

Universidade Estadual Paulista
“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Morangos desidratados como veículos de
probióticos

Aline Soares de Oliveira

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Henriette
Monteiro Cordeiro de Azeredo

Coorientadores: Profa. Dra. Kátia
Sivieri

Prof. Dr. Marcos David Ferreira

Araraquara – SP

2020

Morangos desidratados como veículos de probióticos

Aline Soares de Oliveira

Dissertação apresentada ao
Programa de Pós-graduação em
Alimentos e Nutrição para obtenção
do título de Mestre em Alimentos e
Nutrição.

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Profa. Dra. Henriette
Monteiro Cordeiro de Azeredo

Coorientadores: Profa. Dra. Kátia
Sivieri

Prof. Dr. Marcos David Ferreira

Araraquara – SP

2020

O49m Oliveira, Aline Soares de.
Morangos desidratados como veículos de probióticos / Aline Soares de Oliveira. – Araraquara: [S.n.], 2020.
84 f. : il.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Alimentos e Nutrição. Área de Concentração em Ciência dos Alimentos.

Orientadora: Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.
Coorientadora: Kátia Sivieri.
Coorientador: Marcos David Ferreira.

1. Bactérias Probióticas. 2. Revestimentos Comestíveis. 3. Aginato. 4. Morangos Desidratados. 5. *Bacillus coagulans*. I. Azeredo, Henriette Monteiro Cordeiro de, orient. II. Sivieri, Kátia, coorient. III. Ferreira, Marcos David, coorient. IV. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Morangos desidratados como veículos de probióticos

AUTORA: ALINE SOARES DE OLIVEIRA
ORIENTADORA: HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO
COORIENTADORES: MARCOS DAVID FERREIRA
KÁTIA SIVIERI

Aprovada como parte das exigências para obtenção do Título de Mestra em ALIMENTOS E NUTRIÇÃO, área: Ciência dos Alimentos pela Comissão Examinadora:

Profa. Dra. HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO
Departamento de Instrumentação / Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária - EMBRAPA

Prof. Dr. HERNANE DA SILVA BARUD
Núcleo de Pesquisa em Biotecnologia / Universidade de Araraquara-UNIARA

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas - UNESP- Araraquara

Araraquara, 29 de julho de 2020

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Agradeço à Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara-SP pela oportunidade da realização do curso de Mestrado

A minha orientadora professora Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo pelos ensinamentos, paciência, disposição e por ter aceitado me orientar.

Aos Coorientadores Profa. Dra. Kátia Sivieri e Prof. Dr. Marcos David Ferreira por terem aceito me coorientar, pelos ensinamentos e disponibilidade de seus laboratórios.

A Embrapa Instrumentação de São Carlos por disponibilizar os laboratórios para pesquisa.

AGRADECIMENTOS PESSOAIS

Aos professores do Departamento de alimentos e nutrição da UNESP de Araraquara, SP obrigada pelos ensinamentos, por sempre passar seus conhecimentos e disponibilizar o uso dos laboratórios nos quais são responsáveis. Em especial a Professora Kátia Sivieri e sua equipe que me orientou e sempre que pode atendeu aos meus pedidos.

Gratidão pela equipe de laboratório da Embrapa, em especial Carol e Lulliana que sempre estiveram em disposição a me ajudar.

As técnicas de laboratório da Embrapa pelo ensinamento e disposição, em especial a Joana meu muito obrigada.

Gratidão ao meu companheiro e amigo Paulo pela paciência e apoio nas realizações dos meus sonhos.

A minha mãe pelo apoio.

E a Deus acima de tudo.

“Tente uma, duas, três vezes e se possível tente a quarta, a quinta e quantas vezes for necessário. Só não desista nas primeiras tentativas, a persistência é amiga da conquista. Se você quer chegar a onde a maioria não chega, faça o que a maioria não faz.”

Bill Gates

Resumo

Matrizes não-lácteas têm sido estudadas como veículos de bactérias probióticas, porque é cada vez maior o número de indivíduos que não consomem produtos lácteos devido a restrições alimentares. **Objetivo:** desenvolver morangos desidratados adicionados de probióticos (*Bacillus coagulans*) por diferentes técnicas de incorporação dos probióticos em morangos (impregnação direta de probióticos ou aplicação de revestimento de alginato com probiótico) e dois métodos de desidratação (liofilização e secagem em estufa). **Métodos:** Os morangos receberam quatro tratamentos, impregnação seguida de liofilização (IP-L), impregnação seguida de secagem em estufa (IP-E), revestimento seguido de liofilização (RP-L) e revestimento seguido de secagem em estufa (RP-E). Foram realizadas análises físico-químicas (umidade, acidez total titulável, sólidos solúveis totais, pH, vitamina C, antocianinas, cor e firmeza) e a viabilidade dos probióticos no morango após o processamento e ao longo de 6 meses. Os morangos foram estocados a 25 °C e UR 50%. Os morangos com adição de probióticos foram submetidos às condições gastrointestinais simuladas por meio de ensaio *in vitro* para verificar o comportamento dos probióticos contidos nos produtos à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) e posterior liberação no duodeno. **Resultados:** O número de probióticos viáveis apresentaram concentrações acima de 6 log UFC.g⁻¹, valores encontrados em matrizes probióticas lácteas. Houve diferença significativa (p<0,05) entre os métodos de desidratação, sendo que os morangos secos em estufa apresentaram maiores alterações na viabilidade probiótica e características físico-químicas durante o processamento. Os morangos impregnados com probióticos (IP-L e IP-E) apresentaram contagens de viáveis maiores quando comparados com os revestidos, provavelmente por terem penetrado mais na matriz do morango, sendo protegidos por ela. O tempo de estocagem não afetou significativamente (p>0,05) a viabilidade dos esporos de *Bacillus coagulans*. **Conclusão:** O processo de incorporação probiótica (por revestimento ou impregnação) e posterior desidratação (por estufa ou liofilização) levou à produção de snacks de morangos com capacidade de entregar com sucesso células probióticas viáveis ao trato gastrointestinal. A digestão gastrointestinal simulada demonstrou a capacidade da cepa esporogênica em sobreviver ao processo digestivo. **Palavras-chave:** Bactérias Probióticas; Revestimentos Comestíveis; Alginato; Morangos Desidratados; *Bacillus coagulans*.

Abstract

Non-dairy matrices have been studied as vehicles of probiotic bacteria, because the number of individuals who do not consume dairy products due to dietary restrictions has increased. **Objective:** to develop dehydrated strawberries incorporated with probiotics (*Bacillus coagulans*) by different techniques (direct impregnation of probiotics or application of alginate coating with probiotics) and two methods of dehydration (freeze drying and oven drying). **Methods:** Strawberries received four treatments: probiotic impregnation followed by freeze drying (IP-L), probiotic impregnation followed by oven drying (IP-E), probiotic coating followed by freeze-drying (RP-L) and probiotic coating followed by oven drying (RP-E). Physico-chemical analyses (moisture content, total titratable acidity, total soluble solids, pH, Vitamin C, Anthocyanins, Color and Firmness) and the viability of probiotics in the strawberry after processing and over 6 months of storage were performed. The strawberries were stored at 25 ° C and 50% RH. The strawberries were submitted to simulated gastrointestinal conditions by means of an in vitro test to verify the behavior of the probiotics contained in the products when passing through the gastrointestinal tract and subsequent release in the duodenum. **Results:** The number of viable probiotics showed concentrations above 6 log cfu.g⁻¹, values found in dairy probiotic matrices. There was a significant difference ($p < 0.05$) between the dehydration methods, with oven-dried strawberries showing greater changes in viability and physico-chemical characteristics during processing. Strawberries impregnated with probiotics (IP-L and IP-E) showed higher viable counts when compared to the coated ones, probably because the probiotics were absorbed by the strawberry matrix and were protected by it. The storage time did not significantly affect ($p > 0.05$) the viability of *Bacillus coagulans* spores. **Conclusion:** The process of probiotic incorporation (by coating or impregnation) followed by dehydration (oven-drying or freeze drying) led to a dehydrated snack able to successfully deliver viable probiotic cells to the gastrointestinal tract. The simulated gastrointestinal digestion demonstrated the ability of the sporogenic strain to survive the digestive process.

Keywords: Probiotic bacteria; Edible Coatings; Dehydrated Strawberries; *Bacillus coagulans*.

SUMÁRIO

1. Introdução	11
2. Revisão de Literatura	15
2.1. <i>Morango</i>	15
2.2. <i>Métodos de desidratação</i>	17
2.2.1. <i>Secagem por estufa</i>	18
2.2.2. <i>Liofilização</i>	18
2.3. <i>Probióticos</i>	19
2.3.1. <i>Bacillus coagulans</i>	21
2.4. <i>Plastificante e Prebióticos</i>	22
2.5. <i>Revestimentos comestíveis</i>	23
2.5.1. <i>Alginato</i>	24
3. <i>Objetivos</i>	27
4. <i>Materiais e Métodos</i>	28
4.1. <i>Ativação da cultura liofilizada</i>	28
4.2. <i>Preparo da biomassa probiótica</i>	28
4.3. <i>Preparo das dispersões probióticas</i>	30
4.4. <i>Tratamentos dos morangos</i>	31
4.5. <i>Obtenção dos morangos probióticos desidratados</i>	32
4.6. <i>Viabilidade das células probióticas nos morangos desidratados</i>	34
4.7. <i>Análises físico-químicas</i>	35
4.7.1. <i>Umidade</i>	36
4.7.2. <i>Acidez total titulável (ATT)</i>	36
4.7.3. <i>Sólidos solúveis totais (SST)</i>	36
4.7.4. <i>Cor</i>	37
4.7.5. <i>Firmeza</i>	37
4.7.6. <i>Antocianinas</i>	38
4.7.7. <i>Ácido ascórbico</i>	39
4.8. <i>Teste da viabilidade probiótica no sistema do trato gastrointestinal (TGI) in vitro</i>	40
4.8.1. <i>Viabilidade probiótica após passagem pelo Trato Gastrointestinal in vitro</i>	42
4.9. <i>Análise estatística</i>	42
5. <i>Resultados e Discussões</i>	44
5.1. <i>Caracterização do morango in natura</i>	44
5.2. <i>Avaliação da viabilidade probiótica durante o processamento e estocagem</i>	45
5.3. <i>Comparação e características físicas e químicas dos morangos</i>	48
5.4. <i>Características físico-químicas no processamento e estocagem dos morangos desidratados</i>	49
5.4.1. <i>Acidez Total Titulável (ATT) e Sólidos Solúveis Totais (SST)</i>	49
5.4.2. <i>Cor</i>	52
5.4.3. <i>Firmeza</i>	55
5.4.4. <i>Antocianinas</i>	57

5.4.5. <i>Vitamina C</i>	59
5.4.6. <i>Viabilidade probiótica após passagem pelo trato gastrointestinal in vitro</i>	62
6. Conclusões	64
7. Referências bibliográficas	65
Anexo	84

1. Introdução

Os probióticos são definidos como "micro-organismos vivos que, ao serem administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício à saúde do hospedeiro" (1,2). Esses benefícios funcionais dos probióticos dependem do tipo de bactéria, bem como do número de bactérias viáveis que são entregues ao sistema gastrointestinal (3). As bactérias probióticas, ao resistir à passagem pelo trato gastrointestinal, podem ser capazes de unir-se à microbiota comensal e apresentar efeitos benéficos após aderência ao intestino do hospedeiro (4). Podem ocupar os sítios de ligações na mucosa intestinal, formando uma espécie de barreira física, impedindo a ligação das bactérias patogênicas que serão excluídas pela competição (5).

A incorporação de bactérias probióticas em produtos lácteos é um dos formatos mais comuns disponíveis no mercado de alimentos contendo probióticos, porém o crescente número de indivíduos com intolerância à lactose, dislipidemia e adesão ao vegetarianismo/veganismo reforçam a importância do desenvolvimento de alimentos não lácteos carreadores de probióticos, como frutas e hortaliças (6). Várias tentativas foram feitas em frutas frescas e desidratadas impregnadas com probióticos (7, 8).

O uso de esporos probióticos de *Bacillus* spp. é uma alternativa promissora em produtos probióticos, já que os esporos têm maior capacidade de resistir às condições de processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), permitindo a incorporação dessas bactérias a

vários tipos de alimentos, uma vez que são estáveis em uma ampla faixa de temperaturas, o que significa que o produto pode ser armazenado à temperatura ambiente de forma dessecada, sem qualquer efeito deletério na viabilidade (9). Os esporos podem sobreviver a condições estomacais ácidas e germinar no intestino (10).

Os morangos (*Fragaria x ananassa* Duchesne) são pseudofrutos muito delicados e perecíveis, com taxa respiratória alta, alta taxa de perda de peso e suscetíveis a ataques de fungos (11). Uma maneira de prolongar a vida útil das frutas é o método de secagem. Vários métodos têm sido aplicados à secagem de morangos, incluindo secagem por ar quente, secagem por micro-ondas, secagem por infravermelho e liofilização (12). A secagem por estufa é um método de desidratação mais rápido e econômico, onde o sólido a ser seco é exposto a uma corrente quente de ar que flui continuamente, onde a umidade evapora. Esse processo apresenta algumas desvantagens, como uma redução da qualidade do produto em relação ao produto original, devido a utilização de altas temperaturas para a secagem. A liofilização é baseada na desidratação por sublimação de um produto congelado. Devido à ausência de água líquida e às baixas temperaturas requeridas para o processo, a maioria das deteriorações e reações microbiológicas são interrompidas, assim como a perda de nutrientes e alterações de cor e forma, resultando em um produto final de excelente qualidade (13). Porém apresentam algumas desvantagens, sendo um processo dispendioso e requer tempos de processamento muito longos, o que restringe sua aplicabilidade a produtos de alto valor (14).

A maneira de aplicação das bactérias probióticas em frutas ocorre geralmente por meio de impregnação da fruta (ou de pedaços da fruta) com uma suspensão do probiótico (15-17). Alternativamente, os probióticos podem ser incorporados a uma matriz polimérica usada como revestimento das frutas (18-21).

Um revestimento comestível é uma camada fina de material comestível aplicada sobre a superfície de um produto alimentício. Recentes estudos mostraram que os revestimentos comestíveis podem ser veículos de compostos bioativos como vitaminas, enzimas, antioxidantes e probióticos, que permitem o desenvolvimento de filmes e revestimentos comestíveis bioativos (22). Juntamente com a proteção que esses revestimentos podem oferecer aos micro-organismos, outras propriedades benéficas também podem ser conferidas, como liberação bacteriana no trato gastrointestinal (23). O alginato é um polissacarídeo derivado a partir das algas marinhas marrons (Phaeophyceae) com propriedade espessante, geleificante e estabilizante. Constitui-se como um copolímero linear composto de resíduos com ligação 1,4 glicosídicas com o ácido β -D-manurônico (M) e de ácido α -L-gulurônico (G) (24), que por sua natureza polianiônica, é um material interessante como veículo de probióticos, já que mantém o conteúdo imobilizado no pH baixo do estômago, mas se expande quando desprotonado, liberando o conteúdo no pH do intestino (25).

