveis utilizadas para revestir minimamente processados. No entanto, Leone et al. (2017) reportam a sobrevivência de *L. casei* LC-01 aderidas em amostras de yacon secas submetidas a testes de digestão gástrica *in vitro*, as células probióticas mantiveram aproximadamente 64 % de sua viabilidade e valores superiores a 80 % em testes de condição intestinal. Resultado semelhante foi encontrado no presente trabalho, onde, as amostras CAP e CLP apresentam sobrevivência por volta de 85 e 84 % após a simulação da fase gástrica e 73 e 79 % após as fases entéricas.

Darjani et al. (2016) ao avaliarem a influência de prebióticos e materiais de cobertura na sobrevivência de *L. casei* expostos a condições gastrointestinais simuladas, reportam melhor sobrevivência do probiótico utilizando complexos de alginato-inulina-quitosana.

Bedani et al. (2013) ao avaliar a sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 em produtos fermentados a base de soja com adição de okara e inulina em testes de digestão *in vitro* reportam, de um modo geral, que o decréscimo da viabilidade do probiótico foi entre 3,20 – 4,71 log, em cinco diferentes períodos de estocagem. Os autores salientam que a fase gástrica da digestão é a maior responsável pelo decréscimo de células viáveis do probiótico. No presente trabalho, o decréscimo total no número de células viáveis de *L. casei* LC-01 foi de  $3,00 \pm 0,10$  e  $2,92 \pm 0,50$  log UFC.g<sup>-1</sup> para as amostras CAP e CLP, respectivamente. Desta forma, veicular bactérias probióticas em matrizes não fermentadas como minimamente processados demonstra ser uma alternativa viável de acordo com os testes de digestão *in vitro*. Entretanto, são necessários maiores estudos a fim de elucidar a utilização de probióticos em veículos não convencionais.

### **5.2.1.3 Qualidade microbiológica de yacon minimamente processado**

Apesar de propostas para serem realizadas no período inicial e final da estocagem, o controle amostral (C) foi avaliado apenas no período inicial, uma vez que, a partir do nono dia essas amostras apresentavam-se com características sensoriais alteradas tornando improvável o seu consumo.

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), por meio da Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001 estabelece o limite de coliformes a 45 °C e *Salmonella sp* para produtos na forma de minimamente processados (BRASIL, 2001). Os resultados obtidos a respeito da qualidade microbiológica de yacon minimamente processado com ou sem coberturas comestíveis estão descritos na Tabela 8.

**Tabela 8** – Qualidade microbiológica do yacon minimamente processado segundo o tratamento e tempo de estocagem.

TRATAMENTO	Micro-organismo	Esp.*	Período (dias)	
			1	15
C	Coliformes a 45 °C	10 <sup>3</sup> /g	-	s.d <sup>a</sup>
	Bolores e Leveduras	-	2 x 10 <sup>2</sup> /g	s.d
	Mesófilos Aeróbios	-	4 x 10/g	s.d
	<i>Salmonella sp</i>	Ausência/25g	Aus	s.d
CAS	Coliformes a 45 °C	10 <sup>3</sup> /g	-	-
	Bolores e Leveduras	-	-	3,4 x 10 <sup>4</sup> /g
	Mesófilos Aeróbios	-	-	7,7 x 10 <sup>3</sup> /g
	<i>Salmonella sp</i>	Ausência/25g	Aus	Aus
CAP	Coliformes a 45 °C	10 <sup>3</sup> /g	-	-
	Bolores e Leveduras	-	2 x 10 <sup>2</sup> /g	1 x 10 <sup>4</sup> /g
	Mesófilos Aeróbios	-	-	2 x 10 <sup>4</sup> /g
	<i>Salmonella sp</i>	Ausência/25g	Aus	Aus
CLP	Coliformes a 45 °C	10 <sup>3</sup> /g	-	-
	Bolores e Leveduras	-	1 x 10 <sup>2</sup> /g	1,1 x 10 <sup>4</sup> /g
	Mesófilos Aeróbios	-	-	5,1 x 10 <sup>4</sup> /g
	<i>Salmonella sp</i>	Ausência/25g	Aus	Aus

\*Especificação ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC n. 12 de 02 de janeiro de 2001.

<sup>a</sup>análise não realizada.

C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

Todas as amostras de yacon minimamente processado atenderam as especificações determinadas pela legislação vigente no Brasil, portanto, consideradas próprias ao consumo. Este resultado indica que as etapas de produção do minimamente processado seguiram as boas práticas de fabricação e a

sanificação do produto foi eficiente na manutenção da qualidade microbiológica das amostras. É necessário salientar que as condições de estocagem ( $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ ) também são de extrema importância neste aspecto.

A utilização de coberturas comestíveis promove frescor e durabilidade para minimamente processados, entretanto, por conta de uma maior manipulação desses produtos, pode ocorrer favorecimento na presença de fungos e bactérias. No período 1 de estocagem a amostra CAS apresenta ausência na contagem de mesófilos aeróbios e bolores e leveduras, no entanto, contagens nas amostras com coberturas comestíveis (CAP e CLP) para bolores e leveduras estavam na ordem de  $10^2$ .

Emmambux e Minnaar (2003) e Avena-Bustillos et al. (1994) reportam que a aplicação de coberturas comestíveis em cenouras minimamente processadas não influenciou significativamente a melhora da qualidade microbiológica do produto. Entretanto, os autores salientam que baixas temperaturas durante a estocagem estão relacionadas com a manutenção da qualidade microbiológica destes alimentos.

De acordo com Lee et al. (2003) e Rojas-Graü et al. (2007) para que uma carga microbiana contaminante seja danosa ao produto, e que o mesmo seja considerado impróprio para o consumo, a contagem mínima necessária é de  $10^6$  UFC.g<sup>-1</sup>. Ao final da estocagem as amostras CAS, CAP e CLP apresentavam contagens de mesofilos aeróbios e bolores e leveduras por volta de  $10^4$  UFC.g<sup>-1</sup>, portanto, próprias ao consumo.

### **5.2.2 Análises físico-químicas**

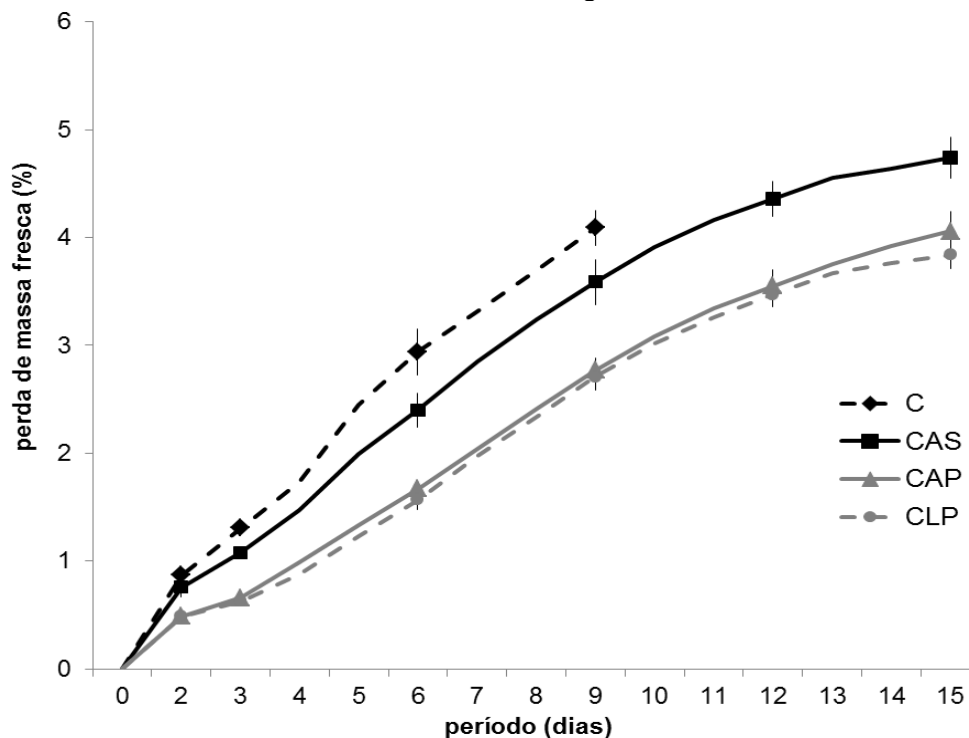
Apesar de inicialmente propostas para serem realizadas nos períodos 1, 3, 6, 9, 12 e 15 da estocagem, o controle amostral (C) foi avaliado apenas nos períodos 1, 3, 6 e 9 de armazenamento, uma vez que, a partir do nono dia essas amostras apresentavam-se com características sensoriais alteradas tornando improvável o seu consumo.

### 5.2.2.1 Perda de massa fresca e umidade

Em vegetais, a redução da massa durante o período de armazenamento ocorre tanto pela perda de matéria seca, resultante da respiração, quanto pela perda de água, decorrente da transpiração. Desta forma, a atividade fisiológica do vegetal, durante a estocagem, promove degradação dos compostos, detrimento da aparência e perda da qualidade, ocasionando na rejeição do produto pelos consumidores (BHOWMIL; PAN, 1992; CHITARRA; CHITARRA, 2005).

No presente estudo, foi avaliada a perda de massa fresca de yacon minimamente processado com e sem cobertura comestível. Verificou-se perdas constantes de massa fresca em todas as amostras, sendo que até o período 9 da estocagem o controle amostral (C) apresentava decréscimo mais acentuado (4,09 %) neste parâmetro, seguido das amostras CAS, CAP e CLP (3,59, 2,77 e 2,71 %, respectivamente), conforme descrito na Figura 9.

**Figura 9** – Perda de massa fresca (%) nas amostras de yacon minimamente processado com e sem coberturas comestíveis durante a estocagem a  $5^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ .



