



UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE  
CENTRO DE TECNOLOGIA E RECURSOS NATURAIS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA AGRÍCOLA

## **DISSERTAÇÃO**

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PROCESSAMENTO E ARMAZENAMENTO DE  
PRODUTOS AGRÍCOLAS

**MICROENCAPSULAÇÃO PROBIÓTICA DA POLPA DA AMEIXA POR  
LIOFILIZAÇÃO**

**MAILSON GONÇALVES GREGÓRIO**

**CAMPINA GRANDE-PB**

**JULHO 2021**

# **MICROENCAPSULAÇÃO PROBIÓTICA DA POLPA DA AMEIXA POR LIOFILIZAÇÃO**

**MAILSON GONÇALVES GREGÓRIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da Universidade Federal de Campina Grande, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Agrícola.

ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas

**ORIENTADORA:** Profa. Dr<sup>a</sup>. Ana Paula Trindade Rocha

**CAMPINA GRANDE-PB**

**JULHO 2021**

G821m Gregório, Mailson Gonçalves.  
Microencapsulação probiótica da polpa da ameixa por liofilização /  
Mailson Gonçalves Gregório. – Campina Grande, 2021.  
85 f. : il. color.

Dissertação (Mestrado em Engenharia Agrícola) – Universidade  
Federal de Campina Grande, Centro de Tecnologia e Recursos Naturais,  
2021.

“Orientação: Profa. Dra. Ana Paula Trindade Rocha”.  
Referências.

1. Ameixa (*Prunus salicina lindl*) – Microencapsulação Probiótica.  
2. Alimentos Funcionais. 3. Microencapsulação. 4. Liofilização – Polpa  
de Ameixa. 5. Alimentos Probióticos. 6. Bactéria Probiótica (*B. animalis*  
*subsp. Lactis*). 7. Processamento e Armazenamento de Produtos  
Agrícolas. I. Rocha, Ana Paula Trindade. II. Título.

CDU 634.22:631.563.8(043)



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
**UNIVERSIDADE FEDERAL DE CAMPINA GRANDE**  
POS-GRADUACAO EM ENGENHARIA AGRICOLA  
Rua Aprigio Veloso, 882, - Bairro Universitario, Campina Grande/PB, CEP 58429-900

## FOLHA DE ASSINATURA PARA TESES E DISSERTAÇÕES

**MAILSON GONÇALVES GREGÓRIO**

MICROENCAPSULAÇÃO PROBIÓTICA DA  
POLPA DA AMEIXA POR LIOFILIZAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de  
Pós-Graduação em Engenharia Agrícola  
como pré-requisito para obtenção do título  
de Mestre em Engenharia Agrícola.

Aprovada em: 27/07/2021

Ana Paula Trindade Rocha – Orientadora – PPGEA/CTRN/UFCG

Josivanda Palmeira Gomes – Examinadora Interna - UAEA/CTRN/UFCG

Francinalva Cordeiro de Sousa - Examinadora Externa - IFPE

Deyzi Santos Gouveia - Examinadora Externa - UAEAl/UFCG



Documento assinado eletronicamente por **JOSIVANDA PALMEIRA GOMES, PROFESSOR 3 GRAU**, em 30/07/2021, às 16:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **Francinalva Cordeiro de Sousa, Usuário Externo**, em 30/07/2021, às 20:35, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



Documento assinado eletronicamente por **DEYZI SANTOS GOUVEIA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 02/08/2021, às 19:34, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).

Documento assinado eletronicamente por **ANA PAULA TRINDADE ROCHA, PROFESSOR 3 GRAU**, em 09/08/2021, às 15:11, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 8º, caput, da [Portaria SEI nº 002, de 25 de outubro de 2018](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site <https://sei.ufcg.edu.br/autenticidade>, informando o código verificador **1672632** e o código CRC **72EE030E**.

Referência: Processo nº 23096.043816/2021-44

SEI nº 1672632

***Dedicatória***

*Aos meus pais, Maria Gonçalves Gregório e Milton Gregório da Silva*

*Por serem minha fortaleza em todos os momentos.*

## **AGRADECIMENTOS**

Primeiramente agradeço a Deus pelo o dom da vida e por ter me abençoando com muita saúde para realizar este trabalho. Toda honra e toda glória a ti, Senhor.

Aos meus pais, Maria Gonçalves Gregório e Milton Gregório da Silva, por todos os ensinamentos repassados e incentivos a educação como instrumento transformação.

Aos meus irmãos, Mailton Gregório Gonçalves e Myrtha Saialla Gregório Gonçalves, por todo companheirismo e união em todos os momentos da minha vida.

A minha orientadora, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Ana Paula Trindade Rocha, por me receber e acolher de forma fraterna em seu núcleo de pesquisa, pela confiança a mim depositada e por repassar conhecimentos, paciência e dedicação ao longo desses dois anos.

A Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Alfredina Dos Santos Araújo e toda sua equipe do Centro Vocacional Tecnológico (CVT) por me receber nas instalações de seu laboratório para realização de boa parte das análises realizadas nesta pesquisa.

Em nome da Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Josivanda Palmeira Gomes, estendo meus agradecimentos aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Engenharia Agrícola da linha de pesquisa de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas, por repassarem todos os conhecimentos técnicos necessários de maneira sublime.

As minhas amigas de laboratório, Thais Jaciane Araújo e Aline Pacheco Albuquerque, por toda amizade e companheirismo durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo/ irmão, Luís Paulo Firmino Romão, por toda parceria e amizade firmada desde da graduação, sou eternamente grato por toda ajuda e tempo que dedicou no decorrer do experimento.

Aos meus amigos Airton Gonçalves de Oliveira e Francisco Jean da Silva Paiva, meu respeito a gratidão a vocês por serem meus parceiros de vida acadêmica e pessoal e pelo o fortalecimento da nossa amizade.

Ao meu amigo de sempre Francisco Alves da Fonseca Júnior, por todos os incentivos, conselhos e paciência durante este período de desenvolvimento desta pesquisa. A você, minha eterna gratidão.

Aos meus amigos Nágela Maria Henrique Mascarenhas, Raimundo Calixto Martins Rodrigues, Daniele Ferreira de Melo e Karoline Carvalho Dornelas, sou grato por ter a amizade de cada um vocês, foram as melhores amizades que ganhei no mestrado.

Aos meus amigos Moises Sesion, Lídia Paloma e Morgana Aragão, por toda ajuda em determinados momentos da minha vida acadêmica.

A todo quadro profissional do Laboratório de Armazenamento e Processamento de Produtos Agrícolas (LAPPA), Laboratório de Engenharia de Alimentos (LEA) e Laboratório Tecnologia do Frio.

A Universidade Federal de Campina Grande por todo suporte para realização desta pesquisa.

A Capes pelo apoio financeiro.



Ebezéner, até aqui nos ajudou o Senhor

Samuel 7:12

## SUMÁRIO

<b>LISTA DE TABELA .....</b>	<b>viii</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>ix</b>
<b>ABSTRACT .....</b>	<b>xi</b>
<b>1. INTRODUÇÃO .....</b>	<b>13</b>
<b>1.1 OBJETIVOS .....</b>	<b>15</b>
1.1.1 Objetivo geral .....	15
1.1.2 Objetivos específicos .....	15
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>16</b>
2.1 A ameixa.....	16
2.2 Composição química e nutricional da ameixa .....	17
2.3 Alimentos funcionais.....	18
2.3. Alimentos probióticos .....	19
2.4.1 Alimentos probióticos não lácteo .....	20
2.5 Bifidobacterium .....	21
2.6 Microencapsulação .....	22
2.7 Liofilização .....	23
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>25</b>
3.1 Matéria-prima .....	25
3.2 Processamento da ameixa.....	25
3.2.1 Recepção e sanitização dos frutos .....	26
3.2.2 Corte e despulpamento .....	26
3.2.3 Pasteurização da polpa da ameixa .....	26
3.2.4 Neutralização da polpa (pH 7,0).....	26
3.2.5 Inoculação da bactéria probiótica .....	26
3.2.6 Processo de congelamento.....	27
3.2.7 Planejamento fatorial para microencapsulação por liofilização e otimização do	

processo .....	27
3.2.8 Microencapsulação por liofilização.....	28
3.3.1 Rendimento do processo de microencapsulação .....	28
3.3.2 Contagem das células viáveis na polpa <i>in natura</i> e encapsulada .....	29
3.3.4 Eficiência da encapsulação .....	29
3.4 Caracterização da polpa da ameixa <i>in natura</i> , fermentada e encapsulada .....	30
3.5.1 Caracterização físico-química .....	30
3.6.2 Caracterização química.....	31
3.7 Propriedades físicas .....	32
3.8 Armazenamento.....	33
3.9 Análise estatística .....	33
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>35</b>
<b>4. RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>46</b>
<b>ARTIGO 1.....</b>	<b>46</b>
<b>VIABILIDADE PROBIÓTICA DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS B94 EM POLPA DE AMEIXA .....</b>	<b>46</b>
RESUMO .....	46
1. INTRODUÇÃO.....	48
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	50
2.1 Obtenção da polpa da ameixa.....	50
2.2 Inoculação da polpa da ameixa com probióticos.....	50
2.3 Caracterização da físico-química polpa probiótica e <i>in natura</i> .....	51
2.4 Contagem das células probióticas.....	51
2.5 Análise estatística .....	51
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	52
4. CONCLUSÕES .....	56
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	57

<b>ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DA AMEIXA PROBIÓTICA POR LIOFILIZAÇÃO .....</b>	<b>61</b>
1. INTRODUÇÃO.....	63
2. MATERIAL E MÉTODOS.....	65
2.1 Obtenção da polpa da ameixa.....	65
2.2 Formulação e inoculação da cultura probiótica na polpa .....	65
2.3 Otimização do processo de microencapsulação .....	65
2.4 Microencapsulação por liofilização.....	66
2.5 Rendimento do processo.....	66
2.6 Viabilidade celular.....	67
2.7 Eficiência do encapsulamento .....	67
2.8 Propriedades físicas do material encapsulado .....	67
2.8 Caracterização físico-química .....	68
2.9 Viabilidade celular durante o armazenamento .....	68
2.10 Análise estatística .....	68
3. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	69
3.1 Caracterização físico-química .....	69
3.2 Caracterização fitoquímica.....	70
3.3 Propriedades físicas .....	72
3.4 Otimização do processo de microencapsulação da polpa da ameixa probiótica .....	73
3.5 Viabilidade celular na polpa probiótica.....	73
3.6 Rendimento do processo.....	75
3.7 Eficiência da microencapsulação por liofilização .....	77
3.8 Armazenamento da polpa em pó probiótica.....	78
4. CONCLUSÕES.....	79
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	81

## LISTA DE TABELA

**Tabela 2.2.** Composição da ameixa

**Tabela 3.1.** Níveis reais e codificados das variáveis de entrada.

**Tabela 3.2.** Variáveis independentes e seus níveis - Planejamento Fatorial-Microencapsulação por liofilização

### ARTIGO 1

**Tabela 1.** Formulação da polpa da ameixa probiótica com diferentes concentrações de maltodextrina e inulina

**Tabela 2.** Caracterização físico-química da polpa da ameixa probiótica e *in natura*

**Tabela 3.** Caracterização fitoquímica das amostras e *in natura* da ameixa e viabilidade das células probióticas

### ARTIGO 2

**Tabela 1.** Matriz do planejamento fatorial do processo de microencapsulação por liofilização

**Tabela 2.** Caracterização físico-química das microcápsulas da ameixa probiótica

**Tabela 3.** Caracterização dos compostos bioativos das microcápsulas da ameixa probiótica

**Tabela 4.** Propriedades físicas das microcápsulas da ameixa probiótica

**Tabela 5.** Avaliação da viabilidade da *B. animalis subsp* (UFC/g) nas microcápsulas da ameixa probiótica

## RESUMO

O presente trabalho teve como objetivo elaborar microcápsulas da polpa da ameixa probiótica não láctea por liofilização, por meio da adição da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis subsp. Lactis*, utilizando diferentes concentrações de maltodextrina e inulina (3, 5, 7%), e submetidos posteriormente a diferentes temperaturas de congelamento (-50, -100 e -150 °C) e tempos de congelamento (2, 4 e 6 horas). As amostras da polpa da ameixa *in natura*, fermentada e as microcápsulas foram caracterizadas quanto aos parâmetros físico-químicos, rendimento, compostos bioativos e análises tecnológicas. As microcápsulas também foram submetidas a testes de viabilidade da bactéria probiótica (*B. animalis subsp. Lactis*) durante o armazenamento a uma temperatura de 25°C. Um planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com pontos centrais totalizando 11 experimentos, visando a otimização do processo de secagem. A liofilização das microcápsulas foi realizada em liofilizador de bancada durante de 48 horas. O processo de microencapsulação da ameixa probiótica demonstrou-se ótima eficiência com relação a remoção água livre presente nesta matriz alimentar, uma vez que as polpas da ameixa probiótica líquida obteve valores de teor de água acima de 87% e após o processo de microencapsulação por liofilização, as microcápsulas apresentaram valores abaixo de 3.76% e conseqüentemente valores reduzidos foram obtidos para atividade de água, o que promove melhor estabilidade para as microcápsulas durante o processo de armazenamento. Além disso, a redução do teor de água da polpa probiótica líquida promoveu as microcápsulas aumento na concentração dos ácidos orgânicos, uma vez que as microcápsulas possuem maiores teores em relação a acidez totais. Com relação aos teores dos compostos bioativos, todos os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa, possuem valores com elevada concentração, porém os compostos fenólicos totais e os taninos possuem destaque nesta, uma vez que foram os componentes orgânicos com maiores concentração quanto para as amostras da polpa líquida como para as microcápsulas. Com relação a viabilidade celular da bactéria probiótica, a polpa líquida obteve valores máximos variando de 2,98x10<sup>11</sup> a 2,88x10<sup>11</sup>(UFC/ml) para as formulações desenvolvidas com as menores concentrações de maltodextrina e inulina (agentes carreadores). Para as microcápsulas probióticas, as variáveis independentes do processo de microencapsulação, promoveu efeito significativo, tendo em vista que os experimentos submetidos a menores temperaturas com maior tempo de congelamento e maiores concentrações dos agentes carreadores, apresentaram maiores concentrações de células

viáveis. Comportamento semelhante foi observado para a eficiência do processo por apresentar efeito significativo, com valor máximo de 97%. O processo de microencapsulação por liofilização resultou com taxas de rendimentos bem reduzidas em todos os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa, sem efeitos significativos. Durante o armazenamento das microcápsulas da ameixa probiótica, ocorreu uma redução natural em relação a viabilidade da bactéria probiótica, porém ao término do período de 28 dias de armazenamento, as microcápsulas não apresentaram redução em seu ciclo logaritmo, o pode ser considerado alimento com propriedades probióticas.

**Palavras-chave:** *Prunus salicina lindl*; ameixa; *Bifidobacterium animalis ssp*; alimentos funcionais; microencapsulação; liofilização.