Esses filmes ou revestimentos podem conter prebióticos, que são definidos como substratos utilizados seletivamente pelos micro-organismos hospedeiros que conferem um benefício à saúde (26).

No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito da técnica de incorporação de *Bacillus coagulans* (impregnação ou revestimento) e do método de secagem (liofilização ou secagem em estufa) sobre as propriedades de morangos desidratados e a estabilidade das bactérias ao longo do processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (TGI) *in vitro*.

2. Revisão de Literatura

2.1. Morango

O morango (*Fragaria x ananassa* Duchesne) é uma planta rasteira da família das rosáceas, possuem folhas ovaladas e flores de pétalas brancas (Figura 2.1). Apresentam caule rastejante, gerando folhas e raízes que darão origem a nova touceiras. Os verdadeiros frutos são denominados de aquênios, que são os pontinhos pretos, chamados de sementes, sendo encontrados na epiderme vermelha que recobre a polpa do morango (27). O morango é, portanto, um pseudofruto muito apreciado por seu atraente sabor, cor e aroma (28). Além disso, contêm uma grande variedade de nutrientes, como açúcares, vitaminas e minerais, além de compostos bioativos não-nutritivos, como constituintes fenólicos (29).

O morango é um pseudofruto não climatérico que deve ser colhido em plena maturidade para obter a máxima qualidade de comercialização. Este pseudofruto também é altamente perecível, devido à alta taxa de respiração, baixa resistência mecânica e alta suscetibilidade ao ataque de patógenos (30,31).

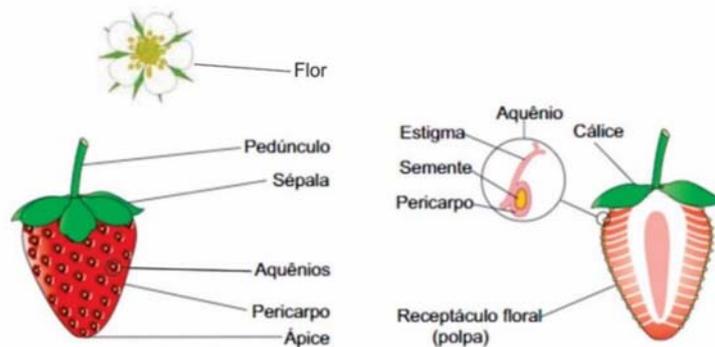


Figura 2.1. Morfologia da flor do morangueiro e do morango. (Adaptado a partir de <https://studylibpt.com/doc/4443853/principais-variedades-de-morango-comercializadas>).

As diferenças de rendimento na produção de morango estão relacionadas principalmente com as diferentes práticas de fertilizantes e irrigação e a diferentes estratégias de manejo de pragas (32,33).

A produção mundial de morango atingiu aproximadamente 8.337.099 de toneladas no ano de 2018. Os morangos estão entre as frutas mais populares do mundo, sendo que liderada pela China, responsável por uma produção de com 2.955.453 toneladas, seguido dos Estados Unidos e México, com 1.296.272 e 653.639 toneladas, respectivamente (34).

A produção anual de morango no Brasil é de 3.481 toneladas em uma área de 390 ha (34). No Brasil, a produção de morango vem se destacando em várias regiões, com ênfase para Minas Gerais, mas também em estados como Rio Grande do Sul, Paraná, Santa Catarina, São Paulo, Espírito Santo, Distrito Federal, Bahia e Ceará (35).

2.2. Métodos de desidratação

A desidratação é provavelmente uns dos métodos mais antigos de conservação de alimentos, consistindo essencialmente na redução do conteúdo de água até que a concentração dos sólidos naturais seja elevada o suficiente para diminuir a atividade de água a níveis que permitam maior estabilidade (36,37). Com a diminuição da atividade de água, ocorre a inibição da multiplicação e atividade de micro-organismos deteriorantes, minimizando a ação das enzimas e de muitas das reações deteriorativas mediadas pela água (38).

A secagem ao sol é um método tradicional em países tropicais e subtropicais, porém, apresenta algumas desvantagens, como longo tempo de secagem, exposição à contaminação por poeira, solo, partículas de areia e insetos etc. Para solucionar esse problema, é necessário usar métodos de secagem alternativos, como por exemplo, a secagem por ar quente, que é muito mais rápida, proporcionando uniformidade e qualidade do produto (39). E a liofilização é um método que utiliza baixas temperaturas e vácuo, sendo considerado uns dos melhores métodos de remoção de água, gerando produtos finais com mais qualidade quando comparados com os outros métodos de secagem de alimentos (13).

2.2.1. Secagem por estufa

A secagem por ar quente é uma técnica simples, que é de certa forma semelhante à secagem solar. Porém, esse processo de secagem ocorre em um ambiente fechado, câmara aquecida. É um processo frequentemente usado para produtos de baixo valor (40).

A secagem por convecção é o método de desidratação mais tradicional usado para preservar os alimentos; consiste principalmente em forçar o ar através do produto a ser seco. No entanto, esse método apresenta algumas desvantagens, como alterações químicas, físicas, nutricionais e sensoriais, ligadas à perda de água e às altas temperaturas aplicadas (41).

2.2.2. Liofilização

A liofilização utiliza o princípio de que, sob alto vácuo, a água congelada é removida por sublimação, onde a água no estado sólido passa para o gasoso, sem passar pelo estado líquido. Como o material permanece congelado, não ocorrem danos pelo calor, o que o torna um método vantajoso pois mantém as características organolépticas e nutricionais do produto. Devido a utilização de baixas temperaturas de processamento e baixa pressão, modificações químicas como oxidação são evitadas, assim como alterações na estrutura, textura, aparência e sabor (42).

O método de desidratação por liofilização apresenta algumas desvantagens, como lentidão e alto custo, sendo muito utilizada em produtos de alto valor agregado ou sensíveis a deterioração sensorial (40).

2.3. Probióticos

Os mecanismos de ação dos probióticos incluem: modificação da microbiota intestinal, produção de substâncias antimicrobianas, aderência competitiva à mucosa e epitélio, fortalecimento da barreira epitelial intestinal e modulação do sistema imunológico (43,44).

Os probióticos devem apresentar resistência às condições adversas do trato gastrointestinal, modular positivamente os sistemas fisiológicos do paciente, ser seguros e não devem transmitir genes de resistência antimicrobiana (2,45).

O uso de probióticos tem sido relatado desde os tempos antigos, observado em alguns produtos utilizados pela civilização faraônica, como leite, sementes, peixe e alguns outros produtos (46). O primeiro a detectar o efeito do que hoje é denominado de probiótico foi Eli Metchnikoff, vencedor do Prêmio Nobel de Medicina em 1908. Ele vinculou a saúde e a longevidade dos camponeses búlgaros à ingestão de bactérias (*Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*) presentes no iogurte (47,48).

Devido ao seu efeito benéfico, vários estudos foram realizados para desenvolver produtos probióticos. No Japão, no início dos anos 1930, Shirota

conseguiu isolar cepas existentes nas bactérias intestinais de indivíduos saudáveis. Ele usou essas cepas para desenvolver um leite fermentado e testar seus efeitos em pacientes, introduzindo seu primeiro produto, Yakult®, no mercado. A cepa isolada e usada nesse leite fermentado foi posteriormente nomeada *Lactobacillus casei* Shirota (46).

Dentre alguns benefícios já relatados do consumo de culturas probióticas destacam-se controle de infecções gastrointestinais, redução da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, controle da pressão arterial, propriedades antimutagênicas, anticarcinogênicas e anti-diarreicas, redução de doença inflamatória intestinal, supressão de infecções como a promovida por *Helicobacter pylori* (49).

Os produtos alimentares probióticos de matrizes lácteas estão comercialmente disponíveis em todo o mundo em diferentes formas. No entanto, alergia à caseína, soro do leite, intolerância à lactose, riscos associados ao colesterol e o aumento da adesão ao vegetarianismo ou veganismo são os principais contratempos para os produtos lácteos. Portanto, é necessário desenvolver produtos alimentícios funcionais probióticos de matrizes não lácteas (ex: cereais, frutas e hortaliças). Entre os vários produtos não lácteos, as frutas têm uma grande variedade de fitoquímicos e têm capacidade de diminuir o risco de várias doenças (50).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são residentes naturais do intestino e também são amplamente estudadas em ensaios clínicos controlados (51). No entanto, esses gêneros (*Lactobacillus* e *Bifidobacterium*) não possuem capacidade de formar esporos, não possibilitando o

armazenamento à temperatura ambiente por um longo prazo, correndo maior risco de perder sua viabilidade durante o processamento e armazenamento (52,53).

2.3.1. *Bacillus coagulans*

Bacillus coagulans é uma bactéria anaeróbica facultativa, catalase positiva, possuindo capacidade de formar esporos e produzir ácido láctico (54). Além da sua característica produtora de ácido láctico, não apresenta fatores de virulência como algumas cepas de *Bacillus subtilis*, cuja espécie possui numerosos estudos como probióticos (9).

A espécie *Bacillus coagulans* é resistente ao calor, e possui temperatura ótima de crescimento de 35 a 50 ° C com pH ótimo de 5,5 a 6,5. Algumas cepas de *Bacillus coagulans* são bactérias termófilas capazes de se multiplicar a pH 6,2 e temperatura 60-65 ° C (55).

Devido à sua capacidade de formar esporos, podem sobreviver no estômago na forma de esporos e germinar no intestino, exercendo seu papel probiótico no trato intestinal. Alguns estudos mostraram que *Bacillus coagulans* possuem fraca capacidade de colonizar no trato intestinal, por não serem considerados como parte natural da microbiota intestinal e de aderir ao epitélio intestinal, sendo completamente eliminada em quatro a cinco dias, a menos que a administração crônica seja mantida (56-58). Portanto a *Bacillus*

coagulans só pode afetar a microbiota intestinal através da proliferação temporária no intestino humano (59).

Entre os benefícios relatados, algumas cepas de *Bacillus coagulans* possuem propriedades probióticas eficazes no manejo de sintomas clínicos da síndrome do intestino irritável em humanos, como alívio da dor abdominal e inchaço em pacientes (60,61), aumento da digestão de proteínas vegetais durante passagem simulada *in vitro* do TGI superior (62) e redução de diarreia associada à estreptomicina em camundongos com imunossupressão induzida por ciclofosfamida (63). Além das suas aplicações em doenças no trato gastrointestinal, cepas de *Bacillus coagulans* têm sido utilizadas para tratar ou prevenir condições médicas não gastrointestinais, incluindo vaginose bacteriana e obesidade (63-64).

2.4. Plastificante e Prebióticos

Plastificante é uma substância ou material incorporado em outro material para aumentar sua flexibilidade, trabalhabilidade ou distensibilidade (65). Os plastificantes mais comuns incluem água, polióis, oligossacarídeos e lipídeos. Entre os plastificantes mais utilizados estão o glicerol e o sorbitol (66-67).

O sorbitol é um polioliol, não tóxico que poder ser usados em alguns materiais de contato com alimentos (65). Além disso, o sorbitol tem um potencial efeito prebiótico (68).

Os prebióticos são substratos utilizados seletivamente pelos micro-organismos hospedeiros que conferem alguns benefícios à saúde (26).

O consumo de prebióticos está associado a vários efeitos sobre a função digestiva do organismo, como aumento da massa fecal, diminuição de bactérias Gram-negativas no cólon, aumento da síntese de vitaminas, melhora do perfil lipídico, melhora da função imunológica e restauração da microbiota habitual após o uso de antibióticos, entre outros (69).

Para que um substrato da dieta seja classificado como prebiótico, são necessários pelo menos alguns critérios como: não ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou no intestino delgado; ser seletivo para bactérias comensais benéficas no intestino grosso como as bifidobactérias; a fermentação do substrato deve induzir efeitos luminiais/ sistêmicos benéficos no hospedeiro (70).

2.5. Revestimentos comestíveis

Os revestimentos comestíveis são definidos como uma camada fina de material aplicado na superfície dos alimentos, podendo ser consumidos juntamente com os alimentos. Geralmente são utilizados para prolongar a vida útil do alimento, reduzindo as taxas de respiração de frutas e hortaliças frescas e as taxas de degradação de vários tipos de alimentos (71).

Alguns estudos mostraram que a aplicação desses revestimentos antes do processo de secagem pode reduzir a perda de aroma, cor e nutrientes,

reduzindo a difusão de oxigênio nos alimentos e mantendo a integridade física do produto (72, 73).

Diferentes materiais biológicos, incluindo polissacarídeos, proteínas, lipídios e seus derivados, são utilizados para preparação de revestimentos comestíveis (74).

Os revestimentos formados a partir de polissacarídeos geralmente apresentam boas propriedades de barreira ao oxigênio, principalmente em condições de baixa umidade (75). Além da sua capacidade de barreira, os revestimentos e filmes podem ser usados para incorporação de compostos bioativos, como antioxidantes, corantes, antimicrobianos, nutrientes, compostos de sabor, prebióticos e probióticos (76).

Dessa maneira, os revestimentos comestíveis são apresentados como bons transportadores de bactérias probióticas, que além de reduzir as perdas de viabilidade celular durante o processamento e armazenamento, protegem esses micro-organismos do ácido gástrico e dos sais biliares (77).

2.5.1. Alginato

Os alginatos são polissacarídeos aniônicos naturais compostos de resíduos de ácido D- manurônico e L- gulurônico unidos linearmente por ligações (1 a 4) glicosídicas (Figura 2.2). O arranjo proporcional e sequencial variável das unidades D- manurônico e L- gulurônico resulta na distribuição de cargas negativas ao longo da estrutura do polímero em solução aquosa (78).

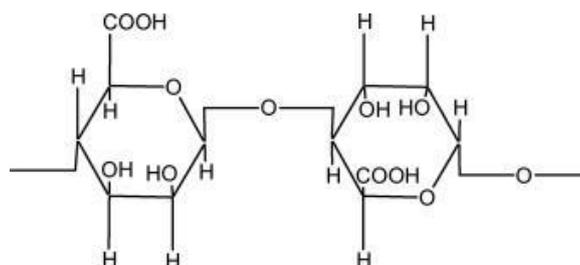


Figura 2.2. Estrutura química do Alginato (HASSAN et al.,2018).

O alginato de sódio é um biopolímero que vem sendo estudados devido à sua biodegradabilidade, biocompatibilidade e capacidade de formar películas e revestimentos não tóxicos (79).

Os alginatos são extraídos a partir de algas marinhas marrons, como *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystis* (80,81). As indústrias de alimentos e bebidas, são um dos ingredientes mais importantes em produtos alimentícios, utilizados como agentes espessantes, formadores de gel e estabilizadores coloidais. E também são muito utilizados no setor farmacêutico como matrizes para encapsulamento de medicamentos, como substratos para cultura de células, como aglutinantes para comprimidos médicos (82).

Uma das características mais úteis e única dos alginatos é sua capacidade de reticulação ao reagir com cátions metálicos polivalentes, especificamente íons cálcio, para produzir géis resistentes (83) e controlar a liberação de alguns ativos (84). Esses géis de alginato se apresentam estáveis quando em soluções de pH baixo, mas se expandem em soluções fracamente básicas. Revestimentos de alginato podem ser usados para proteger compostos bioativos e probióticos da acidez do suco gástrico,

permitindo liberação subsequente no ambiente básico de fluidos intestinais
(85).

