



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS
CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DE TECNOLOGIA
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia



FITAS COMESTÍVEIS DE BANANA COMO VEÍCULOS PARA PROBIÓTICOS

Carolina Madazio Niro*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

* bolsista CAPES - 88882.426523/2019-01

**São Carlos - SP
2021**

CAROLINA MADAZIO NIRO

Fitas Comestíveis de Banana como Veículos para Probióticos

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRA EM BIOTECNOLOGIA do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos.

Orientadora:

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Katia Sivieri

Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara - UNESP

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso

Embrapa Instrumentação

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

Embrapa Instrumentação

São Carlos

2021



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SÃO CARLOS

Centro de Ciências Exatas e de Tecnologia
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia

Folha de Aprovação

Defesa de Dissertação de Mestrado do candidato Carolina Madazio Niro, realizada em 18/08/2021.

Comissão Julgadora:

Profa. Dra. Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo (EMBRAPA)

Profa. Dra. Katia Sivieri (UNESP)

Prof. Dr. Luiz Henrique Capparelli Mattoso (EMBRAPA)

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

O Relatório de Defesa assinado pelos membros da Comissão Julgadora encontra-se arquivado junto ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia.

Dedico este trabalho à minha família, por toda dedicação e apoio durante toda minha vida!

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais e irmã por todo apoio e suporte em toda minha vida e por sempre fazerem o possível para que meus sonhos fossem realizados!

À minha orientadora Dra. Henriette Azeredo, por todo ensinamento, paciência e conhecimento transmitido ao longo do mestrado.

Agradeço também às minhas amigas de graduação que sempre estiveram do meu lado: Julia, Letícia, Natasha e Lívia.

Agradeço a toda a equipe de laboratório da Embrapa, que sempre estiveram à disposição para ajudar, em especial, Aline, Jackson e Lulli. Também agradeço muito aos técnicos dos laboratórios por toda paciência, ensinamento e colaboração nas análises, em especial, a Joana, que me ajudou ao longo de todo processo, Silviane, Paulo e Viviane.

Agradeço também à professora Katia Sivieri e Mateus pela colaboração nos experimentos de simulação da passagem pelo trato gastrointestinal e à Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Departamento de Ciências dos Alimentos e Nutrição, Unesp, Araraquara, Brasil), onde o experimento foi realizado. Também agradeço ao professor Luiz Henrique Mattoso pelas colaborações durante o exame de Qualificação.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal de São Carlos (UFSCar) e a toda equipe de funcionários e professores do Programa, por tornar possível todo o processo do mestrado e à Embrapa Instrumentação de São Carlos, onde pude realizar a pesquisa. Também agradeço à CAPES pelo apoio que possibilitou a realização do mestrado e ao CNPq (processo 408940/2018-2) pelo auxílio financeiro para a condução deste trabalho.

Agradeço a Deus acima de tudo.

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

RESUMO

Considerando a grande demanda por produtos que atendam simultaneamente aos requisitos de saudabilidade, boa aceitação sensorial e conveniência, *snacks* à base de frutas ou hortaliças têm se apresentado como uma forte tendência no mercado. Outra tendência são alimentos contendo probióticos. Porém, a grande maioria de alimentos probióticos disponíveis no mercado atualmente são lácteos. Com uma grande quantidade de pessoas com restrições ao consumo de laticínios e mesmo de produtos de origem animal no geral, cresce a necessidade de introduzir no mercado alimentos probióticos não-lácteos. O objetivo do trabalho foi desenvolver uma fita de banana probiótica. As fitas foram formuladas a partir de polpa de banana e uma matriz filmogênica. Foram testadas duas matrizes - uma digerível (amido) e uma não-digerível (celulose bacteriana - CB) - e duas cepas probióticas (esporogênica e não-esporogênica – *Bacillus coagulans* BC4 e *Lactobacillus acidophilus* LA-3, respectivamente), além da presença de um agente plastificante (xarope de yacon). As diferentes formulações foram avaliadas em termos de suas propriedades físicas e viabilidade das cepas após o processo de secagem em estufa a 50 °C, durante estocagem a 25 °C e ao longo da passagem simulada pelo trato gastrointestinal. As fitas apresentaram valores de resistência à tração entre 1 e 3 MPa, as fitas feitas com CB apresentaram resistência significativamente ($p < 0,05$) maior que as fitas feitas com amido, e a presença de probióticos diminuiu significativamente a resistência à tração. A força de cisalhamento também foi afetada pela matriz (sendo maior para as fitas de CB) e pela presença de *L. acidophilus* (que diminuiu a força de cisalhamento). Após a secagem, a viabilidade de *B. coagulans* reduziu em cerca de 1 ciclo log em relação à dispersão filmogênica, apresentando cerca de 7,6 log UFC g⁻¹, enquanto *L. acidophilus* não apresentou viabilidade suficiente para contagem (< 3 log UFC g⁻¹). A viabilidade de *B. coagulans* permaneceu constante até 187 dias de estocagem em 25 °C. Durante a passagem simulada pelo trato gastrointestinal, as fitas contendo *B. coagulans* BC4 foram resistentes às condições de pH e enzimáticas do estômago e duodeno, liberando $7,45 \pm 0,12$ e $7,77 \pm 0,33$ log UFC g⁻¹ no intestino para as fitas à base de CB e amido, respectivamente (sem diferença significativa para as matrizes). Portanto, fitas de banana podem ser alimentos não-lácteos promissores como carreadores de *B. coagulans* BC4, porém, *L. acidophilus* LA-3 não poderia ser considerada uma cepa adequada para o processo proposto. Indica-se que seja feita futuramente uma análise sensorial com as diferentes formulações de fitas de banana para entender como as diferenças na textura das fitas podem influenciar a aceitação do produto.

Palavras-chave: fitas de frutas, probióticos, polissacarídeos, celulose bacteriana, *snacks* saudáveis.

Madazio Niro, Carolina. **Banana Leathers as Probiotic Carriers**. 2021. Dissertação (Programa de Pós-graduação em Biotecnologia) – UFSCar, São Carlos, 2021.

ABSTRACT

Considering the growing demand for products that simultaneously meet the requirements of healthiness, good sensory acceptance and convenience, snacks based on fruits or vegetables have been a strong market trend. Another trend is that of food containing probiotics. However, most probiotic foods available on the market are dairy products. With a large number of people with restrictions to the consumption of dairy products and even to animal-based products in general, there is a growing need to introduce non-dairy probiotic foods to the market. The objective of this project was to produce a probiotic banana leather. The fruit leathers were made from banana puree and a film forming matrix. Two matrices were compared – a digestible one (starch) and a non-digestible one (bacterial cellulose - BC), and two probiotic strains (one sporogenic and one non-sporogenic - *Bacillus coagulans* BC4 and *Lactobacillus acidophilus* LA-3, respectively), in addition to the presence of a plasticizer and prebiotic agent (yacon syrup). The different formulations were evaluated in terms of their physical properties and viability of the strains after oven drying at 50 °C, during storage at 25 °C and along the simulated passage through the gastrointestinal tract. The leathers presented tensile strength values between 1 and 3 MPa, the ones with BC showing significant higher strengths ($p < 0.05$), and the presence of probiotics significantly decreasing the tensile strength values. The shear force was also affected by the matrix (being higher for the BC-based leathers) and by the presence of *L. acidophilus* (which significantly decreased the shear force values). After the dehydration process, the viability of *B. coagulans* was reduced in about 1 log cycle when compared to that of the film-forming dispersion, showing about $7.6 \log \text{ cfu g}^{-1}$, while *L. acidophilus* did not show enough viability for counting ($< 3 \log \text{ cfu g}^{-1}$). The viability of *B. coagulans* remained constant up to 187 days of storage at 25 °C. During the simulated passage through gastrointestinal tract, *B. coagulans* BC4 resisted well to the pH and enzymatic conditions of the stomach and duodenum, BC- and starch-based leathers released, respectively, 7.45 ± 0.12 e $7.77 \pm 0.33 \log \text{ cfu g}^{-1}$ in the small intestine (without significant differences between matrices). Therefore, banana leathers can be promising non-dairy foods as carriers of *B. coagulans* BC4, however, *L. acidophilus* LA-3 could not be considered a suitable strain for the proposed process. It is recommended that a sensory analysis be carried out in the future with the different formulations of banana leathers to understand how differences in the texture can influence the product acceptance.

Keywords: fruit leathers, probiotics, polysaccharides, bacterial cellulose, healthy snacks.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo 1 - Introdução

Figura 1.1 Estrutura química de um segmento curto de α -amilose (a) e amilopectina (b) e representação do agrupamento de α -amilose e amilopectina como supostamente ocorre nos grânulos de amido (c). 22

Figura 1.2 Estrutura química de um segmento de celulose com duas unidades de resíduos de D-glicose ligados por ligação $\beta(1\rightarrow4)$ (a) e representação de segmentos de duas cadeias de celulose paralelas, mostrando a conformação dos resíduos de D-glicose e as ligações de hidrogênio formando ligações cruzadas (b). 25

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Figura 2.1 Análise de força de cisalhamento no texturômetro. 32

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Figura 3.1 Aparência das diferentes formulações de fitas de banana sobre superfície quadriculada (a) e sobre superfície branca (b). De esquerda para direita e de cima para baixo estão: Cont-CB, Lac-CB e Bac-CB e Cont-AM, Lac-AM e Bac-AM. 38

Figura 3.2 Resistência à tração (a), alongação na ruptura (b) e módulo elástico (c) das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos. 41

Figura 3.3 Curvas de tensão \times deformação para as diferentes formulações de fitas de banana. 42

Figura 3.4 Resistência à tração (a), alongação na ruptura (b) e módulo elástico (c) dos “Rolinhos de frutas” da marca SóSnacks[®] correspondentes aos diferentes sabores. 42

Figura 3.5 Força de cisalhamento das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos. 43

Figura 3.6 Força de cisalhamento dos “Rolinhos de frutas” da marca SóSnacks[®] correspondentes aos diferentes sabores. 44

Figura 3.7 Opacidade das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos. 45

Figura 3.8 Representação do espaço de cor $L^*a^*b^*$ (a) e $L^*C^*h^\circ$ (b). 46

Figura 3.9 Parâmetros L^* , a^* , b^* , croma e ângulo Hue das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos. 47

Figura 3.10 pH das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos. 48

Figura 3.11 Difratoograma do pó de celulose bacteriana. 50

Figura 3.12 Difratoogramas das diferentes formulações de fitas de banana. 51

Figura 3.13 Espectros de ATR/FTIR dos diferentes componentes adicionados nas formulações das fitas de banana: celulose bacteriana (CB), amido, sal sódico de carboximetilcelulose (CMC), polpa de banana e xarope de yacon. 53

Figura 3.14 Espectros de ATR/FTIR das diferentes formulações de fitas de banana.	53
Figura 3.15 Micrografias obtidas por MEV da superfície das diferentes formulações de fitas de banana.	55
Figura 3.16 Micrografias eletrônicas por varredura da criofratura das diferentes formulações de fitas de banana.	56
Figura 3.17 Viabilidade de <i>B. coagulans</i> na dispersão filmogênica (antes da secagem), no tempo 0 (imediatamente após a secagem) e ao longo da estocagem a 25 °C.	60
Figura 3.18 Viabilidade dos probióticos (<i>B. coagulans</i>) após passagem simulada pelas fases oral, gástrica e intestinal, comparada com a viabilidade inicial nas fitas de banana feitas com CB ou amido.	62
Apêndice A – Testes Preliminares	
Figura A.1 Foto da fita de amido com banana cozida.	76

LISTA DE TABELAS

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

Tabela 2.1 Formulações das fitas de banana	31
Tabela 2.2 Formulações dos fluidos digestivos: fluido simulado salivar (FSS), fluido simulado gástrico (FSG) e fluido simulado intestinal (FSI)	36

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

Tabela 3.1 Resultados de umidade e espessura das diferentes formulações de fitas de banana.	39
Tabela 3.2 Resultados de Anova Two-Way do ensaio de tração das fitas de banana	41
Tabela 3.3 Resultados de Anova Two-Way para a força de cisalhamento das fitas de banana	44
Tabela 3.4 Resultados de Anova Two-Way para opacidade as fitas de banana	45
Tabela 3.5 Resultados de Anova Two-Way referentes à análise colorimétrica das fitas de banana	47
Tabela 3.6 Resultados de Anova Two-Way referentes à medida de pH das fitas de banana	49
Tabela 3.7 Variação de pH para as diferentes formulações de fitas de banana após 6 meses de estocagem	49
Tabela 3.8 Resultados de teste t para a perda de viabilidade de <i>B. coagulans</i> durante o processo de secagem para fitas com celulose bacteriana ou amido	60
Tabela 3.9 Viabilidade dos probióticos na dispersão filmogênica antes da secagem para as diferentes formulações.	60

SUMÁRIO

RESUMO	5
ABSTRACT	6
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	9
Capítulo 1 – Introdução	12
1.1 Revisão bibliográfica	14
1.1.1 <i>Snacks</i> saudáveis	14
1.1.2 Probióticos	15
1.1.3 Filmes comestíveis e fitas de frutas	19
1.1.4 Amido	21
1.1.5 Celulose bacteriana	23
1.1.6 Banana	25
1.1.7 Plastificantes e prebióticos	26
1.2 Objetivos	26
Capítulo 2 – Materiais e Métodos	27
2.1 Preparo e caracterização do pó de celulose bacteriana (CB)	27
2.2 Preparo das cepas probióticas	27
2.3 Formulação das fitas probióticas	28
2.3.1 Preparo da polpa de banana	28
2.3.2 Produção e teor de FOS do xarope de yacon	29
2.3.3 Preparo da suspensão de CB	29
2.3.4 Preparo da solução de amido de mandioca	29
2.3.5 Preparo das formulações de fitas probióticas	30
2.4 Caracterização das fitas de banana	31
2.4.1 Determinação da umidade	31
2.4.2 Determinação da espessura	31
2.4.3 Propriedades mecânicas e força de cisalhamento	31
2.4.4 Opacidade	33
2.4.5 Análise colorimétrica	33
2.4.6 pH	33
2.4.7 Difração de raios X	33
2.4.8 Espectroscopia FTIR	34
2.4.9 Microscopia eletrônica de varredura	34
2.4.10 Avaliação da viabilidade dos probióticos após processo de secagem e durante estocagem das fitas	34
2.5 Avaliação da viabilidade de <i>B. coagulans</i> em fitas comestíveis de banana durante passagem simulada pelo TGI	35
2.6 Análise estatística	37
Capítulo 3 – Resultados e Discussão	37
3.1 Rendimento e umidade da polpa de banana	37
3.2 Teor de FOS do xarope de yacon	37

3.3	Caracterização das fitas de banana	38
3.3.1	Umidade e espessura	38
3.3.2	Ensaio de tração	39
3.3.3	Força de cisalhamento	43
3.3.4	Opacidade	45
3.3.5	Análise colorimétrica	46
3.3.6	pH	48
3.3.7	Difração de raios-X	49
3.3.8	Espectroscopia FTIR	51
3.3.9	Microscopia eletrônica de varredura	54
3.3.10	Avaliação da viabilidade dos probióticos após processo de secagem e durante estocagem das fitas	56
3.3.11	Avaliação da viabilidade de <i>B. coagulans</i> em fitas comestíveis de banana durante passagem simulada pelo TGI	60
	Capítulo 4 – Conclusões	63
	Referências	65
	Apêndice A – Testes Preliminares	75

Capítulo 1 – Introdução

A banana é a fruta mais consumida no Brasil e a segunda fruta mais consumida no mundo (CNA, 2015; G1, 2017), por ser uma fruta bastante apreciada, de baixo custo e com bons valores nutricionais. A produção de bananas no Brasil é de cerca de 7 milhões de toneladas por ano (FAO, 2018), porém, dessa quantidade produzida, cerca de 50% é perdida. Uma fração dessa perda são frutos com adiantado grau de maturação que não são adequados à comercialização e são descartados, no entanto, suas polpas poderiam ser aproveitadas como matéria-prima para produtos industrializados, por exemplo (MARTELLI; BARROS; ASSIS, 2014). As bananas são consumidas principalmente frescas no Brasil, mas também podem ser encontradas como doces e geleias, banana-passa, chips de banana, entre outros (SEBRAE, 2010).

Outra área de pesquisa que já utiliza polpa de banana é a de filmes comestíveis (MARTELLI et al., 2013; PINZON; GARCIA; VILLA, 2018; SOTHORNVIT; PITAK, 2007). Filmes comestíveis geralmente são feitos sem sabor e são utilizados tradicionalmente como auxiliares de embalagem externa. Quando se adiciona polpa de frutas a esses filmes, eles se tornam mais atraentes sensorialmente e mais ricos nutricionalmente. Esses filmes podem ser usados não apenas como adjuvantes de embalagem, mas também em outras aplicações, até mesmo como *snacks* (OTONI et al., 2017), como as fitas de frutas.

Fitas de frutas (em inglês, *fruit leathers*, devido à textura que lembra couro) são semelhantes aos filmes comestíveis, porém são feitos necessariamente para serem consumidos como sobremesa ou *snacks*, e são feitos com uma espessura maior, definidas como uma mistura desidratada de polpa de frutas com outros ingredientes ou aditivos. São *snacks* interessantes pois apresentam geralmente baixo teor calórico e de lipídeos, além de alto teor de fibra alimentar, e são uma forma conveniente de consumir frutas e um modo efetivo de conservá-las (DIAMANTE; BAI; BUSCH, 2014). Esse tipo de produto é relativamente comum no mercado de alguns países e é atualmente uma novidade no mercado brasileiro, onde podem ser encontrados como “rolinhos de frutas” ou “tirinhas de frutas” (DROETKER, 2020; SÓ SNACKS, 2020). Com o aumento na demanda por *snacks*

considerados saudáveis, é um produto com alto potencial no mercado (DIAMANTE; BAI; BUSCH, 2014).

Outro tipo de produto com alto potencial no mercado são os alimentos probióticos. Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidade adequadas, conferem algum benefício à saúde (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). A grande maioria dos alimentos probióticos presentes no mercado são lácteos, como por exemplo leites fermentados e iogurtes. Porém, aproximadamente 65% da população mundial apresenta alguma intolerância à lactose após a infância (NIH, 2020), além do aumento do percentual de pessoas com restrições ao consumo de alimentos de origem animal (RANGEL, 2016). Como opção não-láctea, geralmente encontram-se suplementos probióticos em forma de cápsulas. No entanto, o mercado de alimentos probióticos foi mais de 10 vezes maior que o de suplementos probióticos em 2015 (FELDMAN et al., 2015), indicando que a maior parte da população prefere consumir probióticos na forma de alimentos que na forma de suplementos. Com o aumento na demanda por alimentos com apelo de saudabilidade, aliado à crescente quantidade de pessoas com restrições ao consumo de laticínios e mesmo a produtos de origem animal de forma geral, cresce a necessidade de introduzir no mercado alimentos probióticos não-lácteos (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

Um fator que pode influenciar a viabilidade dos probióticos nos alimentos é o tipo de bactéria utilizada. Os microrganismos probióticos mais comumente utilizados são as bactérias da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium* (NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018). Apesar de serem bactérias muito bem conhecidas e estudadas, elas não são esporogênicas e, portanto, costumam ser menos resistentes ao processamento dos alimentos (especialmente a tratamentos térmicos), à estocagem de alimentos em temperatura ambiente e também às condições hostis do trato gastrointestinal (TGI) humano (especialmente ao baixo pH do estômago) (CAI et al., 2014; MU et al., 2018), que são alguns dos grandes desafios para a produção de alimentos probióticos. Por outro lado, algumas bactérias do gênero *Bacillus*, como *Bacillus coagulans*, são probióticos menos comuns e menos estudados, mas têm atraído bastante atenção de pesquisadores e produtores de alimentos. Por serem esporogênicas, são mais resistentes ao processamento e à estocagem dos alimentos em temperatura ambiente, e

também já é relatado na literatura que são resistentes à alta acidez do estômago e a altas concentrações de sais biliares do duodeno (ELSHAGHABEE et al., 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018).

Outro fator que precisa ser estudado é o tipo de matriz utilizada para a produção de filmes e fitas, especialmente quando utilizados como carreadores de probióticos. O amido é uma matriz polissacarídica bastante comum em formulações de filmes, por ser um material abundante, de baixo custo e de fácil obtenção (LIU, 2005; PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017). No entanto, o amido é um polissacarídeo digerível (VOET; VOET; PRATT, 2014), e, por isso, espera-se que não seja uma boa matriz para proteção de bactérias probióticas durante a passagem pelo TGI. Por outro lado, a celulose bacteriana (CB), que, apesar de ter (como o amido) glicose como monômero, tem propriedades estruturais e funcionais bastante diferentes, é uma matriz polissacarídica menos comumente utilizada, mas que tem se mostrado um material promissor para aplicações em alimentos e filmes comestíveis, já que é um polissacarídeo não-digerível e, portanto, uma fibra alimentar (AZEREDO et al., 2019). A princípio, por não ser digerível, a CB parece promissora como matriz de filmes probióticos, pois mantém sua estrutura intacta ao longo do TGI, podendo proteger os probióticos durante a passagem pelo estômago. Porém, ainda são poucos os estudos que avaliam a CB como matriz alimentar carreadora de probióticos e sua capacidade de proteger as bactérias probióticas durante a passagem pelos estômago e duodeno e de liberar as bactérias viáveis no intestino.