\*O comportamento traçado foi definido com os dados de todas as pesagens diárias, e para destaque pontual foi escolhido os dias 2, 3, 6, 9, 12 e 15, nos quais foram estatisticamente comparados pelo teste de Tukey em um nível de 5 % de significância. C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

De modo geral, a aplicação de coberturas comestíveis reduziu significativamente ( $p \leq 0,05$ ) a perda de massa fresca de yacon minimamente processado. Ao final do período de estocagem (15 dias) as amostras revestidas com cobertura comestível CAP e CLP apresentaram valores de perda de massa fresca na ordem de 4,06 e 3,84 %, respectivamente enquanto a amostra CAS apontava redução de 4,74 %. Resultados semelhantes encontrados por Fan et al. (2009), onde os autores relatam menores valores de perda de massa fresca em morangos revestidos com cobertura de alginato de sódio. Os mesmos autores salientam que as perdas são ainda menores ao adicionar leveduras da espécie *Cryptococcus laurentii* nas coberturas, sugerindo que a adição de micro-organismos pode influenciar neste quesito.

Chiumarelli et al. (2011) reportam que o uso de coberturas comestíveis a base de amido de mandioca e alginato contribuíram para uma redução significativa na perda de massa fresca em mangas minimamente processadas, no entanto, não foi detectada diferença entre os tratamentos com coberturas ao final do período de armazenamento do produto. Resultados que corroboram com o presente trabalho, onde a utilização de mucilagem de linhaça na elaboração de cobertura comestível (CLP) não apresentou diferença significativa ( $p > 0,05$ ) quando comparadas as amostras de yacon revestidas somente com cobertura de alginato (CAP).

Segundo Grierson e Wardowski (1978) e Bhowmil e Pan (1992) de maneira fisiológica, a transpiração ocorre devido à diferença de pressão de vapor d'água entre a atmosfera circundante e a superfície do vegetal. Em contrapartida, a respiração é decorrente aos átomos de carbono perdidos para atmosfera quando uma molécula de  $\text{CO}_2$  é produzida, resultando, além da perda de massa, em redução do valor nutritivo e em perda das características sensoriais. No presente estudo o desempenho de ambas as coberturas comestíveis à base de polímeros naturais indicou capacidade de atuar na manutenção da massa fresca de yacon minimamente processado, fato que pode contribuir para maior qualidade e vida útil do produto.

Em vegetais a umidade pode ser definida como quantidade de água presente no tecido em sua totalidade, seja na forma livre ou ligada (KADER, 1992). Sua redução está relacionada com a perda de água no vegetal por transpiração

promovendo murchamento, perda de brilho e tornando-os mais suscetíveis às podridões (SHIBAIRO; UPADHYAYA; TOIVONEN, 1997).

Os resultados de conteúdo de umidade obtidos no presente trabalho estão descritos na Tabela 9.

**Tabela 9** – Valores médios de umidade (g/g) nas amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante o armazenamento a 5 °C ± 2 °C.

TRATAMENTO	Período (dias)					
	1	3	6	9	12	15
<b>C</b>	0,9367 <sup>aA</sup> ±0,003	0,9020 <sup>bB</sup> ±0,006	0,9117 <sup>bA</sup> ±0,001	0,9291 <sup>aA</sup> ±0,004	--	--
<b>CAS</b>	0,9065 <sup>aA</sup> ±0,049	0,9368 <sup>aA</sup> ±0,017	0,9132 <sup>aA</sup> ±0,006	0,9327 <sup>aA</sup> ±0,005	0,8967 <sup>aA</sup> ±0,005	0,8832 <sup>aB</sup> ±0,003
<b>CAP</b>	0,9334 <sup>aA</sup> ±0,001	0,9226 <sup>abAB</sup> ±0,009	0,9144 <sup>bcA</sup> ±0,004	0,9300 <sup>abA</sup> ±0,002	0,9042 <sup>cdA</sup> ±0,005	0,8964 <sup>dA</sup> ±0,008
<b>CLP</b>	0,9306 <sup>aA</sup> ±0,001	0,9267 <sup>aAB</sup> ±0,002	0,8940 <sup>aA</sup> ±0,023	0,9092 <sup>aA</sup> ±0,026	0,9056 <sup>aA</sup> ±0,004	0,8997 <sup>aA</sup> ±0,002

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

Em geral, os tratamentos C, CAS e CLP não apresentaram diferença significativa ( $p > 0,05$ ) considerando os valores de umidade inicial e final de cada tratamento. Entretanto, a amostra CAP demonstrou comportamento oscilante, apresentando redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos valores de umidade durante o período de estocagem.

Ao final do armazenamento as amostras CAP e CLP apresentam índices de umidade ligeiramente superior ( $p \leq 0,05$ ) ao obtido em CAS. Contudo, a mesma situação não foi observada nos demais períodos de estocagem das amostras de yacon minimamente processado. Segundo Gontard e Guilbert (1996) coberturas comestíveis à base de polímeros, como o alginato de sódio e mucilagens, constituem-se em excelentes barreiras contra as trocas gasosas, porém não evitam a perda de umidade do produto para o meio, uma vez que são revestimentos hidrofílicos.

Ainda que durante grande parte da estocagem a aplicação de coberturas comestíveis não tenha contribuído significativamente para a manutenção da umidade, duas considerações devem ser avaliadas: respiração do vegetal e efeito sacrificante da película.

A respiração do vegetal implica na degradação de compostos orgânicos resultando em energia, água e CO<sub>2</sub> (VAROQUAUX; WILEY, 1997). No presente trabalho apesar de que as amostras de yacon minimamente processados apresentarem perda de massa fresca significativa, o mesmo não aconteceu com a umidade. Deste modo, é provável que amostras de yacon tenham apresentado maior atividade respiratória do que transpiração, ocasionado diminuição nos valores de massa fresca das amostras, mas sem grandes variações nos índices de umidade.

Outros pesquisadores sugerem que a utilização de coberturas e películas comestíveis com umidade similar à das amostras, pode atuar de maneira que as películas sofram perda de água antes do produto, efeito denominado “sacrificante”. Deste modo, o teor de água perdido é proveniente da cobertura aplicada, e não do próprio vegetal, conseqüentemente mesmo com grandes períodos de estocagem, a aparência fresca do vegetal é mantida (KESTER; FENNEMA, 1986; BOURTOOM, 2008).

#### **5.2.2.2 Cor**

Dentre os atributos sensoriais, a cor influencia diretamente a apreciação e aceitabilidade do alimento por parte do consumidor. Neste estudo foram avaliados os parâmetros L\*, a\* e b\* que permitiram calcular o ângulo Hue, ou seja, tonalidade ou matiz de cor de amostras de yacon minimamente processado durante a estocagem. Os resultados para o parâmetro L\* estão descritos na Tabela 10.

**Tabela 10** – Parâmetro de cor L\* das amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante estocagem a 5 °C ± 2 °C.

TRATAMENTO	Período (Dias)					
	1	3	6	9	12	15
<b>C</b>	41,92 <sup>aBC</sup> ±0,80	35,45 <sup>bD</sup> ±0,60	30,49 <sup>cC</sup> ±0,63	27,78 <sup>dC</sup> ±0,67	--	--
<b>CAS</b>	41,37 <sup>aC</sup> ±0,99	39,4 <sup>bC</sup> ±0,35	38,59 <sup>bcB</sup> ±0,70	36,86 <sup>cdB</sup> ±0,16	36,78 <sup>dB</sup> ±0,81	33,68 <sup>eC</sup> ±0,55
<b>CAP</b>	46,28 <sup>aA</sup> ±0,33	42,98 <sup>bB</sup> ±0,20	43,06 <sup>bA</sup> ±0,84	42,41 <sup>bcA</sup> ±1,08	41,05 <sup>ca</sup> ±0,67	40,66 <sup>cB</sup> ±0,60
<b>CLP</b>	43,65 <sup>abB</sup> ±0,31	44,23 <sup>aA</sup> ±0,51	44,30 <sup>aA</sup> ±0,44	43,81 <sup>abA</sup> ±0,35	42,58 <sup>bcA</sup> ±1,03	42,07 <sup>ca</sup> ±0,39

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

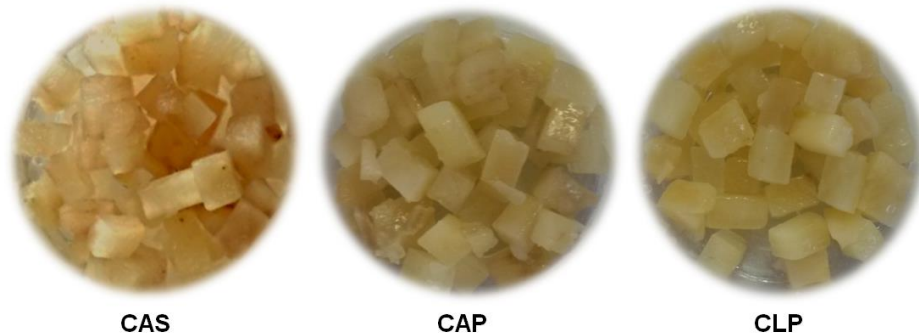
C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 %Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

A luminosidade (L\*) é um parâmetro que pode estar associado ao escurecimento enzimático de frutas e hortaliças, sendo que valores mais próximos de 0 indicam um produto mais escuro, e valores mais próximos de 100 representam um produto mais claro (SALINAS-ROCA et al., 2016). No presente estudo todas as amostras analisadas indicaram redução significativa ( $p \leq 0,05$ ) nos valores de (L\*) ao longo do período de estocagem. Entretanto, a redução é mais acentuada nas amostras C e CAS, que não receberam aplicação de coberturas comestíveis.

Ao final do período de estocagem (15 dias) a amostra CLP apresentou os menores valores de variação do parâmetro L\* (-3,62 %), seguida por CAP e CAS (-12,14 % e -18,59 %, respectivamente). Esses resultados sugerem que a aplicação de cobertura comestível sobre yacon minimamente processado contribuiu para diminuição do escurecimento enzimático na tuberosa (Figura 10). Resultado semelhante foi encontrado por Salinas-Roca et al. (2016), ao combinarem aplicação de coberturas comestíveis à base de alginato de sódio, pulsos de luz e mergulhos em ácido málico em amostras de manga minimamente processada. Os mesmos autores salientam que os tratamentos utilizados e suas combinações contribuíram com a manutenção do parâmetro de cor nas amostras de manga minimamente processada por 14 dias.