3. Objetivos

O objetivo principal da proposta é o de comparar morangos desidratados probióticos produzidos por diferentes técnicas de incorporação dos probióticos e diferentes métodos de secagem.

Os objetivos específicos são:

- Avaliar a estabilidade da bactéria probiótica (*Bacillus coagulans* BC4 50 MLD) a diferentes formas de secagem dos morangos (liofilização e secagem em estufa) e à presença de uma matriz biopolimérica (alginato);
- Acompanhar a viabilidade da bactéria probiótica durante a vida de prateleira dos morangos desidratados (liofilizados ou secos em estufa) armazenados a temperatura de 25° C durante 6 meses;
- Comparar as propriedades físicas e químicas dos morangos desidratados provenientes dos diferentes tratamentos;
- Avaliar a resistência dos micro-organismos probióticos presentes em morangos frente às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

4. Materiais e Métodos

4.1. Ativação da cultura liofilizada

A cultura liofilizada de *Bacillus coagulans* BC4 50 MLD (lote C235515A), fornecida pela Sacco, SRP, Itália). Uma cultura estoque foi preparada inoculando 1 g da cultura liofilizada em 10 mL de meio TGY (Trypticase Glucose Levedura) e incubada a 37°C por 48 h a 150 rpm. Posteriormente, foram transferidos 5 mL da cultura para 45 mL de TGY e incubadas sob as mesmas condições anteriores (37°C, 48 h e 150 rpm), a fim de obter a concentração final das culturas de células de pelo menos 10^{10} UFC/mL⁻¹. As células foram concentradas por centrifugação a 3000 g durante 15 minutos a 20°C, em seguida, foi adicionado a biomassa 40 mL de meio TGY e 10 mL de glicerol A cultura estoque foi agitada em tubos de vórtice e transferidas para tubos criogênicos para armazenamento a -80° até utilização.

4.2. Preparo da biomassa probiótica

Foi utilizada uma cultura estoque de *Bacillus coagulans*, descrita anteriormente no item 4.1. Foram adicionadas 25 mL de cultura estoque em 225 mL de meio TGY (Tabela 4.1), incubada em shaker climatizado a 39°C por 24 h a 200 rpm e centrifugada a 3000 g por 15 minutos. O sobrenadante

foi descartado, e a biomassa, inoculada em 225 mL de meio esporogênico (composição apresentada na Tabela 4.1) baseado no meio padrão FDA a 39°C por 48 h a 200 rpm.

Tabela 4.1. Composição química dos meios utilizados:

Meios de Cultura	Composição	Quantidade
TGY	Extrato de Levedura	0,5g/100mL
	Triptona	0,5g/100mL
	K ₂ HPO ₄	0,1g/100mL
	Dextrose	0,1g/100mL
Meio esporogênico ("FDA")	Milhocina (CSL)	5 mL/1000mL
	Dextrose	1g/1000mL
	MnSO ₄	0,056g/1000mL
	CaCO ₃	0,05 g/1000mL
	(NH ₄) ₂ SO ₄	0,5 g/1000mL

Em seguida, o meio de cultura foi centrifugado a 3000 g por 15 minutos e lavado duas vezes com 40 mL de água destilada estéril. Em seguida, a biomassa de células foi ressuspensionado em 40 mL água destilada estéril, obtendo uma concentração de 10 Log UFC/mL⁻¹ de bactéria probiótica, para posterior inoculação na solução de impregnação e de revestimento comestível. A contagem de células viáveis foi realizada em placas com meio TGY com 1,5% de ágar, após incubação a 37°C por 48 h. A cultura esporulada foi mantida a -18°C até incorporação nas dispersões.

Na Figura 4.1 apresentam-se as características macroscópicas de *Bacillus coagulans*.



Figura 4.1. Característica macroscópica de *Bacillus coagulans*.

4.3. Preparo das dispersões probióticas

Foram preparados 500 mL de cada dispersão. A dispersão de alginato de sódio (TICA-algin 400 F, lot 41369, Tic Gums, White Marsh, MD, USA) foi obtida pela mistura de 1% (m/v) de alginato de sódio em água destilada estéril a temperatura ambiente, com 30% (v/m) de sorbitol (em relação ao alginato) por 15 minutos e 15.000 rpm utilizando um Ultra-Turrax (IKA T18) sanitizado com álcool 70%. Após dissolução, foram adicionados 1 mL de suspensão de células probióticas para cada 100 mL da dispersão de alginato com sorbitol e homogeneizados por 20 minutos a 650 rpm em agitador mecânico (IKA Eurostar 60 Control). Para o preparo da dispersão de água e probiótico, foram adicionados diretamente 1 mL de suspensão de células probióticas para cada 100 mL de água destilada estéril de modo a obter-se 8 Log UFC mL⁻¹ na dispersão e homogeneizados por 20 minutos a 650 rpm em agitador mecânico.

4.4. Tratamentos dos morangos

Os morangos foram obtidos de um fornecedor do município de São Carlos-SP. Foram lavados em solução de detergente neutro, desinfetados por imersão em água clorada (100 mg/kg) por 5 min, enxaguados e secos com gaze estéril. Em seguida, foram retirados os talos e divididos em 6 grupos (Tabela 4.2) de 1,200 kg cada, em seguida, os morangos foram cortados em três partes, para melhor eficiência da secagem e penetração dos probióticos.



Figura 4.2. Processamento dos morangos.

O experimento foi conduzido conforme listado na tabela 3.2.

Tabela 4.2. Descrição dos tratamentos dos morangos.

Tratamentos	Descrição
L	Liofilizados
RP-L	Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados
IP-L	Impregnados com probióticos e liofilizados
E	Secos em estufa
RP-E	Revestidos com alginato com probióticos e secos em estufa
IP-E	Impregnados com probióticos e secos em estufa

4.5. Obtenção dos morangos probióticos desidratados

Os morangos dos tratamentos IP-L e IP-E foram imersos por 30 min (sob agitação 60 rpm) em uma suspensão aquosa contendo um pellet do probiótico com concentração previamente estimada (por testes preliminares) de 10^8 UFC/g para que os morangos tivessem uma contagem inicial de probióticos na faixa de 10^6 a 10^7 UFC/g.

Os morangos dos tratamentos RP-L e RP-E foram imersos por 1 min em uma dispersão a 1% de alginato de sódio contendo 30% de sorbitol (com base no alginato) e um pellet do probiótico (também em quantidade previamente definida para que a dispersão apresentasse uma contagem de células viáveis de 10^8 UFC/mL e os morangos uma contagem inicial de probióticos na faixa de 10^6 a 10^7 UFC/g). Em seguida, foram imersos por 1 min em uma solução de CaCl_2 a 1% para formação do gel e enxaguados em água estéril utilizando uma pisseta por 10 segundos para remoção do excesso de CaCl_2 .

Os morangos dos tratamentos L, RP-L e IP-L foram então desidratados pelo método de liofilização, enquanto os dos tratamentos E, RP-E e IP-E foram desidratados pelo método em estufa.

A figura 4.3 mostra os dois processos de desidratação utilizados neste experimento. O processo de liofilização foi realizado no laboratório de amostras biológicas da Embrapa Instrumentação de São Carlos, onde foi utilizado primeiramente um ultra-freezer marca Liobras, a temperatura de -25°C por 24 horas, seguido do liofilizador marca Liotop, modelo L101, a -41°C por 190 horas.



Figura 4.3. Processos de desidratação dos morangos

O processo de secagem em estufa foi realizado em uma estufa de secagem com circulação da marca Solab SL102 e renovação de ar a 50°C por 48 horas. Os equipamentos foram lavados e sanitizados com álcool 70% antes da utilização.

Após a secagem, os morangos foram acondicionados em sacos de polietileno de baixa densidade (LDPE) com fechamento do tipo “zip lock” e estocados á 25°C e UR 50%, para posteriores análises (figura 4.4).



Figura 4.4. Morangos após a desidratação armazenados em câmara climática sob condições controladas.

4.6. Viabilidade das células probióticas nos morangos desidratados

A viabilidade das células probióticas nos morangos desidratados foi avaliada antes e depois da desidratação, e ainda mensalmente durante 6 meses de armazenamento, como demonstrado na figura 4.5. Amostras de 2,5 g de morango de cada tratamento foram homogeneizadas em 247,5 mL de solução salina peptonada (0,85 % NaCl e 0,1 % peptona) em stomacher por 2 minutos a 230 rpm. E foram realizadas diluições seriadas até 10^8 e 100 μ l de cada diluição foram plaqueadas pelo método *spread plate* em ágar (Trypticase

Glucose Levedura - TGY), e em seguida, as placas foram incubadas em 37 °C durante 48 h. Após o período de incubação foi realizada a contagem das unidades formadoras de colônias (UFC) para determinar a população de células probióticas viáveis por grama de morango.

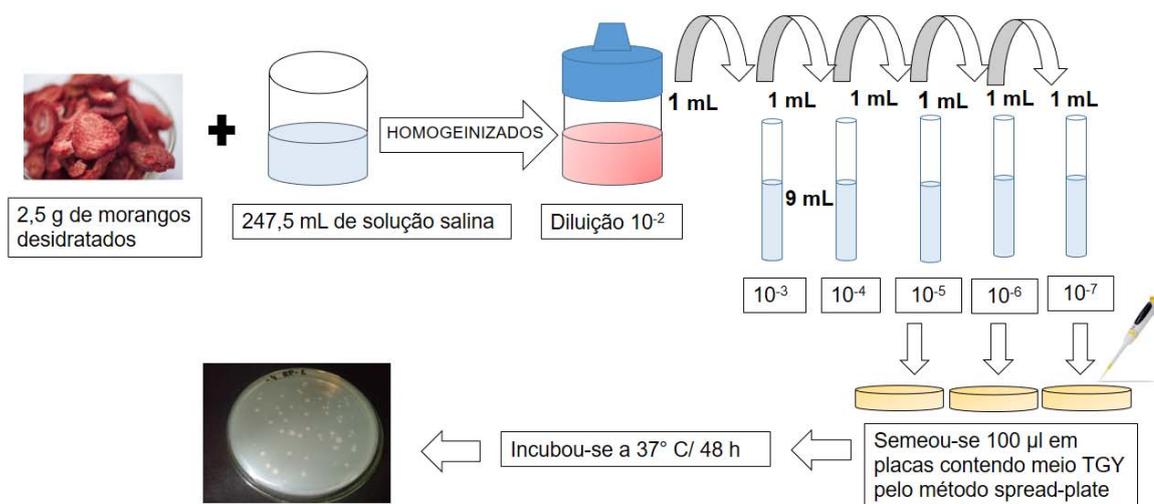


Figura 4.5. Fluxograma ilustrativo do teste de viabilidade probiótica.

4.7. Análises físico-químicas

As análises físico-químicas foram realizadas antes e após o processo de desidratação e após estocagem de 6 meses. As fatias dos morangos *in natura* foram trituradas em mixer (Philips Walita Daily Pro Mix RI1604 250W) por 6 minutos com velocidade 2 e as amostras dos tratamentos desidratados foram trituradas em moinho analítico (Ika, modelo A11 Basic Ika) por 3 minutos, exceto para as análises de cor, firmeza e contagem de viáveis.

4.7.1. Umidade

O teor de umidade foi medido em quintuplicata por balança determinadora de umidade por infravermelho Marte®.

4.7.2. Acidez total titulável (ATT)

A ATT foi determinada a partir da diluição de 1 g de morango triturado em 100 mL de água destilada, seguido de titulação com NaOH 0,1 mol L⁻¹ até que a amostra alcançasse pH 8.1. Os resultados foram expressos em mg ácido cítrico 100 g⁻¹ (86).

4.7.3. Sólidos solúveis totais (SST)

O teor de sólidos solúveis totais foi determinado por leitura direta em refratômetro digital Atago RX-5000cx, utilizando amostras de 1 g de cada tratamento diluídas em 10 mL de água destilada. Os resultados foram expressos em °Brix (86).

4.7.4. Cor

As alterações de cor foram determinadas utilizando-se colorímetro Minolta CR-400 com iluminante D65. Foram obtidos os valores de L^* , a^* e b^* , dado pelo equipamento ao realizar a leitura, onde L representa a luminosidade, a^* define a transição da cor verde ($-a^*$) para a cor vermelha ($+a^*$) e b^* representa a transição da cor azul ($-b^*$) para a cor amarela ($+b^*$). Foram realizadas três leituras na epiderme e três leituras no interior das fatias de morangos. As leituras foram realizadas em local com alta luminosidade, em quintuplicata. Os resultados foram expressos na proporção dos parâmetros “L” (luminosidade), “a” e “b” (cromaticidade), ângulo hue (h°) e diferença de cor em ΔE^* . Conforme a equação 1 a seguir:

$$h^\circ = \tan^{-1} \left(\frac{b}{a} \right) \quad (\text{Equação1})$$

$$C * \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2}$$

$$\Delta E * ab = \sqrt{(\Delta L^*)^2 + (\Delta a^*)^2 + (\Delta b^*)^2}$$

4.7.5. Firmeza

A firmeza dos morangos foi avaliada utilizando-se o texturômetro digital de bancada TA.XT.Plus Texture Analyser® e os resultados foram expressos em Newton (N). A força de compressão foi aplicada usando um probe de 4 mm de diâmetro, distância de penetração de 5 mm e área de contato de 10

mm², demonstrados na Figura 4.6. As leituras foram realizadas em quintuplicata.

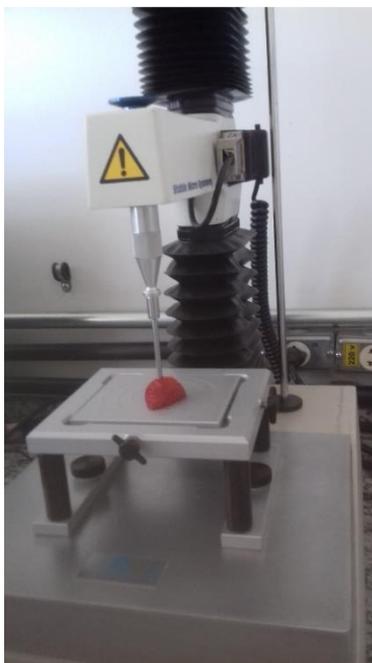


Figura 4.6. Determinação da firmeza em morangos.