1.1 Revisão bibliográfica

1.1.1 Snacks saudáveis

Snacks (ou petiscos) são pequenas porções de alimentos, sem necessidade de preparo (portanto bastante convenientes), geralmente consumidos entre as refeições principais (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). *Snacks* saudáveis representam um encontro entre a conveniência dos *snacks* e o apelo de saudabilidade. O mercado global de *snacks* saudáveis foi de aproximadamente 23 bilhões de dólares em 2018 e espera-se que ultrapasse 32 bilhões de dólares até 2025 (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). Existe uma crescente preocupação dos consumidores em consumir alimentos considerados saudáveis,

de baixo teor calórico, com maior quantidade de fibras e vitaminas e menor quantidade de gordura, açúcar e sódio (GRAND VIEW RESEARCH, 2019; MINTEL, 2018). Além disso, o estilo cada vez mais agitado dos consumidores implicam em uma crescente necessidade de *snacks on-the-go* (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). Segundo a Mintel News, “97% dos brasileiros entrevistados em janeiro de 2017 afirmaram que comeram *snacks*/lanchinhos no último mês e 21% dos consumidores afirmam estar comendo mais *snacks* em relação a 2016” (MINTEL, 2018). Também existe um aumento no número de pessoas que acreditam que se alimentar de forma saudável significa consumir menores porções de alimentos mais vezes ao dia (MINTEL, 2018). Assim, existe uma crescente demanda por *snacks* saudáveis e cada vez mais indústrias estão procurando inovar e lançar novos produtos desse tipo no mercado.

1.1.2 Probióticos

Com o aumento da preocupação da população por uma alimentação saudável, outra tendência são os alimentos funcionais, que são enriquecidos com componentes que conferem benefícios à saúde, como vitaminas, fibras, prebióticos ou probióticos (MIN et al., 2019). É esperado que o mercado global de probióticos alcance 64 bilhões de dólares até 2022, com um crescimento médio de 7% ao ano, e o Brasil é o país em que este mercado mais está crescendo no mundo, segundo pesquisa da Ganeden (GANEDEN, 2020). Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Estudos sugerem que microrganismos probióticos são capazes de exercer funções importantes para funcionamento apropriado do intestino (NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018). Baseado em diversos estudos encontrados na literatura, muitos dos quais incluem testes clínicos, existe um consenso de que alguns efeitos benéficos podem ser atribuídos aos probióticos como uma classe geral. Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos benéficos ainda não são completamente entendidos, mas segundo Hill *et al.* (2014), eles podem ser difundidos, frequentes ou raros: os primeiros são difundidos entre os gêneros probióticos comumente estudados, como a regulação do trânsito intestinal, produção de ácido e de ácidos graxos de cadeia curta, exclusão competitiva de patógenos, normalização da microbiota e aumento da

rotatividade de enterócitos; os frequentes são frequentemente observados entre a maioria das cepas de uma espécie probiótica, como síntese de vitaminas, antagonismo direto, reforço da barreira intestinal, metabolismo da bile, atividade enzimática e neutralização de agentes cancerígenos; e os raros estão presentes apenas em cepas específicas, entre eles estão os efeitos imunológicos, neurológicos, endocrinológicos e produção de bioativos específicos (HILL et al., 2014; KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Existem até mesmo alguns estudos que relacionam o consumo de probióticos com a profilaxia e tratamento da Covid-19, já que há um grande indicativo que a microbiota intestinal tem influência na infecção e que probióticos podem reduzir a gravidade e duração de infecções respiratórias (WALTON; GIBSON; HUNTER, 2020).

A maioria dos alimentos probióticos disponíveis no mercado são alimentos fermentados lácteos, como iogurtes, kefir e leites acidófilos (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018). Porém, estes produtos apresentam algumas limitações. Além de necessitarem de refrigeração e terem pouco tempo de vida de prateleira, muitas pessoas têm restrições ao consumo de laticínios, por motivos variáveis (intolerância à lactose, alergia à proteína do leite, restrição devido ao alto teor de gordura saturada ou restrições ao consumo de alimentos de origem animal) (LALICIC-PETRONJEVIC et al., 2015). A taxa de intolerantes à lactose varia em diferentes continentes e etnias (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015), mas estima-se que cerca de 65% da população mundial apresenta algum tipo de intolerância à lactose (NIH, 2020). Por isso, e com o aumento na demanda por alimentos probióticos e veganos, a demanda por alimentos probióticos não-lácteos no mercado tem aumentado (LALICIC-PETRONJEVIC et al., 2015).

Entretanto, é necessário superar alguns desafios quando se trata de produção de alimentos probióticos, especialmente alimentos não-lácteos. É importante assegurar que um número apropriado de células probióticas sobreviva durante o processamento e durante todo o tempo de vida de prateleira do produto. As condições da produção dos alimentos podem reduzir significativamente a viabilidade de bactérias probióticas devido ao calor e a danos mecânicos, assim como a estocagem sem refrigeração (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018). Quando se

trata de produção de alimentos probióticos desidratados, que fornece uma vida de prateleira maior do que alimentos com alta atividade de água, outro obstáculo é a perda de viabilidade devido à baixa atividade de água, à exposição a altas temperaturas e ao processo de desidratação (JANKOVIC et al., 2010). Além disso, as condições de armazenamento também são importantes: quando não é necessária refrigeração, a viabilidade das bactérias ao longo do tempo pode ser prejudicada (SHU et al., 2018).

Outro desafio é garantir que as bactérias sobrevivam em número suficiente durante a passagem pelo TGI para garantir que cheguem no seu local de ação e exerçam seus benefícios à saúde (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018). A primeira barreira a ser superada é a passagem pela boca, etapa que dura de alguns segundos a 2 min, onde a saliva inicia a digestão dos carboidratos, o que afeta a estrutura da matriz alimentar (MINEKUS et al., 2014; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; YAO et al., 2020). A segunda e principal barreira é a passagem pelo estômago, que apresenta alta acidez com pH entre 1,5 e 3, além da alta atividade enzimática (MINEKUS et al., 2014; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; YAO et al., 2020). O alimento permanece no estômago por aproximadamente 2 h. A terceira barreira é a passagem pelo duodeno, que tem pH entre 7 e 8 e alta quantidade de enzimas (NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; VANDEPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). Um fator importante que afeta a sobrevivência dos microrganismos no duodeno é a alta concentração de sais biliares, que tem efeito bactericida. O alimento e as bactérias, então, passarão pelos estágios do TGI até chegarem no epitélio do cólon, onde geralmente os probióticos colonizam temporariamente (NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; YAO et al., 2020). Os alimentos lácteos têm capacidade tamponante, que estabiliza a matriz alimentar e ajuda durante a passagem pelo estômago. Além disso, o leite apresenta alta quantidade de proteínas e lipídeos, que agem como uma matriz protetora para os probióticos, o que auxilia na sua sobrevivência ao longo da passagem pelo estômago e duodeno (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; RITTER; KOHLER; AH, 2009).

Quando se trata de produção de alimentos probióticos não-lácteos, um fator muito importante que deve ser considerado é a matriz alimentar que será utilizada, a fim de que

ela ajude a proteger o probiótico durante sua passagem pelo TGI. Um método que está sendo utilizado por grupos de pesquisas é a microencapsulação de probióticos. O método mais popular de microencapsulação utiliza matrizes polissacarídicas, como, por exemplo, o alginato (NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018; YAO et al., 2020). Alimentos baseados em frutas e hortaliças, cereais e soja também vêm ganhando importância. Frutas apresentam várias vantagens, pois são ricas em nutrientes e açúcares que auxiliam no crescimento dos probióticos, além de terem apelo sensorial e de saudabilidade (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018).

Outro fator muito importante quando se produz alimentos probióticos é o tipo de cepa de bactérias a ser utilizada. As bactérias probióticas mais comumente utilizadas em alimentos e mais estudadas são da família *Lactobacillaceae* e do gênero *Bifidobacterium*. (ELSHAGHABEE et al., 2017).

Recentemente, o então chamado gênero *Lactobacillus* teve sua taxonomia alterada. O gênero havia sido proposto em 1901 por Beijerinck e contava com 261 espécies que diferenciavam muito entre si em aspectos genotípicos, fenotípicos e ecológicos. Por isso, em março de 2020, Zheng *et al.* (2020) propuseram uma nova organização taxonômica dessas espécies, a fim de manter agrupadas espécies que tenham mais afinidade entre si. O gênero *Lactobacillus* foi então dividido em 25 gêneros: *Lactobacillus*, *Paralactobacillus* e 23 outros novos gêneros. Bactérias probióticas importantes e comuns tiveram sua taxonomia alterada, como *Lactobacillus casei*, que teve sua nomenclatura alterada para *Lacticaseibacillus casei* (LIMA; CASTRO, 2021; ZHENG et al., 2020).

Lactobacillus acidophilus, uma das espécies que não teve sua taxonomia alterada, está entre os probióticos comercializados mais comuns e mais conhecidos, disponíveis em diversos alimentos, comercializados desde a década de 1970 (MU et al., 2018; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001). São bactérias ácido lácticas, Gram-positivas, aerotolerantes ou anaeróbicas e não-esporogênicas, com temperatura ótima de crescimento entre 37 e 41 °C (GOMES; MALCATA, 1999). Apresenta diversos benefícios à saúde: apresenta atividade antimicrobiana, ajudando na proteção contra patógenos; ajuda na redução dos níveis de colesterol, no metabolismo de lactose e a prevenir e melhorar diarreia; melhora os sintomas da síndrome do intestino irritável; apresenta propriedades anticarcinogênicas; ajuda na

estimulação do sistema imunológico; entre outros (GOMES; MALCATA, 1999; SANDERS; KLAENHAMMER, 2001). Porém, por não formarem esporos, essas bactérias são menos resistentes a processamentos mecânicos, altas temperaturas e condições adversas de armazenamento e são bastante suscetíveis às condições hostis do TGI (CAI et al., 2014; MU et al., 2018).

Por outro lado, *Bacillus coagulans* são probióticos menos comuns e menos estudados, porém têm ganhado bastante atenção de cientistas e produtores de alimentos. São bactérias Gram-positivas, anaeróbicas facultativas, produtoras de ácido lático e esporogênicas, com temperatura ótima de crescimento entre 35 a 50 °C. Embora menos estudadas, muitos produtos alimentares contendo *B. coagulans* estão sendo comercializados em vários países (KONURAY; ERGINKAYA, 2018). Considerada segura pelas agências reguladoras, seus benefícios à saúde, segundo estudos, incluem diminuir e controlar os sintomas da síndrome do intestino irritável, redução de diarreia associada à estreptomicina, exercer atividade antimicrobiana contra patógenos, ajudar na digestão de proteínas e carboidratos, exercer propriedades anti-inflamatórias e imunomoduladoras, entre outros (JÄGER et al., 2018; JENSEN et al., 2017). Por serem formadoras de esporos, é reportado na literatura que várias cepas de *B. coagulans* são mais resistentes a altas temperaturas e estresses mecânicos e também à acidez do estômago e a altas concentrações de sais biliares, além de não necessitarem de refrigeração para seu armazenamento, o que faz com que estas bactérias sejam muito interessantes para inserção em alimentos (ELSHAGHABEE et al., 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018).

1.1.3 Filmes comestíveis e fitas de frutas

Um exemplo de alimento probiótico não-lácteo que está sendo estudado são filmes comestíveis, produzidos à base de biopolímeros, que podem ser proteínas, polissacarídeos, lipídeos ou uma mistura destes, e outros aditivos comestíveis (HAN, 2014). Geralmente, os filmes comestíveis são utilizados como auxiliares de embalagens, atuando como barreira mecânica e química, podendo também conferir alguma propriedade funcional, como atividades antioxidantes ou antimicrobianas. Filmes comestíveis com polpas de frutas são uma evolução do conceito de filmes comestíveis, trazendo a estes também um apelo sensorial. Diversos tipos de filmes comestíveis com polpa de frutas foram estudados e

podem ser encontrados na literatura (OTONI et al., 2017), como filmes de pectina, polpa de mamão e nanoemulsões de cinamaldeído (OTONI et al., 2014), filmes à base de manga reforçados com nanofibras de celulose (AZEREDO et al., 2009), filmes de celulose bacteriana e pectina contendo polpa de manga ou goiaba (VIANA et al., 2018), filmes de polpa de maçã com alginato (KADZIŃSKA et al., 2020) e filmes de polpa de banana com nanopartículas de quitosana e pectina (MARTELLI et al., 2013).

Quando se adiciona compostos funcionais (tais como probióticos) a esses filmes, eles se tornam também filmes bioativos (no sentido de favorecer a saúde do consumidor). Diversos filmes comestíveis contendo probióticos estão sendo estudados. Porém, ainda são poucos trabalhos que estudam e reportam a capacidade dos filmes de protegerem as bactérias na passagem pelo TGI. Alguns exemplos de filmes comestíveis como carreadores para probióticos são filmes de pululano e amido com *L. plantarum*, *L. reuteri* ou *L. acidophilus* (KANMANI; LIM, 2013), filmes de carboximetilcelulose como veículos de *L. acidophilus*, *L. casei*, *L. rhamnosus* ou *Bifidobacterium bifidum* (EBRAHIMI et al., 2018), filmes de gelatina como carreadores de *L. acidophilus* e *B. bifidum* (LÓPEZ DE LACEY et al., 2012), filmes de proteína do soro do leite como veículos para *B. animalis* e *L. casei* (PEREIRA et al., 2016) e filmes de metilcelulose com *L. delbrueckii* e *L. plantarum* (ROMANO et al., 2014).

Fitas de frutas (em inglês, *fruit leathers*, *fruit ribbons* ou *fruit roll-ups*) são semelhantes a filmes comestíveis com polpa de frutas, mas são produzidos propriamente para serem consumidos como *snack* ou sobremesa e geralmente possuem uma espessura maior. Esse tipo de produto foi lançado como *snacks* saudáveis de fruta na América do Norte na década de 1980, pela General Mills®, e ganhou bastante popularidade em alguns países (SNACK HISTORY, 2020). São definidos como folhas flexíveis desidratadas feitas de polpa de frutas e outros ingredientes ou aditivos, e são uma forma conveniente de consumir frutas, além de serem uma forma eficiente de conservá-las, por serem desidratadas (DIAMANTE; BAI; BUSCH, 2014). As fitas de frutas podem ser consideradas *snacks* saudáveis por conter baixo teor de gordura, alto teor de fibra alimentar e por conter os compostos funcionais das frutas (como pigmentos antioxidantes) (DIAMANTE; BAI; BUSCH, 2014). Este tipo de produto é comum no mercado de alguns países (SNACK HISTORY, 2020) e é uma novidade no mercado brasileiro. No Brasil, fitas

de frutas podem ser encontrados como “Rolinhas de frutas” (da marca SóSnacks[®]) (SÓ SNACKS, 2020) ou “Tirinhas de frutas” (da marca DrOetker[®]) (DROETKER, 2020), produtos lançados recentemente no mercado. Esse tipo de produto, dentro da linha de *snacks* saudáveis e veganos, podem ter alto potencial no mercado. Além disso, apesar de não existirem no mercado fitas de frutas probióticas, estas podem ser potenciais carreadores de probióticos, ganhando assim o fator de funcionalidade.

1.1.4 Amido

Uma matriz convencionalmente usada para a produção de filmes comestíveis é o amido, produzido pelas plantas como sua reserva principal de energia e depositado nos cloroplastos das células vegetais, sendo um dos polissacarídeos naturais mais abundantes (LIU, 2005; VOET; VOET; PRATT, 2014). É composto por uma mistura de α -amilose (Figura 1.1a), um polímero linear de milhares de resíduos de glicose unidos por ligações glicosídicas $\alpha(1\rightarrow4)$, e amilopectina (Figura 1.1b), que também consiste de resíduos de glicose ligados entre si por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, mas que apresenta pontos de ramificações $\alpha(1\rightarrow6)$ a cada 24 a 30 resíduos (NELSON; COX, 2014; VOET; VOET; PRATT, 2014). A estrutura mais estável para as cadeias ligadas por ligações $\alpha(1\rightarrow4)$ do amido (Figura 1.1c) é uma hélice firmemente enrolada, estabilizada por ligações de hidrogênio e interações de van der Waals entre as cadeias (NELSON; COX, 2014).

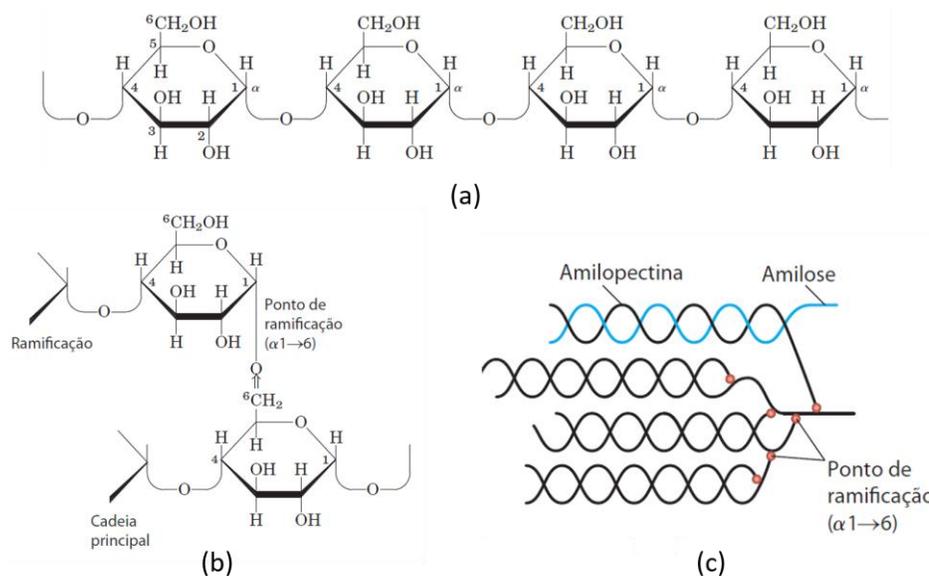


Figura 1.1 Estrutura química de um segmento curto de α -amilose (a) e amilopectina (b) e representação do agrupamento de α -amilose e amilopectina como supostamente ocorre nos grânulos de amido (c).

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2014)

O amido é bastante utilizado para a produção de filmes comestíveis e outros alimentos, graças à sua alta disponibilidade, variedade, capacidade de modificações químicas e físicas, baixo custo e comportamento termoplástico (LIU, 2005; PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017). Além disso, muitos pesquisadores reportaram boas propriedades de formação de filmes de amido de várias fontes diferentes, como milho (CHANG-BRAVO; LÓPEZ-CÓRDOBA; MARTINO, 2014), trigo (BONILLA et al., 2013), mandioca (MALI et al., 2005), arroz (DIAS et al., 2010), batata (TALJA et al., 2007), entre outros. As propriedades físico-químicas de filmes de amido variam dependendo da sua origem, tipo de plastificante usado e das condições de processamento. O amido de mandioca é apreciado por sua baixa temperatura de gelatinização, boa estabilidade de gel, além de ser inodoro, insípido, incolor, não tóxico e biodegradável (PIÑEROS-HERNANDEZ et al., 2017).

O amido é um polissacarídeo digerível. A digestão se inicia na boca, com a amilase presente na saliva, que hidrolisa algumas ligações $\alpha(1\rightarrow4)$, e continua no intestino delgado, onde a amilase pancreática hidrolisa o amido em pequenos oligossacarídeos, a α -glicosidase remove um resíduo de glicose por vez, e uma enzima desramificadora, que hidrolisa tanto ligações $\alpha(1\rightarrow6)$ como $\alpha(1\rightarrow4)$, produz monossacarídeos que são absorvidos pelo intestino (VOET; VOET; PRATT, 2014). Por ser digerível, espera-se que o

amido não seja uma matriz ideal para proteger os probióticos durante a passagem do alimento pelo TGI. Porém, são necessários estudos para verificar sua capacidade como matriz alimentar carreadora de probióticos. Alguns estudos utilizam amido resistente (fração do amido que não é digerido no intestino delgado (SAJILATA; SINGHAL; KULKARNI, 2006)) como agente prebiótico para melhorar a viabilidade dos microrganismos no alimento (DONTHIDI; TESTER; AIDOO, 2010; HOMAYOUNI et al., 2008). Outros estudos utilizam o amido com outras matrizes, como é o caso do trabalho de Dafe *et al.* (2017), que produziram hidrogéis de pectina e amido como carreadores de probióticos, e Martin *et al.* (2013), que obtiveram melhores resultados quando adicionaram amido à microencapsulação de probióticos com alginato, comparados com os resultados obtidos pela microencapsulação utilizando apenas alginato. Kanmani e Lim (2013) compararam a viabilidade de probióticos em filmes de amido, pululano, e pululano com amido. Entretanto, a maioria dos trabalhos que estudam matrizes como veículos para probióticos não estudam a viabilidade dos probióticos durante a passagem simulada pelo TGI.