**Figura 10** – Amostras de yacon minimamente processado com (CAP e CLP) e sem cobertura comestível (CAS) em 15 dias de armazenamento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



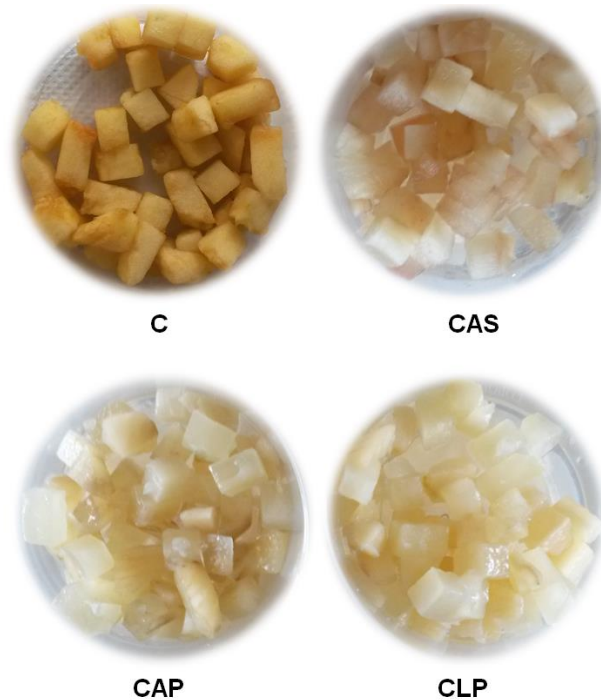
CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

**Fonte:** o próprio autor.

Bierhals, Chiumarelli e Hubinger (2011) ao aplicarem coberturas comestíveis à base de amido de mandioca em abacaxi minimamente processado relatam que a cobertura não exerceu influência no parâmetro  $L^*$  quando comparadas ao controle amostral. No entanto, foi observada diminuição significativa para  $L^*$  em todos os tratamentos durante a estocagem a  $5\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Foi observado um acentuado decréscimo de  $L^*$  na amostra C quando comparada aos demais tratamentos durante todo o período de estocagem dessas amostras. Este fato é atribuído a ausência do agente inibidor de enzimas relacionadas com o escurecimento enzimático (ácido ascórbico). Situação semelhante é reportada por Michels (2005) em estudos envolvendo a aplicação de diferentes antioxidantes na preservação das características da cor de yacon minimamente processado. O mesmo autor salienta que a utilização de ácido ascórbico como agente inibidor do escurecimento enzimático está relacionada com seu mecanismo de ação complexo, atuando como um inibidor competitivo. Os efeitos decorrentes do escurecimento enzimático e da desidratação da amostra C em 9 dias de estocagem podem ser percebidos na Figura 11.

**Figura 11** – Amostras de yacon minimamente processado com (CAP e CLP) e sem cobertura comestível (C e CAS) em 9 dias de armazenamento a  $5\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

O ângulo hue ( $h^*$ ) está associado a tonalidade de cor, podendo variar de 0 a  $360^{\circ}$ , onde os ângulos 0 e  $360^{\circ}$  representam uma tonalidade de cor vermelha,  $90^{\circ}$  o amarelo,  $180^{\circ}$  o verde e  $270^{\circ}$  o azul (MCGUIRE, 1992.; MCLELLAN; LIND; KIME, 1995).

No presente estudo, foi avaliada a variação nas coordenadas do ângulo hue ( $h^*$ ) de amostras de yacon minimamente processado com e sem coberturas comestíveis. Os resultados estão expressos na Tabela 11.

**Tabela 11** – Valores médios de coordenadas do ângulo hue (h\*) das amostras de yacon minimamente processado com e sem coberturas comestíveis durante a estocagem a 5°C ± 2°C.

TRATAMENTO	Período (Dias)					
	1	3	6	9	12	15
<b>C</b>	84,30 <sup>aA</sup> ± 2,18	82,17 <sup>aA</sup> ± 0,95	75,67 <sup>bB</sup> ± 1,51	76,40 <sup>bC</sup> ± 1,91	--	--
<b>CAS</b>	81,84 <sup>aA</sup> ± 1,37	81,91 <sup>aA</sup> ± 3,64	85,04 <sup>aA</sup> ± 0,20	85,30 <sup>aB</sup> ± 0,84	82,35 <sup>aB</sup> ± 1,26	80,79 <sup>aB</sup> ± 1,37
<b>CAP</b>	82,19 <sup>cA</sup> ± 0,95	84,17 <sup>bcA</sup> ± 2,23	86,02 <sup>abcA</sup> ± ± 1,32	89,37 <sup>aA</sup> ± 0,65	87,47 <sup>abA</sup> ± 2,07	83,65 <sup>bcB</sup> ± 1,10
<b>CLP</b>	82,09 <sup>ba</sup> ± 2,33	81,23 <sup>ba</sup> ± 1,15	84,97 <sup>abA</sup> ± 2,00	84,41 <sup>abB</sup> ± 1,93	88,46 <sup>aA</sup> ± 1,57	88,69 <sup>aA</sup> ± 0,92

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey (p>0,05).

C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 %Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

Com exceção da amostra C nos períodos 6 e 9 (75,67° e 76,40°, respectivamente) todas as leituras realizadas foram superiores a 80°, esses resultados apontam para tonalidades de cor próximas ao amarelo, que é a cor natural de yacon. Situação semelhante é encontrada por Vasconcelos et al., (2015) em estudos para controlar o escurecimento enzimático de yacon minimamente processado utilizando agentes anti-escurecimento e atmosferas modificadas.

### 5.2.2.3 pH, acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis totais (SST)

Os resultados dos teores de sólidos solúveis encontrados nas amostras de yacon minimamente processado estão descritos na Tabela 12.

**Tabela 12** – Valores médios de sólidos solúveis totais (°Brix) das amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento durante a estocagem a 5 °C ± 2 °C.

TRATAMENTO	Período (dias)					
	1	3	6	9	12	15
<b>C</b>	5,56 <sup>cb</sup> ± 0,15	5,86 <sup>cb</sup> ± 0,05	6,36 <sup>ba</sup> ± 0,15	7,00 <sup>aa</sup> ± 0,10	--	--
<b>CAS</b>	5,73 <sup>db</sup> ± 0,05	5,90 <sup>cdB</sup> ± 0,10	6,30 <sup>bcA</sup> ± 0,30	6,43 <sup>bb</sup> ± 0,25	6,66 <sup>abA</sup> ± 0,20	6,96 <sup>aa</sup> ± 0,11
<b>CAP</b>	6,13 <sup>ba</sup> ± 0,12	6,40 <sup>abA</sup> ± 0,14	6,53 <sup>aa</sup> ± 0,12	6,43 <sup>abB</sup> ± 0,09	6,60 <sup>aa</sup> ± 0,08	6,56 <sup>ab</sup> ± 0,12
<b>CLP</b>	6,33 <sup>aa</sup> ± 0,11	6,23 <sup>aAB</sup> ± 0,20	6,70 <sup>aa</sup> ± 0,20	6,40 <sup>ab</sup> ± 0,20	6,33 <sup>aa</sup> ± 0,20	6,60 <sup>ab</sup> ± 0,10

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %) com adição de *L. casei* LC-01 (1 %). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5 %) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2 %), mucilagem de linhaça (0,3 °Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1 %).

Fonte: o próprio autor.

No período 1 de estocagem as amostras CAP e CLP apresentaram maior valor de sólidos solúveis (6,13 e 6,33 °Brix, respectivamente) em relação as amostras sem cobertura C e CAS ( $p \leq 0,05$ ). Tal fato era esperado, uma vez que as coberturas comestíveis utilizadas para revestir o yacon minimamente processado eram formuladas à base de polímeros naturais e carreadoras de bactéria probiótica, o que pode contribuir para o aumento do °Brix.

De um modo geral, exceto a amostra CLP, todas as amostras apresentaram acréscimo de sólidos solúveis com o decorrer da estocagem ( $p \leq 0,05$ ). No período 9 a amostra C apresentou aumento significativo ( $p \leq 0,05$ ) nos índices de °Brix quando comparada com as amostras CAS, CAP e CLP. Estas, ao final do período de estocagem (15 dias) apresentam acúmulos de sólidos solúveis na ordem de 21,46, 7,01 e 4,27 %, respectivamente, onde o valor encontrado em CAS é significativamente superior ( $p \leq 0,05$ ) ao encontrado em CAP e CLP.

Desta forma, a utilização de coberturas comestíveis em yacon minimamente processado proporcionou uma maior manutenção na concentração de sólidos solúveis. Resultados semelhantes são reportados por Röble et al. (2011) ao revestirem fatias de maçã com cobertura de alginato de sódio contendo oligofrutose e inulina, onde amostras revestidas apresentavam menores acréscimos nos índices de sólidos solúveis quando comparadas a amostras sem revestimento.

Olivas e Barbosa-Cánovas (2005) salientam que quando comparados a sua forma *in natura*, minimamente processados tem acréscimo de sua necessidade fisiológica, com finalidade de suprir processos de respiração e transpiração. Paralelamente, Carvalho et al. (2004) e Manrique et al. (2005) destacam que o yacon minimamente processado, pode sofrer hidrólises de fruto-oligossacarídeos através de despolimerização para atuar em processos fisiológicos. Conseqüentemente, uma vez que as coberturas comestíveis auxiliaram na manutenção de sólidos solúveis no yacon minimamente processado, sugere-se que as coberturas possam ter influenciado na redução da atividade fisiológica do vegetal.

No presente estudo foi determinado pH e acidez total titulável das amostras de yacon minimamente processado com e sem cobertura comestível. Os resultados estão na Tabela 13.

**Tabela 13** – Valores médios de pH e acidez total titulável (% de ácido málico) em amostras de yacon minimamente processado com e sem revestimento estocadas a 5 °C ± 2 °C.