4.7.6. Antocianinas

Foi quantificado o teor das antocianinas pelo método do pH único (87). As absorvâncias foram avaliadas em espectrofotômetro UV/ VIS efetuando-se leituras em comprimento de onda de 535 nm. Foi utilizado o Coeficiente de Extinção médio (E1% 1cm) de diversas antocianinas, adotando-se para o método de pH Único (pH 2,0) valor de 982. Sendo o cálculo do teor de Antocianinas Totais (AntT) expresso em mg por 100 gramas da fração avaliada, efetuado de acordo com a Equação 2.

$$AntT = \frac{\frac{DO \times VE1 \times VE2 \times 100}{Valq \times m \times 982}}{\frac{E_{1cm}^{1\%}}{10}} = \frac{DO \times VE1 \times VE2 \times 100}{Valq \times m \times E_{1cm}^{1\%}} \quad (\text{Equação 2})$$

Onde,

DO: Densidade ótica do extrato diluído;

VE1: Volume total do extrato concentrado;

VE2: Volume total do extrato diluído;

Valq: Volume da alíquota utilizado na diluição do extrato concentrado;

m: Massa da amostra;

100: Fator de Correção para que resultado seja expresso em 100 gramas de Amostra;

$E_{1cm}^{1\%}$: Coeficiente de Extinção;

10: Constante para correção do Coeficiente de Extinção de modo a expressar o resultado em mg de Antocianina / 100 gramas de Amostra.

4.7.7. Ácido ascórbico

Foram pesadas 0,1 g de cada amostra em balança analítica e completados o volume em um balão volumétrico de 10 mL com ácido metafosfórico 3% (m.v⁻¹), filtradas em unidade filtrante descartável de teflon hidrofílico (porosidade 0,45 µm) e cobertos com papel alumínio. As soluções foram injetadas no sistema cromatográfico imediatamente após o preparo. A vazão da fase móvel foi de 1,0 mL/minuto, o volume de injeção de 30 µL.

A fase móvel consistiu de tampão fosfato pH 2,5 e a coluna utilizada foi uma Agilant C18 (2,5x 25mm,5 µm). O cromatógrafo líquido utilizado foi da marca Varian ProStar com detector Ultravioleta-Visível ajustado para leitura a 254 nm (88).

A equação da reta para curva analítica obtida com análise do padrão de ácido L-ascórbico em solução aquosa foi $y = 1,278x - 1,6369$ com $r^2 = 0,9996$.

4.8. Teste da viabilidade probiótica no sistema do trato gastrointestinal (TGI) in vitro

Os morangos foram submetidos a uma avaliação de sua capacidade de proteção (no ambiente do estômago) e posterior liberação do probiótico (intestino delgado) no Simulador do Ecossistema Microbiano Intestinal Humano (SHIME®), localizado na Faculdade de Ciências Farmacêutica (Departamento de Ciências dos Alimentos e Nutrição, Unesp, Araraquara, Brasil). O modelo (Figura 4.7), consiste em cinco reatores simulando as diferentes partes do trato gastrointestinal (TGI), como estômago, intestino delgado e cólon (ascendente, transversal e descendente) (89). Embora o sistema completo seja composto de 5 reatores conectados, apenas os reatores (reator 1- estômago) e (reator 2- intestino delgado) foram utilizados nesse experimento.

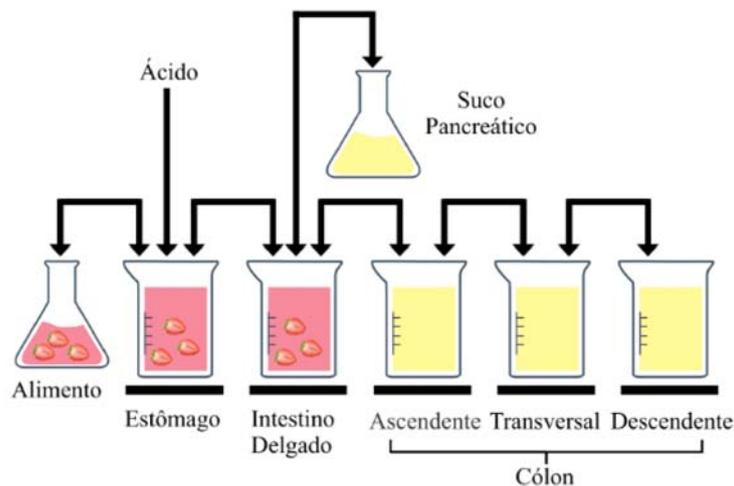


Figura 4.7. Simulador do Ecosistema Microbiano Intestinal Humano.

O meio de alimentação utilizado no SHIME® foi preparado em água destilada, composta por 3 g/L amido (Maisena, Unilever Brasil, SP, BR), 2 g/L de pectina (Sigma-Aldrich, MO, EUA), 4 g/L de mucina gástrica suína tipo II (Sigma-Aldrich, MO, US), 1 g/L de xilana (Megazyme, Bray, IE), 1 g/L peptona (Kasvi, PR, BR), 1 g/L de arabinogalactano (Sigma-Aldrich, MO, EUA), 0,4 g/L de glicose (Synth, SP, BR), extrato de levedura de 3 g/L (Kasvi, PR, BR) e 0,5 g/L de L-cisteína (Sigma-Aldrich, MO, EUA) foi usada para simular condições do estômago (90).

As amostras foram diluídas a 10^2 no meio de alimentação e transferidas para o reator 1 (estômago) permanecendo por 2 h a 37°C em pH de 2,5-2,9. Em seguida todo o conteúdo do reator 1 foi transferido para o reator 2 (duodeno) e incubado por 4 h a 37°C. Para simular as condições do duodeno foi adicionado o suco pancreático artificial, (4 mL/min por 15 minutos), composto por 12,5 g/L de bicarbonato de sódio (LS Chemicals), 6

g/L de ox-bile (Sigma-Aldrich, MO, US) e pancreatina a 0,9 g / L (Sigma-Aldrich, MO, US) foi adicionada no reator 2.

4.8.1. Viabilidade probiótica após passagem pelo Trato Gastrointestinal *in vitro*

Após passagem gástrica e tempo de permanência no reator que simula as condições do duodeno, amostras de 1 mL foram coletadas e ressuspensas em 9 mL de solução salina, em seguida foi realizada diluições seriadas e plaqueadas pelo método *spread-plate* em ágar TGY (Trypticase Glucose Levedura). As placas foram incubadas a 37°C por 48 horas e posteriormente realizou-se a contagem das colônias.

4.9. Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados pelo Minitab 19, por meio de análise de variância de dupla classificação (Two-way anova). Os tratamentos foram comparados entre si com relação aos dois fatores: tipo de processamento (secagem em estufa ou liofilização), por meio do teste t pareado; e forma de incorporação do probiótico (sem incorporação, revestimento ou impregnação), por meio de teste de Tukey. As alterações ocorridas em função do processamento foram sempre avaliadas com base na

média dos valores dos morangos in natura (em base seca). As alterações em função da estocagem, por sua vez, sempre foram avaliadas com base no valor inicial do atributo (no tempo 0 de estocagem). A viabilidade probiótica foi analisada durante toda a estocagem, por análise de regressão.

5. Resultados e Discussões

5.1. Caracterização do morango *in natura*

Como observado na tabela 5.1, foi realizada a caracterização físico-química dos morangos *in natura* para avaliar as perdas durante o processamento. Os morangos *in natura* apresentaram umidade de 92%, valores parecidos aos encontrados por Ornelas-Paz et al. (91). No mesmo estudo foram avaliados pH, ATT e SST, onde os morangos *in natura* com estágio de maturação RS5 (cor vermelho brilhante) apresentaram pH 3,58, ATT 088% e SST 8,4%, valores próximos aos encontrados nesse estudo. Porém, nesse mesmo estudo realizado por Ornelas-Paz et al. (91), quando avaliados a firmeza de morangos *in natura* em diferentes estágios de maturação (vermelho brilhante - RS5 e vermelho escuro - RS6), foram encontrados valores em média de 6 a 3,8 N em morangos maduros. Esses valores foram superiores aos encontrados nesse estudo, onde os morangos *in natura* apresentaram uma firmeza 2,63 N.

Tabela 5.1. Caracterização do morango *in natura*

Parâmetros	Morango <i>in natura</i>
Umidade (%) b.s	92,0
pH	3,57
Acidez Titulável Total (mg ácido cítrico 100g) b.u	0,88
Sólidos Solúveis Totais (Brix°)	5,80
Firmeza (N)	2,63
Ácido ascórbico (mg 100 g ⁻¹) b.s	469,40
Ácido ascórbico (mg 100 g ⁻¹) b.u	37,56
Antocianina (mg 100 g ⁻¹) b.s	94,62
Antocianina (mg 100 g ⁻¹) b.u	7,57

O valor de ácido ascórbico no morango *in natura* foi de 37,56 mg 100 g⁻¹. Esse valor é parecido aos encontrados por Neocleous (92), em cultivares de morangos cultivados sem solo, onde os valores de ácido ascórbico estavam entre 31 a 36 mg 100 g⁻¹. O teor de antocianinas encontrado no morango *in natura* foi de 7,57 mg 100 g⁻¹. Valor médio próximo ao encontrado por Teixeira et al. (87), que utilizou o método de extração pH único (pH 2) e obteve um teor de antocianina de 8,74 mg 100 g⁻¹ em morangos.

5.2. Avaliação da viabilidade probiótica durante o processamento e estocagem

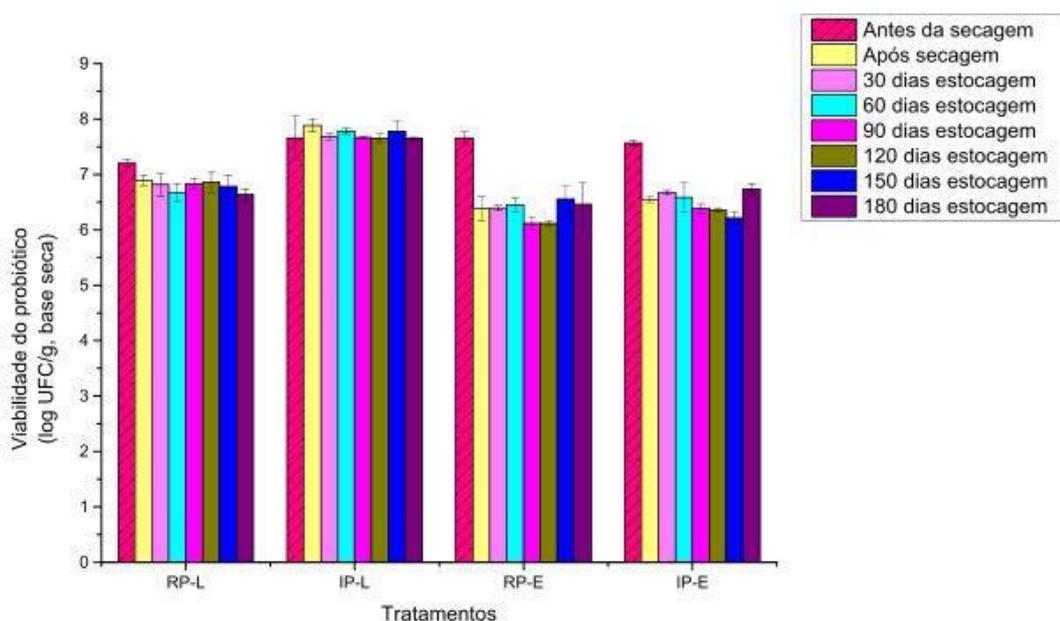
Para avaliar a viabilidade probiótica durante o processamento, foram realizadas a contagem de células viáveis antes da desidratação e após desidratação.

Como observado na figura 5.1, houve diferença significativa ($p < 0,01$) entre os métodos de desidratação, os morangos desidratados por liofilização apresentaram uma concentração maior ($p < 0,01$) de células viáveis do que os morangos secos por estufa. Constatando que o método de secagem em estufa reduziu estatisticamente ($p < 0,05$) a concentração de células viáveis, obtendo-se uma perda de 1,27 Log UFC.g⁻¹ e 1,02 Log UFC.g⁻¹ em RP-E e IP-E, respectivamente.

Estes resultados mostram que os morangos desidratados pelo método de secagem em estufa ainda retêm células viáveis de *Bacillus coagulans*,

embora tratamentos térmicos induzam mais danos na viabilidade celular do que o processo de liofilização.

Esses danos causados pelos tratamentos térmicos na viabilidade celular podem ser atribuídos ao estresse celular causado pelo aumento da temperatura e pela rápida perda intracelular de água, levando a ruptura da parede celular, resultando no vazamento de material citoplasmático, e como consequência na morte celular (93). Além disso, o aumento da concentração de soluto leva ao choque osmótico, aumento das forças de capilaridade e estresse oxidativo causado pela entrada de oxigênio na célula (94).



ANOVA – PERDAS DURANTE O PROCESSAMENTO

Variáveis	Grupos	Perdas médias (log UFC/g)	p
Tipo de processo	Estufa	1,14	<0,01
	Liofilização	0,198	
Incorporação do probiótico	Revestimento	0,787	0,01
	Impregnação	0,556	

REGRESSÃO – VARIAÇÕES COM ESTOCAGEM

Fonte	F	p
Regressão	93,26	<0,01
Tempo estocagem (dias)	0,51	0,47
Tipo de processo	204,36	<0,01
Incorporação do probiótico	82,25	<0,01

Figura 5.1. Viabilidade do probiótico durante processamento e estocagem. Os dados são apresentados como média ± desvio padrão (n = 3). RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Foi constatado que após a desidratação houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre as técnicas de incorporação dos probióticos, onde observou-se que em média os morangos impregnados com probióticos sofreram menor perda de viabilidade, quando comparados com morangos revestidos com uma matriz biopolimérica, o que se deve pela técnica de incorporação, já que os probióticos dos morangos revestidos provavelmente ficaram retidos na matriz do revestimento (ou seja, mais superficialmente), sofrendo mais com o processamento. No caso dos morangos impregnados com probióticos, pode ter ocorrido uma absorção dos probióticos para o interior dos morangos exercendo assim, um efeito de proteção pela própria matriz dos morangos.

O tempo de estocagem não afetou a viabilidade ($p > 0,05$), mas houve diferença ($p < 0,05$) entre os tipos de processos (liofilização e estufa) e entre as técnicas de incorporação dos probióticos (revestimento e impregnação). Em média os morangos liofilizados apresentaram uma concentração maior de células viáveis após a desidratação, mantendo sua viabilidade ao longo da estocagem. Nesse estudo, foram encontrados inicialmente concentrações de células probióticas viáveis a cada porção de 30 g de morangos liofilizados de $2,21 \times 10^8$ UFC e $2,15 \times 10^9$ UFC para RP-L e IP-L, respectivamente. Para os morangos desidratados por estufa, a concentração de probióticos viáveis em uma porção de 30 g foi $7,10 \times 10^7$ UFC e $1,00 \times 10^7$ UFC em RP-E e IP-E, respectivamente, estando dentro da taxa de esporos de *Bacillus coagulans* seguros para aplicação em alimento. Segundo o estudo de Shinde et al. (95), que testaram uma concentração de 2×10^9 UFC/ mL, essas concentrações não apresentaram efeitos citotóxicos nas células intestinais, sendo confirmado

pelo teste de nível de Lactato Desidrogenase (LDH) em sobrenadantes da cultura e o corante azul de tripano teste de exclusão, o que certifica sua segurança para aplicação em alimentos.

Resultados parecidos foram encontrados por Marcial-Coba et al. (96), que estudaram a estabilidade de *Bacillus coagulans* durante o armazenamento de pasta de tâmaras secas e observaram a estabilidade de *Bacillus coagulans* durante o armazenamento de 45 dias. Em outro estudo recente (97), filmes de celulose bacteriana e goma de cajueiro contendo *Bacillus coagulans* apresentaram boa estabilidade das contagens probióticas ao longo de 45 dias de estocagem, a 4°C ou a 20°C.