1.1.5 Celulose bacteriana

Uma matriz que vem ganhando a atenção de pesquisadores para a fabricação de alimentos e filmes comestíveis é a CB. Celulose, apesar de ter o mesmo monômero que o amido (glicose), tem propriedades estruturais e físicas muito diferentes (NELSON; COX, 2014). A celulose é um polímero linear de resíduos de D-glicose ligados entre si por ligações glicosídicas $\beta(1\rightarrow4)$. A ligações do tipo $\beta(1\rightarrow4)$ fazem com que a conformação mais estável para a cadeia de celulose seja aquela na qual cada plano do anel gire 180° em relação aos anéis vizinhos, o que gera uma cadeia reta e estendida (Figura 1.2a) (NELSON; COX, 2014). Isso faz com que os grupos hidroxilas (-OH) da cadeia de celulose fiquem disponíveis para fazer ligações de hidrogênio com cadeias paralelas (Figura 1.2b), formando folhas com ligações de hidrogênio intercadeias (NELSON; COX, 2014; VOET; VOET; PRATT, 2014). Pilhas dessas folhas são unidas por ligações de hidrogênio e interações de van der Waals, o que confere às fibras de celulose alta resistência mecânica e torna-as insolúveis em água, apesar de seu caráter hidrofílico (VOET; VOET; PRATT, 2014). Por isso, a celulose é um material muito interessante para a aplicação em diversos

tipos de materiais. A celulose é o principal componente estrutural da parede celular das plantas (celulose vegetal) (VOET; VOET; PRATT, 2014) ou pode ser produzida por alguns gêneros de bactérias (celulose bacteriana).

A CB é produzida extracelularmente por alguns gêneros de bactérias Gram-negativas, como *Komagataeibacter* (antiga *Gluconacetobacter*), o gênero mais frequentemente escolhido por pesquisadores por ser o produtor mais eficiente (PICHETH et al., 2017). A síntese da CB ocorre primeiramente dentro das células, onde as bactérias produzem as cadeias de CB, e, em seguida, as cadeias são excretadas das células e se agrupam e cristalizam. As principais explicações para a síntese de CB são para mecanismos de autodefesa, como proteção à luz UV ou para ajudar a bactéria a flutuar na interface ar-líquido (AZEREDO et al., 2019; REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017). A principal vantagem em utilizar CB em vez de celulose vegetal é que a CB é produzida livre de lignina, hemicelulose e pectina e, por isso, a purificação da CB é um processo mais fácil e que não requer a utilização de agentes químicos agressivos, como é o caso da celulose vegetal. Além disso, a CB possui cadeias mais curtas, maior área de superfície, propriedades mecânicas superiores, alto teor de umidade e é biocompatível (PICHETH et al., 2017; REINIATI; HRYMAK; MARGARITIS, 2017). A CB é amplamente utilizada na área de biomedicina, mas sua utilização em alimentos vem crescendo, como por exemplo, na nata-de-coco (AZEREDO et al., 2019), um produto tradicional das Filipinas que consiste em cubos de CB embebidas em xarope açucarado.

A celulose é um polissacarídeo não-digerível pelos humanos, o que faz com que a CB seja uma matriz alimentar interessante, já que é uma fibra alimentar (AZEREDO et al., 2019). Por não ser digerível, a CB pode ter potencial como carreadora de probióticos, ajudando a protegê-los durante a passagem pelo TGI, porém, são necessários estudos para entender se a CB liberaria as bactérias probióticas no intestino. Fijałkowski *et al.* (2016) relataram que CB são bons imobilizadores para cepas de *Lactobacillus* spp., conseguindo protegê-las de sucos gástricos e sais biliares. Foram testadas duas técnicas: uma por impregnação, em que as membranas de CB foram impregnadas com as bactérias probióticas, e a outra adicionando as bactérias probióticas no meio de cultura para a produção de CB. O segundo método se mostrou mais eficaz. Khorasani e Shojaosadati (2016) produziram bionanocompósitos de pectina e nanocelulose bacteriana como matriz

protetora de *Bacillus coagulans* e relataram que a matriz conseguiu proteger as bactérias contra sucos gastrointestinais. Tilak *et al.* (2020) testaram nanofibras de CB como imobilizadores de *L. acidophilus* e relataram que as bactérias tiveram uma alta taxa de sobrevivência durante o armazenamento. Da mesma forma, Oliveira-Alcântara *et al.* (2020) produziram filmes de CB/goma de caju como carreadores de *Bacillus coagulans* e relataram que os probióticos foram estáveis durante armazenamento a 4 °C e 20 °C. No entanto, os últimos dois estudos não estudaram a capacidade das matrizes em proteger os probióticos no TGI e sua liberação no intestino. Assim, estudos nesse sentido ainda são necessários.

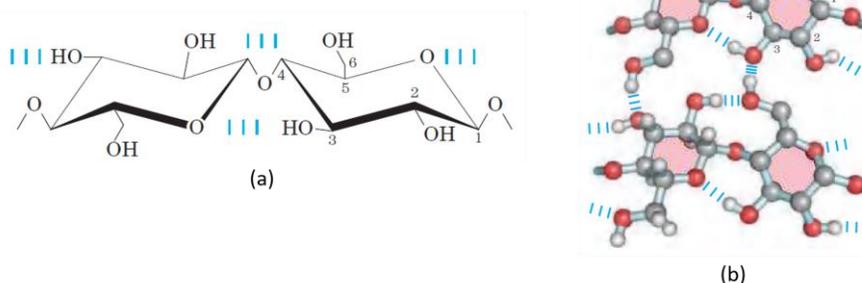


Figura 1.2 Estrutura química de um segmento de celulose com duas unidades de resíduos de D-glicose ligados por ligação $\beta(1\rightarrow4)$ (a) e representação de segmentos de duas cadeias de celulose paralelas, mostrando a conformação dos resíduos de D-glicose e as ligações de hidrogênio formando ligações cruzadas (b).

Fonte: Adaptado de (NELSON; COX, 2014)

1.1.6 Banana

A banana é uma fruta de alto apelo sensorial. É a fruta mais consumida no Brasil e a segunda mais consumida no mundo (CNA, 2015; G1, 2017). Além de baixo custo de produção, tem alto valor nutricional, sendo rica em fibras, potássio, vitaminas e diversos antioxidantes e fitonutrientes (HEALTH LINE, 2020).

O Brasil é o quarto maior produtor mundial de bananas, produzindo cerca de 6,7 milhões de toneladas de banana por ano (FAO, 2018). Porém, em torno de 50% do volume produzido é perdido. Parte dessa perda são frutos em adiantado estado de maturação, não apropriados à comercialização, que normalmente são descartados. No entanto, suas polpas

poderiam ser aproveitadas como matéria-prima para produtos industrializados (MARTELLI et al., 2013), como por exemplo, para a produção de fitas de frutas.

A banana também é rica em açúcares, podendo ser uma boa matriz carreadora de probióticos (KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015). Por isso, a utilização de polpa de banana para a produção de fitas de frutas probióticas pode ser uma forma efetiva de conservá-las e evitar desperdícios.

1.1.7 Plastificantes e prebióticos

Para a produção de filmes e fitas, a adição de plastificantes é muito importante. Plastificantes são compostos de baixa massa molecular, de natureza química semelhante à matriz polimérica, capaz de diminuir as interações entre as cadeias, aumentando sua mobilidade e, assim, aumentando a flexibilidade dos filmes ou fitas (HAQ; HASNAIN; AZAM, 2014; LAOHAKUNJIT; NOOMHORM, 2004). Yacon é uma raiz tuberosa considerada um alimento funcional (DELGADO et al., 2013). Sua matéria seca é composta principalmente por fruto-oligossacarídeos (FOS), entre 40 a 70%, além de conter açúcares simples, como sacarose, frutose e glicose (OJANSIVU; FERREIRA; SALMINEN, 2011). Assim, xarope de yacon pode ser utilizado como plastificante em filmes com matrizes polares, além de ter a capacidade de funcionar como um adoçante natural (DELGADO et al., 2013). Além disso, os FOS, pequenos polímeros de frutose, são comumente usados como prebióticos (substratos seletivamente utilizados por microrganismos do hospedeiro que conferem algum benefício à saúde), conhecidos principalmente por causa de seus efeitos para enriquecimento de probióticos, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (GIBSON et al., 2017).

1.2 Objetivos

O objetivo geral do presente estudo é desenvolver uma fita comestível de banana probiótica.

Os objetivos específicos são:

- Caracterizar e comparar as diferentes formulações de fitas de banana em termos de suas propriedades físicas e químicas;
- Estudar e comparar a viabilidade das bactérias probióticas esporogênicas ou não-esporogênicas após o processo de secagem e sua estabilidade durante a estocagem do produto;
- Estudar o impacto da digestibilidade da matriz sobre a viabilidade dos probióticos durante a passagem simulada pelo TGI;
- Estudar a viabilidade das bactérias probióticas durante a passagem simulada pelo TGI e sua liberação no intestino.

Capítulo 2 – Materiais e Métodos

2.1 Preparo e caracterização do pó de celulose bacteriana (CB)

Membranas de CB purificadas e secas foram cedidas gentilmente pelo Grupo Empresarial Seven (Londrina, PR). Para uso da CB em forma de pó (para formulação da dispersão), as membranas secas foram cortadas e trituradas utilizando-se um moinho de facas A11 (IKA) e moídas a pó em um moinho de alta rotação CT-241 (Servitech). Para isso, 30 g de CB triturada foram adicionados em jarro de cerâmica de 500 mL com 50% de seu volume preenchido de esferas de porcelana e colocados no moinho CT-241 por 20 min em rotação de 380 rpm.

O pó de CB foi caracterizado por difração de raios-X (DRX) em intervalo angular (em 2θ) de 3 a 50° com velocidade de varredura de $0,5^\circ \text{ min}^{-1}$, utilizando um difratômetro de raios X XRD-6000 (Shimadzu).

2.2 Preparo das cepas probióticas

Para obter a cepa probiótica esporogênica, foram utilizados esporos liofilizados de *Bacillus coagulans* BC4 50 MLD (lote C235515A) padronizado com maltodextrina e contendo cerca de 10^{11} unidades formadoras de colônia (UFC) g^{-1} , fornecida pela Sacco

(Cadorago, Itália), que foram adicionados diretamente às dispersões das fitas de banana (MARCIAL-COBA et al., 2019).

Da mesma forma, para obter a cepa probiótica não-esporogênica, foi utilizada uma cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* LA-3 (lote C236623A) contendo cerca de 10^{11} UFC g⁻¹, fornecida pela Sacco (Cadorago, Itália). A cultura liofilizada foi adicionada diretamente às dispersões filmogênicas ou, em outros testes, foi feita sua ativação. A ativação foi feita da seguinte forma: a cultura liofilizada (0,5 g) foi adicionada em 5 mL de caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharpe) e incubada a 37 °C por 24 h. Após 24 h, 2,5 mL da cultura foi inoculada em 25 mL de caldo MRS e a cultura foi incubada novamente a 37 °C por 24 h. Então, a cultura foi centrifugada por 15 min a 3000 g e o sobrenadante foi descartado. O pellet foi ressuscitado em 25 mL de água destilada previamente esterilizada para lavagem, e foi feita uma nova centrifugação por 15 min a 3000 g. A lavagem foi repetida duas vezes. Por fim, o pellet foi ressuscitado novamente em 25 mL de água destilada esterilizada. Então, a cultura foi adicionada à dispersão filmogênica.

2.3 Formulação das fitas probióticas

As fitas foram formuladas a partir de matriz polissacarídica (amido ou CB), polpa de banana, xarope de yacon (plastificante), água destilada e uma quantidade de cultura probiótica.

2.3.1 Preparo da polpa de banana

Bananas da variedade Nanica (*Musa acuminata* 'Dwarf Cavendish') foram adquiridas em um mercado local (São Carlos, SP) e reservadas até atingirem grau de maturação C7, de acordo com a escala de Von Loesecke (GOMES et al., 2013). Então, as bananas foram lavadas com detergente neutro e enxaguadas. Em seguida, foram descascadas, amassadas e cozidas em tacho aberto a cerca de 80 °C até a polpa atingir 60 °Brix. Então, a polpa de banana foi congelada para uso posterior na formulação das fitas. O teor de sólidos totais da polpa de banana cozida foi medido utilizando-se uma balança de infravermelho determinadora de umidade Marte ID50 a 105 °C e a quantidade de sólidos

solúveis (°Brix) foi medido utilizando-se um refratômetro digital (Atago, RX-5000α), em triplicata.

2.3.2 Produção e teor de FOS do xarope de yacon

O xarope de yacon foi produzido na Embrapa Agroindústria Tropical (Fortaleza, CE), e cedido gentilmente pela pesquisadora Ana Paula Dionísio. A quantificação de FOS foi realizada através do método de quantificação de frutanos MA-CQ.172 baseado em AOAC (2012), *Official Method* 999.03, pela mesma pesquisadora.

2.3.3 Preparo da suspensão de CB

Por causa da alta densidade de ligações de hidrogênio entre as cadeias de CB, o pó obtido após trituração de CB não redispersa em água (formando agregados), a menos que seja oxidada (para incorporação de cargas) ou misturada a um polímero carregado. Portanto, para preparar a suspensão de CB, esta foi diluída em água destilada com sal sódico de carboximetilcelulose (CMC) (SIGMA, código 419303) em uma razão de massa de 5:1 (CB/CMC). A proporção foi definida a partir de testes preliminares (Apêndice A).

Para as fitas de CB, 15 g de CB/CMC (12,5 g de CB e 2,5 g de CMC) foram dissolvidos em 375 mL de água destilada utilizando um Ultra Turrax T18 digital (Ika) a 16.000 rpm por 30 min. A suspensão foi então autoclavada a 121 °C por 15 min e, depois de resfriada, foi utilizada para as formulações das fitas.

2.3.4 Preparo da solução de amido de mandioca

Para as fitas de amido, 15 g de amido de mandioca (Siamar[®]) foram adicionados em 375 mL de água destilada e a mistura foi homogeneizada por 5 min utilizando-se um agitador mecânico Eurostar 60 (Ika) a 500 rpm. Então, a mistura foi aquecida em banho-maria, ainda sob agitação, e ao alcançar 85 °C, foi agitada por mais 45 min, para sua gelatinização (BASIAK; LENART; DEBEAUFORT, 2017). Depois de resfriada, a solução foi utilizada para as formulações das fitas.

2.3.5 Preparo das formulações de fitas probióticas

Para todas as diferentes formulações, a proporção a ser utilizada e o método de secagem foram estabelecidos de acordo com os testes preliminares (Apêndice A).

As soluções de amido ou CB/CMC (ambas a 4%, com volume de 375 mL), previamente preparadas, foram misturadas com 150 g de polpa de banana e 5 g de xarope de yacon (plastificante/prebiótico), de acordo com a Tabela 2.1. As misturas foram homogeneizadas por 6 min a 16.000 rpm utilizando-se um Ultra Turrax T18 digital (Ika). Então, foram adicionados 2 g de cultura probiótica liofilizada (*Bacillus coagulans*, para as fitas com probióticos esporogênicos e *Lactobacillus acidophilus*, para as fitas com probióticos não-esporogênicos) para que a dispersão filmogênica tivesse cerca de 8 log UFC mL⁻¹, e as dispersões foram homogeneizadas por mais 5 min manualmente, com o auxílio de um bastão de vidro. Então, todas as dispersões foram desgaseificadas em bomba a vácuo. Para isso, os béqueres contendo as dispersões filmogênicas foram colocados dentro de um dessecador e o dessecador foi conectado à bomba de vácuo de diafragma D-LAB (Edwards) a 800 mbar por 100 min. Logo após, três alíquotas de 1 mL de cada dispersão probiótica foram retiradas e transferidas para 9 mL de água peptonada 0,1% esterilizada para diluições seriadas para a contagem de células viáveis.

Então, as fitas foram obtidas por *casting*: 200g de cada dispersão foram depositados sobre bandejas de 16 cm × 26 cm revestidas com filme de Mylar[®]. Todas as fitas foram secas a 50 °C por 26 h em estufa sem circulação de ar (FANEM A-LT, São Paulo, Brasil).

Para a obtenção das fitas, todos os equipamentos e vidrarias foram pré-aseptizados com álcool 70% ou, quando possível, autoclavagem a 121 °C por 15 min para evitar interferência de contaminantes.

Tabela 2.1 Formulações das fitas de banana

Formulações					
Cont-CB	Cont-AM	Lac-CB	Lac-AM	Bac-CB	Bac-AM
375 mL água destilada	375 mL água destilada	375 mL água destilada	375 mL água destilada	375 mL água destilada	375 mL água destilada
15 g CB/CMC	15 g amido	15 g CB/CMC	15 g amido	15 g CB/CMC	15 g amido
150 g polpa de banana	150 g polpa de banana	150 g polpa de banana	150 g polpa de banana	150 g polpa de banana	150 g polpa de banana
5 g xarope de yacon	5 g xarope de yacon	5 g xarope de yacon	5 g xarope de yacon	5 g xarope de yacon	5 g xarope de yacon
-	-	2 g <i>L. acidophilus</i>	2 g <i>L. acidophilus</i>	2 g <i>B. coagulans</i>	2 g <i>B. coagulans</i>

2.4 Caracterização das fitas de banana

As fitas foram acondicionadas por pelo menos 40 h a 25 °C a 50% de umidade relativa em uma câmara climatizada (Ethick Technology, 420-CLDTS), antes de serem submetidas aos seguintes testes de caracterização.

2.4.1 Determinação da umidade

A umidade das fitas foi determinada utilizando-se uma balança de infravermelho determinadora de umidade Marte ID50 a 105°C, em triplicata, a partir de 1,5 g de fita de banana.

2.4.2 Determinação da espessura

A espessura das fitas foi obtida utilizando-se um medidor de espessura KR1250 (AKROM), com margem de erro de $\pm 1 \mu\text{m}$, em cinco pontos diferentes.

2.4.3 Propriedades mecânicas e força de cisalhamento

As propriedades mecânicas das fitas de banana foram determinadas por meio do ensaio de tração em Texturômetro TA.XT Plus (Stable Micro Systems, Reino Unido). As fitas foram cortadas em tiras de 5 cm \times 1 cm e foi realizado o ensaio padrão de tensão \times deformação, em 10 replicatas, com separação de garras inicial de 30 mm e velocidade de 1

mm s⁻¹ (FARIAS et al., 2012). Como as fitas foram deformadas na região das garras, foi necessário fazer uma chanfradura (*notch*) circular de 1 mm de diâmetro de cada lado no meio da altura da amostra, causando assim um ponto de concentração de tensão. Para cálculo da área da secção transversal dos corpos de prova, a largura considerada foi portanto de 8 mm. Foram calculados a tensão na ruptura (σ_{\max}), alongação na ruptura (ϵ) e o módulo elástico (E), este último sendo calculado como o coeficiente angular da reta inicial (porção linear) da curva de tensão \times deformação.

A análise da força de cisalhamento foi realizada no mesmo texturômetro, utilizando-se uma lâmina *Knife Edge* e base com fenda (HDP/BS, Stable Micro Systems Ltd.), com velocidade de 2 mm s⁻¹ (LIN; HUANG, 2003), a fim de determinar a força necessária para cortar transversalmente cada fragmento, como na Figura 2.1. As fitas foram cortadas em tiras de 7 cm \times 2 cm e o ensaio foi feito em 10 replicatas. O resultado foi expresso como o pico de força, em Newtons (N).

Para comparação da textura das fitas de bananas com produtos semelhantes presentes no mercado, os mesmos ensaios de tração e força de cisalhamento foram feitos também com corpos de prova (nas mesmas dimensões) obtidos de fitas de frutas comerciais, denominados “rolinhos de frutas”, da marca SóSnacks[®]. Os testes foram feitos, em 10 replicatas, para três sabores diferentes do mesmo produto: (a) goiaba e chia (ingredientes: banana, maçã, polpa de goiaba, polpa de acerola, sementes de chia, e biomassa de banana verde); (b) maracujá e goji berry (ingredientes: banana, maçã, abacaxi, polpa de maracujá, polpa de acerola, sementes de goji berry e biomassa de banana verde); e (c) abacaxi e gengibre (ingredientes: banana, maçã, abacaxi, polpa de acerola, gengibre e biomassa de banana verde).

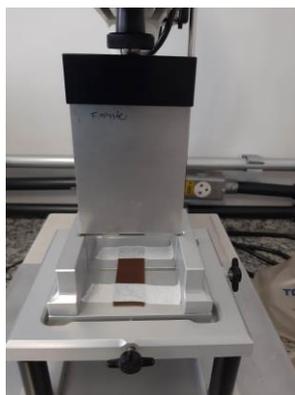


Figura 2.1 Análise de força de cisalhamento no texturômetro.

2.4.4 Opacidade

A opacidade das fitas foi medida utilizando o colorímetro Chroma Meter CR – 410 (Konica Minolta, EUA) como a razão entre a opacidade medida contra um fundo preto e a opacidade medida contra um fundo branco (OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020). Cinco medidas foram feitas para cada amostra e os resultados foram calculados em porcentagem.