## ABSTRACT

The present work had as objective to elaborate microcapsules of the pulp of the non-dairy probiotic plum by lyophilization, through the addition of the probiotic bacterium *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*, using different concentrations of maltodextrin and inulin (3, 5, 7%), and subsequently subjected to different freezing temperatures (-50, -100 and -150 °C) and freezing times (2, 4 and 6 hours) . The fresh and fermented plum pulp samples and the microcapsules were characterized in terms of physicochemical parameters, yield, bioactive compounds and technological analysis. The microcapsules were also submitted to viability tests of the probiotic bacteria (*B. animalis* subsp. *Lactis*) during storage at a temperature of 25°C. A 2<sup>3</sup> factorial design with central points totaling 11 experiments, aimed at optimizing the drying process. The lyophilization of the microcapsules was carried out in a benchtop lyophilizer for 48 hours. The microencapsulation process of the probiotic plum showed great efficiency in relation to the removal of free water present in this food matrix, since the pulps of the liquid probiotic plum obtained water content values above 87% and after the microencapsulation process by freeze drying , the microcapsules presented values below 3.76% and consequently reduced values were obtained for water activity, which promotes better stability for the microcapsules during the storage process. Furthermore, the reduction in the water content of the liquid probiotic pulp promoted an increase in the concentration of organic acids in the microcapsules, since the microcapsules have higher contents in relation to total acidity. Regarding the contents of bioactive compounds, all the experiments carried out in this research have values with high concentration, but the total phenolic compounds and tannins stand out in this, since they were the organic components with the highest concentration as for the liquid pulp samples as for the microcapsules. Regarding the cell viability of the probiotic bacteria, the liquid pulp obtained maximum values ranging from 2.98x10<sup>11</sup> to 2.88x10<sup>11</sup>(CFU/ml) for the formulations developed with the lowest concentrations of maltodextrin and inulin (carrier agents). For the probiotic microcapsules, the independent variables of the microencapsulation process, promoted a significant effect, considering that the experiments submitted to lower temperatures with longer freezing time and higher concentrations of carrier agents, had higher concentrations of viable cells. A similar behavior was observed for the efficiency of the process as it presents a significant effect, with a maximum value of 97%. The freeze-drying microencapsulation process resulted in very low yield rates in all the experiments



carried out in this research, with no significant effects. During the storage of the probiotic plum microcapsules, there was a natural reduction in relation to the viability of the probiotic bacteria, but at the end of the 28-day storage period, the microcapsules showed no reduction in their logarithmic cycle, which can be considered food with probiotic properties.

**Keywords:** *Prunus salicina* lindl; plum; *Bifidobacterium animalis* ssp; functional foods; microencapsulation; lyophilizatio.

## 1. INTRODUÇÃO

A ameixa é uma das frutas mais populares do mundo e possui um papel importante no desenvolvimento e na manutenção da economia agrícola. A ameixa japonesa (*Prunus salicina*. Lindl.) contém em sua composição química elevada concentração de compostos bioativos, principalmente carotenoides, polifenóis, vitamina C e antocianinas. As ameixas são colhidas na fase inicial da maturação e armazenadas sob refrigeração. No entanto as ameixas possuem alto grau de deterioração, em que boa parte dos frutos se perdem durante a colheita, transporte e armazenamento. Com isso, surge a necessidade de estudar e aplicar tecnologias que tem como objetivo conservar as propriedades nutricionais, além de prolongar a vida útil do produto (ALET et al., 2014; EL-SHARKAWY et al., 2016; PAN et al., 2016).

Os compostos bioativos presentes nas frutas são sensíveis e prolongar suas funções biológicas é de suma importância. A fermentação da polpa de frutas utilizando culturas probióticas, como *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* promove a conservação desses compostos (VARELO-CASES et al., 2017). Com ação de algumas enzimas específicas durante a fermentação, as bactérias probióticas tem a capacidade de liberar os fenólicos juntamente com outros componentes, principalmente alguns tipos de açúcares (DELGADO et al., 2019; KAPRASOB et al., 2017).

As polpas de frutas fermentadas utilizando bactérias probióticas são uma ótima opção para o consumo de alimentos probióticos com potencial funcional, especialmente para as pessoas que possuem algum tipo de restrição alimentar com relação a ingestão de alimentos à base de lactose e caseína. Porém, após o processo de fermentação ocorre a redução natural na taxa de sobrevivência das células viáveis das bactérias probióticas, sendo considerado uma das desvantagens do processo. Portanto, a aplicação da encapsulação é de extrema importância na manutenção dessas bactérias, além de aumentar a vida útil do produto (VIVEK et al., 2019; MANSOURIPOUR et al., 2013).

A encapsulação por liofilização é um processo de secagem a frio onde uma determinada substância é desidratada por sublimação. A secagem por liofilização possui três etapas distintas sendo a primeira o congelamento, seguido pela primeira secagem e por fim ocorre a secagem secundária (FISSORE et al., 2019).

A liofilização possui várias vantagens e é considerado um dos melhores métodos de conservação de bactérias benéficas. No entanto, algumas etapas da liofilização necessitam de melhorias, para que os resultados sejam os melhores possíveis. Durante as etapas da liofilização, a exposição não otimizada do material a ambientes extremos possui efeito negativo na integridade na parede celular (DIANAWATI et al., 2013; WANG et al., 2019). As mudanças podem promover danos na fisiologia e reduzir várias funções biológicas das células. Todas as variáveis do processo devem ser otimizadas, incluindo as diferentes condições de congelamento-descongelamento, temperatura da amostra e temperatura de pré-congelamento, além disso a sensibilidade da cepa probiótica deve ser considerada quando submetido ao processo de liofilização (POLO et al., 2017; WANG et al., 2019).

Diante do exposto, surge a necessidade em estudar e desenvolver um novo produto alimentício a partir do crescimento da bactéria probiótica da ameixa, analisando a melhor eficiência do processo com relação ao número de células viáveis, rendimento do processo de encapsulação, além de analisar a composição química, físico-química e propriedades tecnológicas.

## **1.1 OBJETIVOS**

### **1.1.1 Objetivo geral**

Microencapsular probióticos pelo processo de liofilização utilizando malrodextrina como agente encapsulante e inulina como agente probiótico em polpa de ameixa.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Analisar as características químicas e físico-química da ameixa *in natura*;
- Avaliar o efeito da adição das diferentes concentrações dos agentes carreadores (maltodextrina e inulina) na viabilidade celular e nas características físico-química da polpa probiótica;
- Realizar o processo microencapsulação da polpa da ameixa probiótica por liofilização;
- Caracterização físico-química e química das microcápsulas da ameixa probiótica;
- Estudar os efeitos das condições operacionais do processo de microencapsulação por liofilização em relação ao rendimento do processo, viabilidade celular e eficiência da microencapsulação;
- Avaliar as propriedades físicas das microcápsulas;
- Analisar a viabilidade da bactéria probiótica durante o período de armazenamento.

## 2. Revisão Bibliográfica

### 2.1 A ameixa

O gênero *Prunus* possui mais de 400 espécies identificadas, dentre elas as ameixas, pêssegos, amêndoas e cerejeiras apresentam destaque devido a sua importância comercial em todo o planeta. Entre as diferentes espécies de ameixas, a ameixeira japonesa (*Prunus salicina* Lindl) é considerada uma das espécies com maior potencial de venda no comércio internacional. Esta espécie foi introduzida e é cultivada em boa parte do mundo, em diferentes climas, sendo inserida em boa parte da América do Norte e na China no século 19. Grande parte das ameixas cultivadas no mundo, fazem parte das seleções oriundas da Califórnia no final do século 19 e início do século 20 (DAS, 2012; MNEJJA et al., 2004).



**Figura 2.1-** ameixa japonesa (*Prunus salicina* Lindl)

Fonte: CEAGESP, 2021.

As ameixas pertencem a família das Rosáceas, fazendo parte de uma enorme classificação de frutos dicotiledôneas. A ameixa é uma das frutas mais cultivadas em todo mundo, ocupando uma área de 2,61 milhões de hectares e apresentando uma produção 11,76 milhões de toneladas por ano. Países como China, Romênia, Estados Unidos, Sérvia, e Irã são os maiores produtores e exportadores dessa fruta (FAOSTAT, 2018).

No Brasil, o cultivo da ameixa está em constante crescimento ocupando uma área de produção em torno de 4.415 hectares. A produção dessa fruta possui influência positiva na economia, uma vez que o cultivo da ameixa é responsável por gerar empregos e renda nas fazendas. O cultivo da ameixa em solo brasileiro está concentrado região sul e sudeste do país, sendo os maiores produtores os Estados do Rio Grande do Sul, Santa Catarina, Paraná, São Paulo Minas Gerais, onde é produzida ameixas de cultivares japonesas. No

entanto, a produção interna não é suficiente para atender todas as demandas existentes de consumo, sendo assim é necessário importar uma boa quantidade de frutos com a finalidade de suprir a deficiência na produção interna (KLEINA et al., 2019).

A ameixa apresenta ampla aceitabilidade pelos consumidores, porém a produção interna não atende à demanda nacional, sendo necessária a importação de países vizinhos, como o Chile e a Argentina. Entre os anos de 2015 e 2017, as importações cresceram 27,5%. Somente no ano de 2017, aproximadamente 12.600 toneladas de ameixas foram importadas. Por outro lado, as exportações foram baixas, chegando a apenas 1.700 toneladas no mesmo ano. Dados estes números, é nítido que o mercado brasileiro de ameixas frescas apresenta grande potencial de expansão e boas perspectivas de investimento (AGROSTAT/MAPA, 2018).

## **2.2 Composição química e nutricional da ameixa**

A elevada taxa de consumo da ameixa em todo mundo tem total relação com suas características sensoriais, além de apresentar em sua composição química vários elementos que são de suma importância para as funções biológicas do organismo humano (WANG et al., 2018).

As ameixas possuem elevada concentração de compostos bioativos, tais como vitamina C, carotenoides totais, antocianinas e polifenóis em especial substâncias orgânicas que pertencem ao grupo dos flavonoides e taninos (SAHAMISHIRAZI et al., 2017; ROUSSOS et al., 2016).

Os minerais representam um componente significativo da composição química da ameixa. Entre eles, potássio, fósforo, magnésio e cálcio estão presentes em maiores quantidades, enquanto outros minerais, como sódio, ferro, boro, cromo, manganês, cobre, e zinco, estão presentes em quantidades muito menores (COSMULESCU et al., 2017).

A tabela brasileira de composição de alimentos - TACO (2011) apresenta de forma detalhada os componentes nutricionais presentes na ameixa *in natura*. Analisando a Tabela 2.1, nota-se que a fruta possui baixo valor calórico, sendo um dos fatores que possuem importância na escolha de um alimento, além disso, ameixa apresenta elevado teor de água, podendo ocasionar rápida deterioração por fatores bioquímicos e microbiológicos.

**Tabela 2.1.** Composição da ameixa

<b>Composição</b>	<b>Quantidade</b>
Umidade (%)	84,8
Proteína (g)	0,8
Carboidratos (g)	13,9
Fibra Alimentar (g)	2,4
Cinzas (g)	0,6
Cálcio (mg)	6
Magnésio (mg)	5
Ferro (mg)	0,1
Potássio (mg)	134
Fósforo (mg)	14
Zinco (mg)	0,1
Vitamina C (mg)	7,6
Energia (kcal)	53

Fonte: TACO (2011)

O alto grau de valorização das ameixas entre os consumidores a promoveu em todo o mundo como uma das frutas mais importantes. Frutos de ameixa são do ponto de vista nutritivo e dietético, um componente valioso da dieta humana devido ao seu conteúdo em compostos bioativos. Um volume considerável de estudos indicou que aumentou o consumo da fruta, devido à alta concentração de polifenóis, entre outros nutrientes, o que a faz benéfica para a saúde humana (EL-SHARKAWY et al., 2016, MANSOURIPOUR et al., 2013).

### **2.3 Alimentos funcionais**

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), são alimentos funcionais, o alimento ou ingrediente que pode agregar propriedades funcionais ou de saúde, além de conter todas funções nutricionais básicas, quando se tratar de nutriente, produzir efeitos metabólicos e ou fisiológicos e ou efeitos benéficos a saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica (ANVISA, 1999).

A forma de alimentação e a escolha dos alimentos tendem a sofrer possíveis alterações com o passar do tempo, sendo assim, a produção dos alimentos funcionais em escala industrial é um segmento em constate crescimento. No qual a indústria alimentícia tem como principal objetivo produzir alimentos que melhorem as condições de saúde e reduz possíveis riscos de doenças. Os alimentos funcionais além de saciar a fome, podem contribuir de forma positiva no melhoramento do rendimento físico e mental dos consumidores (ARSLAN-TONTUL et al., 2018).

Há uma necessidade em estudar os alimentos que podem melhorar o sistema imunológico humano. Pesquisas recentes comprovam a eficiência dos alimentos funcionais na regulação imunológica, atuando no sistema de defesa do hospedeiro contra possíveis infecções, crises alérgicas e diferentes tipos de inflamações (HACHIMURA et al., 2018).

Devido a seus benefícios e a crescente relevância de um hábito de vida saudável, gêneros alimentares funcionais estão se tornando parte da vida dos consumidores, resultando em um aumento no mercado deste segmento (VECCHIO, 2016). Estima-se que os produtos alimentícios funcionais tenham um mercado valor de US \$ 168 bilhões em 2013 e podendo atingir a US \$ 300 bilhões em 2020 (SANTERAMO et al., 2017).

Uma parte dos alimentos funcionais produzidos no mundo possui relação com a produção e consumo dos alimentos probióticos, que podem auxiliar na redução de possíveis distúrbios gastrointestinais, auxiliam na manutenção da microbiota intestinal (DIANA et al., 2015)

### **2.3. Alimentos probióticos**

Segundo Fuller (1989) os probióticos surgiram com a finalidade de serem um suplemento alimentar, composto de microrganismos vivos e beneficiando a microbiota intestinal. A justificativa de consumir alimentos probióticos é aproveitar todos os benefícios em função da interação simbiótica com as bactérias benéficas presentes no intestino do hospedeiro (SANDERS et al., 2019). A princípio, os probióticos eram definidos de maneira geral como substâncias capazes de promover um equilíbrio intestinal. Atualmente, os probióticos possui uma definição moderna, sendo definido como microrganismos vivos, que após a ingestão em quantidades corretas podem promover melhorias a saúde e bem-estar aos consumidores (HILL et al., 2014).

A funcionalidade dos probióticos vão além da interação positiva da microbiota intestinal com relação a reações associadas. Um dos fundamentos para produzir probióticos de alta eficiência é a sua aptidão de aderir ao TGI (trato gastrointestinal), tais como mucosa intestinal e células epiteliais, com o objetivo de reduzir e/ou evitar serem inativos ocasionados pela mortalidade intestinal, sendo assim, proliferando em todo o intestino e promovendo a modulação do sistema imunológico ao reduzir todos os agentes patogênicos (GUIMARÃES et al., 2020, SCHEPPER et al., 2017).



As bactérias probióticas mais utilizadas na produção dos alimentos fermentados incluem *Lactobacilli*, *Enterococci*, *Bifidobacteria* e *Leuconostoc spp*. As leveduras como *Saccharomyces spp* também são utilizados na produção de probióticos. A demanda por alimentos probióticos aumenta a cada ano, com isso, deixa o mercado desde segmento cada vez mais aquecido, uma vez que os consumidores buscam por alimentos que possuam benefícios a saúde, aumentando o sistema imunológico. Atualmente, os alimentos probióticos são comercializados juntamente com os alimentos tradicionais, sendo disponíveis em diferentes formas como líquido, sólido ou em pó (WAN et al., 2019).

Durante o armazenamento nas prateleiras dos supermercados, os probióticos devem ser viáveis no produto alimentício, sobrevivendo as diferentes condições do estômago humano, até que possam colonizar o intestino (PEREIRA et al., 2018). De acordo com várias pesquisas desenvolvidas com probióticas, consideram a concentração mínima de  $10^6$ - $10^8$  UFC/ g, sendo essa a concentração ideal para suportar o trato gastrointestinal, chegando ao intestino na concentração adequadas (KIM et al., 2018). No entanto, valor mínimo da concentração dos probióticos não foi estabelecido, já que o comportamento de absorção do probiótico pode apresentar variação de acordo com o organismo do hospedeiro, espécie microbiana e o tipo da matriz alimentícia utilizada na produção do probiótico (GOMAND et al., 2019).

Os compostos com propriedades prebióticas fornecem substratos para o metabolismo das bactérias comensais, em contraste com os probióticos, que entregam cepas externas de bactérias probióticas. Exemplos de formulações prebióticas suplementadas incluem compostos à base de carboidratos, como frutooligossacarídeos e inulina, bem como polifenóis e ácidos graxos poliinsaturados (SANDERS et al., 2019).