5.3. Comparação e características físicas e químicas dos morangos

Para prever o efeito da estocagem durante 6 meses nos morangos e retenção da qualidade, esses morangos foram comparados em diferentes parâmetros de qualidade antes e após estocagem dos morangos desidratados. Na figura 5.2 apresentam-se as características dos morangos liofilizados e dos morangos secos em estufa durante a estocagem de 6 meses.

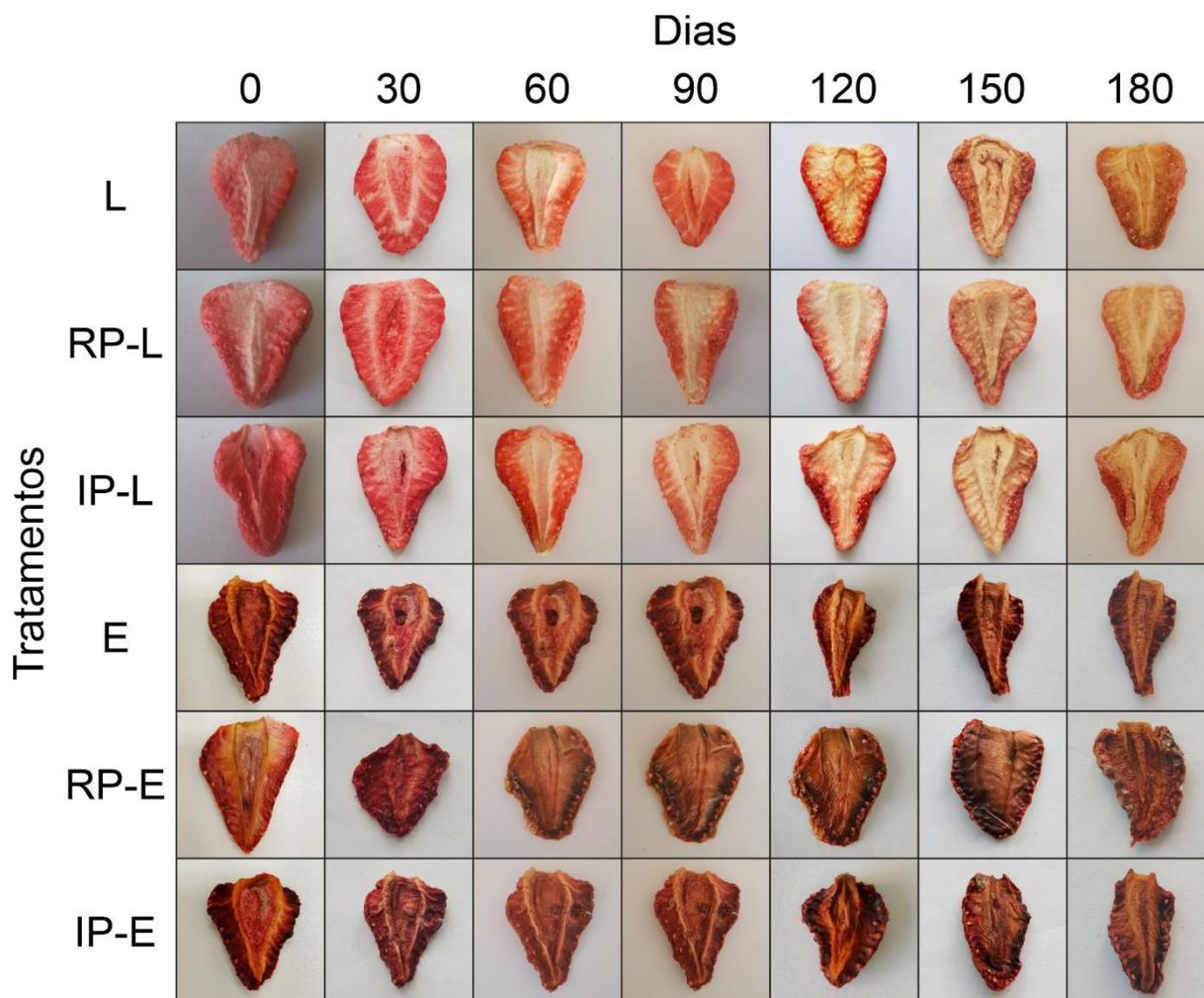


Figura 5.2. Aparência dos morangos desidratados durante a estocagem de 6 meses

5.4. Características físico-químicas no processamento e estocagem dos morangos desidratados

5.4.1. Acidez Total Titulável (ATT) e Sólidos Solúveis Totais (SST)

A ATT dos morangos (figura 5.3 A) foi influenciada ($p < 0,05$) por ambos os fatores (processamento e técnica de incorporação de probióticos). Em

média a secagem em estufa resultou em maior variação de ATT ($p < 0,05$). Nos morangos, o ácido mais abundante é o cítrico, podendo ser degradado significativamente durante o processamento dos morangos em estufa.

Observou-se que os morangos impregnados com probióticos (IP-L e IP-E) apresentaram maiores variações na ATT, podendo ser explicado pelas técnicas utilizadas, onde esses morangos são imersos em uma solução e como efeito ocorre alteração na ATT, sendo ocasionada através do processo lixiviação, uma vez que o alimento em contato com a água, seus componentes em partes ficam retidos no alimento e outra parte arrastados pela solução de incorporação.

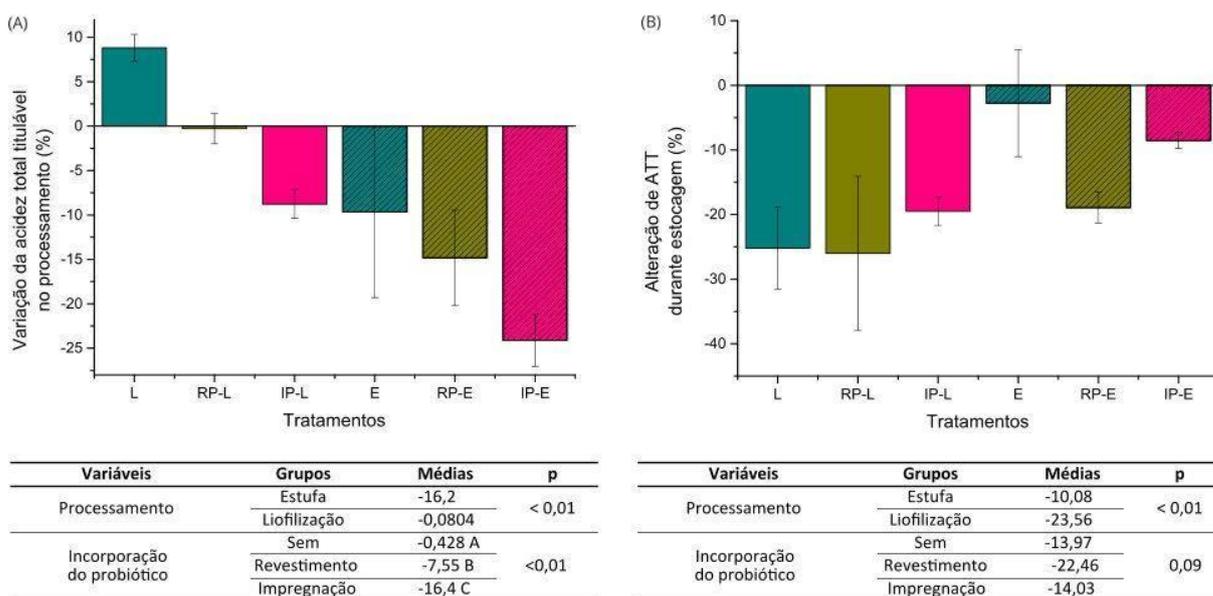


Figura 5.3. Variação da acidez total titulável: (A) durante processamento; (B) durante estocagem. Letras maiúsculas diferentes na tabela indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Quando avaliadas as alterações de ATT durante a estocagem (Figura 5.3 B), observou-se uma maior alteração na ATT nos morangos liofilizados, o

que pode ser explicado pela facilidade de absorção de umidade, devido à sua porosidade e conseqüentemente diluição dos ácidos.

Na figura 5.4 A, os teores de sólidos solúveis totais (SST) apresentaram um aumento no processo de desidratação ($p < 0,05$), esse aumento no processamento se deve à remoção de água no decorrer do processo provocando a concentração dos SST nos morangos.

Entre o método de desidratação, houve diferença ($p < 0,05$), sendo que a liofilização resultou em um aumento maior de sólidos solúveis totais quando comparados com os morangos secos em estufa, os sólidos solúveis totais diminuem com o aumento da temperatura.

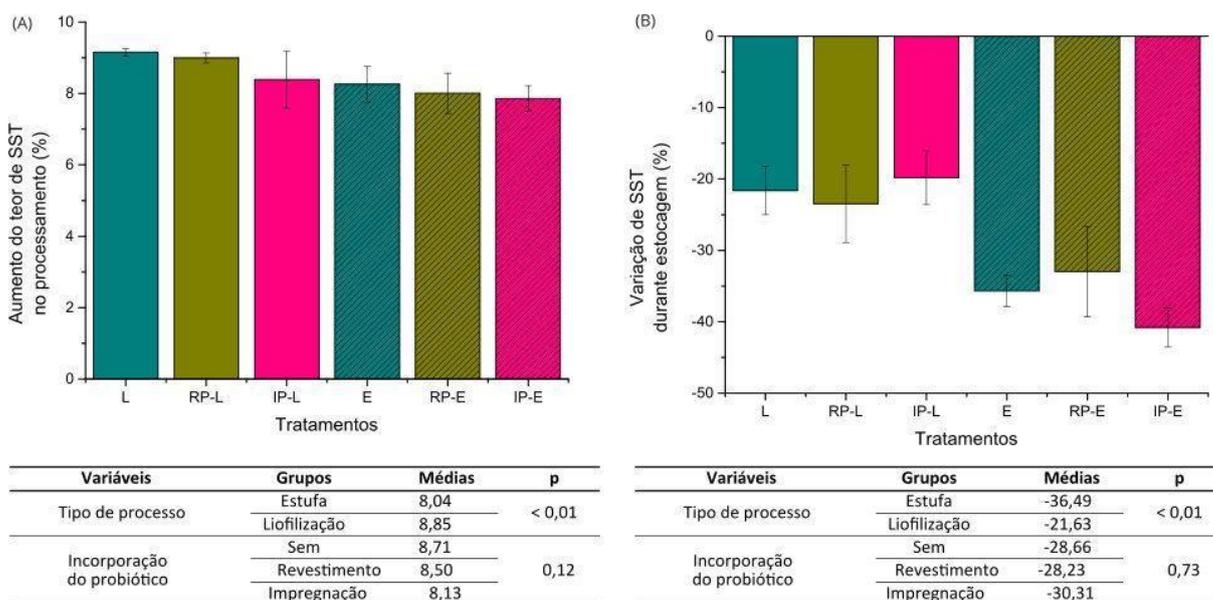


Figura 5.4. Sólidos solúveis totais: (A) durante processamento; (B) durante estocagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Quanto a estocagem, observados na figura 5.4 B, houve variação de SST ($p < 0,05$), somente quando avaliados o tipo de processo, sendo essa variação maior nos morangos secos por estufa.

5.4.2. Cor

Nesse estudo, após o processamento dos morangos, foi analisada a diferença de cor, tendo como referência o morango *in natura*, essa diferença pode ser observada na figura 5.5 A, essa diferença é dada pelo valor de ΔE , esse valor quanto mais próximo estiver de zero, mais será parecido com a referência.

Na epiderme dos morangos, houve uma maior diferença de cor no processo de secagem em estufa, quando comparados com o *in natura*, apresentando um produto mais escuro devido à degradação de antocianinas. Porém, entre as técnicas de incorporação não houve diferença ($p > 0,05$).

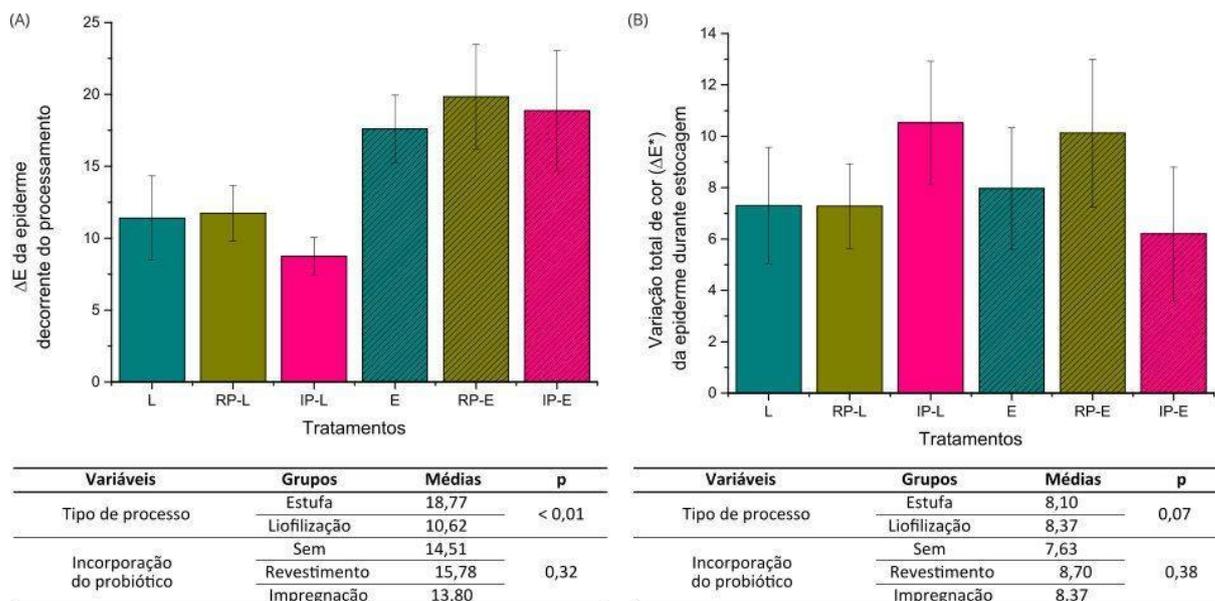


Figura 5.5. Valores médios de DeltaE da epiderme (diferença total de cor): (A) durante processamento; (B) durante estocagem. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Quando avaliados a variação de cor da epiderme na estocagem dos morangos, apresentados na figura 5.5 B. Observou-se que ambos os fatores, como tipo de processo (liofilização e estufa) e técnica de incorporação do probiótico (revestimento e impregnação) não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$).

Na figura 5.6 A, mostra que na região interna, ambos os fatores (tipos de processos e técnicas de incorporação probióticas), foram significativos ($p < 0,05$), em média a secagem em estufa apresentou maior alteração da cor interna de morangos, devido a oxidação da antocianina no processamento.

O revestimento e a impregnação resultaram em maior alteração da cor interna ($p < 0,05$), o que pode ser explicado pela migração de antocianinas da superfície para o interior do morango ou para solução de impregnação durante a imersão desses morangos.