2.4.5 Análise colorimétrica

A determinação da cor das fitas foi feita utilizando-se o colorímetro Chroma Meter CR – 410 (Konica Minolta, EUA). As medidas foram feitas em 10 pontos diferentes (5 em cada face da fita), para determinar os valores L^* , a^* e b^* . A cromaticidade (C^*) e o ângulo Hue (h°) foram determinados de acordo com as seguintes equações (DAVID; POLIANA; SPRICIGO, 2020):

$$C^* = \sqrt{(a^*)^2 + (b^*)^2} \quad (\text{Equação 1})$$

$$h^\circ = \tan^{-1}\left(\frac{b^*}{a^*}\right) \quad (\text{Equação 2})$$

2.4.6 pH

O pH das fitas foi medido logo após a secagem. 1 g de cada fita foi dissolvida em 10 mL de água destilada, em triplicata, e o pH foi medido utilizando-se um pHmetro QX 1500 (Qualxtron) (Instituto Adolfo Lutz, 2008). Utilizando-se a mesma metodologia, o pH das fitas foi medido após 180 dias em armazenamento em câmara climática a 25 °C e 50% de umidade relativa.

2.4.7 Difração de raios X

O padrão de difração de raios-X das fitas foi obtido utilizando-se um difratômetro XRD-600 (Shimadzu) de raios-X em intervalo angular (2θ) de 3 a 50° com velocidade de varredura de 0,5° min⁻¹.

2.4.8 Espectroscopia FTIR

Espectros de infravermelho por transformada de Fourier (FTIR) das fitas foram obtidos no espectrômetro Vertex 70 (Bruker) equipado com acessório de reflectância total atenuada (ATR), na faixa de 4000 a 500 cm^{-1} , em 32 scans e resolução espectral de 4 cm^{-1} . Para comparação, os espectros de FTIR das amostras individuais da polpa de banana, do pó de amido de mandioca, do pó de CB, da CMC e do xarope de yacon utilizados nas formulações das fitas também foram obtidos, nas mesmas condições. Para evitar sinais devido à presença de água, a polpa de banana e o xarope de yacon foram liofilizados antes da análise. Para isso, as amostras foram primeiramente congeladas a $-25\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h e liofilizadas em liofilizador Liotop L-101 a $-41\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 72 h.

2.4.9 Microscopia eletrônica de varredura

A avaliação da microestrutura das fitas de banana foi feita por microscopia óptica de varredura (MEV) das superfícies planas e por criofraturas, utilizando-se o microscópio JSM-6510 (JEOL). Para obtenção das criofraturas, segmentos retangulares de fitas de banana foram imersos em nitrogênio líquido e, após congelados, foram fraturados. As amostras foram recobertas com ouro em equipamento Sputter Coater SCD 050 (LEICA), utilizando corrente de 40 mA por 60 s, e as imagens foram feitas com um aumento de 1000 \times para as imagens de superfície e de 500 \times para as imagens das fraturas.

2.4.10 Avaliação da viabilidade dos probióticos após processo de secagem e durante estocagem das fitas

Para avaliar a viabilidade dos probióticos após o processo de desidratação e ao longo da estocagem das fitas, amostras de 0,1 g, em triplicata, foram imersas em 9,9 mL de água peptonada 0,1% esterilizada e incubadas em shaker a 50 rpm a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$, para dissolução das fitas, resultando em uma diluição 10^{-2} (EBRAHIMI et al., 2018; OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020). Então, foram feitas diluições seriadas, até a diluição 10^{-5} , inoculando 1 mL da diluição anterior em 9 mL de água peptonada e homogeneizando em vortex por 10 s. Cada diluição foi inoculada pelo método de gotas (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001), depositando 10 μL em triplicata em placas de Petri

contendo meio TGY (em inglês, *Tryptone Glucose Yeast*) ágar para *B. coagulans* ou ágar MRS para *L. acidophilus*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h para *B. coagulans* ou por 72 h em ambiente anaeróbico para *L. acidophilus* e, então, foi feita a contagem padrão de colônias. A análise foi feita no tempo zero (imediatamente após secagem) e a cada 30 dias aproximadamente por 180 dias, em armazenamento à temperatura ambiente, em câmara climática (Ethick Technology, 420-CLDTS) a 25 °C e 50% de umidade relativa.

A contagem de bactérias na dispersão foi feita na mesma maneira descrita acima, a partir das diluições seriadas (item 2.3.4).

Todos os resultados foram calculados em UFC por grama de massa seca.

2.5 Avaliação da viabilidade de *B. coagulans* em fitas comestíveis de banana durante passagem simulada pelo TGI

Para avaliar o desempenho funcional das fitas de banana e a viabilidade das bactérias durante a passagem pelo TGI e sua posterior liberação no intestino, foi utilizado o protocolo INFOGEST de digestão simulada *in vitro* descrito por Minekus *et al.* (2014), com algumas adaptações. O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Departamento de Ciências dos Alimentos e Nutrição, Unesp, Araraquara, Brasil).

Para a realização do experimento, foram preparados três fluidos digestivos: fluido simulado salivar (FSS), fluido simulado gástrico (FSG) e fluido simulado intestinal (FSI), de acordo com a Tabela 2.2.

Também foram preparadas as seguintes soluções: pepsina, adicionando 1 g de Pepsina (Sigma-Aldrich, P7000) em 10 mL de água destilada; pancreatina, adicionando 0,8 g de Pancreatina (Sigma-Aldrich, P1750) em 10 mL de água destilada; e solução biliar, adicionando 0,7 g de Bile (Sigma-Aldrich, B8631) em 10 mL de água destilada.

Tabela 2.2 Formulações dos fluidos digestivos: fluido simulado salivar (FSS), fluido simulado gástrico (FSG) e fluido simulado intestinal (FSI)

Componentes	FSS (pH 7) Volume da solução estoque (mL)	FSG (pH 3) mL Volume da solução estoque (mL)	FSI (pH 7) mL Volume da solução estoque (mL)
KCl 0,5 M	15,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄ 0,5 M	3,7	0,9	0,8
NaHCO ₃ 1 M	6,8	12,5	42,5
NaCl 2 M	-	11,8	9,6
MgCl ₂ (H ₂ O) ₆ 2 M	0,5	0,4	1,1
(NH ₄) ₂ CO ₃ 0,5 M	0,06	0,5	-
HCl 6 M	0,09	1,3	0,7
Água destilada	373,75	365,7	338,5

Para a simulação da fase oral, 4 mL da solução FSS, 25 µL CaCl₂ 0,3 M e 975 µL de água destilada foram misturados com 0,4 g de fita de banana probiótica. Então, as amostras foram mantidas em banho metabólico tipo Dubnoff (MA 093, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 37 °C por 2 min sob agitação a 180 rpm. Após a incubação, 0,1 mL do fluido foi retirado e adicionado em 0,9 mL de solução salina (0,85% de NaCl) previamente esterilizada, para realização das diluições seriadas (0,1 mL em 0,9 mL) e plaqueamento pelo método de gotas, como descrito no item 2.4.10 para *B. coagulans*.

Para a simulação da fase gástrica, foram adicionados à solução da fase oral 7,5 mL da solução FSG, 1,6 mL de solução de pepsina (Sigma-Aldrich, P7000, 25000 U mL⁻¹), 5 µL de CaCl₂ 0,3 M, 0,2 mL de HCl 1 M e 0,695 mL de água destilada. O pH foi ajustado para 3 com o auxílio de um pHmetro e a mistura foi incubada novamente em banho metabólico a 37 °C por 2 h. Após a incubação, 0,1 mL do fluido foi retirado, adicionado em 0,9 mL de solução salina para realização das diluições seriadas e contagem de bactérias, como na fase oral.

Para a simulação da fase intestinal, foram adicionados à solução da fase gástrica 11 mL da solução FSI, 5 mL de solução de pancreatina (Sigma-Aldrich, P1750, 800 U mL⁻¹), 2,5 mL de solução biliar (Sigma-Aldrich, B8631, 160 mmol L⁻¹), 40 µL de CaCl₂ 0,3 M, 0,15 mL de NaOH 1 M e 1,31 mL de água destilada. A mistura foi incubada novamente em banho metabólico a 37 °C por 2 h. Após a incubação, 0,1 mL do fluido foi retirado, adicionado em 0,9 mL de solução salina para realização das diluições seriadas e contagem de bactérias, como nas fases anteriores.

O experimento foi feito em triplicata (para cada fase) para as formulações Bac-CB e Bac-AM, já que não foi possível manter a viabilidade de *L. acidophilus* nas fitas neste trabalho. Como controle, um experimento branco (sem amostra) foi realizado simultaneamente.

Antes da realização do experimento, as fitas foram produzidas de acordo com o item 2.3.5 e a quantidade inicial de probióticos nas fitas foram estimadas de acordo com o item 2.4.10.

Os resultados foram calculados em UFC g⁻¹ de fita liberadas em cada fase.

2.6 Análise estatística

Os dados quantitativos foram analisados pelo Minitab 19, por meio de análise de variância One-Way (para comparação de todos os tratamentos entre si). Além disso, Anovas de dupla classificação (Two-way Anova) foram usadas para comparação entre grupos de tratamentos: os grupos baseados em matrizes (CB e amido) foram comparados por teste t pareado, e os grupos baseados em probióticos (nenhum, *L. acidophilus* ou *B. coagulans*) foram comparados por testes de Tukey.

Capítulo 3 – Resultados e Discussão

3.1 Rendimento e umidade da polpa de banana

O rendimento da polpa de banana depois de processada foi de aproximadamente 36,7%. O teor umidade da polpa de banana cozida utilizada nas formulações das fitas foi de (35,14 ± 0,37) %.

3.2 Teor de FOS do xarope de yacon

O teor de FOS do xarope de yacon utilizado nas formulações da fita de banana foi de 23,41%. Como foram adicionados 5 g de xarope de yacon a cada 50 g de fita, aproximadamente, o teor de FOS obtido através do xarope é de 2,34% (em relação à massa de fita seca). Segundo as alegações de propriedade funcional aprovadas pela Anvisa, a alegação de que o alimento contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal devido à

presença de FOS (prebiótico) pode ser utilizada desde que a porção forneça no mínimo 2,5 g de FOS. Como o teor de FOS é menor, as fitas de banana produzidas não podem ser consideradas funcionais com função prebiótica devido à presença do xarope de yacon (ANVISA, 2019).

3.3 Caracterização das fitas de banana

A aparência das fitas de banana pode ser observada na Figura 3.1.

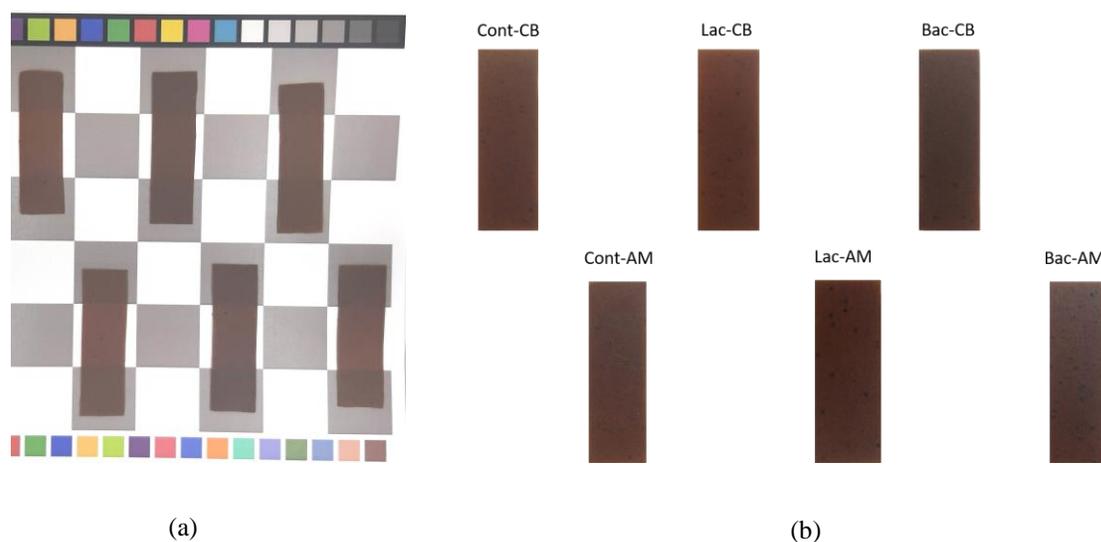


Figura 3.1 Aparência das diferentes formulações de fitas de banana sobre superfície quadriculada (a) e sobre superfície branca (b). De esquerda para direita e de cima para baixo estão: Cont-CB, Lac-CB e Bac-CB e Cont-AM, Lac-AM e Bac-AM.

*Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.1 Umidade e espessura

A umidade e espessura das diferentes formulações de fitas de banana podem ser vistas na Tabela 3.1. A espessura das fitas foi em torno de 800 μm e a umidade aproximadamente 3%.

Tabela 3.1 Resultados de umidade e espessura das diferentes formulações de fitas de banana.

Formulação	Umidade (%)	Espessura (μm)
Cont-CB	3,50 \pm 0,61 ^{ab}	828 \pm 14
Lac-CB	3,77 \pm 0,58 ^{ab}	793 \pm 17
Bac-CB	3,64 \pm 0,36 ^{ab}	804 \pm 24
Cont-AM	5,03 \pm 1,3 ^a	807 \pm 11
Lac-AM	3,27 \pm 0,28 ^{ab}	790 \pm 27
Bac-AM	2,44 \pm 0,11 ^b	806 \pm 37

*Valores na mesma coluna seguidos por pelo menos uma letra em comum (ou não seguidos por letras) indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.2 Ensaio de tração

Os resultados do ensaio de tração podem ser vistos na Figura 3.2 e na Tabela 3.2. O módulo elástico é uma medida da rigidez do material (NANDANE; JAIN, 2015). Quanto maior o seu valor, mais rígido o material, e menor sua deformação elástica. As propriedades mecânicas estão diretamente relacionadas com a estrutura e ordenação do material e com as interações entre as cadeias poliméricas. Materiais mais ordenados (ou seja, com maior grau de cristalinidade) são usualmente mais resistentes e rígidos, porém são menos plásticos, com menores deformações elásticas. Já materiais menos ordenados, com interações mais fracas entre as cadeias poliméricas, apresentam geralmente menores valores de resistência e módulo, mas apresentam maiores elongações. As fitas de banana apresentaram valores de resistência à tração na faixa de 1-3 MPa e de elongação na ruptura entre 20 e 35%, valores esses que corroboram com filmes com alta quantidade de polpa de frutas, por causa da presença de açúcares simples como frutose e sacarose, que podem aumentar a plasticidade dos filmes, embora tornando-os menos resistentes (SOTHORNVIT; RODSAMRAN, 2008). Comparando os valores obtidos com outros filmes à base de polpa de banana, como nos estudos de Martelli *et al.* (2013) e Jirukkakul (2016), os valores foram similares. Além disso, a presença do plastificante (xarope de yacon) também pode interferir nas ligações de hidrogênio entre as cadeias das matrizes, diminuindo a resistência do material (OLIVEIRA-ALCÂNTARA *et al.*, 2020; ROMANO *et al.*, 2014). Comparando os valores entre fitas de amido e de CB, é possível observar valores maiores para a resistência à tração e módulo elástico e menores valores de elongação na ruptura para as fitas de CB, o que indica que a CB pode ser considerada como

uma matriz mais resistente à tração que o amido. Filmes de amido são de fato considerados mais plásticos, porém menos resistentes, pois costumam ter um baixo grau de cristalinidade, devido à sua gelatinização, que causa uma quebra das ligações de hidrogênio e outras interações entre as moléculas de amilose e amilopectina (BERGO; SOBRAL; PRISON, 2010). Por outro lado, devido à estrutura linear de suas cadeias de CB, seus materiais costumam ser mais cristalinos e, portanto, mais resistentes e rígidos (AZEREDO et al., 2019).

A presença de bactérias diminuiu o valor de resistência à tração e de módulo elástico das fitas. Essa diminuição corrobora com outros trabalhos de filmes comestíveis com adição de probióticos (EBRAHIMI et al., 2018; KANMANI; LIM, 2013; OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020). Porém, a diminuição nos valores de resistência à tração não foi acompanhada por aumento da elongação, indicando que essas bactérias provavelmente causaram algum prejuízo à continuidade do material. O efeito da presença de *L. acidophilus* modificou mais drasticamente os valores de resistência à tração e módulo, causando uma maior diminuição em seus valores do que a presença de *B. coagulans*. Essa diferença pode ser explicada pela diferença na estrutura das duas espécies de bactérias. Apesar de ambas serem bactérias Gram-positivas, provavelmente, a maior parte de *B. coagulans* presente nas fitas estão na forma de esporos, que têm estrutura muito diferente das de células vegetativas. A estrutura externa do esporo de *B. coagulans* é ainda pouco conhecida, mas esporos apresentam uma espessa camada de proteínas no seu exterior e algumas espécies de *Bacillus* spp. contêm um exósporo composto de proteínas incluindo glicoproteínas (SETLOW, 2006), que podem ter tido ainda alguma interação com a matriz. Enquanto isso, a parede celular de *L. acidophilus* consiste principalmente de peptidoglicano, ácidos teicoicos, polissacarídeos e a camada S (JAFAREI; EBRAHIMI, 2011). Os ácidos teicoicos compõem grande parte da parede celular de *L. acidophilus* e têm carga negativa (JAFAREI; EBRAHIMI, 2011; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). A camada S de *L. acidophilus* é uma camada de proteínas ricas em aminoácidos ácidos e hidrofóbicos (JAFAREI; EBRAHIMI, 2011), conferindo portanto um caráter hidrofóbico às superfícies celulares (HYMES et al., 2016), o que provavelmente prejudicou as interações dessa bactéria com as matrizes, prejudicando ainda mais as propriedades mecânicas (em comparação com *B. coagulans*).

As curvas médias de tensão \times deformação das diferentes formulações podem ser observadas na Figura 3.3.

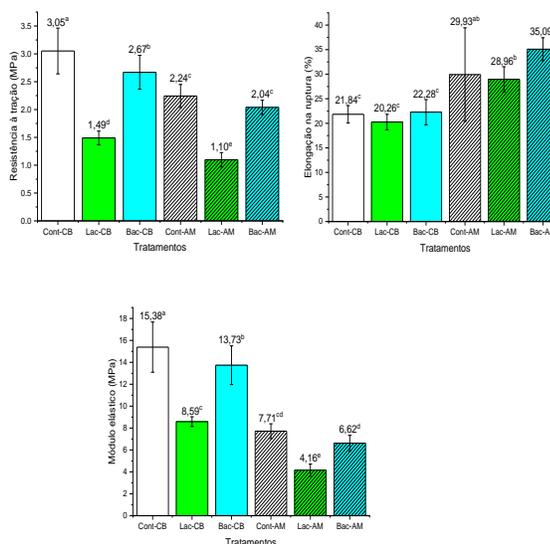


Figura 3.2 Resistência à tração (a), alongação na ruptura (b) e módulo elástico (c) das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos.

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Tabela 3.2 Resultados de Anova Two-Way do ensaio de tração das fitas de banana

Respostas	Matriz		P	Probiótico			P
	CB	Amido		Controle	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
σ (MPa)	2,40	1,79	<0,01	2,64 ^a	1,28 ^c	2,35 ^b	<0,01
ε (%)	21,40	31,37	<0,01	25,80 ^{ab}	24,67 ^b	28,69 ^a	0,011
E (MPa)	12,53	6,10	<0,01	11,49 ^a	6,28 ^c	10,18 ^b	<0,01

* σ , ε e E significam, respectivamente, resistência à tração, alongação na ruptura e módulo elástico. Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Para a comparação entre os tipos de matriz, foi feito teste t ($p < 0,05$).

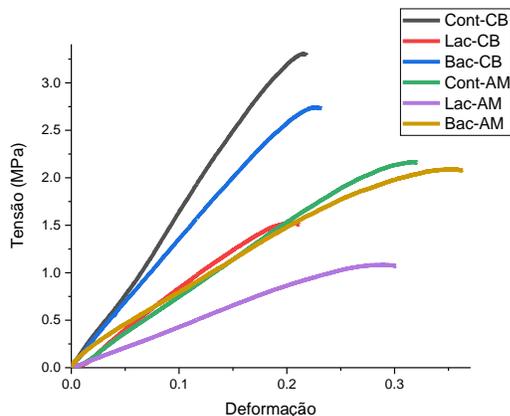


Figura 3.3 Curvas de tensão × deformação para as diferentes formulações de fitas de banana.

*Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Para comparar os valores obtidos com produtos semelhantes já presentes no mercado, o mesmo ensaio foi realizado com fitas comerciais (“Rolinhas de frutas”, da marca SóSnacks®). As propriedades mecânicas foram medidas para três sabores diferentes do mesmo produto e os resultados podem ser vistos na Figura 3.4.

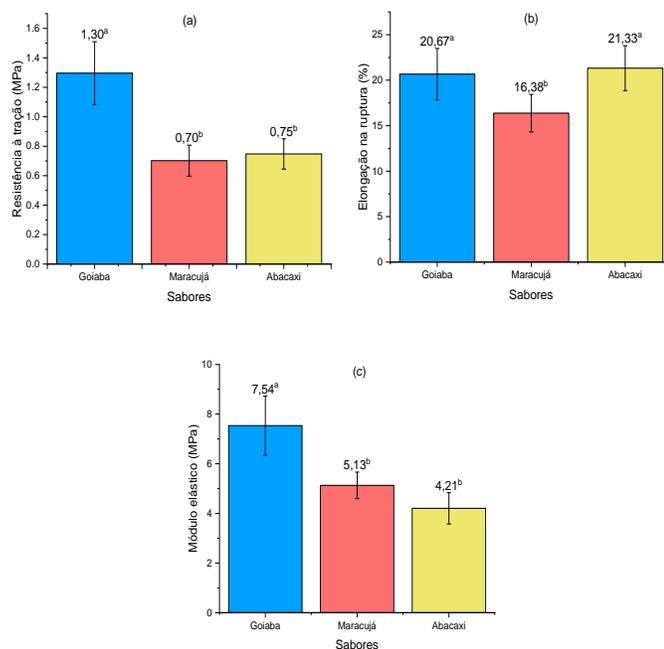


Figura 3.4 Resistência à tração (a), alongação na ruptura (b) e módulo elástico (c) dos “Rolinhas de frutas” da marca SóSnacks® correspondentes aos diferentes sabores.