TRATAMENTO		Período (dias)					
		1	3	6	9	12	15
pH	C	5,61 <sup>bcA</sup> ± 0,03	5,71 <sup>aA</sup> ± 0,03	5,60 <sup>cA</sup> ± 0,01	5,66 <sup>abA</sup> ± 0,01	--	--
	CAS	5,15 <sup>dB</sup> ± 0,04	5,46 <sup>aB</sup> ± 0,04	5,39 <sup>abB</sup> ± 0,06	5,33 <sup>bcB</sup> ± 0,02	5,21 <sup>cdA</sup> ± 0,03	5,22 <sup>cdA</sup> ± 0,04
	CAP	4,88 <sup>aC</sup> ± 0,03	4,77 <sup>bc</sup> ± 0,04	4,65 <sup>cdC</sup> ± 0,03	4,73 <sup>bcC</sup> ± 0,02	4,63 <sup>dB</sup> ± 0,04	4,61 <sup>dB</sup> ± 0,01
	CLP	4,75 <sup>aD</sup> ± 0,02	4,66 <sup>bD</sup> ± 0,02	4,60 <sup>bcC</sup> ± 0,03	4,63 <sup>bD</sup> ± 0,03	4,54 <sup>cdC</sup> ± 0,03	4,52 <sup>dC</sup> ± 0,03
TRATAMENTO		Período (dias)					
		1	3	6	9	12	15
ATT	C	0,9745 <sup>aA</sup> ±0,069	0,9320 <sup>aA</sup> ±0,005	0,8250 <sup>abA</sup> ±0,107	0,6875 <sup>bAB</sup> ±0,119	--	--
	CAS	0,9426 <sup>aA</sup> ±0,010	0,8207 <sup>abA</sup> ±0,108	0,7605 <sup>abcA</sup> ±0,007	0,5725 <sup>cB</sup> ±0,002	0,6269 <sup>bcA</sup> ±0,107	0,6291 <sup>bcA</sup> ±0,103
	CAP	0,8906 <sup>aA</sup> ±0,100	0,8255 <sup>aA</sup> ±0,111	0,6894 <sup>aA</sup> ±0,100	0,7554 <sup>aAB</sup> ±0,004	0,8078 <sup>aA</sup> ±0,090	0,7580 <sup>aA</sup> ±0,004
	CLP	0,8668 <sup>aA</sup> ±0,107	0,7537 <sup>aA</sup> ±0,003	0,6935 <sup>aA</sup> ±0,104	0,8229 <sup>aA</sup> ±0,106	0,8182 <sup>aA</sup> ±0,105	0,7559 <sup>aA</sup> ±0,004

\*Médias seguidas de mesma letra minúscula nas linhas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

\*Médias seguidas de mesma letra maiúscula nas colunas não diferem entre si pelo teste de Tukey ( $p > 0,05$ ).

C = Amostra sem nenhum tratamento. CAS = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5%). CAP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5%) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2%) com adição de *L. casei* LC-01 (1%). CLP = Amostra tratada com ácido ascórbico (1,5%) e revestidas com cobertura comestível à base de alginato de sódio (2%), mucilagem de linhaça (0,3°Brix) com adição de *L. casei* LC 01 (1%).

Fonte: o próprio autor.

Segundo Chitarra e Chitarra (2005) é possível que em amostras vegetais ocorram grandes variações na acidez total titulável sem grandes interferências perceptíveis nos valores de pH. Tal fato ocorre, pois, o potencial hidrogeniônico (pH) expressa apenas a quantidade de ácido dissociado em um meio através da quantificação dos íons  $H^+$ . Em contrapartida, a determinação da acidez total titulável envolve a quantificação de todos os grupamentos ácidos encontrados, tais como, ácidos orgânicos livres e na forma de sais, além de compostos fenólicos (KRAMER, 1994).

De modo geral, em todos os períodos estudados, as amostras CAP e CLP apresentaram menores valores de pH ( $p \leq 0,05$ ) indicando que a aplicação de coberturas comestíveis carreadoras de *L. casei* LC-01 atuam diretamente nessa redução. Segundo Kakiomenou, Tassou e Nychas (1996) a presença de micro-organismos pode contribuir para o decréscimo nos valores de pH, o que pode explicar o comportamento observado no presente estudo. Para mais, as amostras CAS, CAP e CLP foram tratadas com ácido ascórbico (1,5 %) que assim como a adição de micro-organismos pode corroborar a diminuição do pH. Vasconcelos et al. (2015) ao estudarem estratégias para controlar o escurecimento enzimático de yacon minimamente processado utilizando agentes anti-escurecimento, reportaram que as variações nos valores de pH não foram significativas durante a estocagem, no entanto, destacaram que o tipo de agente anti-escurecimento pode reduzir significativamente os valores de pH.

Em relação a acidez total titulável, as amostras C e CAS apresentaram decréscimo significativo ( $p \leq 0,05$ ) durante a estocagem (28,46 e 33,26 %, respectivamente), o mesmo comportamento acontece com as amostras CAP (14,88 %) e CLP (12,79 %), contudo, nessas amostras a redução encontrada não apresentou diferença estatística significativa ( $p > 0,05$ ).

Segundo Rocha, Brochado e Morais (1998), os ácidos orgânicos presentes em vegetais estão mais prontamente disponíveis para obtenção de energia através da atividade respiratória, devido a sua oxidação no ciclo dos ácidos tricarbóxicos, ocasionando a redução do teor de acidez ao longo do armazenamento do vegetal. Desta forma, a menor redução de acidez nos tratamentos revestidos indica uma menor atividade respiratória. Garcia et al. (2011)

ao estudar efeitos de coberturas comestíveis de amido na vida útil de morangos, reportam que não houve diferenças significativas para o parâmetro de acidez total entre as amostras, bem como, durante a estocagem por 15 dias a 5 °C.

## 6 CONCLUSÃO

A utilização de polímeros naturais provenientes de mucilagem de linhaça, exopolissacarídeo Botriosferana do tipo  $\beta$ -D-glucana, e fruto-oligossacarídeo (FOS) comercial exerceram influência positiva na manutenção da viabilidade celular dos probióticos microencapsulados durante o período de estocagem de 15 dias. Em testes de simulação gastrointestinal *in vitro* a utilização de mucilagem de linhaça aliada ao FOS demonstrou ser mais efetiva na proteção a células de *L. casei* LC-01 e *L. casei* BGP 93.

As coberturas comestíveis desenvolvidas para yacon minimamente processado foram eficientes como suporte ao probiótico *L. casei* LC-01, atuando de modo a preservar o número de células viáveis do micro-organismo durante todo o período de estocagem, por volta de 8 log UFC por grama de produto. As amostras de yacon minimamente processado revestidas com as coberturas carreadoras de *L. casei* LC-01 e submetidas a testes de simulação gástrica e entérica apresentaram redução no número de células viáveis do probiótico em média de 2,96 log, resultado similar ao reportado por outros autores em produtos fermentados, indicando o yacon como matriz alternativa e viável para veicular essas bactérias.

A utilização de coberturas comestíveis para revestir yacon minimamente processado auxiliou na preservação de parâmetros físico-químicos do vegetal, diminuindo a perda de massa fresca e o escurecimento enzimático, fatores determinantes para comercialização do produto. Além de indicar maior manutenção nos índices de sólidos solúveis e acidez, características que são associadas a menor atividade fisiológica do produto.

## REFERÊNCIAS

- A.O.A.C. **Official Methods of Analysis of A.O.A.C International**, 18 th ed., Association of Official Analytical Chemists, Arlington, 2005.
- ABD EL-SALAM, M. H.; HIPPEN, A. R.; EL-SHAFIE, K.; ASSEM, F. M.; ABBAS, H.; ABD EL-AZIZ, M.; SHARAF, O.; EL-AASSAR, M. Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 46, n. 10, p. 2103–2110, 2011.
- AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAV, T. M. Recent advances on chitosan-based micro and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n.1, p. 5-28, 2004.
- ALEGRE, I; VIÑAS, I; USALL, J.; ANGUERA, M; ABADIAS, M. Microbiological and physicochemical quality of fresh-cut apple enriched with the probiotic strain *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Microbiology**, Catalonia, v. 28, p. 59-66, 2011.
- ALMEIDA, F. D. L. **Desidratação de suco de abacaxi probiótico por spray-dryer**. 2012. 70 f. Dissertação (Mestrado) – Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2012.
- ALVARENGA, A. L. B.; TODELO, J. C.; PAULILLO, L. F. O. Qualidade e segurança de vegetais minimamente processados: proposta de estruturas de governança entre os agentes da cadeia e os sinais da qualidade. **Gestão & Produção**, v. 21, n. 2, p. 341-354, 2014.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399–409, 2005.
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probiotics: health promoting agents. **Nutrire: Journal of the Brazilian Food and Nutrition Society**, São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, dez. 2007.
- ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. in: A. Mendez-Vilas (Ed.), Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology, **Formatex.org**, p. 466–474, Spain, 2007.
- ARAÚJO, W.M.C.; MONTEBELLO, N.D.P.; BOTELHO, R.B.A; BORGIO, L.A. **Alquimia dos alimentos**. v. 2, Série Alimentos e Bebidas. Brasília: Editora Senac, 560 p., 2009.
- ARIEF, I. I.; WULANDARI, Z.; ADITIA, E. L.; BAIHAQI, M.; NORAIMAH, HENDRAWAN. Physicochemical and microbiological properties of fermented lamb sausages using probiotic *Lactobacillus plantarum* IIA-2C12 as starter culture. **Procedia Environmental Sciences**. v.40, pp. 352-356, 2014.

ARTÉS, F.; GOMÉZ, P. A.; ARTÉS-HERNANDEZ, F. Physical, Physiological and Microbial Deterioration of Minimally Fresh Processed Fruits and Vegetables. **Food Science and Technology International**. v. 13, n. 3. p: 177-188, 2007.

ASP, N. G.; SCHWEIZER, T. F.; SOUTHGATE, D. A. T.; THEANDER, O. Dietary fibre analysis. In: SCHWEIZER, T. F.; EDWARDS, C. A. **Dietary fibre: a component of food nutritional function in health and disease**. London: Springer Verlag; p. 57-99. 1992.

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

AVENA-BUSTILLOS, R. J.; CISNEROS-ZEVALLOS, L. A.; KROCHTA, J. M.; SALTVEIT, M. E. Application of casein–lipid edible emulsions to reduce white blush on minimally processed carrots. **Postharvest Biology Technology**, v. 4, p. 319–329, 1994.

AYAMA, H.; SUMPAPAPOL, P.; CHANTHACHUM, S. Effect of encapsulation of selected probiotic cell on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Songklanakarin Journal of Science and Technology**. v. 36, n.3, p. 291-299. 2014.

BADARÓ, A. C. L.; GUTTIERRRES, A. P. M.; REZENDE, A. C. V.; STRINGHETA, P. C. Alimentos probióticos: Aplicação como promotores da saúde humana. **Revista Digital de Nutrição**, Ipatinga, v. 2, n. 3, ago./dez. 2008.