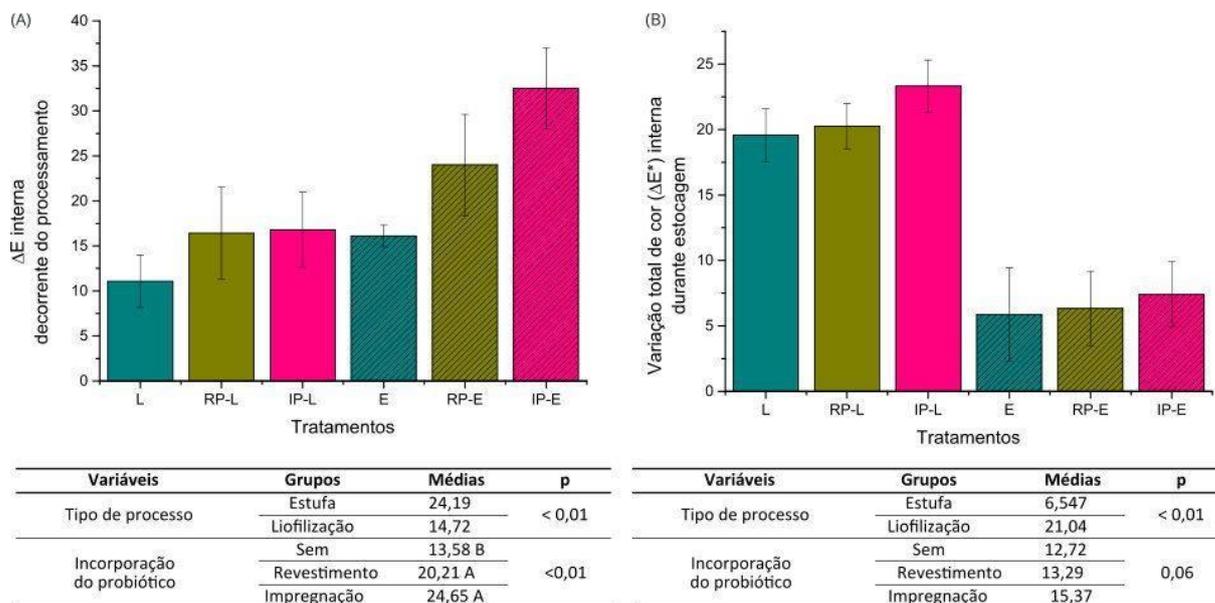


Figura 5.6. Valores médios de DeltaE interno (diferença total de cor): (A) durante processamento; (B) durante estocagem. Letras maiúsculas diferentes na tabela indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Durante a estocagem, houve diferença ($p < 0,05$) somente entre o tipo de processo, sendo que houve uma variação maior de cor na parte interna dos morangos liofilizados, apresentando maiores alterações nos valores de b^* durante a estocagem, um amarelamento nítido foi observado, isso se deve pelo fato dos morangos liofilizados apresentarem maior porosidade e com isso uma exposição maior do produto ao oxigênio e como consequência maior degradação de antocianina por oxidação.

5.4.3. Firmeza

A figura 5.7 A, mostra que houve diferença significativa ($p < 0,05$) sobre o método de desidratação, sendo que a desidratação por estufa aumentou a firmeza nos morangos no processamento. Esse aumento é atribuído aos fenômenos de *case hardening*, nos quais a superfície externa do material seca muito mais rápido que o interior e, portanto, entra no estado vítreo (98). Esse endurecimento pode ser resultado da formação de crostas e/ou perdas de propriedades viscoelásticas de produtos alimentícios secos a alta temperatura (99).

Entre as técnicas de incorporação não houve diferença significativa ($p > 0,05$) na firmeza dos morangos no processamento.

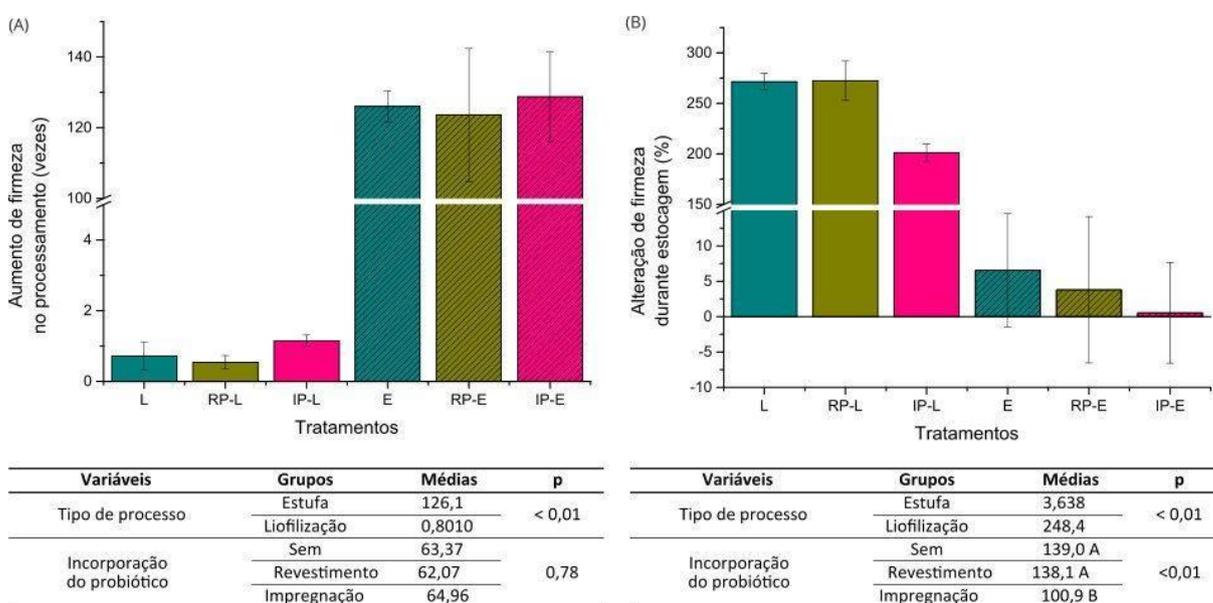


Figura 5.7. Aumento da firmeza dos morangos: (A) durante o processamento; (B) durante a estocagem. Letras maiúsculas diferentes na tabela indicam diferença significativa entre os tratamentos ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Quando avaliada a firmeza de morangos durante a estocagem, na figura 5.7 B, houve uma alteração maior na firmeza de morangos liofilizados, o que pode ser explicado pela sua porosidade, onde esses morangos absorveram mais umidade durante a estocagem e com isso ocorreu um colapso das células, enquanto que os morangos desidratados por estufa obtiveram menores alterações durante estocagem. Quando avaliada a técnica de incorporação do probiótico durante a estocagem, observa-se que em média os morangos revestidos (RP-L e RP-E) e controles (L e E), apresentaram maiores alterações quando comparados com os impregnados (IP-L e IP-E). Isso pode ter ocorrido durante o processamento, onde os morangos impregnados com probióticos (IP-L e IP-E) podem ter sofrido um colapso durante o processamento (imersão em água), diminuindo sua porosidade e conseqüente diminuindo a absorção de água durante a estocagem.

Askari et al. (100), em seu estudo com fatias de maçãs revestidas desidratadas por ar quente assistido por micro-ondas, constatou-se que a presença de materiais de revestimento (amido ou pectina) com inclusão de CaCl_2 , revestido as amostras podem preservar seu volume induzido e estender a estrutura porosa. O que pode ter ocorrido nesse estudo, é que os morangos com maior porosidade obtiveram maior alteração pela facilidade de absorção de umidade nesses morangos, sendo confirmado pelos valores de umidade, ocasionando um colapso maior durante a estocagem.

5.4.4. Antocianinas

A estabilidade da antocianina depende das condições de processamento e armazenamento, incluindo pressão, temperatura, atividade da água, duração do processo, pH, luz, oxigênio, íons metálicos, enzimas e teor de açúcar (101).

Os valores médios do teor de antocianinas totais encontrados no presente estudo foram de 94,62 mg 100 g⁻¹ no morango *in natura*, observou-se na figura 5.8 A, que o tipo de processo (liofilização e estufa), apresentaram efeito significativo ($p < 0,05$), constatando uma retenção de 67,83, 55,59 e 59,61% de antocianinas totais após a liofilização de L, RP-L e IP-L, respectivamente. Os morangos desidratados em estufas sofreram perdas maiores de antocianinas no processamento, restando aproximadamente 21,83, 20,49 e 26,60% de antocianinas no processo de secagem em estufa de E, RP-E e IP-E, respectivamente. Essa maior perda de antocianinas nos morangos desidratados por estufa pode ser explicada pela utilização de temperaturas altas na desidratação desses morangos. A degradação de antocianinas é maior quando submetidas a temperaturas superiores a ambiente (25°C) (102).

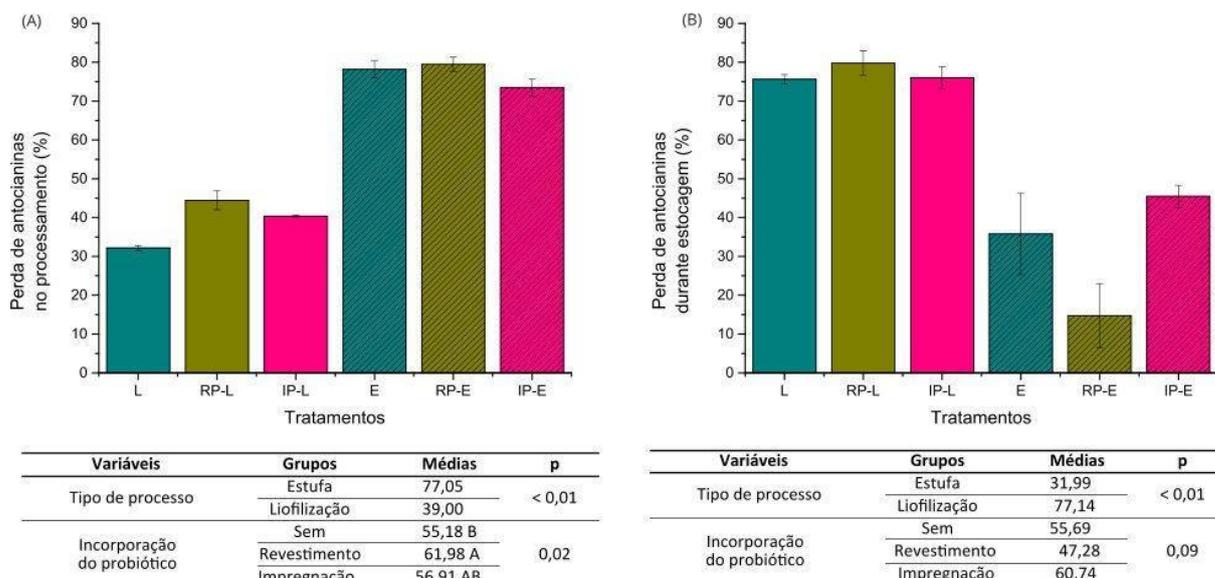


Figura 5.8. Perdas de antocianinas: (A) durante o processamento (B) durante a estocagem. Letras maiúsculas diferentes na figura indicam diferença significativa entre a técnica de incorporação do probiótico ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Houve perdas de antocianinas maiores no processamento de morangos revestidos RP-L e RP-E, quando comparados com o controle ($p < 0,05$). Isso pode ser atribuído a lixiviação pela imersão desses morangos em um meio (alginato + sorbitol + CaCl_2). Isso se deve ao fato de que as antocianinas são hidrossolúveis em água, o que torna possível sua perda por lixiviação durante a imersão, tendo como consequência o descolorimento do produto.

Quando avaliados a perda de antocianinas durante a estocagem na figura 5.8 B, observou-se que houve alteração maior nos morangos liofilizados, o que pode ser atribuído a sua porosidade, aumentando o contato com fatores que afetam sua estabilidade, como luz, umidade e oxigênio, sendo facilmente degradada quando presentes.

Dithal et al. (103) observaram que os morangos revestidos com alginato reteve concentrações maiores de antocianinas quando comparados com o controle durante a estocagem. Esses dados foram diferentes dos encontrados nesse estudo, onde a presença de uma matriz biopolimérica na superfície de morangos desidratados, não reteve concentrações maiores ($p>0,05$) de antocianinas.

5.4.5. Vitamina C

A concentração de vitamina C encontradas nesse experimento nos morangos *in natura* foi de 469,40 mg 100 g⁻¹. Resultados apresentados na figura 5.9 A, constatou-se que houve diferença significativa ($p<0,05$) no tipo de processamento (liofilização e estufa). Em média, a secagem em estufa resultou em perdas maiores ($p<0,05$). As perdas vitamina C deve-se principalmente à sua solubilidade em água e vazamento em soluções osmóticas e à degradação térmica durante a secagem (104,105).

Verificou-se que a presença do revestimento de alginato não reteve concentrações significativamente maiores de vitamina C ($p<0,01$) no processamento de RP-L e RP-E, que pode ter ocorrido devido a sua permeabilidade ao oxigênio. Portanto, esse revestimento não foi capaz de preservar a vitamina C da oxidação durante o processamento.

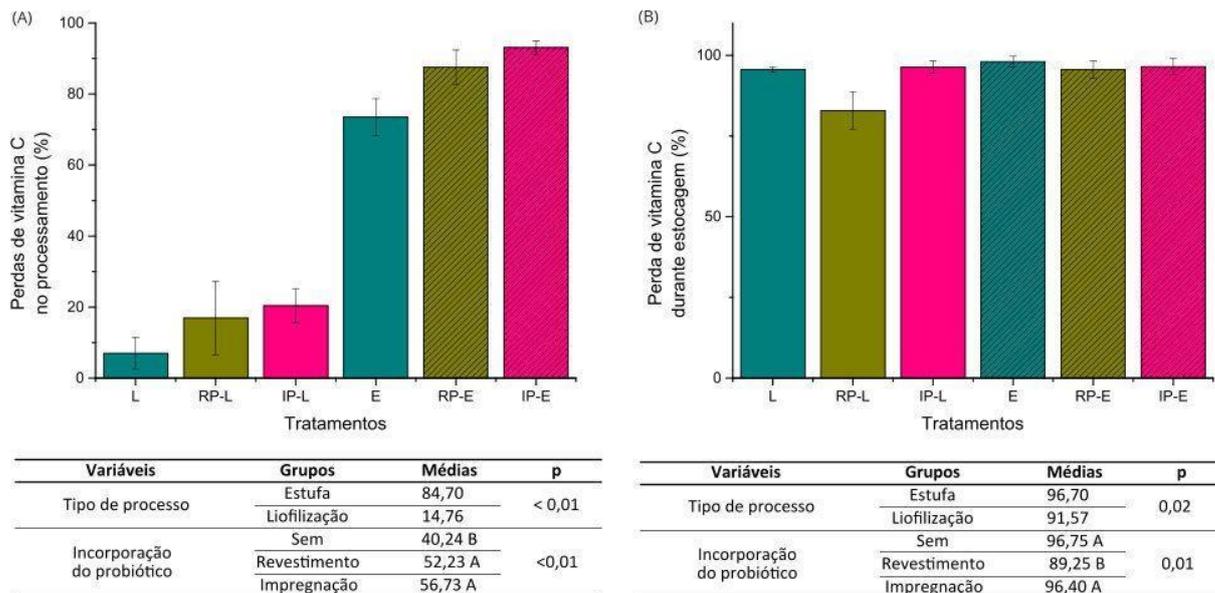


Figura 5.9. Perdas de Vitamina C: (A) durante o processamento (B) durante a estocagem. Letras maiúsculas diferentes na figura indicam diferença significativa entre a técnica de incorporação do probiótico ($p \leq 0,05$) de acordo com o teste de comparação de médias Tukey. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). L: Liofilizados, RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, E: Secos em estufa, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Os morangos revestidos e impregnados com probióticas tiveram maiores perdas de vitamina C, quando comparados com o controle, podendo ser explicado pelo fato desses morangos terem sido imersos em uma solução, exercendo um efeito de lixiviação, devido a sua hidrossolubilidade.