#### **2.4.1 Alimentos probióticos não lácteo**

Com aumento das restrições alimentares relacionadas ao consumo de produtos lácteos, devido algum tipo de alergia ou intolerância à lactose, os alimentos probióticos não lácteo surgiam com a finalidade de suprir essa demanda dos consumidores com restrições, podendo consumir probióticos sem causar nenhum dano a sua saúde. Com isso, é de suma importância estudar a aplicação dos probióticos em novas matrizes alimentares, tais como frutas e vegetais (BEDANI et al., 2014; COSTA et al., 2013; SILVA et al., 2017; GRANATO et al., 2019).

As frutas são ricas em vitaminas, açúcares, minerais, compostos antioxidantes e fibras alimentares, e com isso possibilita o desenvolvimento de novos produtos probióticos não lácteos, uma vez que as frutas possuem em sua composição química boa parte dos constituintes necessários para que ocorra um processo de fermentação (PERES et al., 2012; SANTOS et al., 2017).

Ação combinada dos probióticos com as frutas pode favorecer de maneira simultânea os probióticos e a fibra dietética de que o organismo humano necessita, justificando que a produção de produtos probióticos utilizando frutas é uma tendência promissora na área da ciência e tecnologia de alimentos no futuro próximo. A forma mais utilizada na produção de polpa de fruta probiótica é a adição da cultura probiótica na matriz alimentar de forma direta, tornando o processo mais simples e eficiente (GUAN et al., 2021).

Além das frutas apresentarem uma ótima aceitação, ressaltado suas diferentes características sensoriais, aumenta a disponibilidade em produzir diferentes produtos não lácteos, já que o segmento agrícola mundial possui várias espécies de frutas. Nos últimos anos, estudos estão sendo realizados e direcionados na produção de alimentos probióticos não lácteos, analisando o comportamento e viabilidade das bactérias lácteas adicionadas em diferentes tipos e formas das frutas, com objetivo de obter produtos nutritivos e com excelente qualidade sensorial (GALLO et al., 2014; NIKOLAOU et al., 2019; SPERANZA et al., 2018).

As bactérias do gênero *Bifidobacterium* possui destaque dentro do grupo das bactérias probióticas, sendo uma das mais utilizadas como agente fermentativo na indústria de produtos lácteos (PRASANNA et al., 2014).

## **2.5 Bifidobacterium**

As *bifidobacterium* são bactérias anaeróbias comercializadas em todo planeta, sendo citados por estudos como os seres microscópicos do filo Actinobacteria mais antigos do mundo, com ótima capacidade de adaptação ao trato gastrointestinal (TGI) dos animais que habitavam a terra quando a atmosfera apresentava baixa taxa de oxigênio (DYACHKOVA et al., 2019; MODESTO et al., 2020).

Inicialmente as *bifidobacterium* foram classificadas dentro do gênero dos *Lactobacillus*, porém com aplicação de estudos posteriores foram encontrados filamentos

o que difere dos LAB, passando a ser classificada no filo Actinobacteria. Estas bactérias geralmente surgem em pares nos formatos de V ou Y. As bifidobacterium são microrganismos não formadores de esporos, bastonetes pleomórficos, sendo classificado com um micróbio não patogênico, ou seja, são inofensivos por não causar danos à saúde do hospedeiro (ZACARÍAS et al., 2020).

As bactérias do gênero das bifidobacterium possuem seus fatores extrínsecos bem estabelecidas, uma vez que durante a fermentação a temperatura ideal é em torno de 37°C a 41°C, os fatores intrínsecos também são essenciais para o crescimento desta bactéria, desde a composição centesimal até as características químicas, em que estudos comprovam que o pH ideal da matriz alimentar deve estar entre 6,5 a 7,0 (SONOMOTO & YOKOTA, 2011). A utilização de diferentes espécies de bifidobactérias pode apresentar diferentes benefícios para com a saúde do consumidor/hospedeiro, tais como a regulação da microflora intestinal, ação contra atividades procarcinogênicas no interior da microbiota, além de auxiliar na produção de vitaminas (TOSCANO et al., 2015; CHUGH & KAMAL-ELDIN, 2020).

Fundamentalmente, eles estão sendo explorados como pioneiros de novos mercados por empresas que oferecem produtos com benefícios tangíveis. De acordo com um relatório de análise de mercado divulgado recentemente, o mercado global de probióticos nos últimos anos teve um rendimento em torno de US \$ 48,38 bilhões, e as cepas de probióticos atualmente mais comuns usados no mercado de alimentos funcionais são *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (GVR, 2019).

## **2.6 Microencapsulação**

A tecnologia de microencapsulação é um processo industrial em que os agentes ativos presentes no processo são revestidos por um material encapsulante com a finalidade de promover a formação de partículas e/ou cápsulas em escala manométrica, dessa forma, minimiza todas as lesões e impactos com relação a perda de células, resultando na liberação controlada de microrganismos. A microencapsulação é formada por dois materiais, em que o primeiro consiste nos materiais revestidos, que são os agentes ativos presentes nos produtos, que também pode ser denominado de núcleo, enquanto que o segundo material consiste nos revestimentos, sendo mais conhecidos como material transportador e/ou agente encapsulante do processo (DEVI et al., 2017, TYAGI et al., 2011).

As microcápsulas presentes no processo são formadas por agentes encapsulantes, que além atuar como um filme protetor dos agentes ativos, as microcápsulas reduzem os efeitos negativos quando as microcápsulas são expostas a ambientes com condições adversas. Com relação a geometria das microcápsulas, geralmente são classificadas como uma esfera, com dimensões que podem apresentar uma variação de 1 a 5000  $\mu\text{m}$  de diâmetro, no entanto, o tamanho e o aspecto morfológico das microcápsulas, tem total relação com tecnologia de microencapsulação adotado, assim como os materiais encapsulantes aplicados na mistura do processo (MISHRA, 2015).

A microencapsulação é processo industrial aplicado na indústria alimentícia desde da década de 40, uma vez que os possuem várias formas de aplicações, em que consiste a transformação de um “líquido qualquer” em material sólido, melhorando o manejo e o transporte que otimiza o processo de armazenamento e promove melhor estabilidade do produto, controlando de forma mais eficiente as reações de oxidações e aumentando a vida útil do produto (DESAI; PARK, 2005).

A tecnologia de microencapsulação quando aplicada em produtos probióticos, tem como objetivo reter as células probióticas no material encapsulante, ou seja, dentro do material secundário. As cápsulas são utilizadas para proteger de forma segura as bactérias probióticas, uma vez que essas bactérias são sensíveis ao pH ácido que serão submetidas durante o processo digestivo, promovendo a qualidade e quantidade para que possam fornecer os efeitos positivos das bactérias probióticas (TIMILSENA et al., 2019; EGHBAL et al., 2016).

Um dos métodos mais utilizados na microencapsulação de probióticos é a secagem por liofilização, em que as condições operacionais de baixa temperatura assegura uma elevada taxa de sobrevivência bacteriana (DIMITRELLOU et al., 2016)

## **2.7 Liofilização**

A secagem é uma das operações unitárias mais importantes na indústria de alimentos, que consiste na remoção da livre presença de uma matriz alimentícia. Com relação a secagem de matérias biológicas, tais como produtos alimentícios contendo bactérias probióticas, a secagem por liofilização é considerada uma das técnicas mais aplicadas, uma vez que o produto é desidratado em baixas temperaturas, sendo assim, promove uma maior taxa de sobrevivência das bactérias probióticas após a secagem

(MARQUES DA SILVA et al., 2018; RADDATZ et al., 2020; TERPOU et al., 2019; YING et al., 2010).

A secagem por liofilização ocorre pela sublimação, concluindo que a amostra é desidratada partindo do estado sólido para o gasoso, sem passar pelo estado líquido. O processo de liofilização envolve três fases diferentes, tais como o congelamento, secagem primária (processo de sublimação do gelo) e secagem secundária (remoção da água não congelada) (FISSORE et al., 2019). No entanto, a etapa de congelamento é considerada o ponto crítico do processo de liofilização, pois a parte da eficiência da liofilização possui total ligação com as condições operacionais do tempo e da temperatura de congelamento que a amostra é submetida (GEIDOBLE & WINTER, 2013).

Todas as etapas envolvidas na liofilização devem ser otimizadas, a fim de obter um produto de elevada qualidade, principalmente quando a amostra contém em sua composição cepas de bactérias probióticas, pois cada tipo de bactéria possui suas restrições em relação a exposição a temperaturas extremas de congelamento, podendo ocasionar danos irreversíveis na parede celular (POLO et al., 2017; WANG et al., 2019).

A liofilização por ser um processo que ocorre pela sublimação com baixas temperaturas e pressões durante a operação, promove uma maior retenção dos constituintes químicos presentes nas amostras, tais como os compostos bioativos presentes em produtos de origem vegetal, dessa forma, atua de maneira significativa no valor nutricional do produto final. Com relação a estrutura do material liofilizado, apresenta uma superfície porosa, traçando um ótimo aspecto sensorial relacionado ao perfil textura do produto obtido após o processo de liofilização (FAN et al., 2019).

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

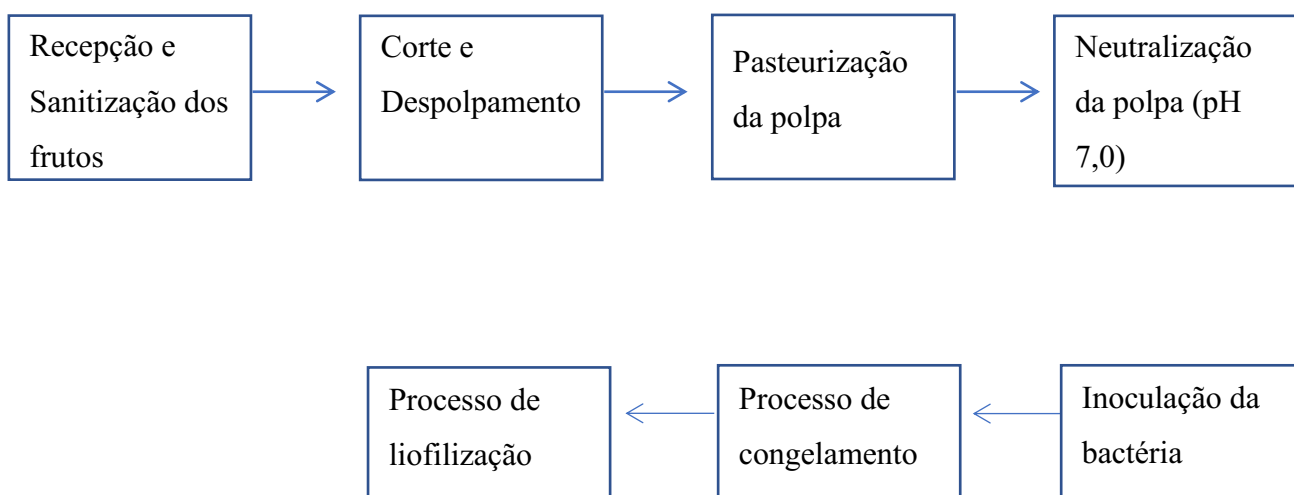
A pesquisa foi conduzida no Laboratório de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas (LAPPA), no Laboratório de Tecnologia do Frio (LTF), no Laboratório de Engenharia de Alimentos, pertencentes a Unidade Acadêmica de Engenharia Agrícola e a Unidade Acadêmica de Engenharia de Alimentos, do Centro de Ciências e Recursos Naturais, da Universidade Federal de Campina Grande, campus Campina Grande, Paraíba, Brasil.

#### 3.1 Matéria-prima

As ameixas utilizadas no desenvolvimento desta pesquisa foram adquiridas na Empresa Paraibana de Abastecimento e Serviços Agrícolas (EMPASA), na cidade de Campina Grande, Paraíba. Para o processo do crescimento da cultura probiótica ocorreu utilizando a *Bifidobacterium animalis ssp*, comercial liofilizada (DELVO®PRO LAFTI B94), a inulina como agente prebiótico e a maltodextrina de dextrose equivalente (DE 10) como agente encapsulante.

#### 3.2 Processamento da ameixa

Na Figura 3.1 tem-se o fluxograma de processamento realizado para obtenção da polpa de in natura e encapsulada. Inicialmente, os frutos foram recepcionados no laboratório, selecionados e pesados para posterior higienização; na seleção foi verificada, além do estágio de maturação, a integridade dos frutos.



**Figura 3.1.** Fluxograma do processamento para obter da polpa da ameixa *in natura* e encapsulada.

### **3.2.1 Recepção e sanitização dos frutos**

As ameixas foram acondicionadas em caixas de papelão e transportadas até o laboratório, onde ocorreu a recepção da matéria-prima, seguido por seleção quanto ao estágio de maturação dos frutos e ausência aparente de danos físicos. Após a seleção, os frutos passaram por uma lavagem em água corrente com a finalidade de retirar quaisquer sujidades, seguido por uma imersão em solução de hipoclorito de sódio a uma concentração de 100 ppm por 10 minutos e, por fim, enxaguadas em água corrente para remover o excesso de cloro.

### **3.2.2 Corte e despulpamento**

Inicialmente os frutos foram cortados ao meio com auxílio de faca inoxidável, com a finalidade de retirar os caroços, posteriormente foram despulpados em uma despulpadeira horizontal previamente higienizada com uma solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm, seguido por um enxágue em água corrente. Após a obtenção da polpa, a mesma foi acondicionada em embalagem de polietileno de baixa densidade e armazenadas em freezer a uma temperatura de -20 °C, até a realização dos ensaios técnicos da pesquisa.

### **3.2.3 Pasteurização da polpa da ameixa**

A polpa da ameixa foi submetida a um processo de pasteurização com auxílio de um banho maria a uma temperatura de 80 °C durante um período de três minutos, com a finalidade de eliminar possíveis microrganismos deteriorantes, além de inibir reações bioquímicas por meio de enzimas presentes na polpa da ameixa *in natura*.

### **3.2.4 Neutralização da polpa (pH 7,0)**

A polpa da ameixa foi neutralizada até obter pH 7,0, utilizando hidróxido de sódio (NaOH), uma vez que esta substância química é considerada um aditivo com função de regular acidez de um produto alimentício (ANVISA, 2007).

### **3.2.5 Inoculação da bactéria probiótica**

A cultura probiótica liofilizada comercial foi introduzida na polpa da ameixa na concentração de 1% (m/m), de acordo a metodologia descritas por Paim et al., (2016). A polpa com inóculo foram acondicionados em béqueres e incubados em estufa BOD durante 22 horas a uma temperatura de 37 °C.

### 3.2.6 Processo de congelamento

As amostras foram distribuídas em bandejas de silicone e submetidas ao processo de congelamento em freezer criogênico, em diferentes temperaturas de congelamento e tempo de congelamento de acordo com as condições operacionais pré-estabelecidas pelo planejamento fatorial para liofilização.

### 3.2.7 Planejamento fatorial para microencapsulação por liofilização e otimização do processo

Na Tabela 3.1 estão expostos os níveis reais e codificados das variáveis independentes de entrada. Para análise dos dados experimentais, foi utilizado um planejamento  $2^3$  com repetições em triplicata no ponto central (nível 0). Na Tabela 3.2 encontra-se a matriz do planejamento fatorial obtida pelo programa Statistica, versão 7.0.