BARBOSA, A.M.; STELUTI, R.M.; DEKKER, R.F.H.; CARDOSO, M.S.; DA SILVA, M.L.C. Structural characterization of Botryosphaeran: a (1→3, 1→6)-β-D-glucan produced by the ascomyceteous fungus, *Botryosphaeria* sp. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 338, p. 1691-1698, 2003.

BARRETEAU, H.; DELATTRE, C.; MICHAUD, P. Production of oligosaccharides as promising new food additive generation. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 323-333, 2006.

BEDANI, R., et al. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v.55, n.2, p. 436-443, 2014.

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 34, n.2, p. 382–389, 2013.

BENGMARK, S.; LORENZO, A. G.; CULEBRAS, M. J. Use of pro, pre and symbiotics in the ICU-future options. **Nutrición Hospitalaria** n. 16, 2001.

BERNARDEAU, M.; VERNOUX, J. P.; HERNRI-DUBERNET, S.; GUÉGUEN, M. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278-285, 2007.

BHOWMIL, S. R.; PAN, J. C. Shelf life of mature green tomatoes stored in controlled atmosphere and high humidity. **Journal of Food Science**. Chicago, v.57, n.4, p.948-953, 1992.

BIERHALS, V. da S. **Estudo de vida útil de abacaxis (*Ananas comosus* L. Merrill cv 'pérola') minimamente processados em rodela com coberturas comestíveis**. 2010. 161 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2010.

BIERHALS, V. S., CHIUMARELLI, M., & HUBINGER, M. D. Effect of Cassava Starch Coating on Quality and Shelf Life of Fresh-Cut Pineapple (*Ananas Comosus* L. Merrill cv "Pérola"). **Journal of Food Science**, 76(1), 62–72, 2011.

BONGIOVANI, R. A. M., et al. Nota Científica: Caracterização reológica dos botriosferanas produzidos pelo *Botryosphaeria rhodina* MAMB-05 em glucose, sacarose e frutose como fontes de carbono. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 12, n. 1, p. 53-59, 2009.

BORGOGNA, M.; BELLICHA, B.; ZORZIN L.; LAPASINC, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416–423, 2010.

BORNET, F.R. Undigestible sugars in food products. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Paris, v.59, n.3, Suppl, p.763-769, 1994.

BOURTOOM, T. Edible films and coatings: characteristics and properties. **International Food Research Journal**, Hat Yai, v.15, n. 3, p. 237-248, 2008.

BRASIL, Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/>. (2016). Acesso em: 20 de maio, 2016.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada (RDC) n. 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, jan. 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução RDC nº 12, de 02 de janeiro de 2001. Aprova o Regulamento Técnico sobre padrões microbiológicos para alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, de 10 de janeiro de 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução nº 386, de 05 de agosto de 1999: Regulamento técnico sobre aditivos utilizados segundo as boas práticas de fabricação e suas funções. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 09 de agosto de 1999.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467– 483, 2011.

BURITI, F.C.A.; ROCHA, J.S.; ASSIS, E.G.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT - Food Science and Technology**, v.38, n.2, p.173-180, 2005

BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica L.*) and flaxseed (*Linum usitatissimum L.*) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry**, 216, 97–105, 2017.

CAHAN, R., GOLDSTEIN, V., FINKELSTEIN, B. Development of the novel active packaging film preventing migration of antimicrobial component. The College of Judea and Samaria, **The Research Institute**, Israel. V. 161, 2002.

CALDERÓN, O. et al. Evaluación del efecto del cultivo probiótico *Lactobacillus rhamnosus* adicionado a yogurt natural y con probióticos comerciales sobre poblaciones de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enteritidis*. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición**, v. 57, n. 1, p. 51-56, 2007.

CALVO, D. R.; MARTORELL, P.; GENOVÉS, S.; GOSÁLBEZ, L. Development of novel functional ingredients: Need for testing systems and solutions with *Caenorhabditis elegans*. **Trends in Food Science and Technology**, v. 54, 2016.

CANO, P.G.; PERDIGÓN G. Probiotics induce resistance to enteropathogens in a renourished mouse model. **Journal of Dairy Research**, v. 70, n. 4, p. 433-440, 2003.

CAPRA, M. L.; TIBALDO, M. M.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J. A.; QUIBERONI, A. Technological and probiotic characterisation of *Lactobacillus casei/paracasei* strains and their phage-resistant mutants. **International Dairy Journal**. v.37, pp. 39-47, 2014.

CÁRDENAS, A.; HIGUERA-CIAPARA, I.; GOYCOOLEA, F. Rheology and aggregation of cactus (*Opuntia ficus-indica*) mucilage in solution. **Journal of the Professional Association for Cactus Development**, v. 2, p. 152-159, 1997.

CARPITA, N. C.; KAMABUS, J.; HOUSLEY, T. L. Linkage structure of fructans and fructan oligomers from *Triticum aestivum* and *Fistuca arundinaceae* leaves. **Journal Plant Physiology**. v. 134, p. 162-168, 1989.

CARVALHO, S.; TOLEDO, I.; ARAÚJO, F.; PEREIRA, G. Fructanos en raíces tuberosas de yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poep. & Endl.) expuestas al sol y almacenadas bajo condiciones ambientales. **Agro-Ciencia**, Botucatu, v.20, n.1, p.17-23, 2004.

CASEMIRO, Í. D. P.; RAMOS, P. Scientific production on functional food: an analysis of Brazilian publications between 2007 and 2013. **DEMETRA: Alimentação, Nutrição & Saúde**. v. 9, n. 4, p. 925-941, 2014.

- CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 61-84, 2005.
- CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185-189, 2010.
- CHEN, H.H.; XU, S.; WANG, Z. Gelation properties of flaxseed gum. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 2, p. 295–303, 2006.
- CHEN, K.N.; CHEN, M.J.; LIU, J.R.; LIN, C.W.; CHIU, H.Y. Optimization of Incorporated Prebiotics as Coating Materials for Probiotic Microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 260- 266, 2005.
- CHEN; KUO; LAI. Effect of surfactants on water barrier and physical properties of tapioca starch/decolorized hsian-tsao leaf gum films. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 3, p. 714-721, 2009.
- CHITARRA, M. I. F. **Alimentos minimamente processados**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2001. 93 p.
- CHITARRA, M. I. F. **Processamento mínimo de frutas e hortaliças**. Lavras: UFLA/FAEPE, 2000. 113 p.
- CHITARRA, M. I. F.; CHITARRA, A. B. **Pós-colheita de frutas e hortaliças: fisiologia e manuseio**. 2<sup>o</sup> ed. Lavras: Editora UFLA. 2005.
- CHIUMARELLI, M., et al. "Fresh cut 'Tommy Atkins' mango pre-treated with citric acid and coated with cassava (*Manihot esculenta Crantz*) starch or sodium alginate. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 12, n.3, p. 381-387, 2011.
- CHONG, E.S.L. A potential role of probiotics in colorectal cancer prevention: review of possible mechanisms of action. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 30, p. 351–374, 2014.
- COEURET V.; GUEGUEN M., VERNOUX J.P. In vitro screening of potential probiotic activities of selected lactobacilli isolated from unpasteurized milk products for incorporation into soft cheese. **Journal of Dairy Research**, v. 71 n. 4, p. 451-460, 2004.
- COLLINS, J.K., THORNTON, G., SULLIVAN, G.O. Selection of probiotic strains for human applications. **International Dairy Journal**, Amsterdam, v.8, p.487-490, 1998.
- CONCEIÇÃO, M. C. **Otimização do processo de extração e caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata Miller*)**. 2013. 121 p. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2013.

- CONTADO, E. W. N. F. **Obtenção, caracterização e utilização dos frutanos de tubérculos de yacon (*Smallanthus sonchifolia*)**. 2009. 144 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Agroquímica, Universidade Federal de Lavras, Lavras, 2009.
- COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 56–67, 2012.
- CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALDS, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024–1039, 2004.
- CORRADI Da SILVA, M. L.; IZELI, N. L.; MARTINEZ, P. F.; SILVA, I. R.; CONSTANTINO, C. J. L.; CARDOSO, M. S.; BARBOSA, A. M.; DEKKER, R. F. H.; SILVA, G. V. J. Purification and structural characterization of (1 → 3; 1 → 6)-β-glucan from *Botryosphaeria* sp. produced in two different carbon sources: a comparative study. **Carbohydrate Polymers**, Oxford, v. 61, n. 1, p. 10-17, 2005.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T. Gastrointestinal effects of prebiotics. **British Journal of Nutrition**, n. 87, 2002.
- CUMMINGS, J. H.; MACFARLANE, G. T.; ENGLIST, H. N. Prebiotics digestion and fermentation. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2001.
- D'ORAZIO, G.; DI GENNARO, P.; BOCCARUSSO, M.; PRESTI, I.; BIZZARO, G., GIARDINA, S.; LA FERLA, B. Microencapsulation of new probiotic formulations for gastrointestinal delivery: *in vitro* study to assess viability and biological properties. **Applied Microbiology and Biotechnology**, 99(22), 9779–9789, 2015.
- DAHER, C.F.; BAROODY, G.M.; HOWLAND, R.J. Effect of a surfactant, *Tween* 80, on the formation and secretion of chylomicrons in the rat. **Food and Chemical Toxicology**, 41, p. 575-582, 2003.
- DAMODARAN, S., KIRK L. P., FENNEMA, O. R.: Tradução Adriano Brandelli et al. **Química de alimentos de Fennema**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 900p, 2010.
- DARILMAZ, D. O.; ASLIM, B.; SULUDERE, Z.; AKCA, G.; Influence of gastrointestinal system conditions on adhesion os exopolysaccharide-producing *Lactobacillus delbruekii* subsp. *bulgaricus* strains to caco-2 cells. **Brazilian Archives of Biology and Technology**. v.54, n.5, pp. 917-926, 2011.
- DARJANI, P.; HOSSEINI NEZHAD, M.; KADKHODAEI, R.; MILANI, E. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, 73, 162–167. 2016.
- DEKKER, R.F.H.; BARBOSA, A.M. The effects of aeration and veratryl alcohol on the production of two laccases by the ascomycete *Botryosphaeria* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, Nova Iorque, v. 28, p. 81-88, 2001.