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Os valores de resistência à tração e de módulo dos “rolinhos de frutas” foram, em geral, mais baixos que as fitas de banana obtidas, porém alguns valores se aproximaram aos das fitas de banana com amido. Já os valores de alongação foram próximos aos valores obtidos. A menor resistência à tração pode ser justificada pela composição do produto, feito somente de polpas de frutas. A espessura dos rolinhos também é maior que a espessura das fitas de banana, entre 1,0 e 1,2 mm.

3.3.3 Força de cisalhamento

No teste de força de cisalhamento ou força de fratura, é medida a força necessária para cortar transversalmente um fragmento da fita de banana. O teste foi feito utilizando-se uma lâmina de faca, que simula a ação de um corte com uma faca ou uma mordida inicial, quando a amostra é colocada entre os dentes incisivos (BLOG EXTRALAB, 2017; STABLE MICRO SYSTEMS, 2021). Assim, o teste é capaz de medir a fraturabilidade do alimento, que pode influenciar diretamente na aceitação sensorial do produto (BLOG EXTRALAB, 2017; PAULA; CONTI-SILVA, 2014; STABLE MICRO SYSTEMS, 2021). O resultado foi expresso como o pico de força, em Newtons, e pode ser visto na Figura 3.5 e na Tabela 3.3.

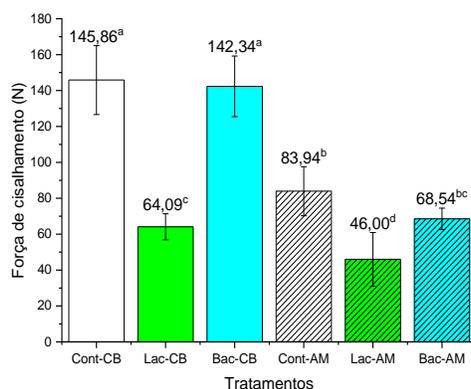


Figura 3.5 Força de cisalhamento das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

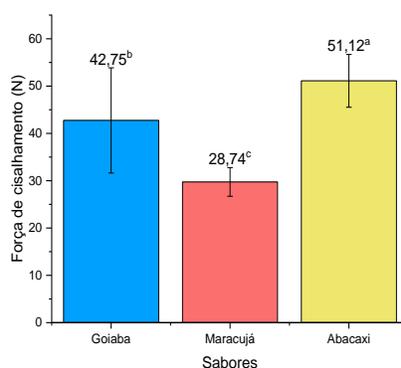
Tabela 3.3 Resultados de Anova Two-Way para a força de cisalhamento das fitas de banana

Resposta	Matriz		P	Probiótico			P
	CB	Amido		Controle	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
Força de cisalhamento (N)	117,10	66,16	<0,01	114,90 ^a	55,04 ^b	104,95 ^a	<0,01

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Para a comparação entre os tipos de matriz, foi feito teste t ($p < 0,05$).

Como é possível ver na Figura 3.5, os valores de força de cisalhamento para as fitas feitas de CB são significativamente maiores que os das fitas de amido, corroborando com os resultados do ensaio de tração. A presença de *B. coagulans* não teve influência significativa nos valores de força de cisalhamento, porém a presença de *L. acidophilus* causou uma diminuição significativa e considerável, que pode ter sido causada pela diminuição da coesão das cadeias poliméricas das fitas, também corroborando com os resultados do ensaio de tração.

Assim como no teste de tração, o teste de força de cisalhamento foi feito para os “rolinhos de frutas” da SóSnacks®. Os resultados podem ser vistos na Figura 3.6.

**Figura 3.6** Força de cisalhamento dos “Rolinhas de frutas” da marca SóSnacks® correspondentes aos diferentes sabores.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$).

Assim como os valores de resistência à tração e módulo, os valores de força de cisalhamento dos rolinhos de frutas foram um pouco menores que os obtidos no projeto, assim como nas propriedades mecânicas. Os valores se aproximaram aos valores obtidos pelas fitas de banana contendo *L. acidophilus*.

No geral, as fitas de banana, especialmente as feitas com CB, apresentaram valores de resistência à tração, módulo e força de cisalhamento maiores que os rolinhos de frutas

comerciais. Seria interessante compreender se essas diferenças seriam perceptíveis em sua textura na análise sensorial, e se os consumidores considerariam essa diferença vantajosa ou desvantajosa.

3.3.4 Opacidade

A opacidade foi medida com um colorímetro e dada em porcentagem. É possível observar que as fitas de banana tiveram valores altos de opacidade (Figura 3.7 e Tabela 3.4) próximas a 90%, que pode ser confirmado pela Figura 3.1, em que pode-se observar a aparência das diferentes formulações. As fitas feitas com CB tiveram opacidade levemente maior, que pode estar relacionada a um maior grau de cristalinidade das fitas de CB em relação às fitas de amido.

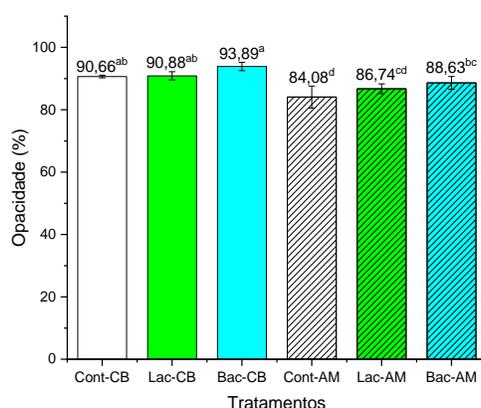


Figura 3.7 Opacidade das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Tabela 3.4 Resultados de Anova Two-Way para opacidade as fitas de banana

Resposta	Matriz		P	Probiótico			P
	CB	Amido		Controle	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
Opacidade (%)	91,81	86,47	<0,01	87,37 ^b	88,81 ^{ab}	91,26 ^a	<0,01

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Para a comparação entre os tipos de matriz, foi feito teste t ($p < 0,05$).

3.3.5 Análise colorimétrica

A cor é um atributo importante para a análise da qualidade do alimento e tem grande influência na escolha e preferências dos consumidores (PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

O espaço de cores CIE $L^*a^*b^*$ fornece uma diferenciação de cores, definido em três eixos perpendiculares. O eixo L^* representa a luminosidade que varia do preto (0) ao branco (100), portanto, quanto menor o valor de L^* , mais escura a amostra. O eixo a^* vai do verde (-) ao vermelho (+) e o b^* do azul (-) ao amarelo (+), como mostrado na Figura 3.8a. O croma é definido como a distância radial do centro do espaço até o ponto da cor. Quanto maior o croma, maior a saturação das cores perceptíveis aos humanos. Já o ângulo Hue, que pode ser visto na Figura 3.8b, é considerado o atributo qualitativo de cor (DAVID; POLIANA; SPRICIGO, 2020; PATHARE; OPARA; AL-SAID, 2013).

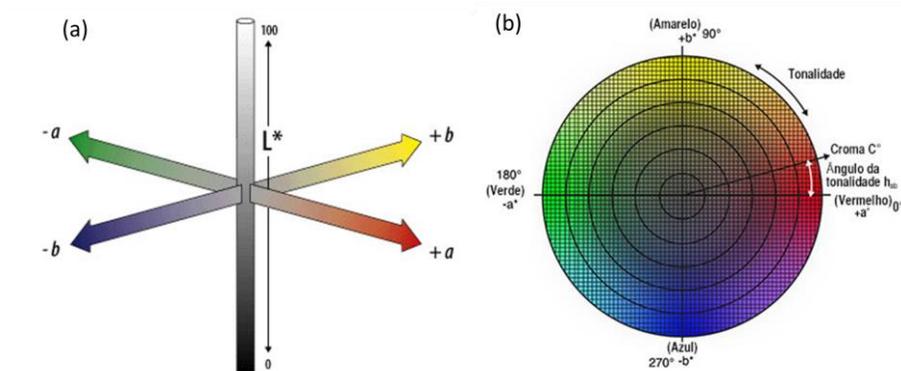


Figura 3.8 Representação do espaço de cor $L^*a^*b^*$ (a) e $L^*C^*h^\circ$ (b).
Fonte: (MIMORIARTY, 2021) (a) e (KONICA MINOLTA SENSING, 2021) (b)

Observando os resultados de colorimetria das fitas de banana, na Figura 3.9 e na Tabela 3.5, é possível notar que, no geral, as fitas podem ser consideradas escuras, com valores de L^* em torno de 32, e apresentaram valores de a^* e b^* positivos, com valores em torno de 9 e 10, respectivamente. A partir do ângulo Hue, é possível notar que as cores das diferentes formulações se encontram no primeiro quadrante do espaço (Figura 3.8b), representando uma cor amarronzada, como pode ser observada visualmente na Figura 3.1.

Comparando as diferentes formulações, é possível observar que as formulações com *L. acidophilus* apresentaram valores de L^* , a^* e b^* maiores comparados aos seus respectivos controles. Já a presença de *B. coagulans* não alterou, no geral,

significativamente os valores de colorimetria. Comparando as fitas de CB ou amido, é possível observar que os valores para as fitas de CB foram levemente maiores.

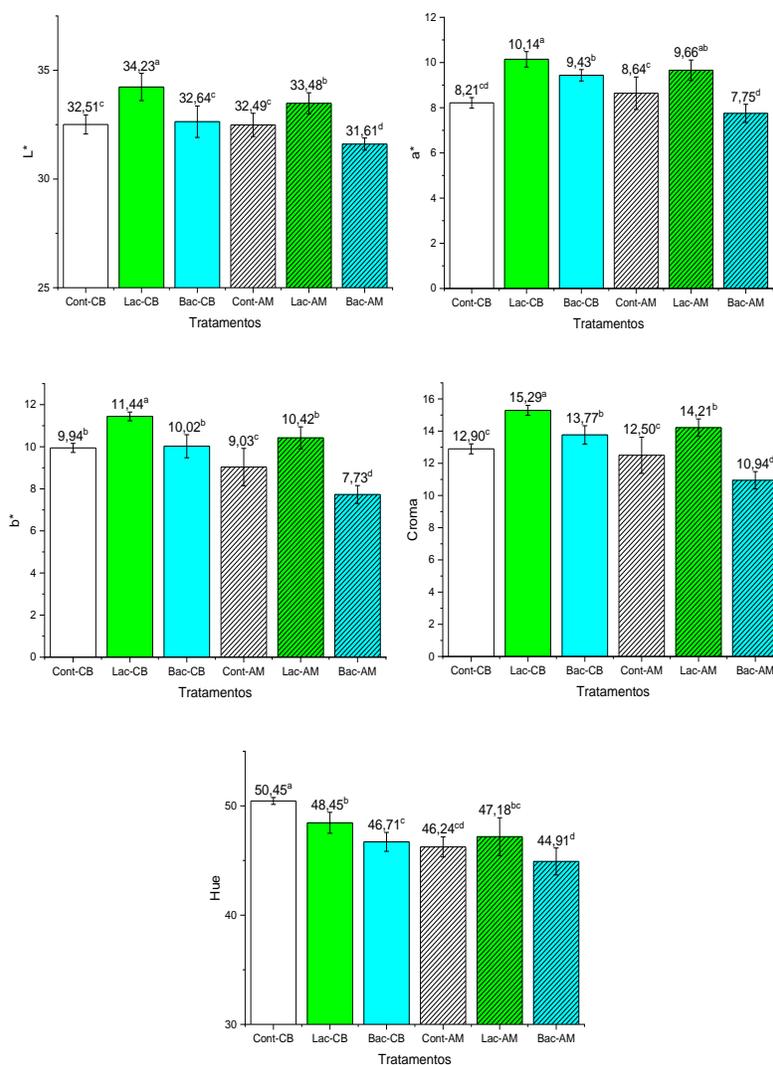


Figura 3.9 Parâmetros L*, a*, b*, croma e ângulo Hue das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Tabela 3.5 Resultados de Anova Two-Way referentes à análise colorimétrica das fitas de banana

Respostas	Matriz		P	Probiótico			P
	CB	Amido		Controle	<i>L. acidophilus</i>	<i>B. coagulans</i>	
L*	33,13	32,53	<0,01	32,50 ^b	33,86 ^a	32,12 ^b	<0,01
a*	9,26	8,68	<0,01	8,43 ^b	9,90 ^a	8,59 ^b	<0,01
b*	10,47	9,06	<0,01	9,49 ^b	10,93 ^a	8,88 ^c	<0,01
Croma	13,99	12,55	<0,01	12,70 ^b	14,75 ^a	12,36 ^b	<0,01
Hue (°)	48,54	46,11	<0,01	48,35 ^a	47,81 ^a	45,81 ^b	<0,01

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Para a comparação entre os tipos de matriz, foi feito teste t ($p < 0,05$).

3.3.6 pH

O pH das diferentes formulações de fitas medidas logo após a secagem pode ser visto na Figura 3.10 e Tabela 3.6. Como é possível observar, enquanto as fitas controle tiveram pH de 5,12 e 5,00 para as fitas com CB e amido, respectivamente, as fitas com probióticos apresentaram pH mais baixo. Esse resultado pode ser resultado da produção de ácido lático pelos probióticos, já que tanto *L. acidophilus* quanto *B. coagulans* são bactérias ácido lácticas (GOMES et al., 2013; KANMANI; LIM, 2013; KONURAY; ERGINKAYA, 2018). Este resultado pode não parecer adequado, pois as condições de desidratação, como baixa atividade de água, não são adequadas para produção de metabólitos. Porém, as bactérias foram adicionadas às dispersões filmogênicas antes da degaseificação das soluções, processo que levou 100 min. Além disso, o processo de secagem em estufa sem circulação de ar é lento (26 h), e, apesar de *L. acidophilus* não terem mantido sua viabilidade durante a desidratação, a produção de ácido lático pode ter ocorrido antes da morte celular. Porém, mais experimentos precisam ser realizados para verificar se a queda de pH pode ser resultado ou não da produção de ácido lático pelas bactérias. Para isso, indica-se, em testes futuros, a quantificação de ácido lático nas amostras. As fitas com *L. acidophilus* apresentaram uma diminuição maior em relação às fitas com *B. coagulans*, apesar da viabilidade de *L. acidophilus* não ter sido mantida enquanto de *B. coagulans* se manteve alta após da desidratação das fitas.

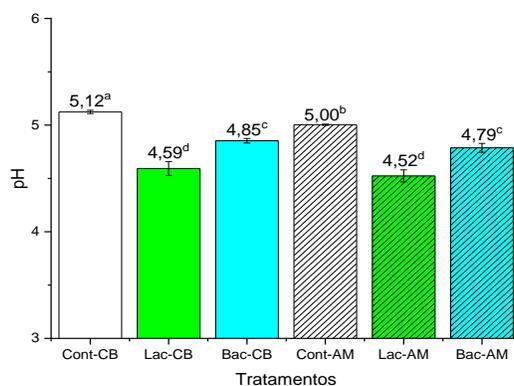


Figura 3.10 pH das fitas correspondentes aos diferentes tratamentos.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e

amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Tabela 3.6 Resultados de Anova Two-Way referentes à medida de pH das fitas de banana

Resposta	Matriz		P	Probiótico		p	
	CB	Amido		Controle	<i>L. acidophilus</i>		<i>B. coagulans</i>
pH	4,86	4,77	<0,01	5,06 ^a	4,56 ^c	4,82 ^b	<0,01

*Valores seguidos por ao menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Para a comparação entre os tipos de matriz, foi feito teste t ($p < 0,05$).

O pH das fitas também foi medido após 6 meses de armazenamento em temperatura ambiente (25 °C). Como pode ser visto na Tabela 3.7, houve uma pequena queda no pH para todas as diferentes formulações após a estocagem (apresentando diferença significativa entre os valores de pH inicial e após 6 meses, através de testes t), porém, no geral, não houve diferença significativa na queda de pH dependendo da formulação.

Tabela 3.7 Variação de pH para as diferentes formulações de fitas de banana após 6 meses de estocagem

Formulações	Variação de pH
Cont-CB	- 0,04 ± 0,01 ^a
Lac-CB	- 0,17 ± 0,05 ^b
Bac-CB	- 0,05 ± 0,02 ^{ab}
Cont-AM	- 0,10 ± 0,02 ^{ab}
Lac-AM	- 0,20 ± 0,04 ^b
Bac-AM	- 0,09 ± 0,02 ^{ab}

*Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p < 0,05$). Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente

3.3.7 Difração de raios-X

O difratograma do pó de CB pode ser visto da Figura 3.11 e indica que a CB tem regiões bastante cristalinas. Os principais picos apontados na figura são típicos de celulose I (celulose nativa), que apresenta picos em torno de 14,5°, 16,5°, 22,5° e 33,7° (FERNANDES et al., 2009; GONG et al., 2017). O principal pico comumente encontrado em difratogramas de celulose (em torno de 22,5°) refere-se ao plano (2 0 0) (GONG et al., 2017).

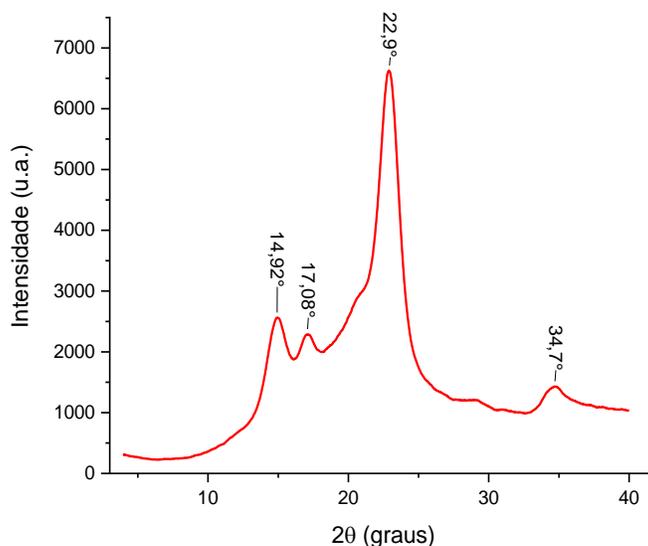


Figura 3.11 Difratograma do pó de celulose bacteriana.

Na Figura 3.12, são apresentados os difratogramas das diferentes formulações de fitas de banana. Para as fitas com CB, pode-se concluir que as fitas mantiveram um certo grau de cristalinidade, mantendo o pico principal em torno de 22° . Também é possível observar que a presença de bactérias probióticas nas fitas diminuíram a intensidade dos picos em torno de 22° , e essa diminuição foi maior para as fitas com *L. acidophilus*. Isso indica que a presença das bactérias diminuiu a ordenação das cadeias poliméricas das fitas. Esses resultados corroboram com os resultados de propriedades mecânicas, em que a presença dos probióticos diminuíram os valores de resistência à tração e módulo (e nas fitas com *L. acidophilus* a diminuição foi mais brusca), indicando que as bactérias causaram descontinuidades e diminuíram a coesão da estrutura das fitas.

Para os difratogramas de amido, o perfil é de materiais mais amorfos, o que também corrobora com os valores de resistência à tração e módulo obtidos, que foram menores para as fitas com amido. O difratograma da formulação Cont-AM tem um perfil semelhante a outros difratogramas de filmes à base de amido, como para os estudos de Bergo *et al.* (2010) e Li *et al.* (2018). Para esse tratamento, o pico único e largo indica que houve formação de regiões semicristalinas. Para os difratogramas das fitas de amido com probióticos, o perfil foi de estruturas amorfas, principalmente das formulações com *L. acidophilus*, também corroborando com os resultados de propriedades mecânicas. A formação de filmes mais amorfos à base de amido pode ser justificada pela gelatinização do

amido, que causa uma quebra das ligações de hidrogênio e outras interações entre as moléculas de amilose e amilopectina (BERGO; SOBRAL; PRISON, 2010; LI et al., 2018).