**Tabela 3.1.** Níveis reais e codificados das variáveis de entrada.

Níveis reais	Níveis codificados		
	-1	0	+1
t (h)	2	4	6
Tc (°C)	-50	-100	-150
Ca (%)	3	5	7

Fonte: autor (2021)



**Tabela 3.2.** Matriz de planejamento fatorial  $2^3$  com em triplicata repetições em triplicata no ponto central.

Experimento s	Variáveis independentes		
	Tempo de congelamento (horas)	Temperatura de congelamento (°C)	Concentração (%)
1	2 (-1)	-50 (-1)	3,0 (-1)
2	6 (+1)	-50 (-1)	3,0 (-1)
3	2 (-1)	-150 (+1)	3,0 (-1)
4	6 (+1)	-150 (+1)	3,0 (-1)
5	2 (-1)	-50 (-1)	7,0 (+1)
6	6 (+1)	-50 (-1)	7,0 (+1)
7	2 (-1)	-150 (+1)	7,0 (+1)
8	6 (+1)	-150 (+1)	7,0 (+1)
9	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)
10	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)
11	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)

Fonte: autor (2021)

O planejamento fatorial utilizado teve, como objetivo, avaliar a influência das variáveis de entrada: tempo de congelamento (horas), temperatura de congelamento (°C) e concentração dos adjuvantes da microencapsulação (maltodextrina e inulina) sobre as respostas: eficiência da encapsulação, viabilidade celular e rendimento do processo. Para análise de regressão não linear dos dados experimentais, utilizou-se um planejamento fatorial  $2^3$  com três repetições no ponto central (nível 0) empregando-se o programa computacional Statistica, versão 7.0.

### 3.2.8 Microencapsulação por liofilização

Após o processo de congelamento, as amostras foram desidratadas em liofilizador modelo ALPHA 1-2 LD *plus* a uma temperatura de  $-48^{\circ}\text{C}$  com pressão de 0,9 mbar durante 48 horas de processo de desidratação.

#### 3.3.1 Rendimento do processo de microencapsulação

O desempenho do processo de microencapsulação por liofilização foi analisado

por meio do cálculo do rendimento da elaboração do material encapsulado, utilizando a Equação 3.3.

$$\text{Rendimento}(\%): \frac{X}{X_0} \times 100 \quad (3.1)$$

Em que:

X - Massa coletada após a microencapsulação

X<sub>0</sub> - Massa alimentada antes da microencapsulação

### 3.3.2 Contagem das células viáveis na polpa *in natura* e encapsulada

A contagem de microrganismos probióticos foi realizada a partir da diluição seriada da amostra do produto contendo água peptonada 1% (m/v) conforme metodologia da International Dairy Federation (2006). O plaqueamento foi realizado em placas de Petri por inoculação em profundidade de Agar MRS, adicionado de L-cisteína a 0,5 g/L com adição de sobrecamada (DE MAN, ROGOSA & SHARPE, 1960), incubadas a 35°C por 72 horas em jarras de anaerobiose contendo sistema de remoção de oxigênio, seguida da contagem de unidades formadoras de colônia (UFC), que deverá estar entre 10<sup>8</sup> e 10<sup>9</sup> de acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA, 2008).

### 3.3.4 Eficiência da encapsulação

A eficiência do processo de encapsulação foi determinada por meio da taxa de sobrevivência das *Bifidobacterium animalis spp*, fazendo uma simples relação entre a viabilidade celular antes e após o processo de microencapsulação por liofilização (DIAS et al., 2018). Sendo calculado utilizando a Equação 3.4.

$$EE\% = \frac{\log N}{\log N_0} \times 100 \quad (3.4)$$

Em que:

EE- Eficiência,

logN - Viabilidade celular após a microencapsulação, (UFC/g)

logN<sub>0</sub> - Viabilidade celular antes do processo de microencapsulação, (UFC/g)

### **3.4 Caracterização da polpa da ameixa *in natura*, fermentada e encapsulada**

As amostras da polpa da ameixa *in natura*, fermentada e liofilizada foram caracterizadas quanto ao teor de flavonoides, compostos fenólicos totais, antocianinas totais, carotenoides totais, vitamina C, açúcares redutores, taninos, teor de água e atividade de água, acidez total titulável, pH e teor de cinzas. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

#### **3.5.1 Caracterização físico-química**

##### **3.5.1.2 pH**

A determinação do pH foi realizada pelo método potenciométrico, utilizando-se 5 g das amostras, onde foram diluídas em 50 mL de água destilada. Para determinação do pH utilizou-se um pHmetro de bancada (Quimis, precisão 0,01) devidamente calibrado com soluções-tampão de pH 4,0 e 7,0 (IAL, 2008).

##### **3.5.1.3 Acidez total titulável**

A acidez total titulável foi realizada pela técnica titulométrica baseada na neutralização da amostra com a solução padronizada de NaOH 0,1 M, de acordo com o método descrito por IAL (2008). Os resultados foram expressos em percentagem de ácido cítrico (%).

##### **3.5.1.4 Teor de água**

O teor de água foi determinado pela diferença entre as massas das amostras antes e após a secagem em estufa a 105°C, durante 8 horas para a polpa da ameixa *in natura* e as fermentadas e 24 horas para as amostras liofilizadas, de acordo com a metodologia descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008)

##### **3.5.1.5 Atividade de água**

A determinação da atividade de água foi utilizando o aparelho Aqualab-3TE da Decagon Devices, com precisão de 0,003, na temperatura de 25°C. Este aparelho utiliza como método para determinação da atividade de água, a temperatura do ponto de orvalho por resfriamento e condensação em espelho.

##### **3.5.1.6 Teor de cinzas**

A determinação quantitativa das cinzas foi realizada através da metodologia

descrita por IAL (2008) utilizando-se uma mufla a 600 °C, para incineração da amostra até a obtenção de um resíduo isento de carvão, com coloração branca acinzentada e os resultados foram expressos em percentagem (%).

### **3.6.2 Caracterização química**

#### **3.6.2.1 Teor de flavonoides e antocianinas**

Para determinação de flavonoides e antocianinas, seguiu-se a metodologia descrita por Francis (1982), utilizando solução de etanol 95 % + HCL 1,5 N (85:15 v/v). A leitura das amostras foi realizada em espectrofotômetro utilizando  $\lambda = 374$  nm para flavonoides e de  $\lambda = 535$  nm para antocianinas. O branco foi composto apenas da solução de etanol 95 % + HCL 1,5 N (85:15 v/v).

#### **3.6.2.3 Teor de carotenoides**

Os carotenoides foram quantificados conforme métodos descritos por Lichthenthaler (1987), no qual 0,1 g da amostra foi macerada em almofariz com 0,2 g de Carbonato de cálcio e 5 mL de acetona 80%, em ambiente escuro ou luz reduzida, obtendo um extrato que foi depositado em tubo de ensaio envolvido com papel alumínio. Em seguida, as amostras foram centrifugadas por 10 minutos a 10°C e 3000 rpm, sendo então realizada a leitura em espectrofotômetro no comprimento de onda de 470 nm para carotenoides.

#### **3.6.2.4 Compostos fenólicos totais**

A determinação de fenólicos totais foi realizado pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Waterhouse (2006), utilizando o ácido gálico como padrão e leitura em espectrofotômetro a 765 nm. Os resultados foram expressos em mg L<sup>-1</sup> de ácido gálico.

#### **3.6.2.5 Açúcares Totais**

A quantificação dos açúcares totais foi realizada pelo método de antrona com leitura em espectrofotômetro (620 nm) utilizando a metodologia proposta por Yemn e Willis (1954).

#### **3.6.2.6 Taninos**

Os taninos foram analisados segundo a metodologia descrita por Goldstein e Swain (1963), utilizando a curva de ácido tânico como padrão e os resultados expressos

em mg EAT (equivalente de ácido tânico) /100 g.

### **3.7 Propriedades físicas**

#### **3.7.1 Densidade aparente**

A densidade aparente foi determinada utilizando a metodologia descrita por Caparino et al. (2012), em que 3 g das microcápsulas da ameixa probiótica foram pesadas em proveta graduada de 10 mL, sem a presença de compactação, determinado assim o volume total preenchido pelo os matérias sólidos. A determinação desta propriedade física foi calculada conforme a Equação 3.7.1.

$$\rho_a = \frac{ms}{V_t} \quad (3.7.1)$$

Em que:

$\rho_a$  - densidade aparente, g.mL<sup>-1</sup>

$ms$  - massa do sólido, g

$V_t$  - volume total, mL

#### **3.7.2 Densidade compactada**

Para determinação da densidade compactada (g/cm<sup>3</sup>) utilizou-se a metodologia de Tonon et al. (2013), calculada pela relação entre a massa e o volume ocupado pela amostra compactada. O cálculo da densidade compactada foi por meio da Equação 3.7.2

$$\rho_c = \frac{ms}{V_c} \quad (3.7.2)$$

Em que:

$\rho_c$  - densidade compactada, g.mL<sup>-1</sup>

$ms$  - massa do sólido, g

$V_c$  - Volume do sólido após compactação, mL

#### **4.7.3 Índice de Carr ou Índice de compressibilidade**

O índice de compressibilidade (IC) é um método mais simples quando comparado

aos demais, que visa avaliar de forma indireta as propriedades dos fluxos de materiais em pó por meio de simples comparação entre a densidade aparente ( $\rho_a$ ) e da densidade compactada ( $\rho_c$ ) do pó Wells (1988), e foi calculado de acordo com a Equação 3.7.3.

$$IC = \frac{\rho_c - \rho_{ap}}{\rho_{ap}} \times 100\% \quad (3.7.3)$$

Em que:

Ic- Índice de compressibilidade

$\rho_c$  - densidade compactada, g.mL<sup>-1</sup>

$\rho_a$  - densidade aparente, g.mL<sup>-1</sup>

### 3.7.4 Fator de Hausner

A partir das massas específicas aparente e compactada foram determinados o fator de Hausner (Hausner et al., 1967) conforme a Equações 3.7.4

$$FH = \frac{\rho_c}{\rho_{ap}} \times 100\% \quad (3.7.4)$$

Em que:

FH- fator de Hausner

$\rho_c$  - densidade compactada, g.mL<sup>-1</sup>

$\rho_a$  - densidade aparente, g.mL<sup>-1</sup>

### 3.8 Armazenamento

As microcápsulas foram acondicionadas em embalagens laminadas, seguido pelo armazenamento em estufa incubadora BOD durante um período de 28 dias a uma temperatura de 25°C, protegidas de quaisquer exposições a luminosidade. A viabilidade celular da *Bifidobacterium animalis spp* nas microcápsulas foram analisadas a cada 7 dias de intervalo.

### 3.9 Análise estatística

Os dados experimentais obtidos da caracterização físico-química, química e propriedades físicas foram analisados por meio do programa estatístico SISVAR 5.6, os quais foram submetidos a análise de variância (ANOVA) com a finalidade de houve

diferença significativa entre as amostras estudadas ( $p < 0,05$ ). A influência das variáveis independentes do processo de microencapsulação por liofilização foi analisada pelo método de superfície de resposta, com auxílio do software STATISTICA 7.0.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGROSTAT, Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento- MAPA. Exportação e Importação Brasil. Disponível em: <http://indicadores.agricultura.gov.br/agrostat/index.htm>. Acesso em 17/03/2021.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem**, 1999.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos e Aromatizantes**, 2007.

ALET, V.; ELIZABETH, J.; DALENE, D.B. Nutraceutical value of yellow- and red-fleshed South African plums (*Prunus salicina* Lindl.): evaluation of total antioxidant capacity and phenolic composition. **Molecules**, v. 19, p. 3084-3109, 2014.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M.; GORGULU, A. The Use of Probiotic-Loaded Single- and Double-Layered Microcapsules in Cake Production. **Probiotics and Antimicro**, n. 11, p. 840-849, 2019.

BARBOSA, F. H. F.; DA SILVA, A. M.; BARBOSA, L. P. J. D. L.; NICOLLI, J. R. O gênero *Bifidobacterium*: Dominância á favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2012.

BEDANI, R.; VIEIRA, A. D. S.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. Tropical fruit pulps decreased probiotic survival to in vitro gastrointestinal stress in synbiotic soy yoghurt with okara during storage. **LWT-Food Science and Technology**, v. 55, n. 2, 436-443, 2014.

CAPARINO, O. A.; TANG, J.; NINDO, C. I.; SABLANI, S. S.; POWERS, J. R.; FELLMAN, J. K. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine 'Carabao' var.) powder. **Journal of Food Engineering, Oxford**,



v.111, n.1, p.135-148, 2012.

CEAGESP. Serviço de entrepostos. Disponível em: <http://www.ceagesp.gov.br/entrepostos/servicos-entrepotagem/hortiescolha/ameixa/>  
Acesso em: 22/01/2021.

CHUGH, B. & KAMAL-ELDIN, A. Bioactive compounds produced by probiotics in food products. **Current Opinion in Food Science**, v.32, p. 76-82, 2020.

COSMULESCU, S.; TRANDAFIR, I.; NOUR, V.; BOTU, M. Variation in minerals of skin and pulp of different cultivars according of plum. **Acta Horticulture**, v. 1175, p. 93-98, 2017.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; DE JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 4, 261-266, 2013.

DAS, B. Prunus diversity—Early and present development: A review. **Int. J. Biodivers. Conserv**, v. 3, n.14, 2012

DELGADO, S.; GUADAMURO, L.; FLÓREZ, A. B.; VÁZQUEZ, L.; MAYO, B. Fermentation of commercial soy beverages with lactobacilli and bifidobacteria strains featuring high  $\beta$ -glucosidase activity. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 51, p. 148-155, 2019.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients, **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KHATUN, B.; MAJI, T. K. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136-145, 2017.

DIAS, C. O.; ALMEIDA, J. D. S. O.; PINTO, S. S.; OLIVEIRA, F. C.; VERRUCK, S.; MÜLLER, C. M. O. Development and physicochemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product 57 for probiotic delivery. **Food Biosci**, v. 24, p. 26-36, 2018.

DIANA, M.; QUÍLEZ, J.; RAFECAS, M. Gamma-aminobutyric acid as a bioactive

compound in foods: a review, *Journal of Functional Foods*, v. 10, p. 407–420, 2015.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Research International*, v. 51, p. 503–509, 2013.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; PETROVIĆ, T.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S., LEVIĆ, S.; NEDOVIĆ, V.; KOURKOUTAS, Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, 169-174, 2016.

DYACHKOVA, M.S.; CHEKALIN, E. V.; DANILENKO, V.N. Positive Selection in *Bifidobacterium* genes drives species-specific host–bacteria communication. **Front. Microbiol.**, v. 10, 2019.

EGHBAL, N.; YARMAND, M. S.; MOUSAVI, M.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N.; GHARSALLAOUI, A. Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, 2016.

EL-SHARKAWY, I.; SHERIF, S.; QUBBAJ, T.; SULLIVAN, A. J.; & JAYASANKAR, S. Stimulated auxin levels enhance plum fruit ripening, but limit shelf-life characteristics. **Postharvest Biology and Technology**, v. 112, p. 215-223, 2016.

FAN, K.; ZHANG, M.; MUJUMDAR, A. S. Recent developments in high efficient freeze-drying of fruits and vegetables assisted by microwave: A review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 59, n. 8, p. 1357-1366, 2019.

FAOSTAT, Statistical Database. **Food and Agriculture Organization of The United Nations**, 2018.

FISSORE, D.; GALLO, G.; RUGGIERO, A. E.; THOMPSON, T. N. On the use of a micro freeze-dryer for the investigation of the primary drying stage of a freeze-drying process. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 141, p. 121-129, 2019.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. Anthocyanins as food

colors. **New York: Academic Press**, p.181-207, 1982.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v. 66, n.5, p.365-37, 1989.

GALLO, M.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 9, 2092-2100, 2014.

GEIDOBLE, R.; WINTER, G. Controlled ice nucleation in the field of freeze-drying: Fundamentals and technology review. **Eur. J. Pharm. Biopharm.** v. 85, p. 214–222, 2013.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. *Phytochemistry*, Cambridge, v. 2, p. 371-383, 1963.

GOMAND, F.; BORGES, F.; BURGAIN, J.; GUERIN, J.; REVOL-JUNELLES, A. M.; GAIANI, C. Food matrix design for effective lactic acid bacteria delivery. **Annual Review of Food Science and Technology**, v, p. 285-310, 2019.