Quando avaliados as perdas de vitamina C durante a estocagem, observados na figura 5.9 B, verificou-se ambos os fatores (tipo de processo e técnica de incorporação do probiótico), apresentaram diferença ($p < 0,05$) nas perdas de vitamina C. Os morangos liofilizados obtiveram menores perdas ($p < 0,05$) de vitamina C durante a estocagem, quando comparados com os morangos secos em estufa. Isso ocorre, devido ao método de liofilização manter o tecido intacto, fornecendo um efeito de proteção contra componentes oxidativos da célula. Essa diferença no teor de vitamina C, pode

ser atribuída a mudança na estrutura celular ser mais drástica nos morangos secos em estufa, onde algumas microestruturas quando não destruídas durante a desidratação, podem ser danificadas, e como consequência, maiores perdas de vitamina C durante a estocagem dos morangos secos em estufa. Outra resposta é que estabilidade da vitamina C é influenciada por fatores como estrutura química, pH, temperatura, luz, presença de oxigênio e interações com os constituintes individuais de cada alimento, tais como as antocianinas. Segundo Bobbio e Bobbio (106), essa interação causa a degradação de ambos os compostos. O que pode ser observado na (figura 5.8 B) que as perdas de antocianinas foram menores durante a estocagem dos morangos secos em estufas, o que pode ter ocasionado uma degradação maior de vitamina C nesses morangos durante a estocagem.

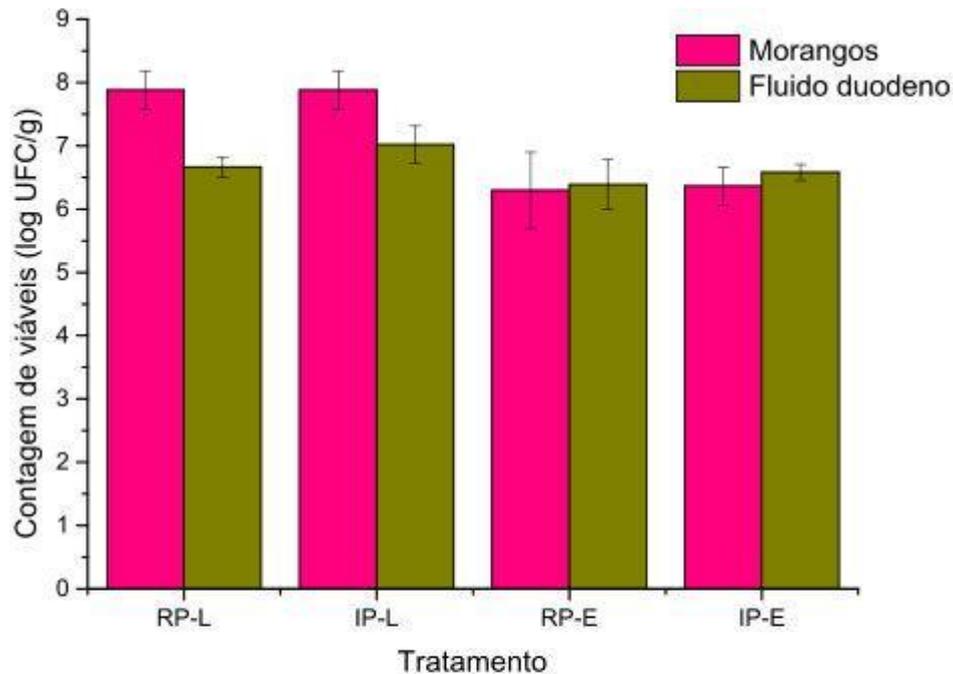
Observou-se que em média a presença do revestimento diminuiu ($p > 0,05$) as perdas durante a estocagem nos morangos liofilizados. Resultados esperados, onde vários trabalhos constataram retenções superiores de vitamina C em produtos revestidos, isso ocorre devido a um efeito da diminuição do contato com o oxigênio, evitando sua oxidação.

Em um estudo feito por Canizares e Mauro (107), onde avaliou-se a estabilidade de mamões secos revestidos com pectina, constatou-se melhores resultados para retenção de vitamina C em mamões revestidos durante a secagem e armazenamento de 30 dias. Nesse mesmo estudo, observou-se perdas de vitamina C ocorridas durante o processamento, ocasionados pelo manuseio durante a imersão de mamões para aplicação do revestimento.

5.4.6. Viabilidade probiótica após passagem pelo trato gastrointestinal *in vitro*

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) entre o tipo de processamento (liofilização e secagem em estufa). Observa-se na figura 5.10 que a entrada dos probióticos no simulador do intestino humano influenciou na entrega do probiótico no duodeno. Essa entrada do probiótico foi influenciada pelo processo de desidratação ($p < 0,05$), onde os morangos secos em estufas (RP-E e IP-E) entraram com concentrações de viáveis menores quando comparados com os morangos liofilizados (RP-L e IP-L).

Após finalização do processo, observou-se que as técnicas de incorporação de probióticos não diferiram entre si ($p > 0,05$), apresentando uma entrega de células probióticas viáveis de no mínimo $6,39 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ no duodeno.



Variáveis	Grupos	Médias	p
Processamento	Estufa	6,48	< 0,04
	Liofilização	6,84	
Incorporação do probiótico	Revestimento	6,53	0,10
	Impregnação	6,80	

Figura 5.10. Viabilidade probiótica após a passagem pelo simulador do trato gastrointestinal. Os dados são apresentados como média \pm desvio padrão ($n = 3$). RP-L: Revestidos com alginato com probióticos e liofilizados, IP-L: Impregnados com probióticos e liofilizados, RP-E: Revestidos de Alginato com probióticos e secos em estufa, IP-E: Impregnados de Alginato com probióticos e secos em estufa.

Em um estudo realizado por Marcial- Coba (96), constatou-se que os esporos de *Bacillus coagulans* BC4 incorporados em pastas de tâmaras secas, apresentaram resistência após a passagem gástrica in vitro, apresentando-se uma entrega de células viáveis de no mínimo 7,76 Log UFC. mL⁻¹ no duodeno.

6. Conclusões

As técnicas utilizadas neste trabalho para incorporar probióticos permitiram introduzir probióticos por diferentes técnicas em morangos e posterior secagem em estufa ou por liofilização.

Os morangos desidratados por liofilização utilizando a técnica de impregnação (IP-L), carregaram uma concentração maior de células probióticas viáveis de 10^7 UFC g⁻¹, valores médios encontrados em matrizes lácteas probióticas comerciais;

Os morangos desidratados por liofilização apresentaram menor alteração nas características físico-químicas durante o processamento.

As técnicas de incorporação probióticas utilizadas entregaram o probiótico em concentrações significativamente iguais ($p > 0,05$) no duodeno. Portanto, a presença do revestimento não alterou significativamente ($p > 0,05$) na entrega do probiótico no duodeno;

Assim conclui-se que os esporos de *Bacillus coagulans* podem ser incorporados a frutas previamente ao tratamento de desidratação, sendo capazes de se manter viáveis para posterior entrega no duodeno.

7. Referências bibliográficas

1. FAO/WHO. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002, 1-11.
2. Hill C, Guarner, Reid G, Gibson GR, Merenstein DJ, Pot B, Morelli L, Canani RBC, Flint HJ, Salminen S, Calder PC, Sander ME. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2014; 11: 506-14.
3. Govender M, Choonara YE, Kumar P, Du Toit LC, Van Vuuren S, Pillay V. A review of the advancements in probiotic delivery: Conventional vs. non-conventional formulations for intestinal flora supplementation. *AAPS Pharm Sci Tech*. 2014; 15(1):29-43.
4. Mitsuoka T. Development of functional foods. *Bioscience of Microbiota. Food an Health*. 2014, 33: 117-28.
5. Varavallo MA, Thomé IN, Teshima E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais. *Semina: Ciências Biológicas e da Saúde*. 2008; 29: 83-104.

6. Martins EMF, Ramos AM, Vanzela ESL, Stringheta PC, Pinto CLO, Martins JM. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. *Food Research International*. 2013, 51:764-70.
7. Speranza B, Campaniello D, Bevilacqua A, Altieri C, Sinigaglia M, Corbo MR. Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. *Front. Microbiol*. 2018; 9: 2538, 2018.
8. Akman K, Uysal E, Uzkaya GU, Tornuk E, Durak, M.Z. Development of probiotic carrier dried apples for consumption as snack food with the impregnation of *Lactobacillus paracasei*. *LWT- Food Sci Technol*. 2019; 103: 60-8.
9. Cutting SM. *Bacillus* probiotics. *Food Microbiol*. 2011; 28(2): 214-220.
10. Maathuis AJH, Keller D, Farmer, S. Survival and metabolic activity of the GannedenBC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic in vitro model of the stomach and small intestine. *Benef. Microbes*. 2010;1 (1): 31-6.
11. Azodanlou R, Darbellay C, Luisier JL, Villettaz JC, Amadò R. Quality assessment of strawberries (*Fragaria* species). *J. Agric Food Chem*. 2003; 51(3): 715-21.

12. Corrêa SC, Clerici MTPS, Garcia JS, Ferreira EB, Eberlin MN, Azevedo L. Evaluation of dehydrated marolo (*Annona crassiflora*) flour and carpels by freeze-drying and convective hot-air drying. *Food Research International*. 2011;44 (7):2385-2390.
13. Ratti C. Hot air and freeze-drying of high-value foods: A review *Journal of Food Engineering*. 2001; 49: 311-319.
14. Karam MC, Petit J, Zimmer D, Djantou EB, Scher J. Effects of drying and grinding in production of fruit and vegetable powders: A review *J Food Engineering*. 2016; 188:32-49.
15. Rößle C, Auty MAE, Brunton N, Gormley RT, Butler F. Evaluation of fresh-cut apple slices enriched with probiotic bacteria. *Innov Food Sci Emerg Technol*. 2010; 11: 203–9.
16. Rodrigues S, Silva LCA, Mulet A, Cárcel JA, Fernandes AN. Development of dried probiotic apple cubes incorporated with *Lactobacillus casei* NRRL B-442. *J Functional Foods*. 2018; 41:48-54.
17. Zura-Bravo L, Rodriguez A, Stucken K, Vega-Gálvez A. Drying kinetics of probiotic-impregnated murta (*Ugni molinae* T.) berries. *J Food Sci Technol*. 2019; 56:103-113.

18. Tapia MS, Rojas-Graü MA, Rodríguez FJ, Ramirez J, Carmona A, Martín-Belloso O. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J Food Sci.* 2007; 72(4): 190-2.
19. López de Lacey AM, López-Caballero ME, Gómez-Estaca J, Gómez-Guillén MC, Montero P. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. *Innov Food Sci Emerg Technol.* 2012; 16: 277.
20. López de Lacey AM, López-Caballero ME, Montero P. Agar films containing green tea extract and probiotic bacteria for extending fish shelf-life. *LWT Food Sci Technol.* 2014; 55: 559, 2014.
21. Romano N, Tavera-Quiroz MJ, Bertola N. Mobili P, Pinotti A, Gómez-Zavaglia A. Edible methylcellulose-based films containing fructooligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. *Food Res. Int.* 2014; 64: 560-6.
22. Falguera V, Quintero JP, Jiménez A, Muñoz JA, Ibarz A. Edible films and coatings: structures, active functions and trends in their use. *Trends in Food Sci and Technol, Reino Unido.* 2011; 22(6): 292-303.

23. Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos, D.; Khutoryanskiy, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J. control release*. 2012; 162(3): 56-67.
24. Pinheiro AC, Cerqueira MA, Souza BWS, Martins JT, Teixeira JA, Vicente AA. Utilização de revestimentos/filmes edíveis para aplicações alimentares. *Boletim de Biotecnologia, Braga*. 2010; 85:18-28.
25. Mei L, He F, Zhou RQ, Wu CD, Llang R, Xie R, Ju XJ, Wang W, Chu LY. Novel intestinal-targeted Ca-alginate-based carrier for pH-responsive protection and release of lactic acid bacteria. *ACS Appl Mat Interfaces*. 2014; 6: 5962-70.
26. Gibson G, Hutkins R, Sanders M, Prescott SL, Reimer RA, Salminen SJ, Scott K, Stanton C, Swanson KS, Cani PD, Verbeke K, Reid G. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2017; 14: 491-502.
27. Santos AM. A cultura do morango. Brasília, DF: Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária; 1993. p.35.

28. Henschel JM, Resende JTV, Giloni-Lima PC, Zeist André R, Lima Filho, RB, Santos MH. Produção e qualidade de morango cultivado sob diferentes cores de cobertura de túnel baixo. *Horticultura Brasileira*. 2017; 35: 364-70.
29. Giampieri F, Forbes-Hernandez TY, Gasparrini M, Alvarez-Suarez JM, Afrin S, Bompadre S, Quiles JL, Mezzetti B, Battino M. Strawberry as a health promoter: an evidence based review *Food Funct*. 2015; 6 (5):1386-1398.
30. Hashmi MS, East AR, Palmer JS, Heyes JA. Hypobaric treatment stimulates defence-related enzymes in strawberry. *Postharvest Biol. Technol*. 2013; 85: 77-82.
31. Neri F, Cappellin L, Spadoni A, Alarcon AA, Aprea E, Romano A, Gasperi F, Biasioli F. Role of strawberry volatile organic compounds in the development of *Botrytis cinerea* infection. *Plant Pathol*. 2014; 64: 709-17.
32. Roussos PA, Triantafillidis A, Kepolas E. Strawberry fruit production and quality under conventional, integrated and organic management. *Acta Horti*. 2012; 926: 541-6.
33. Khoshnevisan B, Shariati HM, Rafiee S, Mousazadeh H. Comparison of energy consumption and GHG emissions of open field and greenhouse strawberry production *Renew. Sustain. Energy Ver*. 2014; 29:316-14.