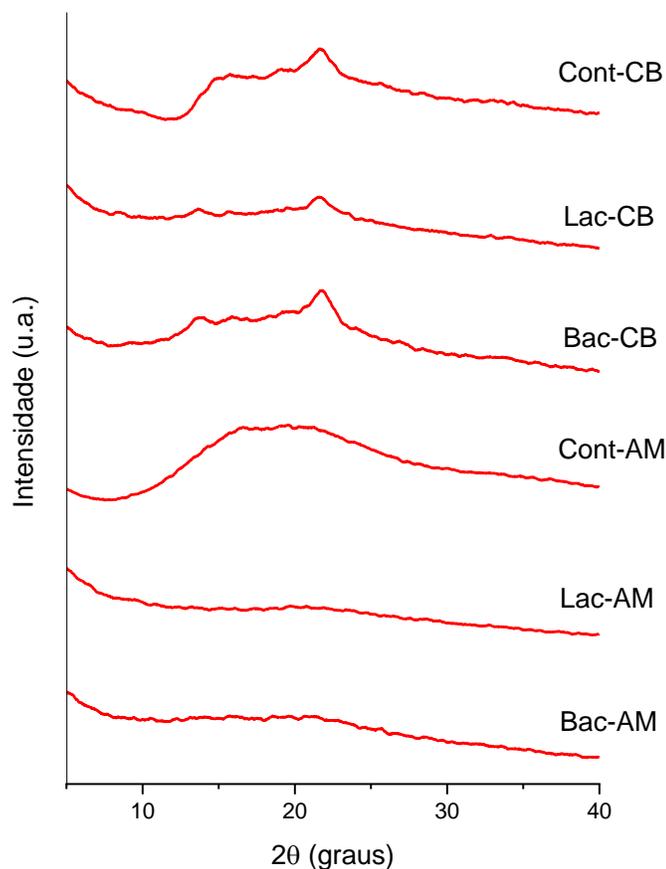


Figura 3.12 Difratogramas das diferentes formulações de fitas de banana.

*Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.8 Espectroscopia FTIR

Os espectros de ATR/FTIR dos componentes adicionados nas formulações das fitas (CB, amido de mandioca, CMC, polpa de banana e xarope de yacon) podem ser vistos na Figura 3.13. Os espectros dos cinco componentes apresentam bandas bastante semelhantes, característicos de espectros de polissacarídeos, apresentando apenas algumas diferenças ou deslocamentos entre si. O espectro de CB apresenta bandas características de CB (BARUD et al., 2011), assim como o espectro de amido de mandioca (ABDULLAH et al., 2018). A banana e o xarope de yacon, apesar de terem também em sua composição componentes não

polissacarídicos, são compostos majoritariamente por polissacarídeos ou açúcares simples, e os componentes não polissacarídicos estão em menores concentrações, não identificáveis nos espectros. A banda larga em torno de 3300 cm^{-1} se deve ao estiramento de ligações de O-H, presente nas estruturas de celulose e amido, e também de outros polissacarídeos e açúcares simples presentes na banana e xarope de yacon (JARAMILLO et al., 2016; XU et al., 2005). A banda em torno de 2920 cm^{-1} está associada a vibrações de estiramento C-H de grupos CH_2 e CH_3 (JARAMILLO et al., 2016; MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006; XU et al., 2005). A banda em aproximadamente 1620 cm^{-1} (em CB, amido, banana e yacon) geralmente estão associadas com ligações C-O associadas com grupos hidroxilas (ABDULLAH et al., 2018). As bandas entre 1450 e 1300 cm^{-1} são referentes à deformação angular de ligações C-H (ABDULLAH et al., 2018; MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006; YEASMIN; MONDAL, 2015). A banda em torno de 1120 cm^{-1} pode se referir ao estiramento C-O-C (COLOM et al., 2003; OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020), comum em ligações glicosídicas, e a banda 1016 cm^{-1} ao estiramento C-O de álcool primário, presentes nos resíduos de glicose do amido e celulose e outros polissacarídeos (MATHEW; BRAHMAKUMAR; ABRAHAM, 2006). No caso do espectro de CMC, também característico de CMC comercial (NIST, 2021; YEASMIN; MONDAL, 2015), é possível observar uma diferença em algumas bandas: uma banda acentuada em torno de 1600 cm^{-1} , indicando ligação C=O (YASMIN; MONDAL, 2015), presente em ácido carboxílico, e bandas mais acentuadas entre 1450 e 1300 cm^{-1} (também presentes nos outros componentes, porém em menor intensidade).

Os espectros para todas as seis diferentes formulações de fitas de banana (Figura 3.14) foram muito similares entre si, bastante semelhantes aos espectros de amido, CB e banana, apenas com alguns deslocamentos. As características dos espectros não foram alteradas pelos probióticos, que contêm componentes não polissacarídicos em suas paredes celulares, provavelmente por causa de sua baixa concentração em relação ao restante dos componentes das fitas (COLOM et al., 2003; OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020).

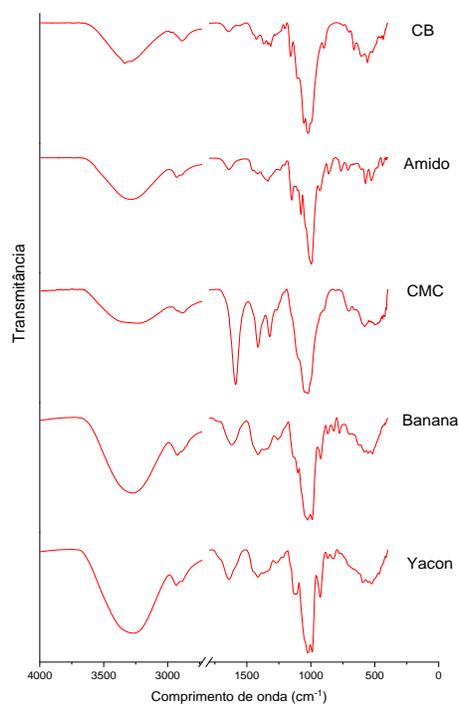


Figura 3.13 Espectros de ATR/FTIR dos diferentes componentes adicionados nas formulações das fitas de banana: celulose bacteriana (CB), amido, sal sódico de carboximetilcelulose (CMC), polpa de banana e xarope de yacon.

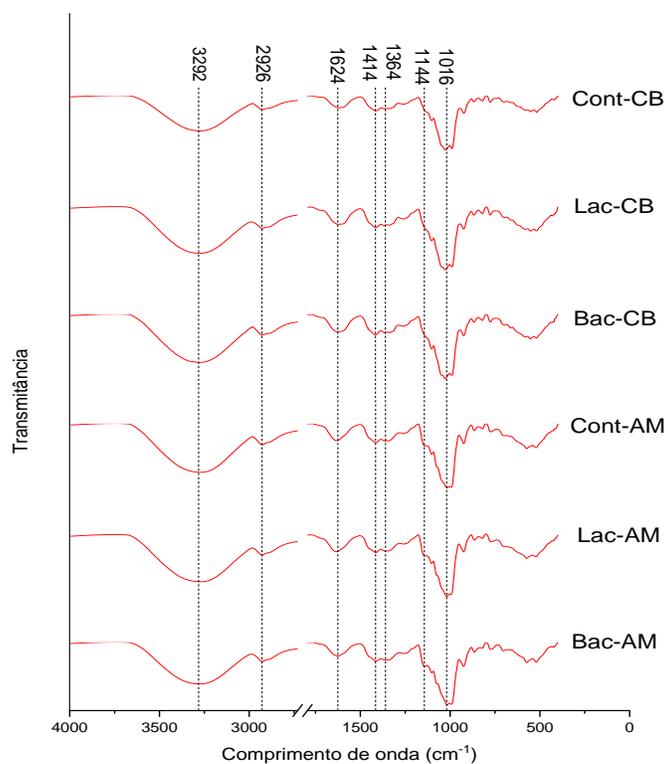


Figura 3.14 Espectros de ATR/FTIR das diferentes formulações de fitas de banana.

*Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido

respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.9 Microscopia eletrônica de varredura

Foram feitas imagens por MEV das superfícies e fraturas das fitas de banana. Nas micrografias feitas das superfícies (Figura 3.15), é possível observar que, no geral, as superfícies das fitas foram heterogêneas e rugosas, provavelmente por causa da presença de polpa de banana, que tem uma estrutura complexa. Resultados parecidos foram obtidos em outros trabalhos que produziram filmes com polpa de frutas, e essa estrutura pode evidenciar o comportamento plástico das fitas (MARTELLI et al., 2013; VIANA et al., 2018). As fitas de amido tiveram uma superfície mais lisa que as de CB, que apresentaram uma superfície ondulada e mais rugosa, típica de estruturas à base de CB. Este resultado corrobora com outros estudos, como Bersaneti *et al.* (2016), que observaram uma superfície lisa e homogênea em filmes à base de amido de mandioca e FOS e Viana *et al.* (2018) e Oliveira-Alcântara *et al.* (2020) que observaram uma superfície mais ondulada e rugosa em filmes à base de CB nanofibrilada. A presença de bactérias deixou as superfícies das fitas mais rugosas, também corroborando com outros estudos de filmes carreadores de bactérias probióticas (HEINEMANN; CARVALHO; FAVARO-TRINDADE, 2013; MOZAFFARZOGH et al., 2020; OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020), podendo indicar que as bactérias causam descontinuidades na estrutura das fitas, que podem justificar a diminuição da resistência à tração das fitas contendo probióticos.

Nas micrografias das fitas com *B. coagulans*, não foi possível observar a presença de bactérias na superfície. Já no caso das fitas com *L. acidophilus*, foi possível observar as bactérias na superfície, apontadas pelas setas brancas na figura. Em especial, na micrografia do tratamento Lac-CB, foi possível observar uma grande quantidade de bactérias em uma determinada área.

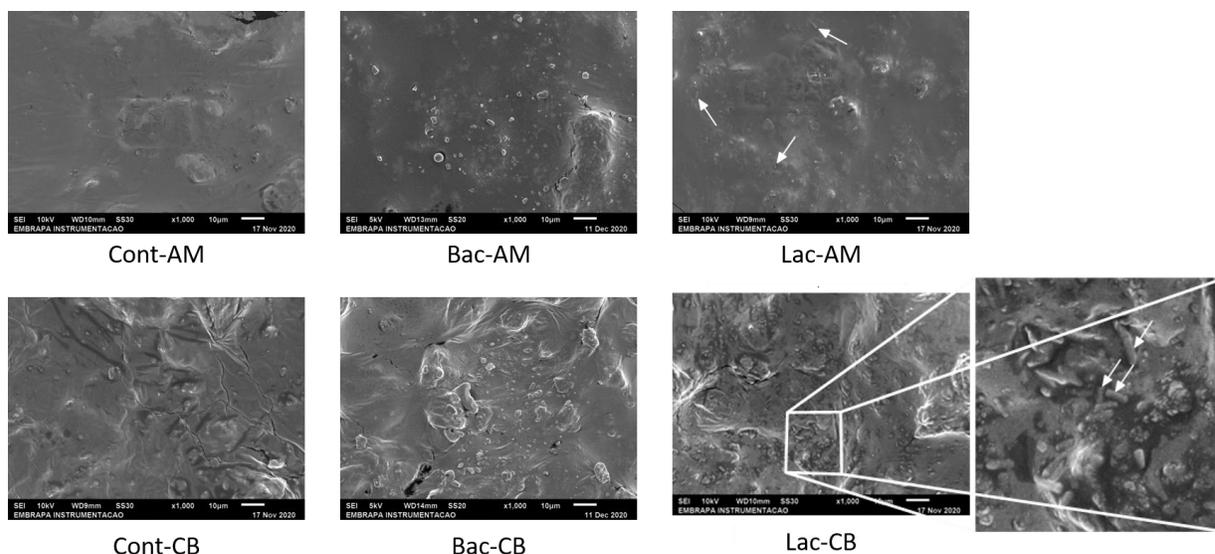


Figura 3.15 Micrografias obtidas por MEV da superfície das diferentes formulações de fitas de banana.
 *Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Na Figura 3.16, é possível observar as micrografias das fraturas das fitas. Como nas imagens da superfície, as fitas de amido apresentaram superfície de fratura mais lisa e as de CB mais rugosa. Nas formulações com probióticos, é possível observar a presença de bactérias no interior da estrutura, indicadas na figura por setas, o que pode causar discontinuidades na estrutura, diminuindo a resistência à tração das fitas (EBRAHIMI et al., 2018). Além disso, é possível observar rachaduras em todas as formulações, que pode indicar que as estrutura das fitas não estão muito coesas. Por outro lado, as rachaduras podem ter sido causadas na hora da preparação das criofraturas.

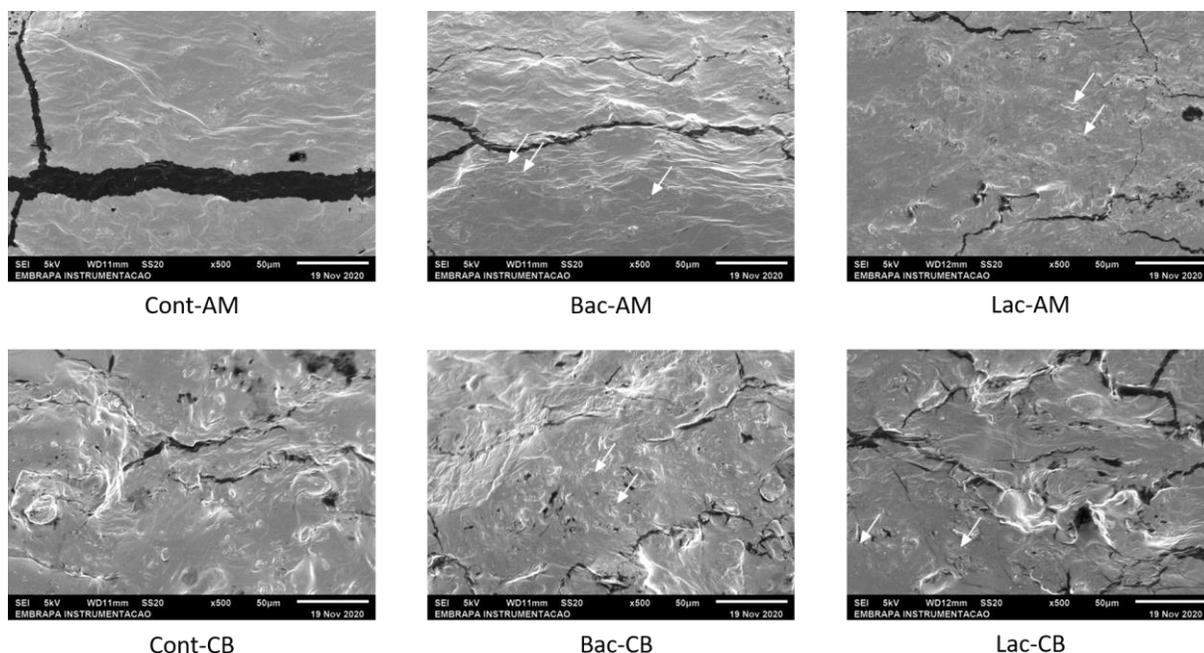


Figura 3.16 Micrografias eletrônicas por varredura da criofatura das diferentes formulações de fitas de banana.

*Cont-CB e Cont-AM: Controles (sem probióticos), com matrizes celulose bacteriana e amido, respectivamente; Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.10 Avaliação da viabilidade dos probióticos após processo de secagem e durante estocagem das fitas

O processo de desidratação pode provocar estresse osmótico ou estresse térmico, que podem causar danos às células probióticas, diminuindo sua viabilidade. Por isso, para avaliar a influência do processo de secagem em estufa na viabilidade das bactérias probióticas, foi feita a contagem de bactérias da dispersão filmogênica, antes da secagem, e da fita seca imediatamente após a secagem.

Para as fitas com *B. coagulans*, a perda de viabilidade após a secagem foi em torno de 1 ciclo log e não apresentou diferença significativa ($p > 0,05$) dependendo do tipo de matriz utilizada (Figura 3.17 e Tabela 3.8), com cerca de $7,6 \log \text{ UFC g}^{-1}$ após a secagem. Uma viabilidade similar após o processo de secagem foi obtida por Oliveira-Alcântara *et al.* (2020) ao produzirem filmes de CB e goma de caju e com *B. coagulans*, na presença FOS. A presença de FOS (presente no xarope de yacon) também pode ter colaborado para essa alta viabilidade, já que FOS é reportado como tendo um efeito protetivo durante o processo

de desidratação (OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020; ROMANO et al., 2014), embora os filmes de *B. coagulans* sem a presença de FOS também apresentaram alta viabilidade após o processo (OLIVEIRA-ALCÂNTARA et al., 2020).

Por outro lado, as fitas com *L. acidophilus* não apresentaram viabilidade detectável ($< 3 \log \text{ UFC g}^{-1}$) após a secagem das fitas a 50 °C, mesmo com viabilidade similar à de *B. coagulans* nas dispersões filmogênicas (Tabela 3.9).

Essa diferença em comparação à viabilidade da *B. coagulans* pode ser explicada pelo fato desta última ser uma bactéria esporogênica, e, portanto, mais resistente a estresses térmicos e osmóticos, diferente de bactérias não esporogênicas, como a *L. acidophilus*, que são mais sensíveis a esses tipos de estresses. Porém, esse resultado não corrobora com outros estudos que produziram filmes com *L. acidophilus* e mantiveram uma viabilidade relativamente alta depois da desidrataação (EBRAHIMI et al., 2018; KANMANI; LIM, 2013; LÓPEZ DE LACEY et al., 2012).

Para os testes em que o inóculo da cultura de *L. acidophilus* foi realizado antes de sua adição na dispersão filmogênica, o resultado foi o mesmo: após o processo de secagem, não houve viabilidade detectável, mesmo com concentração de $8,38 \pm 0,07 \log \text{ UFC g}^{-1}$ na dispersão. Outros testes foram feitos para verificar se a causa da perda brusca de viabilidade se deve à temperatura de secagem. Para isso, experimentos com secagem a 40 °C em estufa com circulação de ar foram realizados, porém o mesmo resultado foi obtido. Uma sugestão para esse resultado negativo, mesmo havendo estudos de filmes comestíveis em que *L. acidophilus* mantiveram viabilidade adequada após o processo de desidrataação é a quantidade de solutos presentes na dispersão filmogênica, com alta concentração de açúcares presentes na banana e no xarope de yacon. Isso, somado ao processo de desidrataação sem proteção às células, pode causar estresse osmótico devido à rápida perda intracelular de água, causando danos à parede celular (RIVEROS; FERRER; BÓRQUEZ, 2009). Para experimentos futuros, indicam-se testes que envolvam o uso de técnicas para proteger as células probióticas contra os estresses causados pelo processo de secagem. Por exemplo, estudos mostram que a utilização de íons Ca^{2+} podem ter um papel protetor em bactérias ácido lácticas a estresses térmicos (WANG et al., 2020). Alguns estudos propõem que o efeito protetivo de Ca^{2+} pode estar relacionado à estabilização das estruturas subcelulares e à melhora do estresse intrínseco das células (SU et al., 2019; WANG et al.,

2020; ZHENG et al., 2016). Outra sugestão é a microencapsulação das células probióticas para adição nas fitas de banana (MALMO; LA STORIA; MAURIELLO, 2013).

O fato de *B. coagulans* ser uma bactéria esporogênica é decisivo para esse resultado e para a diferença entre a bactéria esporogênica e *L. acidophilus*. O processo de formação de esporos, chamado esporulação, ocorre quando um nutriente essencial se torna escasso ou se esgota. Quando isso ocorre, um cromossomo bacteriano recém-replicado da célula vegetativa é isolado juntamente com uma porção do citoplasma por uma invaginação da membrana plasmática (septo do esporo). Então, a membrana plasmática circunda o septo do esporo, formando uma membrana dupla, tornando-se uma estrutura fechada no interior da célula (pré-esporo). Em seguida, camadas de peptidoglicano são formadas entre as duas membranas e uma espessa capa de proteína é formada em torno da membrana externa, formando o endósporo que é, em seguida, liberado da célula. O núcleo do esporo contém DNA, RNA, ribossomos, enzimas e pequenas moléculas importantes, essenciais para retomar o metabolismo posteriormente, durante a germinação do esporo (TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). Esses esporos não realizam reações metabólicas e são capazes de sobreviver a temperaturas extremas, escassez de água e exposição a diversos agentes químicos (SETLOW, 2006; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). Estudos indicam que essa resistência se deve a algumas características da estrutura do esporo. A membrana plasmática interna do esporo forma uma forte barreira de permeabilidade, contribuindo para a resistência dos esporos a muitos agentes químicos. A baixa quantidade de água presente no núcleo é provavelmente o principal fator causador da dormência enzimática, ajudando na resistência do esporo ao calor úmido (SETLOW, 2006). Além disso, o núcleo apresenta ácido dipicolínico (ADP) que é acompanhado por um grande número de íons Ca^{2+} . Acredita-se que o ADP protege o DNA do esporo contra danos, tendo também um importante papel na resistência dos esporos (SETLOW, 2006; TORTORA; CASE; FUNKE, 2016). Por último, o núcleo apresenta um grupo de proteínas de esporos solúveis em ácido do tipo α/β , que saturam o DNA do esporo, alterando drasticamente a estrutura e as propriedades do DNA, contribuindo significativamente na resistência dos esporos ao calor, a agentes químicos e à radiação UV (SETLOW, 2006). Assim, uma grande diferença nos resultados de viabilidade entre as duas bactérias já era esperada.