GRANATO, D.; NAZZARO, F.; PIMENTEL, T. C.; ESMERINO, E. A.; GOMES DA CRUZ, A. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, v. 1, p. 422-428, 2019.

GUAN, Q.; XIONG, T.; XIE, M. Influence of Probiotic Fermented Fruit and Vegetables on Human Health and the Related Industrial Development Trend. **Engineering**, v. 7, n 2, p. 212-218, 2021.

GUIMARÃES, J. T.; BALTHAZAR, C. F.; SILVA, R., ESMERINO, E. A.; SILVA, M. C.; SANT'ANA, A. S CRUZ, A. G. Impact of probiotics and prebiotics on food texture. **Prob. Preb. Food Text**, v. 33, p.38-44, 2020.

GVR. Probiotics market size, share & trends analysis report by product (food & beverages, dietary supplements), by ingredient (bacteria, yeast), by end use, by distribution channel, and segment forecasts, 2019 - 2025.

<https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/probiotics-market>.

HACHIMURA. S.; TOTSUKA. M.; HOSONO. A.). Immunomodulation by food: impact on gut immunity and immune cell function. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v. 82, n. 4, p. 584-599, 2018.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. *Powder Metall*, v.3, p.7-13, 1967.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; SANDERS, M. E. Expert consensus document: The International Scientific Association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 11, n. 8, p. 506-514, 2014.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **ISO 20128/IDF 192: Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37°C**. Geneva: ISO, p. 11, 2006.

KAPRASOB, R.; KERDCHOECHUEN, O.; LAOHAKUNJIT, N.; SARKAR, D.; SHETTY, K. Fermentation-based biotransformation of bioactive phenolics and volatile compounds from cashew apple juice by select lactic acid bacteria. **Process Biochemistry**, v. 59, p. 141-149, 2017.

KIM, Y. A., KEOGH, J. B., & CLIFTON, P. M. Probiotics, prebiotics, synbiotics and insulin sensitivity. **Nutrition Research Reviews**, v. 35, p. 35-51, 2018.

KLEINA, H. T.; ESTEVES, M.B.; DALBO, M. A.; LOPES, J. R. S. Escaldadura das folhas: a doença que ameaça os pomares de ameixeira no Brasil. **Todafruta**, 2019.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350–382, 1 jan. 1987.

DE MAN J. C.; ROGOSA M.; SHARPE M. E. A medium for the cultivation of

lactobacilli. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 23, p.130-135, 1960.

MANSOURIPOUR, S., ESFANDIARI, Z., & NATEGHI, L. The effect of heat process on the survival and increased viability of probiotic by microencapsulation: A review. **Annals of Biological Research**, v.4, n.4, p.83-87, 2013.

MARQUES DA SILVA, T.; JACOB LOPES, E.; CODEVILLA, C.F.; CICHOSKI, A.J.; FLORES, É.M.DE M.; MOTTA, M. H.; DA SILVA, CDEB.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Development and characterization of microcapsules containing Bifidobacterium Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. **LWT-Food Sci. Technol**, v. 90, p. 412-417, 2018.

MISHRA, M. **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2015.

MNEJJA, M.; GARCIA-MAS, J.; HOWAD, W.; BADENES, M.L.; ARÚS, P. Simple-sequence repeat (SSR) markers of Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.) are highly polymorphic and transferable to peach and almond. **Mol. Ecol. Notes**, n, 4, p. 163–166, 2004.

MODESTO, M.; SATTI, M.; WATANABE, K.; SCARAFI, D.; HUANG, C. H.; LIOU, J. S.; MATTARELLI, P. Phylogenetic characterization of two novel species of the genus *Bifidobacterium*: *Bifidobacterium saimiriisciurei* sp. nov. and *Bifidobacterium platyrrhinorum* sp. Nov. **Systematic and Applied Microbiology**, v.43, n5, 2020.

NIKOLAOU, A.; TSAKIRIS, A.; KANELLAKI, M.; BEZIRTZOGLU, E.; AKRIDA-DEMERTZI, K.; KOURKOUTAS, Y. Wine production using free and immobilized kefir culture on natural supports. **Food Chemistry**, v. 272, p. 39-48, 2019.

PAIM, D. R. S. F.; COSTA, S. D. O.; WALTER, E. H. M.; TONON, R. V. Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, p. 21-25, 2016.

PAN, H.; WANG, R., L. I. L.; WANG, J.; CAO, J.; JIANG, W. Manipulation of the ripening progress of different plum cultivars during the shelf life by post-storage treatments with ethylene and 1-methylcyclopropene. **Scientia Horticulturae**, v.198, p.176–182, 2016.

PEREIRA, G. V. M.; DE OLIVEIRA COELHO, B.; JÚNIOR, A. I. M.; THOMAZ-SOCCOL, V.; SOCCOL, C. R. How to select a probiotic? A review and update of methods and criteria. **Biotechnology Advances**, v. 36, 2060-2076, 2018.

PERES, C. M.; PERES, C.; HERNÁNDEZ-MENDOZA, A.; MALCATA, F. X. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 31-42, 2012.

POLO, L.; MAÑES-LÁZARO, R.; OLMEDA, I.; CRUZ-PIO, L. E.; MEDINA, Á.; FERRER, S.; PARDO I. Influence of freezing temperatures prior to freeze-drying on viability of yeasts and lactic acid bacteria isolated from wine. **J Appl Microbiol**, v. 116, n. 6, p. 1603-1614, 2017.

PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. **Food Research International**, v. 55, p. 247-262, 2014.

RADDATZ, G. C.; POLETTO, G.; DEUSC, D. E.; CODEVILLA, C. F.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; MULLER, E. I.; FLORES, E. M. M.; ESMERINO, E. A.; DE MENEZES, C. R. Use of prebiotic sources to increase probiotic viability in pectin microparticles obtained by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying. **Food Res. Int**, v. 130, 2020.

ROUSSOS, P. A.; EFSTATHIOS, N.; INTIDHAR, B.; DENAXA, N. K.; TSAFOUROS, A. Plum (*Prunus domestica* L. and *P. salicina* Lindl.). MSJ Simmonds, VR Preedy (Eds.), Nutritional composition of fruit cultivars. **Academic Press San Diego**, p. 639-666, 2016.

SAHAMISHIRAZI, S.; MOEHRING, J.; CLAUPEIN, W.; GRAEFF-HOENNINGER, S. Quality assessment of 178 cultivars of plum regarding phenolic, anthocyanin and sugar content. **Food Chemistry**, v. 214, 2017.

SANDERS, M. E.; MERENSTEIN, D. J.; REID, D.; GIBSON, G. R., RASTALL, R. A.

SANDERS, M. E.; MERENSTEIN, D. J.; REID, D.; GIBSON, G. R.; RASTALL, R. A. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic.

**Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 16, p. 605–616, 2019.

SANTERAMO, F. G.; CARLUCCI, D.; DE DEVITIIS, B.; SECCIA, A., STASI, A.; VISCECCHIA, R., ET AL. Emerging trends in European food, diets and food industry. **Food Research International**, v. 104, 39–47, 2017.

SANTOS, E.; ANDRADE, R.; GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Biosci**, v.20, p. 56-61, 2017.

SCHEPPER, J. D.; IRWIN, R.; KANG, J.; DAGENAIS, K.; LEMON, T.; SHINOUSKIS, A.; MCCABE, L. R. Probiotics in Gut-Bone Signaling. **Adv Exp Med Biol**, v. 1033, p. 225-247, 2017.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; MARINHO, J. F.; MAZZOCATO, M. C.; DE MARTINIS, E. C.; LUCCAS, V.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Semisweet chocolate as a vehicle for the probiotics *Lactobacillus acidophilus* LA3 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1: Evaluation of chocolate stability and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, n. 75, 640-647, 2017.

SONOMOTO, K., & YOKOTA, A. Lactic acid bacteria and bifidobacteria: current progress in advanced research. **Norwich: Academic Press**, 2011.

SPERANZA, B.; CAMPANIELLO, D.; BEVILACQUA, A.; ALTIERI, C.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Viability of *Lactobacillus plantarum* on fresh-cut chitosan and alginate-coated apple and melon pieces. **Frontiers in Microbiology**, n. 9, 2018.

TACO - Tabela Brasileira de Composição de Alimentos. 4. ed. rev. e ampl. Campinas: **NEPA - UNICAMP**, p. 161, 2011.

TERPOU, A.; PAPADAKI, A.; LAPPA, I. K.; KACHRIMANIDOU, V.; BOSNEA, L. A.; KOPSAHELIS, N. Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v. 11, n. 7, 2019.

TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation.

**International Journal of Biological Macromolecules**, v.121, p. 1276–1286.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 1950-1958, 2009.

TOSCANO, M.; DE VECCHI, E.; GABRIELI, A.; ZUCCOTTI, G. V.; DRAGO, L. Probiotic characteristics and in vitro compatibility of a combination of *Bifidobacterium breve* M16 V, *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis* M-63 and *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* BB536. **Annals of Microbiology**, v. 65, n. 2, p. 1079-1086, 2015

TYAGI, V.; KAUSHIK S.; TYAGI S.; AKIYAMA T. Development of phase change materials based microencapsulated technology for buildings: A review. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 1373-1391, 2011.

VALERO-CASES, E.; NUNCIO-JÁUREGUI, N.; FRUTOS, M. J. Influence of fermentation with different lactic acid bacteria and in vitro digestion on the biotransformation of phenolic compounds in fermented pomegranate juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 65, n. 31, p. 6488-6496, 2017.

VECCHIO, R.; VAN LOO, E. J.; ANNUNZIATA, A. Consumers' willingness to pay for conventional, organic and functional yogurt: Evidence from experimental auctions. **International Journal Of Consumer Studies**, v.40, n. 3, p. 368-378, 2016.

VIVEK, K.; MISHRA, S.; PRADHAN, R. C. Characterization of spray dried probiotic Sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, 2019.

WAN, M. L. Y.; FORSYTHE S. J.; EL-NEZAMI H. Probiotics interaction with foodborne pathogens: a potential alternative to antibiotics and future challenges. **Crit Rev Food Sci Nutr**, v. 59, n. 30, p. 3320-3333, 2019.

WANG, G.; YU, X.; LU, Z., YANG, Y.; XIA, Y., LAI, PF-H.; AI, L. Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p. 217–223, 2019.



WANG, R.; WANG, L.; YUAN, S.; LI, Q.; PAN, H.; CAO, J.; JIANG, W. Compositional modifications of bioactive compounds and changes in the edible quality and antioxidant activity of 'Friar' plum fruit during flesh reddening at intermediate temperatures. **Food Chemistry**, v. 254, p. 26-35, 2018.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, p.3-5, 2006.

WELLS, J. I. Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances. **New York: Ellis Horwood Limited**, p. 553, 1988.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **J. Food Sci**, v. 75, n. 9, p. 588–595, 2010.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **The Biochemical Journal, London**, v.57, p. 508-514, 1954.

ZACARÍAS, M. F.; REINHEIMER, J. A.; VINDEROLA, G.; KULOZIK, U.; AMBROS, S. Effects of conventional and nonconventional drying on the stability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* INL1. **International Journal of Dairy Technology**, v. 73, n. 3, p. 625-633, 2020.

Os resultados obtidos com o desenvolvimento deste trabalho proporcionaram a elaboração dos artigos descritos a seguir:

ARTIGO1: VIABILIDADE PROBIÓTICA DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS B94 EM POLPA DE AMEIXA

ARTIGO2: OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DA AMEIXA PROBIÓTICA POR LIOFILIZAÇÃO

## 4. RESULTADOS E DISCUSSÕES

### ARTIGO 1

#### VIABILIDADE PROBIÓTICA DE BIFIDOBACTERIUM ANIMALIS SSP. LACTIS B94 EM POLPA DE AMEIXA

##### RESUMO

Os alimentos probióticos são comumente consumidos devido sua comprovação científica dos benefícios que promovem a saúde do consumidor. Porém, novos estudos estão desenvolvendo produtos probióticos de origem vegetal, como uma alternativa para as pessoas que possuem alguma restrição alimentar ou novos hábitos alimentares. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo analisar a composição físico-química da polpa da ameixa *in natura* e probiótica como também a viabilidade das bactérias probióticas após o processo de fermentação. A polpa da ameixa (*Prunus salicina Lindl.*) foi fermentada com *Bifidobacterium animalis spp* com diferentes concentrações de maltodextrina para determinar a melhor formulação do processo de fermentação. As amostras foram caracterizadas quanto a sua composição físico-química e contagem de células viáveis. As amostras fermentadas a partir da adição das diferentes concentrações de maltodextrina e de inulina promoveram um aumento significativo em relação ao teor dos compostos bioativos. A concentração máxima das células viáveis foi obtida nas formulações com a menor concentração dos adjuvantes do processo de fermentação, ou seja, quanto menor a adição de maltodextrina e de inulina, maior será a concentração final de células viáveis da *Bifidobacterium animalis spp*.

**Palavras-chaves:** Probióticos; *Prunus salicina Lindl*; Viabilidade microbiana.

##### ABSTRACT

Probiotic foods are commonly consumed due to their scientific proof of the benefits that promote the health of the host. However, new studies are developing probiotic products of plant origin, as an alternative for people who have some dietary restrictions or new eating habits. Given the above, the present study aimed to analyze the physical-chemical composition of the plum pulp *in natura* and probiotics as well as the viability of probiotic bacteria after the fermentation process. The plum pulp (*Prunus salicina Lindl.*) Was

fermented with *Bifidobacterium animalis* spp with different concentrations of maltodextrin to determine the best formulation of the fermentation process. The samples were characterized according to their physical-chemical composition and viable cell count. Samples fermented from the addition of different concentrations of maltodextrin and inulin promoted a significant increase in relation to the content of bioactive compounds. The maximum concentration of viable cells was obtained in formulations with the lowest concentration of fermentation process adjuvants, that is, the lower the addition of maltodextrin and inulin, the higher the final concentration of viable cells of *Bifidobacterium animalis* spp.

**Keywords:** Probiotics; *Prunus salicina* Lindl; Microbial viability.

## 1. INTRODUÇÃO

A procura por uma alimentação com hábitos saudável tem promovido alterações na indústria de alimentos, sendo desenvolvido novos produtos alimentícios com propriedades funcionais, principalmente fontes de compostos bioativos e alimentos com a introdução de probióticos. Os probióticos são microrganismos vivos, que quando realizado a ingestão em quantidades corretas, promovem benefícios a saúde do seu hospedeiro (MARRERO et al., 2019). Boa parte dos seus efeitos positivos, tem relação a problemas gastrointestinais (FLOCH, 2018).

Durante muito tempo, os probióticos fazem parte da indústria de produtos lácteos, sendo utilizado na elaboração de iogurtes, bebidas lácteas e demais produtos fermentados, porém com as novas tendências de alimentação e o aumento significativo de indivíduos que apresentam intolerância à lactose e alergias causadas pela proteína do leite exigiram mudanças neste segmento industrial (NGUYEN et al., 2019).

Matrizes alimentares de origem vegetal têm sido apontadas como fonte promissora para o desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos (KANDYLIS et al., 2016; PANGHAL et al., 2017). Neste segmento, as frutas e seus derivados tais como os sucos e polpas podem facilitar a incorporação destes microrganismos, tendo em vista que em sua composição química possuem vitaminas, diversos minerais e compostos com atividade antioxidantes e açúcares, além disso, as frutas sempre são associadas a uma alimentação saudável (KANDYLIS et al., 2016).

A ameixa (*Prunus salicina Lindl.*) é a fruta com maior taxa de consumo em todo mundo, devido conter em sua composição química compostos orgânicos que promovem benefícios à saúde do consumidor, tais como carotenoides, polifenóis e vários monômeros de antocianina. Além disso, a fruta possui ótima aceitação sensorial por apresentar sabor levemente doce e acidez equilibrada o que torna seu consumo mais frequente (XU et al., 2020).