DELGADO, G. T. C.; TAMASHIRO, W. M. da S. C.; MARÓSTICA JUNIOR, M. R.; PASTORE, G. M. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. **Plant Foods for Human Nutrition**, May. 2013.

DELGADO, G. T. C.; THOMÉ, R.; GABRIEL, D. L.; TAMASHIRO, W. M. S. C.; PASTORE, G. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*)-derived fructooligosaccharides improves the immune parameters in the mouse. **Nutrition Research** 32:884–892, 2012.

DEL-VALLE, V.; HERNÁNDEZ-MUÑOZ, P.; GUARDA, A.; GA-LOTTO, M. J. Development of a cactus-mucilage edible coating (*Opuntia ficus-indica*) and its application to extend strawberry (*Fragaria ananassa*) shelf-life. **Food Chemistry**, v. 91, p. 751-756. 2005.

DETERS, A. M.; LENGSELD, C.; HENSEL, A. Oligo- and polysaccharides exhibit a structure dependent bioactivity on human keratinocytes *in vitro*. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 102, p. 391-399, 2005.

DICK M. **Desenvolvimento de Filmes Biodegradáveis a partir da Semente e da Mucilagem de Chia (*Salvia hispanica L.*)**. 2014. 93 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2014.

DING, W.K.; SHAH, N.P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 100-107, 2009.

DOWNES, F.P.; ITO, K (Eds.). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 ed. Washington: American Public Health Association (APHA), 2001.

EMMAMBUX, N. M.; MINNAAR, A. The effect of edible coatings and polymeric packaging films on the quality of minimally processed carrots. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 83, p. 1065–1071, 2003.

FAI, A. E. C.; PASTORE, G. M. Galactooligosaccharides: production, health benefits, application to foods and perspectives. **Scientia Agropecuaria**, p. 69-81, 2015.

FAN, Y.; XU, Y.; WANG, D.; ZHANG, L.; SUN, J.; SUN, L.; ZHANG, B. Effect of alginate coating combined with yeast antagonist on strawberry (*Fragaria x ananassa*) preservation quality. **Postharvest Biology and Technology**, v. 53 p. 84-90, 2009.

FAO/WHO. **Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Ontario, Canada; 2002.

FAREEZ, I. M., LIM, S. M., MISHRA, R. K., RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, n. 72, p. 1419–1428, 2015.

FAVARO-TRINDADE, C. S., HEINEMANN, R. J. B., & PEDROSO, D. L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, 6, 1e8, 2011.

FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e Probióticos – Atualização e Prospecção**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 226p. 2012.

FONTES, L. C. B.; SARMENTO, S. B. S.; SPOTO, M. H. F.; DIAS, C. T. dos S. Conservação de maçã minimamente processada com o uso de películas comestíveis. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 872-880, out./dez. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION - FDA. **Generally recognized as safe (GRAS)**. Silver Spring. Disponível em: <<http://www.fda.gov/Food/IngredientsPackagingLabeling/GRAS/>>. Acesso em: 5 maio 2015.

FRITZEN-FREIRE, C.B; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C; PINTO, S.S; NEGRÃO-MURAKAMI, A.; MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306–312, 2012.

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

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 161-182, 1988.

GARCIA, L.C., PEREIRA, L.M., LUCA SARANTÓPOULOS, C.I.G., HUBINGER, M.D. Effect of antimicrobial starch edible coating on shelf-life of fresh strawberries. **Packaging Technology and Science**, 25 (7), 413–425. 2011.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103-105, 2009.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, R. A. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Reviews**. v.17, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Prebiotics: Development & Application. **John Wiley & Sons Ltd**, The Atrium, Southern Gate, Chichester. 2006, 266p.  
GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. **S.T.P Pharma Sciences**, n. 5, 1995.

GLICKSMAN, M. Origin and classification of hydrocolloids. In: GLICKSMAN, M. (Ed.). **Food hydrocolloids**. New York: Academic Press, v. 1, p. 3-18, 1982.

GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, 1998.

GONTARD, N.; GUILBERT, S. Bio-packing: Technology and properties of edible and/or biodegradable material of agricultural origin. **Boletim da SBCTA**, v. 30, n. 1, p. 3-15, 1996.

GRAEFE, S; HERMANN, M; MANRIQUE, I; GOLOMBEK, S; BUERKERT, A. Effects of post-harvest treatment on the carbohydrate composition of yacon roots in the Peruvian Andes. **Field Crops Research**, v.86, p.157-165, Aug. 2004.

GRIERSON, W.; WARDOWSKY, W.F. Relative humidity effects on the postharvest life of fruits and vegetables. **HortScience**, v. 13, n. 5, p. 570-574, 1978.

GUSSO, A. P; MATTANNA, P.; RICHARDS, N. Yacon: benefícios à saúde e aplicações tecnológicas. **Ciência Rural**, v. 45, n. 5, p.912-919, 2015.

HABIB, N.C. et al. Hypolipidemic effect of *Smallanthus sonchifolius* (yacon) roots on diabetic rats: Biochemical approach. **Chemico-Biological Interaction**, v. 194, p. 31-39, 2011.

HAGHSHENAS, B., ABDULLAH, N., NAMI, Y., RADIAH, D., ROSLI, R., & KHOSROUSHAHI, A. Y. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. **Journal of Applied Microbiology**, 118(4):1048-57, 2015.

HOLZAPFEL, W. H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**. v. 35, p. 109–116, 2002.

HORI, T. et al. Argumentation of cellular immunity and reduction of influenza virus titer in aged mice fed *Lactobacillus casei* strain Shirota. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v. 9, n. 1, p. 105-108, 2002.

HORWITZ, W. (Ed) **Official methods of analysis of AOAC international**. 18 ed. Gaithersburg. Maryland. 2005.

IFPA - INTERNATIONAL FRESH-CUT PRODUCE ASSOCIATION. **Food safety guidelines for the fresh-cut produce industry**. 4. ed. [S.l.], 213 p. 2001.

ISO 6579. Microbiology of food and animal feeding stuffs- **Horizontal method for the detection of *Salmonella* spp.**, 4 a Ed. 2002. The International Organization for Standardization, amendment 1: 15/07/2007.

JANI, G. K.; SHAH, D. P.; PRAJAPATI, V. D.; JAIN, V. C. Gums and mucilages: versatile excipients for pharmaceutical formulations. **Asian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 4, n. 5, 2009.

JAWORSKA, D.; NEFFE, K.; KOŁOZYN-KRAJEWSKA, D.; DOLATOWSKI, Z.J. Survival during storage and sensory effect of potential probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus acidophilus* Bauer and *Lactobacillus casei* Bif3'/IV in dry fermented pork loins. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46: 2491-2497, 2011.

JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, p. 1115-1122, 1993.

KADER, A. A. **Postharvest technology of horticultural crops**. 2. Ed. Oakland. University of California, 1992. 296p.

KAKIOMENOU, K.; TASSOU, C.; NYCHAS, G. Microbiological, physicochemical and organoleptic changes of shredded carrots stored under modified storage. **International Journal of Food Science and Technology**, n. 31, p. 359-366, 1996.

KASIMOĞLU A.; GÖNCÜOĞLU, M.; AKGÜN, S. Probiotic white cheese with *Lactobacillus acidophilus*. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 12, p. 1067–1073, 2004.

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

KAY, R. M.; STRASBERG, S. M. Origin, chemistry, physiological effects and clinical importance of dietary fibre. **Clinical and investigative medicine**, n.1, p. 9-24, 1978.

KESTER, J. J.; FENNEMA, O. R. Edible films and coatings: A review. **Food Technology**, v. 40, n.12, p. 47-59, 1986.

KING, A. H. Brown seaweed extracts (alginates). In: GLICKSMAN, M.E.D. (Ed.). **Food hydrocolloids**. Boca Raton: CRC Press, 1983. V.2, chap. 6, p. 115-190.

KOTOVICZ, V. **Otimização da desidratação osmótica e secagem do yacon (*Polymnia sonchifolia*)**. 2011. 89 f. Dissertação (Mestrado) - Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Departamento de Engenharia Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2011.

KRAMER, A. Fruits and vegetables. In: KRAMER, A.; TWIGG, B. A. **Quality control for coatings and films to improve food quality**. Basel. Technomic Publishing Company, 1994.

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

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H.; The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

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

LACEY, A. M. L. de; LÓPEZ-CABALLERO, M.E.; GÓMEZ-ESTACA, J.; GÓMEZ-GUILLÉN, M.C.; MONTERO, P. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. Madri, v.16, p. 277-282. 2012.

LAURENTI, E. S.; GARCIA, S. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 16, n. 2, p. 107-115, 2013.

LEE, J. Y.; PARK, H. J.; LEE, C. Y.; CHO, W. Y. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. **LWT - Food Science and Technology**, v.36, n.3, p.326-329, 2003.

LENGSFELD, C.; TITGEMEYER, F.; FALLER, G.; HENSEL, A. Glycosylated compounds from okra inhibit adhesion of *Helicobacter pylori* to human gastric mucosa. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, vol. 52, p. 1495-1503, 2004.

LEONE, R. DE S.; DE ANDRADE, E. F.; ELLENDERSEN, L. N.; TAIS DA CUNHA, A.; CHUPEL MARTINS, A. M.; GRANATO, D.; MASSON, M. L. Evaluation of dried yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as an efficient probiotic carrier of *Lactobacillus casei* LC-01. **LWT - Food Science and Technology**, 75, 220–226, 2017.

LIMA, G. J. A. **Uso de Polímero Natural do Quiabo como Auxiliar de Floculação e Filtração em Tratamento de Água e Esgoto**. 2007. 113 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Sanitária e do Meio Ambiente) -Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2007.

LUVIELMO, M. de M.; LAMAS, S. V. Revestimentos comestíveis em frutas. **Estudos Tecnológicos em Engenharia**, Pelotas, v. 8 n. 1, p. 8-15, jan./jun. 2013.

MACFARLANE, G.T.; H. STEED, H.; MACFARLANE, S. Bacterial metabolism and health-related effects of galacto-oligosaccharides and other prebiotics. **Journal of Applied Microbiology**, v. 104, p. 305–344, 2008.

MAHAPATRA, S; BANERJEE, D. Fungal Exopolysaccharide: Production, Composition and Applications. **Microbiology Insights**, v. 6, p. 1–16, 2013.