Para analisar a estabilidade das bactérias probióticas (*B. coagulans*) durante a estocagem a 25 °C, a contagem de células viáveis foi feita a cada 30 dias, aproximadamente, até completar em torno de 6 meses de estocagem. Os resultados podem ser vistos na Figura 3.17. Como é possível observar, no geral, não houve diferença significativa nas contagens ao longo da estocagem até 187 dias em comparação com a contagem no tempo 0 (imediatamente após secagem), indicando que as bactérias se mantêm viáveis durante esse tempo de armazenamento. No final do tempo de estocagem, em 187 dias, a viabilidade de *B. coagulans* se manteve. Resultados parecidos foram obtidos também por Oliveira-Alcântara *et al.* (2020) e Marcial-Coba *et al.* (2019) que verificaram que a viabilidade de *B. coagulans* BC4 se manteve estável em filmes comestíveis e tâmaras desidratadas, respectivamente, após 45 dias. No trabalho de Oliveira *et al.* (2021), morangos desidratados revestidos ou impregnados com *B. coagulans* BC4 foram produzidos e as bactérias também mantiveram sua viabilidade após 180 dias de estocagem à temperatura ambiente. Mais uma vez, esse resultado pode ser justificado pela capacidade dessas bactérias de formarem esporos e, assim, serem mais resistentes às condições adversas, como a baixa atividade de água desses alimentos. Além disso, é reportado na literatura que *B. coagulans* são capazes de manter sua viabilidade sem refrigeração, diferentemente de bactérias da família *Lactobacillaceae*, que tendem a diminuir sua viabilidade mais rapidamente quando armazenadas em temperatura ambiente (ELSHAGHABEE *et al.*, 2017; KONURAY; ERGINKAYA, 2018; NEFFE-SKOCI; RZEPKOWSKA; SZYDŁOWSKA, 2018).

Os resultados obtidos com as fitas de *B. coagulans* são bastante positivos, já que é muito importante que o alimento probiótico mantenha a viabilidade das bactérias em quantidade adequada durante todo o seu tempo de vida de prateleira. Assim, *B. coagulans* BC4, apesar de menos explorada comercialmente, mostrou-se uma cepa bastante promissora para utilização em alimentos, em especial alimentos desidratados, que não necessitam de refrigeração para estocagem e que possuem tempo de vida de prateleira mais longo.

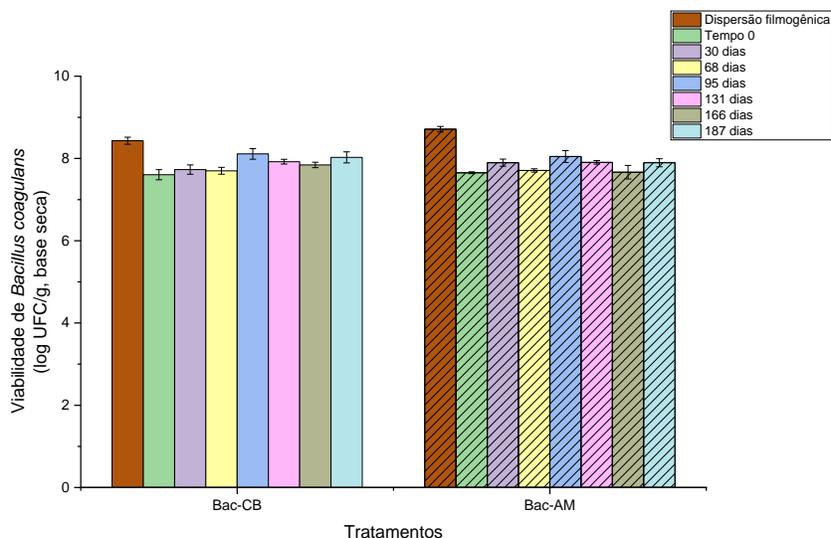


Figura 3.17 Viabilidade de *B. coagulans* na dispersão filmogênica (antes da secagem), no tempo 0 (imediatamente após a secagem) e ao longo da estocagem a 25 °C.

*Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Tabela 3.8 Resultados de teste t para a perda de viabilidade de *B. coagulans* durante o processo de secagem para fitas com celulose bacteriana ou amido

Resposta	Matriz		P
	CB	Amido	
Perda de viabilidade (log UFC g ⁻¹)	0,83	1,06	0,077

Tabela 3.9 Viabilidade dos probióticos na dispersão filmogênica antes da secagem para as diferentes formulações.

Formulação	Viabilidade na dispersão filmogênica (log UFC g ⁻¹)
Lac-CB	8,85 ± 0,05 ^a
Lac-AM	8,72 ± 0,03 ^a
Bac-CB	8,43 ± 0,09 ^b
Bac-AM	8,71 ± 0,07 ^a

* Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, p <0,05). Lac-CB e Lac-AM: fitas com *L. acidophilus*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente; Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

3.3.11 Avaliação da viabilidade de *B. coagulans* em fitas comestíveis de banana durante passagem simulada pelo TGI

Além de ser muito importante que a viabilidade das bactérias probióticas se mantenham viáveis durante todo o tempo de vida de prateleira do alimento, até ser consumido, é muito importante que as bactérias sobrevivam às condições do TGI e

cheguem viáveis em quantidade adequada ao intestino, para exercer funções benéficas à saúde do hospedeiro.

Para verificar a funcionalidade das fitas de banana com *B. coagulans* (já que neste projeto, não foi possível produzir fitas de banana com viabilidade adequada de *L. acidophilus*), foram realizados experimentos para a simulação da passagem do alimento pelas fases oral, gástrica e intestinal e a quantidade de UFC liberadas por grama de fita foi calculada para cada fase e comparada com a quantidade inicial presente na fita.

Os resultados podem ser observados na Figura 3.18. A concentração inicial de bactérias presente nas fitas era em torno de $8,1 \log \text{UFC g}^{-1}$, e foram liberadas na fase oral cerca de $7,1 \log \text{UFC g}^{-1}$ pelas duas matrizes polissacarídicas. Após a passagem pela fase gástrica, com pH 3, grande parte das células viáveis presentes nas fitas foram liberadas e permaneceram viáveis após 2 h de incubação. Para as fitas de CB, a contagem celular no fluido gástrico por grama de fita foi um pouco menor do que a contagem inicial, enquanto para as fitas de amido, não houve diferença significativa ($p > 0,05$). Esse resultado pode indicar que, para as fitas de amido, as bactérias foram liberadas no fluido quase que em sua totalidade, enquanto que para as fitas de CB, parte das bactérias pode ter ficado retida em sua estrutura, o que poderia ser esperado, considerando que a CB não é digerível e apresenta uma estrutura mais compacta do que o amido (outra explicação seria perda de viabilidade, porém, isto provavelmente implicaria em perda para as duas matrizes, não apenas para a CB).

Após a passagem pela fase intestinal, as bactérias permaneceram viáveis no fluido do duodeno. Mais uma vez, para as fitas de CB, houve diferença significativa entre a contagem no fluido do duodeno e no fluido do estômago (em contraste com as fitas de amido), o que pode indicar menor liberação para o fluido por parte das fitas de CB.

Embora tenha havido essa diferença entre os tratamentos, não houve diferença significativa entre a contagem de probióticos viáveis liberados no fluido do duodeno ao final da incubação para fitas de CB ou de amido (segundo teste t). Segundo os resultados da fase intestinal, as fitas de banana de CB e de amido são capazes de entregar cerca de 7,45 e $7,77 \log \text{UFC g}^{-1}$. Portanto, as duas matrizes foram capazes de entregar uma quantidade alta de *B. coagulans* BC4 no intestino. Se fosse possível elaborar as formulações com uma bactéria não-esporogênica, é possível que se apresentasse alguma diferença significativa

entre as matrizes. Apesar disso, esse resultado é muito positivo e indica que o alimento pode ser considerado probiótico e, portanto, funcional, pois é estimado que um alimento deve entregar entre 7 e 8 log UFC g⁻¹ no intestino (MARCIAL-COBA et al., 2019). Porém, segundo a Resolução da Diretoria Colegiada (RDC) n° 241/2018, além da necessidade da comprovação da sobrevivência das bactérias às condições do TGI, é necessária evidência de seus efeitos em humanos por meio de estudos.

Outros estudos com a CB seriam muito interessantes para verificar, por exemplo, uma potencial atividade prebiótica (NSOR-ANTIDANA et al., 2020) ou até mesmo uma possível liberação controlada dos probióticos no intestino.

A alta sobrevivência de *B. coagulans* após passagem pelo estômago e duodeno se deve ao fato de que os esporos de *B. coagulans* são altamente resistentes às suas condições hostis. O resultado corrobora com diversos estudos, como os de Oliveira *et al.* (2021) e Marcial-Coba *et al.* (2019), que produziram morangos desidratados e tâmaras desidratadas, respectivamente, e conferiram que *Bacillus coagulans* BC4 foram resistentes às condições do estômago e duodeno. Além disso, outros estudos também apontam que esporos de *B. coagulans* são resistentes às condições do estômago e duodeno (ARA et al., 2002; CUTTING, 2011).

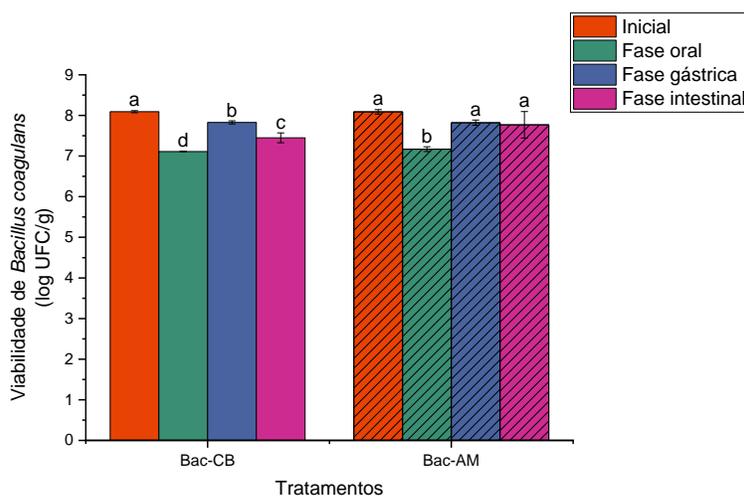


Figura 3.18 Viabilidade dos probióticos (*B. coagulans*) após passagem simulada pelas fases oral, gástrica e intestinal, comparada com a viabilidade inicial nas fitas de banana feitas com CB ou amido.

*Valores seguidos por pelo menos uma letra maiúscula em comum indicam que não há diferença estatística significativa (Tukey, $p > 0,05$) entre os valores dentro do mesmo tratamento. Não houve diferença significativa ($p > 0,05$) entre os tratamentos para valores dentro da mesma fase (inicial, oral, gástrica ou intestinal), segundo avaliado por testes t. Bac-CB e Bac-AM: fitas com *B. coagulans*, matrizes celulose bacteriana e amido respectivamente.

Capítulo 4 – Conclusões

Foi possível produzir fitas de banana com *B. coagulans* mantendo alta viabilidade do probiótico na fita durante o processo de secagem e durante estocagem em temperatura ambiente (25 °C) por cerca de 180 dias, sem perda de viabilidade significativa durante a estocagem. Não houve diferença significativa na perda de viabilidade durante a secagem das fitas e nem na estabilidade dos probióticos durante o período de armazenamento dependendo do tipo de matriz polissacarídica utilizada (amido ou CB). Já no caso das fitas com *L. acidophilus*, houve perda de viabilidade, e a quantidade de bactérias viáveis nas fitas de banana após a secagem ficou abaixo do que é possível estimar ($< 3 \log \text{ UFC g}^{-1}$), para as duas matrizes polissacarídicas testadas. Portanto, *B. coagulans* BC4, por ser esporogênica, mostrou-se uma cepa promissora para utilização neste tipo de produto, enquanto *L. acidophilus* LA-3 não manteve viabilidade suficiente e, portanto, não poderia ser considerada uma cepa adequada para utilização nas fitas de banana (pelo menos se produzidas segundo o método proposto). Para experimentos futuros, indicam-se testes de proteção às bactérias *L. acidophilus*, a fim de verificar e garantir sua viabilidade após o processo de secagem. Porém, é importante ressaltar que o processo de proteção às células pode encarecer o produto, tornando-se inviável quando se considera sua comercialização. Além disso, é necessário verificar se, mesmo com a proteção, as bactérias permaneceriam viáveis durante estocagem em temperatura ambiente. Por isso, a utilização de *B. coagulans*, que não necessita de proteção ou preparação prévia, parece mais promissora.

Durante o teste da passagem simulada das fitas de banana com *B. coagulans* pelo TGI, tanto as fitas de CB quanto de amido liberaram mais do que $7 \log \text{ UFC g}^{-1}$ no duodeno (sem diferenças significativas entre as matrizes, indicando que ambas são adequadas). Esses valores são positivos, já que é estimado que um alimento deve liberar entre 7 e $8 \log \text{ UFC g}^{-1}$ no intestino. No entanto, os resultados estatísticos indicam que as fitas de CB podem ter liberado um pouco menos bactérias nos fluidos digestivos do que as fitas de amido.

Quanto às propriedades físicas, as matrizes polissacarídicas apresentaram diferenças. As fitas de banana com CB tiveram maiores valores de resistência à tração, módulo e força de cisalhamento do que as fitas com amido. No entanto, seriam necessários testes sensoriais para verificar como essas diferenças seriam percebidas na textura, e qual

perfil seria mais apreciado pelos consumidores. A presença de bactéria diminuiu significativamente a resistência e a força de cisalhamento das fitas de banana, especialmente *L. acidophilus*. Esses resultados corroboraram com os difratogramas das fitas, que mostraram que as fitas de CB apresentaram um maior grau de cristalinidade do que as fitas de amido e que a presença de bactérias, em especial de *L. acidophilus*, diminuiu a cristalinidade das fitas.

Por fim, fitas de banana com amido ou CB foram produzidas com sucesso e podem ser um produto promissor como carreador de *B. coagulans* e uma opção de alimento probiótico não-lácteo, restando conhecer a aceitação sensorial de cada formulação para entender qual perfil de textura seria mais apreciado (o que não foi possível em função das restrições impostas pela pandemia de Covid-19).

Muitos estudos seriam necessários para que o produto pudesse chegar ao mercado. Experimentos de produção das fitas por *casting* contínuo, para verificar a possibilidade de aumento no escalonamento de produção (escala semi-industrial) seriam muito importantes. Além disso, como o desempenho probiótico das fitas de banana foi similar quando adicionada de CB ou amido de mandioca, outros fatores precisam ser avaliados para comparar as duas matrizes. Por um lado, o processo de produção de CB ainda é lento e poucas indústrias produzem CB em alta escala. Muitos estudos para otimizar o processo de CB são ainda necessários. Por outro lado, a CB é uma matriz não digerível e, assim, é uma fibra alimentar, podendo trazer diversos benefícios à saúde. Além disso, a CB pode ser um potencial agente prebiótico (tal hipótese precisaria ser estudada), o que poderia trazer mais vantagens a essa matriz polissacarídica, podendo contribuir para o desempenho probiótico das fitas de banana e trazer diversos benefícios à saúde do consumidor. Enquanto isso, o amido de mandioca, apesar de ser digerível, é um polissacarídeo de fácil extração, abundante e de baixo custo, o que poderia favorecer a comercialização das fitas de banana à base de amido.

Referências

ABDULLAH, A. H. D. et al. **Physical and chemical properties of corn, cassava, and potato starches**. IOP Conference Series: Earth and Environmental Science. Institute of Physics Publishing, 18 jun. 2018. Disponível em: <<https://iopscience.iop.org/article/10.1088/1755-1315/160/1/012003>>. Acesso em: 16 jun. 2021

ANVISA. **Alegações de propriedade funcional aprovadas**. Disponível em: <https://www.gov.br/agricultura/pt-br/assuntos/inspecao/produtos-vegetal/legislacao-1/biblioteca-de-normas-vinhos-e-bebidas/alegacoes-de-propriedade-funcional-aprovadas_anvisa.pdf>. Acesso em: 12 jun. 2021.

ARA, K. et al. Effect of spore-bearing lactic acid-forming bacteria (*Bacillus coagulans* SANK 70258) administration on the intestinal environment, defecation frequency, fecal characteristics and dermal characteristics in humans and rats. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 14, n. 1, p. 4–13, 2002.

AZEREDO, H. M. C. et al. Nanocomposite edible films from mango puree reinforced with cellulose nanofibers. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 5, p. 31–35, 2009.

AZEREDO, H. M. C. et al. Bacterial Cellulose as a Raw Material for Food and Food Packaging Applications. **Frontiers in Sustainable Food Systems**, v. 3, n. 7, 18 fev. 2019.

BARUD, H. S. et al. Bacterial cellulose/poly(3-hydroxybutyrate) composite membranes. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, n. 3, p. 1279–1284, 30 jan. 2011.

BASIAK, E.; LENART, A.; DEBEAUFORT, F. Effect of starch type on the physico-chemical properties of edible films. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 98, p. 348–356, 1 maio 2017.

BERGO, P.; SOBRAL, P. J. A.; PRISON, J. M. Effect of glycerol on physical properties of cassava starch films. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 34, n. SUPPL. 2, p. 401–410, maio 2010.

BERSANETI, G. T. et al. Edible films based on cassava starch and fructooligosaccharides produced by *Bacillus subtilis* natto CCT 7712. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 1132–1138, 20 out. 2016.

BLOG EXTRALAB. **Texturômetro no Estudo de Produtos de Surimi (parte 2)**. Disponível em: <<https://blogextralab.wordpress.com/2017/04/19/texturometro-no-estudo-de-produtos-de-surimi-parte-2/>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

BONILLA, J. et al. Properties of wheat starch film-forming dispersions and films as affected by chitosan addition. **Journal of Food Engineering**, v. 114, n. 3, p. 303–312, 2013.

CAI, S. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* CGMCC1.2686 via

emulsification/internal gelation of alginate using Ca-EDTA and CaCO₃ as calcium sources. **Food Hydrocolloids**, v. 39, p. 295–300, 2014.

CHANG-BRAVO, L.; LÓPEZ-CÓRDOBA, A.; MARTINO, M. Biopolymeric matrices made of carrageenan and corn starch for the antioxidant extracts delivery of Cuban red propolis and yerba mate. **Reactive and Functional Polymers**, v. 85, p. 11–19, 2014.

CNA. **Banana é a fruta mais consumida pelos brasileiros.**

COLOM, X. et al. Structural analysis of photodegraded wood by means of FTIR spectroscopy. **Polymer Degradation and Stability**, v. 80, n. 3, p. 543–549, 1 jan. 2003.

CUTTING, S. M. *Bacillus* probiotics. **Food Microbiology**. Academic Press, , 1 abr. 2011.

DAFE, A. et al. Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 97, p. 536–543, 2017.

DAVID, M.; POLIANA, F.; SPRICIGO, C. **Capítulo 1 - Colorimetria - Princípios e aplicações na agricultura.**

DELGADO, G. T. C. et al. Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): A Functional Food. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 68, n. 3, p. 222–228, 2013.

DIAMANTE, L. M.; BAI, X.; BUSCH, J. Fruit Leathers: Method of preparation and effect of different conditions on qualities. **International Journal of Food Science**, v. 2014, 2014.

DIAS, A. B. et al. Biodegradable films based on rice starch and rice flour. **Journal of Cereal Science**, v. 51, n. 2, p. 213–219, 2010.

DONTHIDI, A. R.; TESTER, R. F.; AIDOO, K. E. Effect of lecithin and starch on alginate-encapsulated probiotic bacteria. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 1, p. 67–77, 2010.

DROETKER. **Frutiritas**. Disponível em: <<https://www.oetker.com.br/nossos-produtos/snacks-de-frutas/produktssortiment>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

EBRAHIMI, B. et al. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 54–60, 2018.

ELSHAGHABEE, F. M. F. et al. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1490, 2017.

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. p. 1–11, 2002.

FAO. **Trade and markets: Banana facts and figures**. Disponível em:

- <<http://www.fao.org/economic/est/est-commodities/bananas/bananafacts/en/#.XsB7tGhKjIV>>. Acesso em: 16 maio. 2020.
- FARIAS, M. G. et al. Caracterização físico-química de filmes comestíveis de amido adicionado de acerola (*Malpighia emarginata* D.C.). **Química Nova**, v. 35, n. 3, p. 546–552, 2012.
- FELDMAN, M. et al. **Cultivate Your Probiotic Performance: Market Trends and Innovative Solutions**. 2017.
- FERNANDES, S. C. M. et al. Novel transparent nanocomposite films based on chitosan and bacterial cellulose. **Green Chemistry**, v. 11, n. 12, p. 2023–2029, 3 dez. 2009.
- FIJAŁKOWSKI, K. et al. Survival of probiotic lactic acid bacteria immobilized in different forms of bacterial cellulose in simulated gastric juices and bile salt solution. **LWT - Food Science and Technology**, v. 68, p. 322–328, 1 maio 2016.
- G1. **Banana é a fruta mais consumida no Brasil**. Disponível em: <<https://g1.globo.com/economia/agronegocios/agro-a-industria-riqueza-do-brasil/noticia/banana-e-a-fruta-mais-consumida-no-brasil.ghtml>>. Acesso em: 16 maio. 2020.
- GANEDEN. **A Global Look at the Digestive and Probiotic Market**. Disponível em: <https://explore.ganedenbc30.com/ProbioticMarket2018WP_LandingPage.html>. Acesso em: 30 ago. 2020.
- GIBSON, G. R. et al. Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4–5, p. 139–157, 1999.
- GOMES, J. F. S.; VIEIRA, R. R.; LETA, F. R. Colorimetric indicator for classification of bananas during ripening. **Scientia Horticulturae**, v. 150, p. 201–205, 4 fev. 2013.
- GONG, J. et al. Research on cellulose nanocrystals produced from cellulose sources with various polymorphs. **RSC Advances**, v. 7, n. 53, p. 33486–33493, 3 jul. 2017.
- GRAND VIEW RESEARCH. **Healthy Snacks Market Size Worth \$32.88 Billion By 2025 | CAGR: 5.2%**. Disponível em: <<https://www.grandviewresearch.com/press-release/global-healthy-snack-market>>. Acesso em: 15 jun. 2020.
- HAN, J. H. Edible Films and Coatings: A Review. In: **Innovations in Food Packaging (Second Edition)**. [s.l.] Academic Press, 2014. p. 213–255.