Um dos grandes desafios na elaboração de polpa de fruta probiótica é promover uma ótima adaptação da bactéria probiótica ao meio ácido que a grande maioria das frutas possuem devido à alta concentração de ácidos orgânicos presente em sua composição química. As *Bifidobacterium animalis* são bactérias probióticas altamente sensíveis

quando submetida a condições adversas de pH, ou seja, quando introduzida em uma matriz extremamente ácida o seu crescimento é afetado de forma significativa, além do pH a temperatura do processo de fermentação e a exposição ao oxigênio pode ocasionar a toxidade das células probióticas, tendo em vista que as *Bifidobacterium animalis* são microrganismos anaeróbicos (SHORI et al., 2016). Portanto, o presente trabalho teve como objetivo caracterizar a composição físico-química da polpa da ameixa in natura e probiótica, bem como a viabilidade das bactérias probióticas após o processo de fermentação.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Obtenção da polpa da ameixa

O experimento foi realizado no Laboratório de Processamento e Armazenamento de Produtos Agrícolas (LAPPA), da Universidade Federal de Campina Grande (UFCG). Inicialmente os frutos foram previamente selecionados, passaram por um processo de sanitização em solução de hipoclorito de sódio a 100 ppm por um período de 10 minutos seguido de enxágue em água corrente. A polpa foi obtida com auxílio de uma despulpadeira horizontal.

### 2.2 Inoculação da polpa da ameixa com probióticos

Com a finalidade de regular a acidez do meio, utilizou-se NaOH como aditivo alimentar de acordo com ANVISA (2007), segundo as Boas Práticas de Fabricação com a finalidade de regular a acidez do meio, até obter pH de 7,0. Para desenvolvimento da polpa probiótica foi utilizada a *Bifidobacterium animalis* ssp. lactis (DELVO®PRO LAFTI B94) adicionando 1% da cultura probiótica nas formulações elaboradas a partir da adição de concentrações de maltodextrina e de inulina conforme descrito na Tabela 1, sendo a incubação prosseguida a  $35\pm 2^{\circ}\text{C}$  por 22 horas, de acordo com metodologia descrita por Paim et al., (2016).

**Tabela 1.** Formulação da polpa da ameixa probiótica com diferentes concentrações de maltodextrina e inulina.

Experimentos	Maltodextrina (%)	Inulina (%)
1	1.5	1.5
2	1.5	1.5
3	1.5	1.5
4	1.5	1.5
5	3.5	3.5
6	3.5	3.5
7	3.5	3.5
8	3.5	3.5
9	2.5	2.5
10	2.5	2.5
11	2.5	2.5

Fonte: autor, (2021)

### **2.3 Caracterização da físico-química polpa probiótica e *in natura***

As polpas probióticas e *in natura* foram caracterizadas físico-quimicamente conforme as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008): pH em phmetro digital, teor de água por secagem direta em estufa a vácuo (70 °C); cinzas por incineração em mufla a 550 ° C; acidez total titulável por titulação com NaOH 0,1 M.

Os carotenoides foram determinados de acordo com Lichtenthaler (1987), as antocianinas e os flavonoides foram determinados de acordo com o método de Francis (1982) e a determinação dos compostos fenólicos totais foram realizadas pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Waterhouse (2006). Os açúcares totais foram quantificados pelo método da antrona segundo metodologia descrita por YEMN (1954). Os taninos foram analisados segundo a metodologia descrita por Goldstein e Swain (1963), utilizando a curva de ácido tânico como padrão.

### **2.4 Contagem das células probióticas**

A contagem microbiana probiótica foi feita por diluição em série em 0,1% (w/w) de água peptonada estéril, de acordo com a International Dairy Federation (2006). Alíquotas foram inoculadas em ágar MRS e incubado a 35 C por 72 h em potes anaeróbicos com sistema de remoção de oxigênio (Interlab, São Paulo, Brasil), seguido por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) por mL.

### **2.5 Análise estatística**

Todos os ensaios analíticos foram realizados em triplicata e avaliados estatisticamente por análise de variância (ANOVA), seguido do teste de Tukey, ao nível de 5% de significância. Os dados foram analisados com auxílio do software SISVAR, versão 5.6.



### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

A caracterização físico-química da polpa da ameixa *in natura* e probióticas foi determinada para analisar possíveis danos da adição da *Bifidobacterium animalis* spp nesta matriz alimentar, dados médios obtidos no presente encontram-se na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química da polpa da ameixa probiótica e *in natura*.

Experimentos	pH	Acidez Total <sup>1</sup>	Cinza <sup>2</sup>	Umidade <sup>3</sup>	a <sub>w</sub>	Açúcares Totais <sup>4</sup>
<b>F1</b>	5,87 b	0,73 cd	1,43 c	87,18 cd	0,98 a	3,49 d
<b>F2</b>	5,80 cde	0,69 fg	1,39 c	88,41 ab	0,98 a	3,54 d
<b>F3</b>	5,81 bcd	0,71 e	1,41 c	87,29 cd	0,97 a	3,47 d
<b>F4</b>	5,85 bc	0,75 b	1,33 d	88,12 bcd	0,98 a	3,96 c
<b>F5</b>	5,94 a	0,68 f	1,53 b	87,08 d	0,96 a	4,46 b
<b>F6</b>	5,74 e	0,72 de	1,56 b	89,46 a	0,98 a	4,49 b
<b>F7</b>	5,75 de	0,72 de	1,54 b	89,47 a	0,99 a	4,76 a
<b>F8</b>	5,79 cde	0,72 de	1,63 a	88,09 bcd	0,98 a	4,98 a
<b>F9</b>	5,76 de	0,71 ef	1,25 e	87,6 bcd	0,97 a	3,62 d
<b>F10</b>	5,81 bcd	0,75 bc	1,28 e	88,25 bc	0,98 a	3,59 d
<b>F11</b>	5,83 bc	0,76 b	1,25 e	88,46 ab	0,97 a	3,59 d
<b>Polpa in natura</b>	3,36 f	1,32 a	0,35 f	87,55 bcd	0,98 a	2,54 e

<sup>1</sup> ácido láctico (%), <sup>2</sup> (%), <sup>3</sup> (%), <sup>4</sup> (g 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>). Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p < 0,05).

A polpa da ameixa com boa parte das frutas possui pH ácido, podendo interferir no processo de fermentação, uma vez que bactérias probióticas são sensíveis ao meio ácido, sendo necessário neutralizar a polpa antes da fermentação. Neste estudo, a polpa da ameixa *in natura* apresentou valor de 3,36 para pH, diferindo estatisticamente das polpas fermentadas (p < 0.05). Resultado semelhante foi obtido por Silva & Kunigk (2019) ao analisar as características físico-químicas da polpa da ameixa integral, com valor de pH de 3,60. Aplicação de bactérias probióticas em alimentos de origem vegetal é uma das inovações da indústria de alimentos no mundo todo (ALVAREZ et al., 2020). Com relação ao pH das amostras fermentadas, a formulação F5 obteve maior pH em relação as demais formulações, com diferença significativa (p < 0.05).

Nguyen et al., (2019) estudando suco de abacaxi fermentado com *Bifidobacterium* obteve pH inferior no final do processo de fermentação. Bujna et al., (2018) analisando a composição química do suco de damasco probiótico com diferentes bactérias do gênero *Bifidobacterium* obteve pH de variando de 4,6 a 4,9.

A acidez total, apresentou comportamento semelhante ao pH, uma vez que a polpa da ameixa *in natura* possui maior concentração de ácidos orgânicos quando comparado com as amostras fermentadas, com diferença estatística ( $p < 0.05$ ). Estudos comprovaram que bactérias do gênero *Bifidobacterium* spp possuem metabolismo heterofermentativo, com a capacidade de produzir durante a fermentação ácido acético e ácido láctico, diferente dos lactobacilos, que produzem somente ácido láctico (Oliveira et al., 2017).

Com relação ao teor de cinzas totais das amostras, nota-se que a polpa da ameixa *in natura* apresentou a menor concentração de minerais totais, com 0,35% apontando diferença significativa entre as demais amostras ( $p < 0.05$ ). Já as amostras fermentadas apresentaram valores médios variando de 1,63 a 1,25%, respectivamente. Esse resultado possui total relação com as diferentes concentrações de maltodextrina e inulina adicionadas nas amostras, uma vez que as amostras formuladas com as maiores concentrações dos adjuvantes apresentaram elevadas concentrações de minerais totais.

As formulações F6 e F7 apresentaram as maiores médias em relação ao teor de água, diferindo assim das demais formulações das amostras probióticas e da polpa da ameixa *in natura*. A atividade de água não obteve valores com diferença estatística ao nível de 5% de probabilidade. De acordo com Santos et al., (2019), valores elevados de teor de água e atividade de água promovem uma baixa estabilidade dos frutos, principalmente durante a etapa de armazenamento, por promover o desenvolvimento de microrganismos deteriorantes e patogênicos, além de facilitar diversas reações químicas.

Analisando os resultados apresentados na Tabela 2, verifica-se que a concentração dos açúcares totais, da polpa da ameixa *in natura* obteve a menor concentração e diferindo das amostras fermentadas ( $p < 0.05$ ). Os teores de açúcares totais obtidos nas polpas fermentadas apresentaram valores médios variando de 4,98 a 3,47%, respectivamente, ou seja, possui diferença estatística entre as amostras analisadas ( $p < 0.05$ ). Esta diferença estatística entre as amostras fermentadas tem relação com as diferentes concentrações de maltodextrina e inulina utilizadas na formulação das amostras. Yuasa et al., (2021) ao caracterizar em suco de frutas cítricas fermentado usando bactérias de ácido láctico probióticas obteve valor de 3,94 para açúcares totais. Valores semelhantes também foram obtidos por Bujna et al., (2018) em suco damasco probiótico.

A Tabela 3 apresenta os valores médios dos compostos bioativos das polpas probióticas e *in natura* da ameixa como também viabilidade das células probióticas.

**Tabela 3.** Caracterização fitoquímica da polpa da ameixa probiótica e *in natura* da e viabilidade das células probióticas.

Formulações	Parâmetros					
	Compostos Fenólicos Totais <sup>1</sup>	Flavonoides Totais <sup>2</sup>	Antocianina s Totais <sup>3</sup>	Carotenoides Totais <sup>4</sup>	Taninos <sup>5</sup>	Viabilidade celular <sup>6</sup>
	<b>Polpa <i>in natura</i></b>	1775,33 g	39,67 d	3,64 g	48,94 c	724,65 h
<b>F1</b>	2259,11 b	44,85 c	9,26 a	72,97 b	1145,53 a	2,98x10 <sup>11</sup> a
<b>F2</b>	2255,15 b	57,38 a	8,43 c	72,22 b	1136,58 b	2,88x10 <sup>11</sup> c
<b>F3</b>	2214,83 d	37,23 de	8,48 bc	72,98 b	1129,01 c	2,92x10 <sup>11</sup> b
<b>F4</b>	2236,02 c	52,95 b	8,91 ab	73,83 b	1127,95 c	2,88x10 <sup>11</sup> c
<b>F5</b>	1998,88 f	38,64 de	4,47 e	44,45 e	1040,82 d	2,68x10 <sup>11</sup> f
<b>F6</b>	2011,74 e	36,15 e	3,95 f	47,58 cd	1001,41 e	2,71x10 <sup>11</sup> e
<b>F7</b>	2005,51 ef	36,56 e	4,11 ef	42,20 f	1040,49 d	2,75x10 <sup>11</sup> d
<b>F8</b>	2006,12 ef	38,62 de	3,82 f	46,16 de	1003,73 e	2,67x10 <sup>11</sup> f
<b>F9</b>	2355,16 a	54,16 b	6,28 d	95,49 a	948,14 f	2,5x10 <sup>11</sup> 4 g
<b>F10</b>	2351,23 a	53,69 b	6,68 d	96,71 a	949,98 f	2,55x10 <sup>11</sup> g
<b>F11</b>	2356,15 a	54,28 b	6,26 d	95,84 a	943,93 g	2,55x10 <sup>11</sup> g

<sup>1</sup> mg EAG (equivalente ácido gálico) 100 g<sup>-1</sup>, <sup>2</sup> (µg/100g), <sup>3</sup> (mg/100g), <sup>4</sup> (µg/100g), <sup>5</sup> mg EAT (equivalente de ácido tânico) 100 g<sup>-1</sup>, <sup>6</sup> UFC/ml. Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p <0,05).

Para os compostos fenólicos totais, a polpa da ameixa *in natura* apresentou a menor concentração nesta pesquisa com valor de 1775,33 mg EAG e quando comparado com as formulações das polpas probióticas percebe-se que houve diferença significativa entre as amostras (p < 0.05). O processo de fermentação promoveu aumento significativo na concentração final dos compostos bioativos em todas as formulações, porém as formulações F9, F10 e F11 apresentaram as maiores concentrações, com valores variando de 2351,23 a 2356,15 mg EAG e quando comparado as demais formulações das polpas probióticas pode verificar diferença estatística com as amostras fermentadas. Lacerda Massa et al., (2020) estudando a adição de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em

subprodutos jabuticaba obteve aumento na concentração final dos compostos fenólicos após o processo de fermentação.

Com relação aos teores de flavonoides totais, as formulações F1, F2, F4, F9, F10 e F11 apresentaram aumento significativo na concentração final deste composto orgânico e diferindo de forma significativa da polpa da ameixa *in natura* ( $p < 0.05$ ). Para antocianinas totais o comportamento foi semelhante, uma vez que as diferentes formulações da polpa probiótica apresentou o mesmo aumento significativo, com valores variando de 3,64 (mg/100g) da polpa *in natura* para 9,26 (mg/100g), sendo essa a maior concentração, obtida na formulação F1 comprovando que o processo de fermentação para obter as polpas probióticas promove aumento significativo em relação a composição da polpa *in natura* ( $p < 0.05$ ). A concentração dos carotenoides totais nas F9, F10 e F11 foi o dobro do valor médio obtido para a polpa da ameixa *in natura*, com valores médios 95,49 a 96,71 ( $\mu\text{g}/100\text{g}$ ), respectivamente, diferindo das demais amostras ( $p < 0.05$ ).

Para taninos, os resultados obtidos comprovam que o processo de fermentação ocasionou aumento na concentração dos compostos bioativos, tendo em vista que para este composto orgânico a concentração na polpa *in natura* foi de 724,65 (mg EAT), sendo está a menor concentração obtida na pesquisa e diferindo assim das formulações das polpas probióticas ( $p < 0.05$ ). Com relação as polpas probióticas, as formulações F1, F2, F3 e F4 apresentaram as maiores concentrações, com valores variando de 1127,95 a 1145,53 (mg EAT) com diferença estatística entre as amostras fermentadas ( $p < 0.05$ ). Os taninos e os compostos fenólicos podem atuar de forma positiva durante a fermentação de frutas, porém alguns estudos comprovaram a influência negativa destes compostos orgânicos durante a fermentação, uma vez que esses compostos bioativos possuem ação antioxidante e podem promover a destruição das células na fase inicial da fermentação (CASSANI et al., 2018).

As polpas formuladas com adição de 1,5% maltodextrina e 1,5% de inulina apresentaram a maior concentração de células viáveis, com valores médios variando de  $2,98 \times 10^{11}$  a  $2,88 \times 10^{11}$  UFC/ml, diferindo das demais formulações em relação a concentração de células viáveis da *Bifidobacterium animalis spp* ( $p < 0.05$ ). Soares et al., (2019) estudando a viabilidade da *Bifidobacterium animalis spp* em diferentes matrizes,

obteve valor inferior em suco de laranja integral com concentração inicial de 7,3 log/ UFC. Santos et al., (2019) obteve uma concentração máxima de  $5,59 \times 10^{11}$  UFC/ ml de células viáveis de *Lactobacillus reuteri* em suco de maracujá em diferentes índices de temperatura de fermentação e pH. Valor inferiores foram obtidos por Nguyen et al., (2019) em suco de abacaxi fermentado por *Bifidobacterium*. Resultado semelhante foi obtido por Bujna et al., (2018) na elaboração de bebida probiótica do suco de damasco fermentado com *Bifidobacterium*.