34. FAOSTAT Statistical Database of the Food and Agriculture Organization of the United Nations, 2020.
35. Anuário Brasileiro da Fruticultura. Editora Gazeta, Santa Cruz do Sul; 2015. p. 104.
36. Chen XD, Mujumdar AS. Drying technologies in food processing. Wiley-Blackwell, West Sussex, United Kingdom; 2008. 352 p.
37. Kudra T, Mujumdar AS. Advanced drying Technologies. 2nd Ed. CRC Press, Boca Raton, FL, USA; 2009.448p.
38. Wu L, Orikasa T, Ogawa Y, Tagawa A. Vacuum drying characteristics of eggplants. J. Food Eng. 2007; 83: 422-29.
39. Doymaz I, Göl E. Convective drying Characteristics of eggplant slices. J Food Process Engineering. 2011; 4(4):1234-52.
40. Cohen JS, Yang TCS. Progress in food dehydration. Trends in Food Sci & Technol.1995; 6 (1): 20-25.
41. Puig A, Perez- Munuera I, Carcel JA, Hernando I, Garcia- Perez JV. Moisture loss kinetics and microstructural changes in eggplant (*Solanum*

melongena L.) during conventional and ultrasonically assisted convective drying. Food and Bioproducts Processing. 2012; 90: 624-32.

42. Vega-Mercado H, Góngora-Nieto MM, Barbosa-Cánovas GB. Advances in dehydration of foods. Journal of food Engineering. 2001; 49: 288.

43. Bermudez-Brito M, Plaza- Diaz J, Muñoz-Quezada J, Gomez-Llorente C. Probiotic Mechanisms of Action. Ann Nutr Metab. 2012; 61, p. 160-74.

44. Plaza-Diaz J, Ruiz-Ojeda FJ, Gil-Campos M, Gil, A. Mechanisms of Action of Probiotics. Advances in nutrition, 2019; 10:49-66.

45. Coppola MM, Turnes CG. Probióticos e resposta imune. Ciência Rural. 2004;34(4):1297-303.

46. Amara AA, Shibl A. Role of Probiotics in health improvement, infection control and disease treatment and management. Saudi Pharm J. 2015; 23(2): 107-14.

47. Metchnikoff E. The Prolongation of Life. New York: Putmans Sons;1908. 343 p.

48. Metchnikoff II. The Prolongation of Life: Optimistic Studies. Springer Publishing Company. New York, NY, USA, 2004.

49. Tavera-Quiroz MJ, Romano N, Mobili P, Pinotti A, Gómezzavaglia A, Bertola N. Green apple baked snacks functionalized with edible coatings of methylcellulose containing *Lactobacillus plantarum*. Journal of Functional Foods. 2015; 16:164-73.

50. Vivek K, Mishra S, Pradhan RM. Characterization of spray dried probiotic Sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum*. LWT Food Sci Technol. 2020; 117:18699.

51. Hardy H, Harris J, Lyon E, Beal J, Foey AD. Probiotics, prebiotics and immunomodulation of gut mucosal defenses: Homeostasis and immunopathology. Nutrients. 2013; 5: 1869-1912.

52. Corona-Hernandez RI, Álvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, De La Rosa La, Wall-Medrano A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. Comprehensive Reviews Food Sci Food Safety. 2013;12(6):614-628.

53. Succi M, Tremonte P, Pannella G, Tipaldi L, Cozzolino A, Romaniello R, Sorrentino E, Coppola R. Pre-cultivation with selected prebiotics enhances the survival and the stress response of *Lactobacillus rhamnosus* strains in simulated gastrointestinal transit. Front. Microbiol. 2017.

54. Özüsağlam MA, Aksaray U. Importance of *Bacillus coagulans* bacterium as probiotic in animal nutrition Süleyman Demirel University Journal of Agriculture (Turkey).2010; 5: 50-7.
55. Konuray G, Erfinkaya, Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. Foods. 2018; 7: 92-102.
56. Donskey CJ, Hoyen CK, Das SM, Farmer S, Dery M, Bonomo RA. Effect of oral *Bacillus coagulans* administration on the density of vancomycin-resistant enterococci in the stool of colonized mice. Lett Appl Microbiol. 2001; 33(1): 84-8.
57. Maathuis AJH, Keller D, Farmer, S. Survival and metabolic activity of the Ganeden BC30 strain of *Bacillus coagulans* in a dynamic *in vitro* model of the stomach and small intestine. Benef. Microbes. 2010;1(1): 31-6.
58. Casula G, Cutting SM. Bacillus Probiotis: Spore Germination in the Gastrointestinal Tract. Appl Environ Microbiol. 2002; 68 (5): 2344-52.
59. Abhari k, Shekarforoush SS, Sajedianfard J, Hosseinzadeh S, Nazifi S. The effect of probiotic, prebiotic and symbiotic diets containing *Bacillus coagulans* and inulin on rat intestinal microbiota. Iran J of Vet Res. 2015;16 (3): 267-73.

60. Hum L. *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgrad Med.* 2009; 121:119-24.
61. Rogha M, Esfahani MZ, Zangarzadeh AH. The Efficacy of a Synbiotic Containing *Bacillus coagulans* in Treatment of Irritable Bowel Syndrome: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Gastroenterol Hepatol Bed Bench.* 2014; 7(3):156-63.
62. Keller D, Van Dinter R, Cash H, Farmer S, Venema K. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 increases plant protein digestion in a dynamic, computer-controlled in vitro model of the small intestine (TIM-1). *Beneficial Microbes.* 2017;8(3):1-6.
63. Bomko TV, Nosalskaya TN, Kabluchko TV, Lisnyak YV, Martynov AV. Immunotropic Aspect of the *Bacillus coagulans* Probiotic Action. *J Pharm Pharmacol.* 2017 Aug; 69(8):1033-40.
64. Ratna S, Yelikar KA, Deshpande S. Clinical Study of *Bacillus coagulans* Unique IS-2 (ATCC PTA-11748) in the treatment of patients with Bacterial Vaginosis. *Indian J Microbio.* 2012; 52: 396-99.
65. Tian H, Liu Di, Yao Y, Ma S, Zhang X, Xiang A. Effect of sorbitol plasticizer on the structure and properties of melt processed polyvinyl alcohol films. *J Food Sci.* 2017; 82(12): 2926-32.

66. Suyatma NE, Tighzert L, Copinet A, Coma V. Effects of Hydrophilic Plasticizers on Mechanical, Thermal, and Surface Properties of Chitosan Films. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 2005; 53(10), 3950-57.
67. Felix M, Carpintero V, Romero A, Guerrero A. Influence of sorbitol on mechanical and physico-chemical properties of soy protein-based bioplastics processed by injection molding. *Polímeros*. 2016; 26(4):277-81.
68. Sarmiento-Rubiano LA, Zúñiga M, Pérez-Martínez G, Yebra M J. Dietary supplementation with sorbitol results in selective enrichment of lactobacilli in rat intestine. *Research in Microbiology*. 2007; 158 (8–9): 694-701.
69. Jenkins D, Kendall C, Vuksan V. Inulin, oligofructose and intestinal function. *J Nutr*. 1999; 129(7): 1431-33.
70. Scantlebury-Manning T, Gibson GR. Prebiotics Best Practice and Research *Clinical Gastroenterology*. 2004; 18: 287-9.
71. Hassan B, Chatha SAS, Hussain AI, Zia KM, Akthar N. Recent advances on polysaccharides, lipids and protein based edible films and coatings: A review. *International J. Biological Macromolecules*. 2018; 109: 1095- 1107.

72. Baloch AK, Buckle KA, Edwards RA. Effect of coating with starch and nordihydroguaiaretic acid on the stability of carotenoids of dehydrated carrot. J. Chem Soc Pak.1986; 8: 59-62.

73. Zhao YP, Chang KC. Sulfite and starch affect color and carotenoids of dehydrated carrots (*Daucus carota*) during storage. Journal of Food Science. 1995; 60:324-47.

74. Gol NB, Patel PR, Rao TVR. Improvement of quality and shelf-life of strawberries with edible coatings enriched with chitosan Postharvest Biol. Technol. 2013; 85: 185-195.

75. Cuq B.; Gontard N, Guilbert S. Edible films and coatings as active layers IN ML Rooney (Ed.), Active food packaging, Blackie Academic & Professional. Glasgow.1995;111-142.

76. Pereira JO, Soares J, Sousa S, Madureira AR, Gomes A, Pintado M. Edible films as carrier for lactic acid bacteria LWT: Food Sci Technol. 2016; 73:543-50.

77. Capela P, Hay TKC, Shah NP. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. Food Research International. 2006; 39: 203-11.

78. Thu B, Bruheim P, Espevik T, Smidsrød O, Soon-Shiong P, Skjåk-Bræk G. Alginate polycation microcapsules. I. Interaction between alginate and polycation Biomaterials.1996,17: 1031-1040.
79. Sachan NK, Pushkar S, Jha A, Bhattacharya A. Sodium alginate: The wonder polymer for controlled drug delivery Journal of Pharmacy Research. 2009; 2:1191-99.
80. Benavides S, Carvajal RV, Reyesb JE. Physical, mechanical and antibacterial properties of alginate film: Effect of the crosslinking degree and oregano essential oil concentration. J. Food Eng. 2012; 110 (2): 239-39.
81. Liakos L, Rizzello L, BAYER IS, POMPA PP, CINGOLANI R, ATHANASSIOU A. Controlled antiseptic release by alginate polymer films and beads. Carbohydrate Polymers. 2013, 92:176-183.
82. Goh CH, Heng PWS, CHAN LW. Alginates as a useful natural polymer for microencapsulation and therapeutic applications. Carbohydrate Polymers. 2012; 88(1): 1-12.
83. Rhim JW. Physical and chemical properties of water resistant sodium alginate films. LWT Food Sci Technol. 2004; 37: 323-30.

84. Al-Musa S, Abu Fara D, Badwan AA. Evaluation of parameters involved in preparation and release of drug loaded in crosslinked matrices of alginate. *Journal of Controlled Release*. 1999; 57(3): 223-32.
85. Annan NT, Borza AD, Hansen LT. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Res. Int.* 2008; 41(4): 184-93.
86. Association of Official Analytical Chemists – AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists International. Washington: Ed. Patrícia Cunniff. 1997; 2 (16): 37.
87. Teixeira IN, Stringheta PC, Oliveira FA. Comparação de métodos para quantificação de antocianinas. *Rev. Ceres*. 2008; 55: 297- 304.
88. Bresolin JD, Hubinger SZ. Metodologia para determinação de ácido ascórbico em sucos de citrus utilizando cromatografia líquida de alta eficiência. In: Simpósio Nacional de instrumentação agropecuária; 2014.p.497-9.
89. Freire FC, Adorno MAT, Sakamoto IK, Antoniassi R, Sampaio AC, Santos KMOS, Sivieri K. Impact of multi-functional fermented goat milk beverage on

gut microbiota in a dynamic colon model. *Food Res Int.* 2017; 99: 315-317, 2017.

90. Possemiers S, Verthé K, Uyttendaele S, Vestraete W. PCR-DGGE-based quantification of stability of the microbial community in a simulator of the human intestinal microbial ecosystem. *FEMS Microbi Ecol.* 2004; 49(3): 495-507.

91. Ornela-Paz JJ, Yahia EM, Ramírez-Bustamante N, et al. Physical attributes and chemical composition of organic strawberry fruit (*Fragaria x ananassa* Duch, Cv. Albion) at six stages of ripening. *Food Chemistry.* 2013; 138 (1): 372-381.

92. Neocleus D. Effects of cultivars and coco-substrates on soilless strawberry production in Cyprus. *Journal of Berry Research.* 2012; 2(4): 207-213.

93. Riveros B, Ferrer J, Bórquez R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technol: An International J.* 2009 27(1):123-32.

94. Ragoonanan V, Malsam J, Bond DR, Aksan A. Roles of membrane structure and phase transition on the hyperosmotic stress survival of

Geobacter sulfurreducens. *Biochimica et Biophysica Acta*. 2008; 1778: 2283-2290.

95. Shinde T, Vemuri R, Tristram SG, Eri R, Stanley R, Perera P. Probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 spores exhibit excellent in-vitro functional efficacy in simulated gastric survival, mucosal adhesion and immunomodulation. *J. Functional Foods*. 2013; 52: 100-8.

96. Marcial-Coba MS, Pjaca AS, Andersen CJ, Knoche L S, Nielsen D. S. Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. *LWT Food Sci Technol*. 2019; 99:197-201.

97. Oliveira-Alcântara AV, Abreu AAS, Gonçalves C, Fuciños P, Cerqueira MA, Gama FMP, Pastrana LM, Rodrigues S, Azeredo HMC. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *LWT Food Sci Technol*. 2020; 130:109699.

98. Gulati T, Datta AK. Mechanistic understanding of case-hardening and texture development during drying of food materials. *J food Engineering*. 2015; 166:119-38.

99. Demirel D, Turhan M. Air-drying behavior of Dwarf Cavendish and Gros Michel banana slices. *J. food engineering*. 2003; 59(1):1-11.

100. Askari GR, Emam- Djomeh Z, Mousavi SM. Effects of Combined Coating and Microwave Assisted Hot-air Drying on the Texture, Microstructure and Rehydration Characteristics of Apple Slices. *Food Sci Tech Int.* 2006; 12(1): 39-46.

101. Qiu G, Wang D, Song X, Deng Y, Zhao Y. Degradation kinetics and antioxidant capacity of anthocyanins in air-impingement jet dried purple potato slices. *Food Research International.* 2018; 105:121-28.

102. Stringheta PC. Identificação da estrutura e estudo da estabilidade das antocianinas extraídas da inflorescência de capim gordura (*Melinis minutiflora*, Pal de Beauv.). [Tese]- Campinas: UNICAMP; 1991.138 f.

103. Dithal R, Mora NB, Watson D, kohli P, Chouldhary R. Efficacy of limonene nano coatings on post-harvest shelf life of strawberries. *LWT Food Sci Technol.* 2018; 97: 124-134.

104. Vial C, Guilbert S, Cuq JL. Osmotic dehydration of kiwi fruits: influence of process variables on the color and ascorbic acid content. *Sci. Des Aliments.* 1991;11: 63-84.

105. Heng K, Guilbert S, Cug JL. Osmotic dehydration of papaya: Influence of process variables on the product quality. *Sciences des Aliments*. 1990,10:831-48.

106. Bobbio FO, Bobbio PA. *Introdução à química de alimentos*. 2 ed. São Paulo: Varela. 223 p.

107. Canizares D, Mauro MA. Enhancement of Quality and Stability of Dried Papaya by Pectin-Based Coatings as Air-Drying Pretreatment. *Food Bioprocess Technol*. 2015; 8:1187-97.

Anexo



Sacco Brasil Comércio de Alimentos Ltda.
Rua Emilio Nucci, 103 – Bairro Jardim Conceição (Sousas)
13.105-080 - Campinas – SP

Fone/Fax: 19-3758-8700
hans@saccobrasil.com.br
www.saccobrasil.com.br

DECLARAÇÃO

DECLARAMOS PARA OS DEVIDOS FINS QUE IMPORTAMOS NESTE MÊS A
CULTURA

BACILLUS COAGULANS BC4 – NÚMERO DE LOTE C235515A

DA SACCO SRL., ITALIA.

Firmo a presente declaração,

Campinas, 29 de julho de 2019.


HANS HENRIK KNUDSEN
GERENTE GERAL