HAQ, M. A.; HASNAIN, A.; AZAM, M. Characterization of edible gum cordia film: Effects of plasticizers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 163–169, 2014.

HEALTH LINE. **Bananas 101: Nutrition Facts and Health Benefits**. Disponível em: <<https://www.healthline.com/nutrition/foods/bananas>>. Acesso em: 5 jul. 2020.

HEINEMANN, R. J. B.; CARVALHO, R. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity - Development of a novel product for oral health. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 19, p. 227–232, 2013.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, n. 2, p. 121–129, 1 mar. 2001.

HILL, C. et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014.

HOMAYOUNI, A. et al. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50–55, 2008.

HYMES, J. P. et al. Functional analysis of an S-layer-associated fibronectin-binding protein in *Lactobacillus acidophilus* NCFM. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82, n. 9, p. 2676–2685, 1 maio 2016.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ (SÃO PAULO). **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4^o edição.

JAFAREI, P.; EBRAHIMI, M. T. *Lactobacillus acidophilus* cell structure and application. **African Journal of Microbiology Research**, v. 5, n. 24, p. 4033–4042, 30 out. 2011.

JÄGER, R. et al. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, n. 4, p. 611–615, 2018.

JANKOVIC, I. et al. Application of probiotics in food products-challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 175–181, 2010.

JARAMILLO, C. M. et al. Biodegradability and plasticizing effect of yerba mate extract on cassava starch edible films. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 150–159, 20 out. 2016.

JENSEN, G. S. et al. Inactivated probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30 induces complex immune activating, anti-inflammatory, and regenerative markers in vitro. **Journal of Inflammation Research**, v. 10, p. 107, 2017.

JIRUKKAKUL, N. The study of edible film production from unripened banana flour and ripened banana puree. **International Food Research Journal**, v. 1, n. 23, 2016.

KADZIŃSKA, J. et al. Influence of vegetable oils addition on the selected physical properties of apple–sodium alginate edible films. **Polymer Bulletin**, v. 77, n. 2, p. 883–900, 2020.

KANMANI, P.; LIM, S. T. Development and characterization of novel probiotic-residing pullulan/starch edible films. **Food Chemistry**, v. 141, n. 2, p. 1041–1049, 2013.

KHORASANI, A. C.; SHOJAOSADATI, S. A. Bacterial nanocellulose-pectin bionanocomposites as prebiotics against drying and gastrointestinal condition. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 83, p. 9–18, 1 fev. 2016.

KONICA MINOLTA SENSING. **Compreendendo o Espaço de Cor CIE L*C*h**. Disponível em: <<https://sensing.konicaminolta.us/br/blog/compreendendo-o-espaco-de-cor-cie-lch/>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

KONURAY, G.; ERGINKAYA, Z. Potential use of *Bacillus coagulans* in the food industry. **Foods**, v. 7, n. 6, p. 92, 2018.

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

LALICIC-PETRONIJEVIC, J. et al. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days. **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 541–550, 2015.

LAOHAKUNJIT, N.; NOOMHORM, A. Effect of plasticizers on mechanical and barrier properties of rice starch film. **Starch-Stärke**, v. 56, n. 8, p. 348–356, 2004.

LI, L. et al. Development and characterization of irradiated-corn-starch films. **Carbohydrate Polymers**, v. 194, p. 395–400, 15 ago. 2018.

LIMA, T. A. DE S.; CASTRO, A. K. F. DE. **ALTERAÇÃO TAXONÔMICA DE ESPÉCIES DO GÊNERO *Lactobacillus***. 2021. Disponível em: <https://www.gov.br/anvisa/pt-br/canais_atendimento>. Acesso em: 17 abr. 2021.

LIN, K. W.; HUANG, H. Y. Konjac/gellan gum mixed gels improve the quality of reduced-fat frankfurters. **Meat Science**, v. 65, n. 2, p. 749–755, 1 out. 2003.

LIU, Z. Edible films and coatings from starches. **Innovations in food packaging**, p. 318–337). Academic Press, 2005.

LÓPEZ DE LACEY, A. M. et al. Functionality of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* incorporated to edible coatings and films. **Innovative Food**

Science and Emerging Technologies, v. 16, p. 277–282, 2012.

MALI, S. et al. Water sorption and mechanical properties of cassava starch films and their relation to plasticizing effect. **Carbohydrate Polymers**, v. 60, n. 3, p. 283–289, 2005.

MALMO, C.; LA STORIA, A.; MAURIELLO, G. Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 Cells Coated in Alginate Beads with Chitosan by Spray Drying to Use as a Probiotic Cell in a Chocolate Soufflé. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 3, p. 795–805, 1 mar. 2013.

MARCIAL-COBA, M. S. et al. Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. **Lwt**, v. 99, n. September 2018, p. 197–201, 2019.

MARTELLI, M. DOS R.; BARROS, T. T.; ASSIS, O. B. G. Filmes de polpa de banana produzidos por batelada: Propriedades mecânicas e coloração. **Polímeros**, v. 24, n. 1, p. 137–142, 2014.

MARTELLI, M. R. et al. Effect of Chitosan Nanoparticles and Pectin Content on Mechanical Properties and Water Vapor Permeability of Banana Puree Films. **Journal of Food Science**, v. 78, n. 1, p. N98–N104, 1 jan. 2013.

MARTIN, M. J. et al. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 480–486, 2013.

MATHEW, S.; BRAHMAKUMAR, M.; ABRAHAM, T. E. Microstructural imaging and characterization of the mechanical, chemical, thermal, and swelling properties of starch-chitosan blend films. **Biopolymers**, v. 82, n. 2, p. 176–187, 5 jun. 2006.

MIMORIARTY. **A space of possibilities: CIELAB**. Disponível em: <<https://mimoriarty.wordpress.com/2011/11/21/a-space-of-possibilities-cielab/>>. Acesso em: 5 jan. 2021.

MIN, M. et al. Non-dairy probiotic food products: An emerging group of functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 59, n. 16, p. 2626–2641, 2019.

MINEKUS, M. et al. A standardised static *in vitro* digestion method suitable for food-an international consensus. **Food and Function**, v. 5, n. 6, p. 1113–1124, 28 maio 2014.

MINTEL. **A indústria de snacks pode aproveitar interesse do consumidor brasileiro por carne**. Disponível em: <<https://brasil.mintel.com/blog/noticias-mercado-alimentos-bebidas/a-industria-de-snacks-pode-aproveitar-interesse-do-consumidor-brasileiro-por-carne>>. Acesso em: 15 jun. 2020.

MOZAFFARZOGH, M. et al. Evaluation of probiotic carboxymethyl cellulose-sodium caseinate films and their application in extending shelf life quality of fresh trout fillets. **LWT**, v. 126, p. 109305, 1 maio 2020.

MU, R. J. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with konjac glucomannan hydrogel. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 42–48, 2018.

NANDANE, A. S.; JAIN, R. Study of mechanical properties of soy protein based edible film as affected by its composition and process parameters by using RSM. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 6, p. 3645–3650, 29 jun. 2015.

NEFFE-SKOCI, K.; RZEPKOWSKA, A.; SZYDŁOWSKA, A. Trends and Possibilities of the Use of Probiotics in Food Production. In: **Alternative and Replacement Foods**. Elsevier, 2018. p. 65–94.

NELSON, D. L.; COX, M. M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 6. ed. Artmed, 2014.

NIH. **Lactose intolerance: Genetics Home Reference**. Disponível em: <<https://ghr.nlm.nih.gov/condition/lactose-intolerance>>.

NIST. **Sodium carboxymethyl cellulose**. Disponível em: <<https://webbook.nist.gov/cgi/formula?ID=B6002711&Mask=80>>. Acesso em: 16 jun. 2021.

NSOR-ATINDANA, J. et al. Enhancing the prebiotic effect of cellulose biopolymer in the gut by physical structuring via particle size manipulation. **Food Research International**, v. 131, p. 108935, 1 maio 2020. OJANSIVU, I.; FERREIRA, C. L.; SALMINEN, S. Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 1, p. 40–46, 2011.

OLIVEIRA-ALCÂNTARA, A. V. et al. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, p. 109699, 2020.

OLIVEIRA, A. S. et al. Dehydrated strawberries for probiotic delivery: Influence of dehydration and probiotic incorporation methods. **LWT**, v. 144, p. 111105, 1 jun. 2021.

OTONI, C. G. et al. Antimicrobial and physical-mechanical properties of pectin/papaya puree/cinnamaldehyde nanoemulsion edible composite films. **Food Hydrocolloids**, v. 41, p. 188–194, 1 dez. 2014.

OTONI, C. G. et al. Recent Advances on Edible Films Based on Fruits and Vegetables—A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 16, n. 5, p. 1151–1169, 2017.

PATHARE, P. B.; OPARA, U. L.; AL-SAID, F. A. J. **Colour Measurement and Analysis in Fresh and Processed Foods: A Review** **Food and Bioprocess Technology** Springer, , 11 maio 2013. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s11947-012-0867-9>>. Acesso em: 5 jan. 2021

PAULA, A. M.; CONTI-SILVA, A. C. Texture profile and correlation between sensory and instrumental analyses on extruded snacks. **Journal of Food Engineering**, v. 121, n. 1, p.

9–14, 1 jan. 2014.

PEREIRA, A. L. S. **Aerogéis de nanocelulose funcionalizados para absorção seletiva de solventes orgânicos**. 2018. Tese (Doutorado em Química) - Centro de Ciências, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, p. 120, 2018.

PEREIRA, J. O. et al. Edible films as carrier for lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 543–550, 2016.

PICHETH, G. F. et al. Bacterial cellulose in biomedical applications: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 104, p. 97–106, 2017.

PIÑEROS-HERNANDEZ, D. et al. Edible cassava starch films carrying rosemary antioxidant extracts for potential use as active food packaging. **Food Hydrocolloids**, v. 63, p. 488–495, 2017.

PINZON, M. I.; GARCIA, O. R.; VILLA, C. C. The influence of Aloe vera gel incorporation on the physicochemical and mechanical properties of banana starch-chitosan edible films. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 98, n. 11, p. 4042–4049, 2018.

RANGEL, A. Pequenas empresas de produtos vegetarianos crescem 40% ao ano. **Folha de S. Paulo**, 2016.

REINIATI, I.; HRYMAK, A. N.; MARGARITIS, A. Recent developments in the production and applications of bacterial cellulose fibers and nanocrystals. **Critical Reviews in Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 510–524, 19 maio 2017.

RITTER, P.; KOHLER, C.; AH, U. VON. Evaluation of the passage of *Lactobacillus gasserii* K7 and bifidobacteria from the stomach to intestines using a single reactor model. **BMC Microbiology**, v. 9, n. 87, 8 maio 2009.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**. Academic Press, , 1 fev. 2010.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BÓRQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus*. **Drying Technology**, v. 27, n. 1, p. 123–132, 2009.

ROMANO, N. et al. Edible methylcellulose-based films containing fructo-oligosaccharides as vehicles for lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 560–566, 2014.

SAJILATA, M. G.; SINGHAL, R. S.; KULKARNI, P. R. Resistant Starch — A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 5, n. 1, p. 1–17, 2006.

SANDERS, M. E.; KLAENHAMMER, T. R. Invited review: The scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal of Dairy Science**, v. 84, n. 2, p. 319–331, 2001.

SEBRAE. **Conheça o mercado da bananicultura.** Disponível em: <<https://www.sebrae.com.br/sites/PortalSebrae/artigos/conheca-o-mercado-da-bananicultura,187b9e665b182410VgnVCM100000b272010aRCRD>>. Acesso em: 16 maio. 2020.

SETLOW, P. Spores of *Bacillus subtilis*: Their resistance to and killing by radiation, heat and chemicals. **Journal of Applied Microbiology**, v. 101, n. 3, p. 514-525, 2006.

SHU, G. et al. Characterization of freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* in goat milk powder and tablet: Optimization of the composite cryoprotectants and evaluation of storage stability at different temperature. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 70–76, 2018.

SILVA-CARVALHO, R. et al. Inhalation of Bacterial Cellulose Nanofibrils triggers an inflammatory response and changes lung tissue morphology of mice. **Toxicological Research**, v. 35, n. 1, p. 45–63, 2019.

SNACK HISTORY. **Fruit Roll-Ups — Snack History.** Disponível em: <<https://www.snackhistory.com/fruit-rollups>>. Acesso em: 1 jul. 2020.

SÓ SNACKS. **Lanche sem glúten.** Disponível em: <<https://www.sosnacks.com.br/>>. Acesso em: 16 maio. 2020.

SOTHORNVIT, R.; PITAK, N. Oxygen permeability and mechanical properties of banana films. **Food Research International**, v. 40, n. 3, p. 365–370, 2007.

SOTHORNVIT, R.; RODSAMRAN, P. Effect of a mango film on quality of whole and minimally processed mangoes. **Postharvest Biology and Technology**, v. 47, n. 3, p. 407–415, 2008.

STABLE MICRO SYSTEMS. **Measure Chewiness | Texture Analyser.** Disponível em: <<https://www.stablemicrosystems.com/MeasureChewiness.html>>. Acesso em: 10 jan. 2021.

SU, Y. et al. Spray drying of *Lactobacillus rhamnosus* GG with calcium-containing protectant for enhanced viability. **Powder Technology**, v. 358, p. 87–94, 2019.

TALJA, R. A. et al. Effect of various polyols and polyol contents on physical and mechanical properties of potato starch-based films. **Carbohydrate Polymers**, v. 67, n. 3, p. 288–295, 2007.

TILAK, J. et al. Bacterial Cellulose Nano Fiber (BCNF) as carrier support for the immobilization of probiotic, *Lactobacillus acidophilus* 016. **Carbohydrate Polymers**, p. 116965, 20 ago. 2020.

TORTORA, G. J.; CASE, C. L.; FUNKE, B. R. **Microbiologia - 12ª Edição.** Artmed Editora, 2016.

TSEN, J. H.; KING, V. A. E. Density of banana puree as a function of soluble solids concentration and temperature. **Journal of Food Engineering**, v. 55, n. 4, p. 305–308, 2002.

VANDEPLAS, Y.; HUYS, G.; DAUBE, G. Probiotics: An update. **Revista Cubana de Pediatría**. Editorial Ciencias Médicas, , 1 abr. 2015.

VIANA, R. M. et al. Nanofibrillated bacterial cellulose and pectin edible films added with fruit purees. **Carbohydrate Polymers**, v. 196, p. 27–32, 2018.

VOET, D.; VOET, J. G.; PRATT, C. W. **Fundamentos de Bioquímica: a vida em nível molecular**. 4. ed. Artmed, 2014.

WALTON, G. E.; GIBSON, G. R.; HUNTER, K. A. Mechanisms linking the human gut microbiome to prophylactic and treatment strategies for COVID-19. **British Journal of Nutrition**, p. 1–9, 2020.

WANG, Y. et al. Enhanced thermal stability of lactic acid bacteria during spray drying by intracellular accumulation of calcium. **Journal of Food Engineering**, v. 279, p. 109975, 1 ago. 2020.

XU, Y. X. et al. Chitosan-starch composite film: Preparation and characterization. **Industrial Crops and Products**, v. 21, n. 2, p. 185–192, 1 mar. 2005.

YAO, M. et al. Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 19, n. 2, p. 857–874, 2020.

YEASMIN, M. S.; MONDAL, M. I. H. Synthesis of highly substituted carboxymethyl cellulose depending on cellulose particle size. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 725–731, 1 set. 2015.

ZHENG, J. et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 15 abr. 2020.

ZHENG, X. et al. Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique. **Food Research International**, v. 90, p. 226–234, 1 dez. 2016.

Apêndice A – Testes Preliminares

1 Testes preliminares para preparação da polpa de banana

O primeiro passo dos testes preliminares foi definir o melhor método de preparo da polpa de banana, de forma a garantir que ela conferisse às fitas um sabor intenso e bem aceito de banana, assim como uma textura bem aceita. Embora não tenha sido feita uma avaliação sensorial formal nesta etapa, os colegas do laboratório avaliaram informalmente as polpas e fitas obtidas a partir dos testes aqui descritos, para definir o melhor tratamento.

As bananas nanicas foram previamente lavadas com detergente neutro e descascadas. Foram testadas bananas com dois diferentes graus de maturação, de acordo com a escala de Von Loesecke (GOMES et al., 2013): maturação C6 (ou seja, com as cascas amareladas) e C7 (com cascas amarelas e manchas marrons). Além disso, as bananas foram submetidas a três tratamentos alternativos para obtenção de purês: (a) corte em fatias e branqueamento em água em ebulição por 1 min seguido por imersão em solução de ácido cítrico 1% por 3 min, finalizando com trituração; (b) corte em fatias e branqueamento em água em ebulição por 7 min, seguindo a metodologia de Tsen e King (2002), finalizando com trituração; (c) trituração manual, seguida por cozimento em tacho aberto até atingir 60 °Brix. Os dois primeiros tratamentos visavam obter polpa com propriedades sensoriais (cor e sabor) mais próximas de banana fresca, o branqueamento tendo o objetivo principal de inativar a polifenol oxidase, inibindo o escurecimento enzimático. Por outro lado, o tratamento (c) visou a obtenção de um doce de banana, com sabor mais concentrado e características sensoriais de banana processada. Adicionalmente, foram testadas incorporações de componentes adicionais ao purê de banana, a saber: polpa de morango, suco de maracujá, canela em pó e óleo essencial de canela.

Os diferentes purês foram usados para elaborar fitas de banana segundo a seguinte formulação: 5 g de polpa de banana, 0,5 g de amido de mandioca, 0,5 g de glicose de milho, 10 mL de água destilada (quantidade determinada verificando a viscosidade da solução). As misturas foram homogeneizadas utilizando-se um Ultra Turrax T18 digital (Ika) a 12.000 rpm por 5 min e vertidas em placas de Petri, para posterior secagem em estufa com circulação de ar a 50 °C por 16 h.

O purê obtido a partir de banana com grau de maturação C7, submetida ao tratamento de cozimento em tacho aberto por 85 °C e sem quaisquer componentes adicionais resultou nas fitas mais bem aceitas pelos colegas do laboratório (Figura A.1). As fitas ficaram flexíveis, adocicadas e com o sabor mais intenso de banana madura (de acordo com a equipe do laboratório). Este tratamento foi então definido como padrão para a elaboração das fitas.



Figura A.1 Foto da fita de amido com banana cozida.

2 Testes para obtenção da suspensão de CB

Foram feitos diversos testes para obtenção da suspensão de CB. Por causa da alta densidade de ligações de hidrogênio entre as cadeias de CB, o pó obtido após trituração de CB não redispersa em água (formando agregados), a menos que seja oxidada (para incorporação de cargas). Uma metodologia muito utilizada é a oxidação da CB mediada por TEMPO (catalisador radical 2,2,6,6-tetrametilpiperidina-1-oxil) (PEREIRA, 2018). Porém, o radical TEMPO, além do seu custo elevado, é bastante tóxico, não sendo adequado para utilização em alimentos (a menos que a CB seja posteriormente submetida a algum tratamento que garanta a completa eliminação de resíduos de TEMPO). Outra opção é misturar o pó de CB a um polímero eletricamente carregado, de forma a promover dispersão entre as cadeias. Baseado no estudo de Silva-Carvalho *et al.* (2019), em que os autores modificaram CB com sal sódico de carboximetilcelulose (CMC) usando microfluidização, foi testado o seguinte método: adicionar pó de CB e CMC em água destilada em proporção de (1:1) e homogeneizar com o auxílio de um Ultra-Turrax. A CB dispersou na água e a mistura ficou homogênea. Filmes da mistura foram feitos por *casting* para testar sua homogeneidade. Então, diversos testes com outras proporções CB:CMC foram feitos (para que a formulação final tivesse a maior proporção possível de CB em relação a CMC). A proporção de massa de 5:1 (CB/CMC) foi então escolhida. A

concentração de CB/CMC em água também foi escolhida baseada em outros testes preliminares, para chegar em viscosidade adequada para obtenção das fitas por *casting*. A concentração de 4% (massa/volume) foi escolhida.

3 Testes preliminares para determinação do protocolo da produção das fitas de banana

Testes também foram feitos para determinar as proporções que seriam utilizadas na formulação das fitas, assim como a quantidade de solução filmogênica que deveria ser adicionada em formas para obtenção de fitas com a espessura desejada (0,8 a 1,0 mm).

O método de secagem também foi testado. A princípio, foi utilizada estufa com circulação de ar a 50 °C para secagem mais rápida das fitas. Porém, devido à circulação de ar, as fitas resultantes apresentavam rachaduras. Assim, foi determinada a utilização de estufa sem circulação de ar, a 50 °C (para temperaturas mais baixas, o processo de secagem ficou muito lento), por 26 h.

Além disso, experimentos preliminares de contagem de probióticos também foram realizados, para verificar a melhor metodologia para a contagem.