Todas as formulações desenvolvidas no presente estudo apresentam valores de células viáveis acima da concentração mínima para que um produto seja considerado probiótico, a Anvisa (2008) estabelece que a quantidade mínima viável de probióticos deve estar entre  $10^8$  e  $10^9$  unidades formadoras de colônia (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, o que corresponde ao consumo de 100g contendo de  $10^7$  a  $10^8$  UFC/g.

#### **4. CONCLUSÕES**

A polpa da ameixa (*Prunus salicina Lindl.*) mostrou-se como uma ótima alternativa para desenvolvimento de alimentos probióticos de origem vegetal, tendo em vista a elevada concentração das células viáveis da *Bifidobacterium animalis spp* presente nas formulações, sendo a formulação F1 com maior concentração de células.

O desenvolvimento da bactéria probiótica na polpa da ameixa, promoveu elevação na composição dos compostos bioativos, principalmente em relação a concentração dos compostos fenólicos totais. A ação combinada dos probióticos com os compostos bioativos potencializam as propriedades funcionais dos alimentos, promovendo maior biodisponibilidade dos constituintes funcionais.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALVAREZ, M. V; BAMBACE, M.F; QUINTANA, G; GOMEZ-ZAVAGLIA, A.; MOREIRA, M. DEL R. Prebiotic-alginate edible coating on fresh-cut apple as a new carrier for probiotic lactobacilli and bifidobacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v.137, 2020.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos**, 2008.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos e Aromatizantes**, 2007.

BUJNA, E.; FARKAS, N. A.; TRAN, M. A.; DAM, S. M.; NGUYEN, D. Q. Lactic acid fermentation of apricot juice by mono- and mixed cultures of probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Food Sci Biotechn.** v.27, n.5 p.47– 54, 2018.

CASSANI, L.; GERBINO, E.; D. E. L.; ROSARIO MOREIRA, M.; GÓMEZ-ZAVAGLIA, A. Influence of non-thermal processing and storage conditions on the release of health-related compounds after in vitro gastrointestinal digestion of fiber-enriched strawberry juices. **Journal of Functional Foods**, v.40, p.128-136, 2018.

FLOCH, M. H. The role of prebiotics and probiotics in gastrointestinal disease, **Gastroenterology Clinics**, v. 47, 179-191, 2018.

FRANCIS, F.J. Analysis of anthocyanins. In: MARKAKIS, P. Anthocyanins as food colors. **New York: Academic Press**, p.181-207, 1982.

GOLDSTEIN, J. L.; SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry**, Cambridge, v. 2, p. 371-383, 1963.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p, 2008.

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION;  
INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. ISO 20128/IDF 192: **Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium –**

**Colony-count technique at 37°C.** Geneva: ISO, p. 11, 2006.

KANDYLIS, P.; PISSARIDI, K.; BEKATOROU, A.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Current Opinion in Food Science**, n. 7, p.58-63, 2016.

LACERDA MASSA, N. M.; DANTAS DUARTE MENEZES, F. N.; DE ALBUQUERQUE, T. M. R.; DE OLIVEIRA, S. P. A.; LIMA, M. DOS S., MAGNANI, M.; DE SOUZA, E. L. Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.131, 2020.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. In: Packer, L.; Douce, R. **Methods in enzymology**. London: Academic Press, v.148, p.350-382, 1987.

MALATARRE, A.; REMIZE, F.; POUCHERET, P. Fermentation of tomato juice improves in vitro bioaccessibility of lycopene, *Food Research International*, v. 104, p. 68-86, 2018.

MARRERO, S. C.; MARTÍNEZ-RODRÍGUEZ, A.; PÉREZ, S. E. M.; MOYA, S. P. New Trends and Applications In Fermented Beverages. **Woodhead Publishing**, p.31-66, 2019.

MILLER, G. L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. **Analytical Chemistry**, Washington, v.31, n.3, p.426-428, 1959.

NGUYEN, B. T.; BUJNA, E.; FEKETE, N.; TRAN, A.; REZESSY-SZABO, J. M.; PRASAD, R., NGUYEN, Q. D. Probiotic beverage from pineapple juice fermented with *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* strains. **Frontiers in nutrition**, v. 54, n. 6, 2019.

OLIVEIRA, D.; VIDAL, L.; ARES, G.; WALTER, E. H.; ROSENTHAL, A.; DELIZA, R. Sensory microbiological and physicochemical screening of probiotic cultures for the development of non-fermented probiotic milk. **LWT-Food Science and Technology**, v.79, p.234-241, 2017. MONTEIRO, S. S.; ALBERTINA, S. B. Y.; MIGUEL, L. O. H.; PASQUALI, M. A DE B. Production of Probiotic Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) Drink Using *Lactobacillus reuteri* and Microencapsulation via Spray

Drying. **Foods**, v.9, n.3, 2020.

PAIM, D. R. S. F.; COSTA, S. D. O.; WALTER, E. H. M.; TONON, R. V. Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, p. 21-25, 2016.

PANGHAL, A.; VIRKAR, K.; KUMAR, V.; DHULL, S. B.; GAT, Y.; CHHIKARA, N. Development of probiotic beetroot drink. **Current Research in Nutrition And Food Science Journal**, n.5, 2017.

SANTOS, N. C.; BARROS, S. L.; MONTEIRO, S. S.; SILVA, S. N.; RIBEIRO, V. H. A.; SILVA, V. M. A.; GOMES, J. P.; SANTIAGO, A. M.; LUIZ, M. R.; VIEIRA, D.M.; ARAUJO, R. D.; VILAR, S. B. O.; BARROS, E. R. Kinetics of Drying and Physical-Chemical Quality of Peach cv. Hubimel. **Journal of Agricultural Science**, v.11, n.16, p.223-232, 2019a.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SILVA, L. C; Kunigk, C. J. Efeito do pH na sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* em matriz de fruta, **Brazilian Journal of Food Research**, v. 10, n. 4, p. 118-130, 2019.

SOARES, M. B.; MARTINEZ, R. C. R.; PEREIRA, E. P. R.; BALTHAZAR, C. F.; CRUZ, A. G.; RANADHEERA, C. S.; SANT'ANA, A. S. The resistance of *Bacillus*, *Bifidobacterium*, and *Lactobacillus* strains with claimed probiotic properties in different food matrices exposed to simulated gastrointestinal tract conditions. **Food Research International**, v. 125, 2019.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. **American Journal of Enology and Viticulture**, p.3-5, 2006.

XU, Y.; LI, S.; HUAN, C.; JIANG, T.; ZHENG, X.; BRECHT, J. K. Effects of 1methylcyclopropene treatment on quality and anthocyanin biosynthesis in plum (*Prunus salicina* cv. Taoxingli) fruit during storage at a non-chilling temperature. **Biology and post-harvest technology**, v.169, 2020.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by



anthrone. **The Biochemical Journal, London**, v.57, p. 508-514, 1954.

YUASA, M.; SHIMADA, A.; MATSUZAKI, A.; EGUCHI, A.; TOMINAGA, M.  
Chemical composition and sensory properties of fermented citrus juice using probiotic  
lactic acid bacteria, v. 39, 2021.

## ARTIGO 2 – OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DA AMEIXA PROBIÓTICA POR LIOFILIZAÇÃO

### RESUMO

O desenvolvimento de probióticos em matriz vegetal é uma tendência promissora da indústria de alimentos, e as frutas por sua vez são apontadas como ótima matriz para o desenvolvimento probióticos não lácteo, porém fatores intrínsecos das frutas, tais como acidez e pH podem causar danos as células probióticas, surgindo assim a necessidade aplicação de tecnologias que promovam a estabilidade do produto. A microencapsulação por liofilização é uma alternativa viável para assegurar a qualidade do produto em diferentes ambientes. Portanto, a presente pesquisa teve como objetivo analisar a composição química das microcápsulas probiótica da ameixa e avaliar a influência das variáveis do processo de liofilização na viabilidade da *B. animalis subsp.* As polpas foram fermentadas utilizando a *B. animalis subsp.*, com diferentes concentrações dos agentes carreadores (maltodextrina e inulina) e submetidas a diferentes temperaturas de congelamento e tempos de congelamento e encapsuladas por liofilização. As microcápsulas probióticas apresentaram valores ótimos quanto ao teor de água e atividade de água, promovendo melhor estabilidade do produto durante o armazenamento. A concentração de fenólicos foram elevadas em todos os experimentos, tornando as microcápsulas em produtos de alto teor em compostos bioativos. O processo de liofilização demonstrou ineficiência com relação ao rendimento, porém as diferentes temperaturas de congelamento e as diferentes concentrações dos agentes carreadores influenciaram de forma significativa na viabilidade das células probióticas, com valores  $\log^{11}$  UFC/g para todos os experimentos. Durante o armazenamento, ocorreu uma redução significativa na viabilidade da *B. animalis subsp* em função tempo de armazenamento, porém o ciclo logaritmo permaneceu intacto.

**Palavras-chave:** *Prunus salicina lindl*; *Bifidobacterium animalis ssp*; Microencapsulação; Liofilização.

### ABSTRACT

The development of probiotics in plant matrix is a promising trend in the food industry, and fruit in turn is seen as an excellent matrix for the development of non-dairy probiotics,

however intrinsic factors of fruits, such as acidity and pH can cause damage to cells probiotics, thus arising the need to apply technologies that promote product stability. Freeze drying microencapsulation is a viable alternative to ensure product quality in different environments. Therefore, the present research aimed to analyze the chemical composition of the plum probiotic microcapsules and to evaluate the influence of the lyophilization process variables on the viability of *B. animalis* subsp. The pulps were fermented using *B. animalis* subsp, with different concentrations of carrier agents (maltodextrin and inulin) and subjected to different freezing temperatures and freezing times and encapsulated by lyophilization. The probiotic microcapsules showed optimum values in terms of water content and water activity, promoting better product stability during storage. The concentration of phenolics was high in all experiments, making microcapsules into products with a high content of bioactive compounds. The lyophilization process showed inefficiency with respect to yield, however the different freezing temperatures and the different concentrations of the carrier agents significantly influenced the viability of the probiotic cells, with  $\log^{11}$  CFU / g values for all experiments. During storage, there was a significant reduction in the viability of *B. animalis* subsp as a function of storage time, however the logarithm cycle remained intact.

**Keywords:** *Prunus salicina* lindl; *Bifidobacterium animalis* ssp; Microencapsulation;

Lyophilization.

## 1. INTRODUÇÃO

A ameixa (*prunus salicina lindl*) é segunda espécie de fruta com caroço mais cultivada no mundo, apresentando elevado grau de valorização, consumo e beneficiamento em diferentes segmentos industriais. Com relação a composição química e nutricional, os frutos da ameixa possuem componentes orgânicos essenciais para dieta humana, devido seu alto teor de compostos bioativos, em especial com os polifenóis (FRAGA et al., 2019; SWALLAH et al., 2020).

As frutas são consideradas excelentes matrizes para o desenvolvimento de microrganismos, principalmente por conter vitaminas e carboidratos que atuam como fonte de energia durante o processo de fermentação. Por meio destas evidências, estudos comprovaram que as frutas podem ser utilizadas como meio para elaboração de produtos probióticos de origem vegetal, podendo exercer efeito protetor dos microrganismos durante todo percurso realizado pelo trato intestinal, com isso, possibilita que bactérias lácteas como *Lacticaseibacillus* e *Bifidobacterium* cheguem ao organismo do hospedeiro em quantidade suficiente para que possam promover os benéficos específicos (CAMPANIELLO et al., 2020).

As bactérias dos gêneros das *Bifidobacterium* são probióticos utilizados no setor de laticínios na produção de queijos, bebidas lácteas dentre outros produtos e que além de apresentar valor nutricional, atua na manutenção e prevenção de várias doenças, principalmente a problemas da microbiota gastrointestinal do hospedeiro (KONG et al., 2019). Quando aplicado em polpa de fruta pode ocorrer uma taxa rápida de degradação destes microrganismos, uma vez que são sensíveis ao pH ácido das frutas, sendo necessário adequar o meio para seu desenvolvimento, além disso, outro fator preocupante é a alteração do pH, temperatura e umidade do gastrointestinal, podendo destruir estes microrganismos durante o processo natural digestivo. Portanto, eles requerem proteção contra degradação e inativação rápida até que sejam entregues ao local desejado; a microencapsulação é uma alternativa para essa proteção (HOLKEM et al., 2020).

A técnica de microencapsulação consiste no recobrimento das partículas, formando minúsculas cápsulas, que protege das condições adversas do gastrointestinal do hospedeiro, podendo liberar seu conteúdo de forma totalmente controlada. Dentre as principais técnicas de microencapsulação, a liofilização é a mais utilizada e indicada para

materiais contendo microrganismos, uma vez que o processo de secagem ocorre a frio e sobre vácuo, promovendo menores taxas de perdas após a secagem e apresenta melhores resultados na preservação dos constituintes ao longo do armazenamento. No entanto, as etapas anteriores a liofilização pode influenciar na qualidade do produto final, sendo necessário otimizar todos os processos, principalmente aqueles que tem total relação com a temperatura e tempo de congelamento. Diante do exposto, o presente estudo teve como objetivo elaborar microcápsulas da polpa da ameixa probiótica por liofilização, analisando a influência das variáveis independentes do processo na composição química e viabilidade celular durante o armazenamento.

## **2. MATERIAL E MÉTODOS**

### **2.1 Obtenção da polpa da ameixa**

A polpa 100% da ameixa foi obtida a partir do processamento em despulpadeira horizontal com frutos previamente selecionados e sanitizados. O pH inicial da polpa foi ajustado de 3,30 para 7,0, utilizando NaOH antes do processo de fermentação, visto que as *Bifidobacterium* são sensíveis a pH ácido (ANVISA, 2007).

### **2.2 Formulação e inoculação da cultura probiótica na polpa**

Inicialmente as amostras foram formuladas utilizando diferentes concentrações de maltodextrina e inulina (Tabela 1). A cultura probiótica liofilizada *Bifidobacterium animalis ssp* (DELVO®PRO LAFTI B94), foi hidratada diretamente na polpa da ameixa, na concentração de 1% (p/p). O processo de fermentação das amostras ocorreu durante 22 horas a uma temperatura de 37°C em estufa BOD, de acordo com metodologia descrita por Paim et al., (2016).

### **2.3 Otimização do processo de microencapsulação**

Os diferentes tempos de congelamento (2, 4 e 6 horas), temperatura de congelamento (-50, -100 e -150°C) e as diferentes concentrações maltodextrina e inulina (3,0, 5,0 e 7,0%), foram analisados utilizando matriz de planejamento fatorial 2<sup>3</sup> com repetição em triplicata no ponto central, resultando em 11 experimentos definindo assim, as variáveis independentes do processo de microencapsulação por liofilização como apresenta a Tabela 1.

**Tabela 1.** Matriz do planejamento fatorial do processo de microencapsulação por liofilização.

Experimentos	Variáveis independentes		
	Tempo de congelamento (horas)	Temperatura de congelamento (°C)	Concentração (%)
1	2 (-1)	-50 (-1)	3,0 (-1)
2	6 (+1)	-50 (-1)	3,0 (-1)
3	2 (-1)	-150 (+1)	3,0 (-1)
4	6 (+1)	-150 (+1)	3,0 (-1)
5	2 (-1)	-50 (-1)	7,0 (+1)
6	6 (+1)	-50 (-1)	7,0 (+1)
7	2 (-1)	-150 (+1)	7,0 (+1)
8	6 (+1)	-150 (+1)	7,0 (+1)
9	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)
10	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)
11	4 (0)	-100 (0)	5,0 (0)

Fonte: autor (2021)

Os efeitos das variáveis independentes na viabilidade das *Bifidobacterium animalis ssp*, rendimento e a eficiência do processo de microencapsulação foram analisados utilizando a metodologia de superfície de resposta. A análise de variância (ANOVA) da otimização do processo de microencapsulação por liofilização foi realizado com nível de probabilidade de 95%, com auxílio do software Statistica 7.0.