MANRIQUE, I.; PÁRRAGA, A.; HERMANN, M. **Yacon syrup: Principles and processing. Series: Conservación y uso de la biodiversidad de raíces y tubérculos andinos: Una década de investigación para el desarrollo (1993-2003)**. n. 8B. International Potato Center, Universidad Nacional Daniel Alcides Carrión, Erbacher Foundation, Swiss Agency for Development and Cooperation. Lima, Peru, 2005, 31p.

MASTROMATTEO, M.; CONTE, A.; DEL NOBILE, M. A. Packaging strategies to prolong the shelf-life of fresh carrots (*Daucus carota L.*). **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 13, p. 215-220, 2012.

MATIAS, Natalia Silva. **Desenvolvimento de alimento probiótico à base de soja com polpa de fruta**. 2011. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2011.

MCGUIRE, R. G. Reporting of objective colour measurements. **HortScience**, v. 27, n. 12, p.1254–1255, 1992.

MCLELLAN, M. R.; LIND, R. M.; KIME L. W. Hue angle determinations and statistical analysis for multiquadrant Hunter *L, a, b* data. **Journal of Food Quality**, n.183, p. 235–40, 1995.

MEDICI, M.; VINDEROLA, C.G.; PERDIGÓN, G. Gut mucosal immunomodulation by probiotic fresh cheese. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 7, p. 611-618, 2004.

MESSAOUDI, S.; MANAI, M.; KERGOURLAY, G.; PRÉVOST, H.; CONNIL, N.; CHOBERT, J. M.; DOUSSET, X. *Lactobacillus salivarius*: Bacteriocin and probiotic activity. **Food Microbiology**, v. 36, pp. 296-304, 2013.

MICHELS, I. **Aspectos tecnológicos do processamento mínimo de tubérculos de yacon (*Polymnia sonchifolia*) armazenados em embalagens com atmosfera modificada**. 2005. 107 f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, Setor de Tecnologia, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, 2005.

MISHRA, S. P. Polyacrylonitrile-grafted Okra mucilage: A renewable reservoir to polymeric materials. **Carbohydrate Polymers**, v. 68, p. 95-100, 2007.

MOAYEDNIA, N.; EHSANI, M. R.; EMANDJOMEH, Z.; ASADI, M. M.; MIZANI, M.; MAZAHERI, A. F. A note on the effect of calcium alginate coating on quality of refrigerated strawberries. **Irish Journal of Agricultural and Food Research**, v. 49, p. 165–170, 2010.

MOAYEDNIA, N.; EHSANI, M. R.; EMANDJOMEH, Z.; ASADI, M. M.; MIZANI, M.; MAZAHERI, A. F. The Effect of Sodium Alginate Concentrations on Viability of Immobilized *Lactobacillus acidophilus* in Fruit Alginate Coating During Refrigerator Storage. **Australian Journal of Basic and Applied Sciences**, v. 3, n. 4, p. 3213-3226, 2009.

MONEGO, M. A. **Goma da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) para uso como hidrocolóide na indústria alimentícia**. 2009. 87 f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia em Alimentos) – Universidade Federal de Santa Maria – Santa Maria, RS, 2009.

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. **Probiotics and Food Probiotic Products: based on Dairy Probiotic Products**. Eta publication, Iran, 2007.

MORTON, R.D. Aerobic plate count. In: DOWNES, F.P.; K. ITO (Ed.) **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**, 4 a Ed. American Public Health Association, Washington, D.C., Chapter 7, p. 63-67, 2001.

MUSHTAQ, M.; GANI A.; MASOODI, F. A.; AHMAD, M. Himalayan cheese (Kalari/Kradi) – effect of different probiotic strains on oxidative stability, microbiological, sensory and nutraceutical properties during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 67, pp. 74–81, 2016.

NARAN, R.; CHEN, G.; CARPITA, N. C. Novel Rhamnogalacturonan I and Arabinoxylan polysaccharides of flax seed mucilage. **Plant Physiology**, v. 148, n.1, p. 132–141, 2008.

NOVELLO, D.; POLLONIO, M. A. R. Caracterização e propriedades da linhaça (*Linum usitatissimum L.*) e subprodutos. **B.CEPPA**, Curitiba, v. 29, n. 2, p. 317-330, jul./dez. 2011.

OLIVAS, G.I.; BARBOSA-CÁNOVAS, G.V. Edible Coatings for Fresh-Cut Fruits. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Philadelphia, v.45, n.7-8, p.657-670, 2005.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007.

OLIVEIRA, C. S. de; GRDEN, L.; RIBEIRO, M. C. de O. Utilização de Filmes Comestíveis em Alimentos. **Série em Ciência e Tecnologia de Alimentos: Desenvolvimentos em Tecnologia de Alimentos**. Ponta Grossa, v. 01, p. 52 - 57, 2007.

OLIVEIRA, M. A.; SOUZA, V. M.; BERGAMINI, A. M. M.; MARTINIS, E. C. P. Microbiological quality of ready-to-eat minimally processed vegetables consumed in Brazil, **Food Control**, v. 22, n.8, p. 1400-1403, 2011.

OMS-OLIU, G.; ODRIOZOLA-SERRANO, I.; SOLIVA-FORTUNY, R.; MARTÍNBELLOSO, O. Antioxidant Content of Fresh-cut Pears Stored in High-O<sub>2</sub> Active and Passive Modified Atmosphere Packaging. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 56, p. 932-940, 2008.

ONSOYEN, S. Alginates. In: IMENSON, A. **Thickening and gelling agents for food**. 2. Ed. London: Blackie Academic & Professional, 1997. P. 22-44.

PARTE, A. C. LPSN - List of prokaryotic names with standing in nomenclature. **Nucleic Acids Research**, 42(D1), p. 613–616, 2014.

PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Ionotropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.

PEREIRA, J. A. R.; BARCELOS, M. F. P.; PEREIRA, M. C. A.; FERREIRA, E. B. Studies of chemical and enzymatic characteristics of Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and its flours. **Food Science and Technology**, Campinas, v. 33, n. 1, p. 75-83. 2013.

PIMENTEL, M.B.V.C. de, FRANCKI, M.V., GOLLÜCKE, B.P.A. **Alimentos funcionais. Introdução às principais substâncias bioativas em alimentos**. São Paulo, 2005.

QIN, Y. Review – Alginate fibers: an overview of the production processes and applications in wound management. **Polymer International**, v. 57, p. 171-180, 2008.

RACOVITĂ, S., VASILIU, S., POPA, M., LUCA, C. Polysaccharides based on micro- and nanoparticles obtained by ionic gelation and their applications as drug delivery systems. **Revue Roumaine de Chimie**, v. 54, n. 9, p. 709–718, 2009.

- RAJAM, R., & ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015.
- RANADHEERA R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, Vol.43, pp.1-7, 2010.
- RATHORE, S., ET AL. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013.
- RENARD, D.; GARNIER, C.; LAPP, A.; SCHMITT, C.; SANCHEZ C. Structure of arabinogalactan-protein from Acacia gum: From porous ellipsoids to supramolecular architectures. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 322– 332, 2012.
- ROBERFROID, M. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**. v. 34, Suppl. 2, p. 105-10, 2002.
- ROBERFROID, M. Prebiotics: The Concept Revisited. **The Journal of Nutrition**, n. 137, p. 830-837, 2007.
- ROBERTS R.F.; KIMMEL S.A.; ZIEGLER G.R. Optimization of exopolysaccharide production by *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* RR grown in a semidefined medium. **Applied and Environmental Microbiology**, 64, 659–664, 1998.
- ROCHA, A. M. C. N.; BROCHADO, C. M.; MORAIS, A. M. M. B. Influence of chemical treatment on quality of CUT Apple (cv. Jonagored). **Journal of Food Quality**, Malden, v.21, n. 1, p. 13-28, jan 1998.
- RODRIGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Alimentos funcionales y nutrición optima. **Revista da Espanha de Salud Pública**. v. 77, n. 3, p. 317-331, 2003.
- ROJAS-GRAÜ, M. A.; RAYBAUDI-MASSILIA, R. M.; SOLIVA-FORTUNY, R.; AVENA-BUSTILLOS, R. J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Apple puree-alginate edible coatings as carrier of antimicrobial agents to prolong shelf-life of fresh cut apples. **Postharvest Biology and Technology**, v. 45, p. 245-264, 2007.
- RÖßLE, C.; BRUNTON, N.; GORMLEY, R. T.; ROSS, P. R.; BUTLER, F. Development of potentially synbiotic fresh-cut apple slices. **Journal of Functional Foods**, v. 2, n. 4, p. 245–254, 2010.
- RÖßLE, C., et al. Alginate coating as carrier of oligofructose and inulin and to maintain the quality of fresh-cut apples. **Journal of Food Science**, Chicago, v.76, n.1, p. H19-H29, jan./fev. 2011.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1., p.1-16, 2006.
- SAAD, S. M.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e Prebióticos em Alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, Amsterdam, v.84, p.197-215, 2000.

SALINAS-ROCA, B.; SOLIVA-FORTUNY, R.; WELTI-CHANES, J.; MARTÍN-BELLOSO, O. Combined effect of pulsed light, edible coating and malic acid dipping to improve fresh-cut mango safety and quality. **Food Control**, v. 66, p. 190–197, 2016.

SANDERS, M.E.; GIBSON, G.R.; GILL, H; GUARNER, F. Probiotics: their potential to impact human health. Council for Agricultural Science and Technology (CAST), **CAST** Ames, Iowa, n.36, 2007.

SANDERS; KLAENHAMMER. Invited review: The scientific basis os *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**. v. 84, pp. 319 – 331, 2001.

SATHYABAMA, S., et al. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n.1, p. 419-425, 2014.

SCHREZENMEIR J, VRESE M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, 2001.

SCHWENNINGER, S.M. et al. Detection of antifungal properties in *Lactobacillus paracasei subsp paracasei* SM20, SM29, and SM63 and molecular typing of the strains. **Journal of Food Protection**, v. 68, n. 1, p. 111-119, 2005.

SEYFRIED, M. **Caracterização química dos polissacarídeos provenientes dos frutos de *Abelmoschus esculentus* L. Moench e suas atividades biológicas *in vitro***. 2014. 155 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Univerisdade Federal do Paraná, Curitiba, 2014.

SHAH, A.; GANI, A.; AHMAD, M.; ASHWAR, B. A.; MASOODI, F. A.  $\beta$ -Glucan as an encapsulating agent: Effect on probiotic survival in simulated gastrointestinal tract. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 82, p. 217–222, 2016.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHIBAIRO, S.I.; UPADHYAYA, M.K.; TOIVONEN, P.M.A. Postharvest moisture loss characteristics of carrot (*Daucus carota* L.) cultivars during short-term storage. **Scientia Horticulturae**, v. 71, n. 1, p. 1-12, 1997.

SILVA, F. DE A. S. E.; AZEVEDO, C. A. V. DE. Principal Components Analysis in the Software Assistat-Statistical Attendance. In:**WORLD CONGRESS ON COMPUTERS IN AGRICULTURE, 7**, Reno-NV-USA: American Society of Agricultural and Biological Engineers, 2009.

SILVA, V. C. **Efeitos da radiação gama e temperaturas de armazenamento em legumes minimamente processados e pré-cozidos e aceitabilidade de mercado de produtos irradiados**. 2014. Tese (Doutorado em Energia Nuclear na Agricultura

e no Ambiente) - Centro de Energia Nuclear na Agricultura, Universidade de São Paulo, Piracicaba, 2014.

SILVA, V. S. N. **Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e mucilagem extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.)**. 2006. 116 f. Tese (Doutorado) - Pós-graduação de Faculdade de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2006.

SILVA, E. O.; PINTO, P. M.; JACOMINO, A. P.; SILVA, L. T. **Processamento mínimo de produtos hortifrutícolas** – Fortaleza: Embrapa Agroindústria Tropical, 2011.

SIMONOVSKA, B.; VOVK, I.; ANDRENESEK, S.; VALENTOVA, K.; ULRICHOVA, J. Investigation of phenolic acids in yacon (*Smallanthus sonchifolius*) leaves and tubers. **Journal of Chromatography A**, v.1016, n.1, p.89-98, 2003.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BREAEEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Tibtech Innovations**, v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SOUSA, Graziela Leal. **Desenvolvimento de sorvete simbiótico de graviola (*Annona muricata* L.) com teor reduzido de gordura e avaliação da resistência gastrointestinal dos probióticos in vitro**. 2013. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2013.

SOUSA, S., GOMES, A. M., PINTADO, M. H., SILVA, J. P., COSTA, P., AMARAL, M. H., DUARTE, A. C., RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A. P., FREITAS, A. C. Characterization of freezing effect upon stability of probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, n. 93, p. 90–97, 2015.

STELUTI, R. M.; GIESE, E. C.; PIGATO, M. M.; SUMIYA, A. F. G.; COVIZZI, L. G.; JOB, A. E.; CARDOSO, M. S.; CORRADI Da SILVA, M. L.; DEKKER, R. F. H.; BARBOSA, A. M. Comparasion of botryosphaeran production by the ascomyceteous fungus *Botryosphaeria* sp., grown on different carbohydrate carbono sources, and their partial structural features. **Journal of Basic Microbiology**, São Francisco, v. 44, n. 6, p. 480-486, 2004.

SUTHERLAND, I.W. Novel and established applications of microbial polysaccharides. **Tibtech**, v. 16, p. 41-46, 1998.

SZAJEWSKA, H.; WANKE, M.; PATRO, B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare associated diarrhoea in children. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 34, n. 9, p. 1079 - 87, 2011.

TANG, Y.; XIE, F.; ZHANG, D.; ZHU, M.; LIU, L.; LIU, P.; GU, C. Physical properties and prebiotic activity of maize starch-based functional films. **Starch/Staerke**, 67(1–2), 124–131, 2015.

TANIWAKI, M.H., IAMANAKA, B.T., BANHE, A.A. Comparison of culture media to recover fungi from flour and tropical fruit pulp. **Journal of Food Mycology**, v.2, p. 291-302, 1999.

TAOKA, Y.;NAGANO, N.;OKITA, Y.;IZUMIDA, H.;SUGIMOTO, S.; HAYASHI, M. Effect of Tween 80 on the growth, lipid accumulation and fatty acid composition of *Thraustochytrium aureum* ATCC 34304. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, 111, p. 420-424, 2011.

TAPIA, M. S.; ROJAS-GRAU, M.A; RODRÍGUEZ, F.J.; RAMÍREZ, J.; CARMONA, A.; MARTIN-BELLOSO, O. Alginate- and Gellan-Based Edible Films for Probiotic Coatings on Fresh-Cut Fruits. **Journal of Food Science**, Venezuela, v.72, n. 4, p.190-196, 2007.

TAVARES, F. D. O., ET AL. Cobertura Comestível Adicionada De Óleos Essenciais De Orégano E Alecrim Para Uso Em Ricota. **Revista do Instituto de Laticínios Cândido Tostes**, v, 69, n. 4, p. 249, 2014.

THIES, C. **How to make microcapsules lecture and laboratory manual**. St. Louis. Missouri, 1995.

TRIGO, J. M.; ALBERTINI, S.; SPOTO, M. H. F.; SARMENTO, S. B. S.; REYES, A. E. L.; SARRIÉS, G. A. Efeito de revestimentos comestíveis na conservação de mamões minimamente processados. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 15, n. 2, p. 125-133, 2012.

VALENTOVÁ, K.; ULRICHOVÁ, J. *Smallanthus sonchifolius* and *Lepidium meyenii* – prospective Andean crops for the prevention of chronic diseases. **Biomedical Papers**, Czech Republic, v.147, n.2, p.119-130, 2003.

VAROQUAUX, P.; WILEY, R.C. Cambios biológicos y bioquímicos en frutas y hortalizas refrigeradas minimamente procesadas. In: WILEY, R.C. **Frutas y hortalizas minimamente procesadas y refrigeradas**. Zaragoza: Acribia, 1997. p. 221-262.

VASCONCELOS, C. M.; DE OLIVEIRA, E. B.; ROSSI, S. N.; ARANTES, L. F.; PUSCHMANN, R.; CHAVES, J. B. P. Evaluating Strategies to Control Enzymatic Browning of Minimally Processed Yacon (*Smallanthus sonchifolius*). **Food and Bioprocess Technology**, v.8, n.9, p.1982–1994, 2015.

VICENTINO, S.L; FLORIANO, P.Q; DRAGUNSKI, D.C; CAETANO, J. Filmes de amidos de mandioca modificados para recobrimento e conservação de uvas. **Química Nova**, v.34, n.8, p. 1309-1314, 2011.

VINDEROLA, G.; BINETTI, A.; BURNS, P.; REINHEIMER, J. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. **Frontiers in Microbiology – Food Microbiology**, v. 2, p. 1-6, 2011.

WANG,Y. Prebiotics: Present and future in food science and technology. **Food Research International**, v. 42, p. 8–12, 2009.

WANNERBERGER, K.; NYLANDER, T.; NYMAN, M. Rheological and chemical properties of mucilage in different varieties from linseed (*Linum usitatissimum*). **Acta Agriculturae Scandinavica**, v. 41, p. 311–319, 1991.

WATZL, B.; GIRRBACCH, S.; ROLLER, M. Inulin, oligofructose and immunomodulation. **British Journal of Nutrition**, n. 93, p. 49-55, 2005.

WONG, D. W. S.; CAMIRAND, W. M.; PAVLATH, A. E. Development of edible coatings for minimally processed fruits and vegetables. **J. M. Krochta** (Ed). Edible coatings and films to improve food quality. Lancaster, Pennsylvania: Technomic Publishing Co., Inc., p. 65-88, 1994.

WONG, J. M. W.; JENKINS, D. J. A. Carbohydrate Digestibility and Metabolic Effects. **Journal of Nutrition**. v.137, n. 2, 2007.

World Gastroenterology Organisation (WGO). **Guias prácticos: Probióticos e Prebióticos**, 2011, 29 p.

YING, D.Y.; PARKAR, S.; LUO, X.X.; SEELYE, R.; SHARPE, J.C.; BARKER, D. Microencapsulation of probiotics using kiwifruit polysaccharide and alginate chitosan. **Acta Horticulturae**, (ISHS) v. 753, p. 801-808, 2007.

YUN, J.W. Fructooligosaccharides - Occurrence, preparation and applications. **Enzymes and Microbial Technology**, Kyungbug, v.19, p.107-117, 1996.

**ANEXO**

**Anexo 1: Certificado da análise de especificação do FOS**



**DRAFTI CHILE SA**  
 KM.445 RUTA 5 SUR  
 PEMUCO  
 CHILE

**Attention of Customer :** Sweetmix Industria Comercio Importacao e Exportacao Ltda  
 Sweetmix Industria Comercio Importacao e Exportacao Ltda  
 Rua Alceste del Cistia 108  
 18085-751 Sorocaba-SP  
 Brazil

**CERTIFICATE OF ANALYSIS**

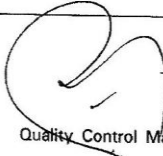
<b>Date of shipping</b>	: 20.11.2015
<b>Sold to</b>	: 170128 Sweetmix Industria
<b>Ship to</b>	: 170175 Sweetmix Industria Comercio
<b>Drafti order nr</b>	: 2200486038 / 21105342
<b>Your order nr</b>	: 115310137
<b>Product</b>	: 42003099 DRAFTI P95 BAG 25KG (750kg)
<b>Batch nr</b>	: PEQJZ5DJZ5( pal. from: 1 to 72 )
<b>Best before date</b>	: 25.07.2019
<b>Quantity</b>	: 21.000,00 KG <b>Date of production</b> : 25.07.2015.

Analysis		Values	Norms
<b>Specifications:</b>			
Physico-Chemical param. powdered product	Dry matter (grav.)	96.6 %	95.5 - 98.5
	pH	5.2	5.0 - 7.0
	Conductivity (uS/cm)	7	0 - 249
Chromatography powdered product	Oligofructose (% DM)	96.4 %	93.2 - 100.0
	Glucose + fructose + sucrose(%DM)	3.6 %	0.0 - 6.8
Microbiology	Total count/(g d.m.)	0	0 - 1000
	Yeasts/(g d.m.)	0	0 - 20
	Moulds/(g d.m.)	0	0 - 20

**Customer note:**

**Customer note for material:**

**Carla Muñoz Sepúlveda**  
 Jefe de Calidad  
 Orafiti Chile S.A.

  
 Quality Control Manager