#### 2.4 Microencapsulação por liofilização

Para o processo de encapsulação da polpa da ameixa probiótica as amostras da polpa da ameixa probiótica foram desidratadas em liofilizador de bancada (modelo ALPHA 1-2 LD *plus*) a uma temperatura de -48°C e com pressão de 0,9 mbar durante 48 horas de processo de desidratação.

#### 2.5 Rendimento do processo

O rendimento do processo de microencapsulação foi calculado por meio da divisão em relação da massa final do material encapsulado e a massa da amostra inicial.

Utilizando a seguinte equação (1).

$$\text{Rendimento}(\%): \frac{X}{X_0} \times 100(1)$$

Em que:

X é a massa final do encapsulado (g), e X<sub>0</sub> é a massa total da amostra utilizado no início.

## 2.6 Viabilidade celular

A contagem microbiana probiótica foi realizada por diluição em série em 0,1% (w/w) de água peptonada estéril, de acordo com a International Dairy Federation (2006). Alíquotas foram inoculadas em ágar MRS e incubado a 35 C por 72 h em potes anaeróbicos com sistema de remoção de oxigênio (Interlab, São Paulo, Brasil), seguido por contagem de unidades formadoras de colônias (UFC/g).

## 2.7 Eficiência do encapsulamento

A taxa de sobrevivência *Bifidobacterium animalis spp* foi calculada para determinar a eficiência do processo microencapsulação probiótica por liofilização (DIAS et al., 2018a). Utilizando a seguinte equação (2).

$$EE\% = \frac{\log N}{\log N_0} \times 100 \quad (2)$$

Em que:

N é o número de células viáveis em pó após a liofilização (UFC/g base seca), e N<sub>0</sub> é o número de células viáveis antes do processo microencapsulação por liofilização (UFC/g seco base).

## 2.8 Propriedades físicas do material encapsulado

As microcápsulas da ameixa probiótica foram caracterizadas quanto a densidade aparente (CAPARINO et al., 2012), densidade compactada (TONON et al., 2013), Índice de Carr (WELLS, 1988) e Fator de Hausner (HAUSNER, 1967).



## **2.8 Caracterização físico-química**

As amostras probióticas foram caracterizadas físico-quimicamente conforme as metodologias descritas pelo Instituto Adolfo Lutz (IAL, 2008): pH em phmetro digital, teor de água por secagem direta em estufa a vácuo (70 ° C); cinzas por incineração em mufla a 550 ° C; acidez total titulável por titulação com NaOH 0,1 M.

Os carotenoides foram determinados de acordo com Lichtenthaler (1987), as antocianinas e flavonoides foram determinadas de acordo com o método de Francis (1982) e a determinação dos compostos fenólicos totais foram realizadas pelo método de Folin-Ciocalteu, descrito por Waterhouse (2006). Os açúcares totais foram quantificados pelo método da antrona segundo metodologia descrita por YEMN (1954). Os taninos foram analisados segundo a metodologia descrita por Goldstein e Swain (1963), utilizando a curva de ácido tânico como padrão.

## **2.9 Viabilidade celular durante o armazenamento**

As amostras foram acondicionadas em embalagens laminadas e armazenadas em BOD a uma temperatura de 25°C durante 28 dias de armazenamento e protegidas de quaisquer exposições a luminosidade. A viabilidade das das *Bifidobacterium animalis spp* foi analisada a cada 7 dias de intervalo.

## **2.10 Análise estatística**

Todos os experimentos desta pesquisa foram conduzidos em triplicata. A análise de variância (ANOVA) foi realizado com auxílio do software SISVAR, versão 5, seguido do teste de Tukey ao nível de 95% de confiança.

Os efeitos das variáveis independentes, temperatura de congelamento, tempo de congelamento e concentração dos adjuvantes, sobre as variáveis dependentes, rendimento, viabilidade celular e eficiência do processo de microencapsulação, foram avaliados mediante análise de planejamento fatorial, com nível de confiança de 95%, utilizando o programa software STATISTICA, versão 7.0.

### 3. RESULTADOS E DISCUSSÕES

#### 3.1 Caracterização físico-química

Os valores médios obtidos da caracterização físico-química da polpa da ameixa probiótica microencapsulação por liofilização estão expressos na Tabela 2.

**Tabela 2.** Caracterização físico-química das microcápsulas da ameixa probiótica.

Experimentos	pH	Acidez Total <sup>1</sup>	Cinzas <sup>2</sup>	Umidade <sup>3</sup>	a <sub>w</sub>	Açúcares Totais <sup>4</sup>
P1	5.15 c	2.62 a	2.44 e	3.46 bc	0.220 e	29,99 e
P2	4.70 h	2.45 b	2.50 d	3.49 bc	0.224 cd	27,39 f
P3	5.16 c	2.36 d	2.54 c	3.76 a	0.228 ab	28,92 e
P4	4.89 g	2.35 d	2.65 b	3.51 bc	0.224 cd	29,69 e
P5	5.15 c	2.15 i	2.68 ab	3.55 bc	0.227 bc	39,70 b
P6	4.94 f	2.42 c	2.67 ab	3.43 c	0.220 e	40,63 b
P7	4.99 e	2.26 f	2.70 a	3.54 bc	0.225 cd	42,72 a
P8	5.07 d	2.32 e	2.48 d	3.47 bc	0.225 cd	40,74 b
P9	5.20 b	2.21 g	2.12 f	3.61 ab	0.229 a	31,52 cd
P10	5.23 a	2.18 h	2.14 f	3.60 b	0.224 d	31,87 c
P11	5.19 b	2.21 g	2.13 f	3.60 b	0.229 ab	30,24 de

<sup>1</sup> ácido láctico (%), <sup>2</sup> (%), <sup>3</sup> (%), <sup>4</sup> (g 100<sup>-1</sup> g<sup>-1</sup>). Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p < 0,05).

O pH das frutas e dos seus derivados é um fator decisivo na utilização de polpa de fruta na elaboração de produtos probióticos de origem vegetal, tendo em vista que as bactérias do gênero das *Bifidobacterium* são sensíveis a pH ácido que a maioria das frutas possuem, sendo necessário a neutralização do meio para crescimento das bactérias. No presente estudo, o experimento 10 apresentou a maior média para potencial hidrogeniônico (pH), com valor de 5.23 diferindo dos demais experimentos (p < 0.05). Massounga Bora et al., 2019 obteve resultados semelhantes ao desenvolver microcápsulas de banana em pó por liofilização com pH inicial de 5.11. Para acidez total titulável os valores médios variam de forma significativa entre os experimentos, sendo que o experimento 1 apresentou a maior média para este parâmetro, com valor de 2.62% (p < 0.05).

As microcápsulas apresentaram valores de cinzas variando de 2.12 a 2.70%, respectivamente, essa variação significativa nos resultados tem relação com as diferentes concentrações de maltodextrina e inulina, uma vez que as microcápsulas elaboradas com

maior concentração dos agentes carreadores promoveram aumento significativo no teor de minerais de cada experimento ( $p < 0.05$ ).

O processo de microencapsulação por liofilização demonstrou-se ótima eficiência na remoção da água livre presente nas matrizes alimentares desenvolvidas no presente estudo, sendo o maior valor médio foi obtido para o experimento 3, apresentando umidade total de 3.76% e diferindo estatisticamente dos demais experimentos ( $p < 0.05$ ). Dias et al., 2018a apresentaram valores próximos para umidade em microencapsulas probióticas do maracujá por spray-dried. Para atividade de água das microcápsulas resultou em dados semelhantes a umidade total, com valores bem reduzidos para este parâmetro, porém ao analisar os dados estatisticamente nota-se que o experimento 9 apresenta maior valor médio dentre os experimentos, com diferença estatística ( $p < 0.05$ ). Valores semelhantes foram obtidos por Li et al., 2018 para microencapsulação da ameixa por spray-dried com valores médios de variando de 0.4 a 0.2. González et al., 2020 observaram valores com variação mais elevada ao avaliar a influência da liofilização e características físicas do caqui liofilizado.

Com relação ao teor dos açúcares totais, nota-se que os experimentos elaborados com as maiores concentrações dos agentes carreadores apresentaram teores de açúcares totais mais elevados, sendo o experimento 7 obteve maior teor de açúcares totais ( $p < 0.05$ ), esse resultado tem relação com as diferentes concentrações maltodextrina e inulina utilizadas na formulação das polpas probióticas, sendo que a inulina por ser frutooligossacarídeo e ter em sua composição química compostos orgânicos que são considerados adoçantes influenciou de maneira mais direta neste resultado. Lacerda Massa et al., 2020 estudando desenvolvimento de microcápsulas probiótica a partir do subproduto da Jaboticaba por liofilização, observam valor inferior com relação a concentração dos açúcares totais.

### **3.2 Caracterização fitoquímica**

A composição química das microcápsulas em relação a concentração dos compostos fenólicos totais, flavonoides, antocianinas, carotenoides e taninos estão expressos na Tabela 3 os valores médios de cada parâmetro analisado.

**Tabela 3.** Caracterização dos compostos bioativos das microcápsulas da ameixa probiótica.

Experimentos	Parâmetros				
	Compostos Fenólicos	Flavonoides Totais <sup>2</sup>	Antocianinas Totais <sup>3</sup>	Carotenoides Totais <sup>4</sup>	Taninos <sup>5</sup>
	Totais <sup>1</sup>				
<b>P1</b>	1095.11h	95.46 c	27.12 d	72,97 b	5378.04 d
<b>P2</b>	1157.83 i	96.30 c	32.84 b	72,22 b	6270.31 c
<b>P3</b>	1002.05 d	92.04 d	24.61 e	72,98 b	5218.28 e
<b>P4</b>	1193.58 g	92.03 d	29.53 c	73,83 b	6522.66 b
<b>P5</b>	8355.12 e	91.17 d	29.44 c	44,45 e	5020.36 f
<b>P6</b>	8233.29 f	99.38 b	13,70 g	47,58 cd	4961.75fg
<b>P7</b>	8958.56 c	83.87 f	16,26 f	42,20 f	5079.46 f
<b>P8</b>	8775.59 d	85.32 e	15,98 f	46,16 de	4828.40 g
<b>P9</b>	9506.73 b	120.98 a	35.54 a	95,49 a	6764.02 a
<b>P10</b>	9615.77 a	120.81 a	34.70 ab	96,71 a	6750.24 a
<b>P11</b>	9588.80 a	120.28 a	35.47 a	95,84 a	6703.34 a

<sup>1</sup> mg EAG (equivalente ácido gálico) 100 g<sup>-1</sup>, <sup>2</sup> (µg/100g), <sup>3</sup> (mg/100g), <sup>4</sup> (µg/100g), <sup>5</sup> mg EAT (equivalente de ácido tânico) 100 g<sup>-1</sup>. Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade (p <0,05).

De acordo com esta tabela, os experimentos 10 e 11 apresentaram maior concentração dos compostos fenólicos totais, com valores médios variando de 9588.80 a 9615.77 mg EAG, obtendo diferença significativa (p < 0.05). Bajić et al., 2020 observaram valores inferiores para compostos fenólicos totais em bagaço da ameixa liofilizado utilizando diferentes concentrações de maltodextrina. Santos monteiro et al., 2020 também obteve valores inferiores aos demonstrados nesta pesquisa estudando composição dos fenólicos em microcápsulas probiótica de maracujá com teores variando de 12.83 a 22.0 mg EAG.

Os resultados obtidos para flavonoides, antocianinas, carotenoides apresentaram comportamento estatístico semelhante, tendo em vista que as amostras que correspondem aos experimentos 9, 10 e 11 possuem as maiores médias para estes compostos bioativos, e analisando os valores estatisticamente, nota-se que estes experimentos apresentam diferença significativa quando comparado com os demais dados para cada respectivo composto orgânico (p < 0.05). Paim et al., 2016 avaliaram o teor dos compostos bioativos

da jussara probiótica microencapsulada por atomização e concluíram que as amostras formuladas 50% maltodextrina e 50% de unulina apresentaram uma maior retenção dos compostos bioativos.

Os teores de taninos totais das microcápsulas probióticas apresentam valores elevados em todos os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa, porém o experimento 9 possui uma concentração de 6764.02 mg EAT, com isso percebe-se que a média deste experimento diferiu do restante das médias ( $p < 0.05$ ).

### 3.3 Propriedades físicas

As microcápsulas foram caracterizadas em relação as suas propriedades físicas, sendo analisado as densidades aparente e compactada, índice de Carr e fator de Hausner, que são propriedades de fluxo extremamente importante para materiais em pó. Os valores médios obtidos para estas propriedades físicas estão expressos na Tabela 4.

**Tabela 4.** Propriedades físicas das microcápsulas da ameixa probiótica.

<b>Experimentos</b>	<b>Aparente<sup>1</sup></b>	<b>Compactada<sup>2</sup></b>	<b>Índice de Carr<sup>3</sup></b>	<b>Fator de Hausner</b>
P1	0.491 a	0.516 abc	4.75 k	1.04 g
P2	0.486 b	0.528 abc	7.92 j	1.08 f
P3	0.484 c	0.530 ab	8.72 i	1.08 ef
P4	0.476 d	0.525 abc	8.78 h	1.08 ef
P5	0.434 h	0.504 cde	14.01 <sup>a</sup>	1.15 a
P6	0.449 g	0.540 a	11.40 e	1.12 bc
P7	0.456 e	0.505 bcd	9.72 g	1.10 de
P8	0.453 f	0.506 bcd	10.31 f	1.11 cd
P9	0.422 h	0.480 e	12.19 d	1.12 bc
P10	0.424 j	0.486 de	12.71 b	1.13 b
P11	0.426 i	0.482 de	12.50 c	1.12 bc

Densidade aparente ( $\text{g cm}^{-3}$ ), Densidade compactada ( $\text{g cm}^{-3}$ ), Índice de Carr (%). Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

Os resultados comprovam que os pré-tratamentos utilizados nesta pesquisa influenciam diretamente nas propriedades físicas dos pós obtidos pela microencapsulação por liofilização. A densidade aparente foi significativamente maior para as amostras

elaboradoras com as menores concentrações dos agentes carreadores do processo de liofilização. Além da influência dos agentes carreadores, microencapsulação por liofilização promove alteração irregular na estrutura morfológica formando áreas ocas entre as partículas, podendo aumentar o volume e diminuir de forma significativa a densidade aparente (DADI et al., 2020). A densidade compactada o material encapsulado também apresentou efeito significativo entre as amostras analisadas, com redução nos valores destas propriedades em função do acréscimo das concentrações agentes carreadores.

Os índices de Carr dos materiais apresentaram variação com efeito significativo entre os experimentos, com valores variando de 4.75 a 14.01%, respectivamente. Com relação os fatores de Hausner os dados também apresentaram discrepância significativa para os diferentes experimentos desenvolvidos na presente pesquisa, com valor máximo de 1.15. Reddy et al., 2014 classificou os materiais em pó em função a sua eficiência de fluxo, em que valores de índice de Carr de 0-15% são classificados como excelente e fator de Hausner de 1.00-1.11 são classificados como excelente e valores 1.12-1.18 estão na categoria de ótimo. No tocante destes resultados, as microcápsulas são possuem excelente taxa de fluxo com relação aos índices de Carr e para os fatores de Hausner as microcápsulas foram classificadas variando de excelente para ótimo. Vivek et al., 2019 analisando microcápsulas de fruta *Sohiong* probiótico por atomização obteve valores inferiores de taxas de fluidos.

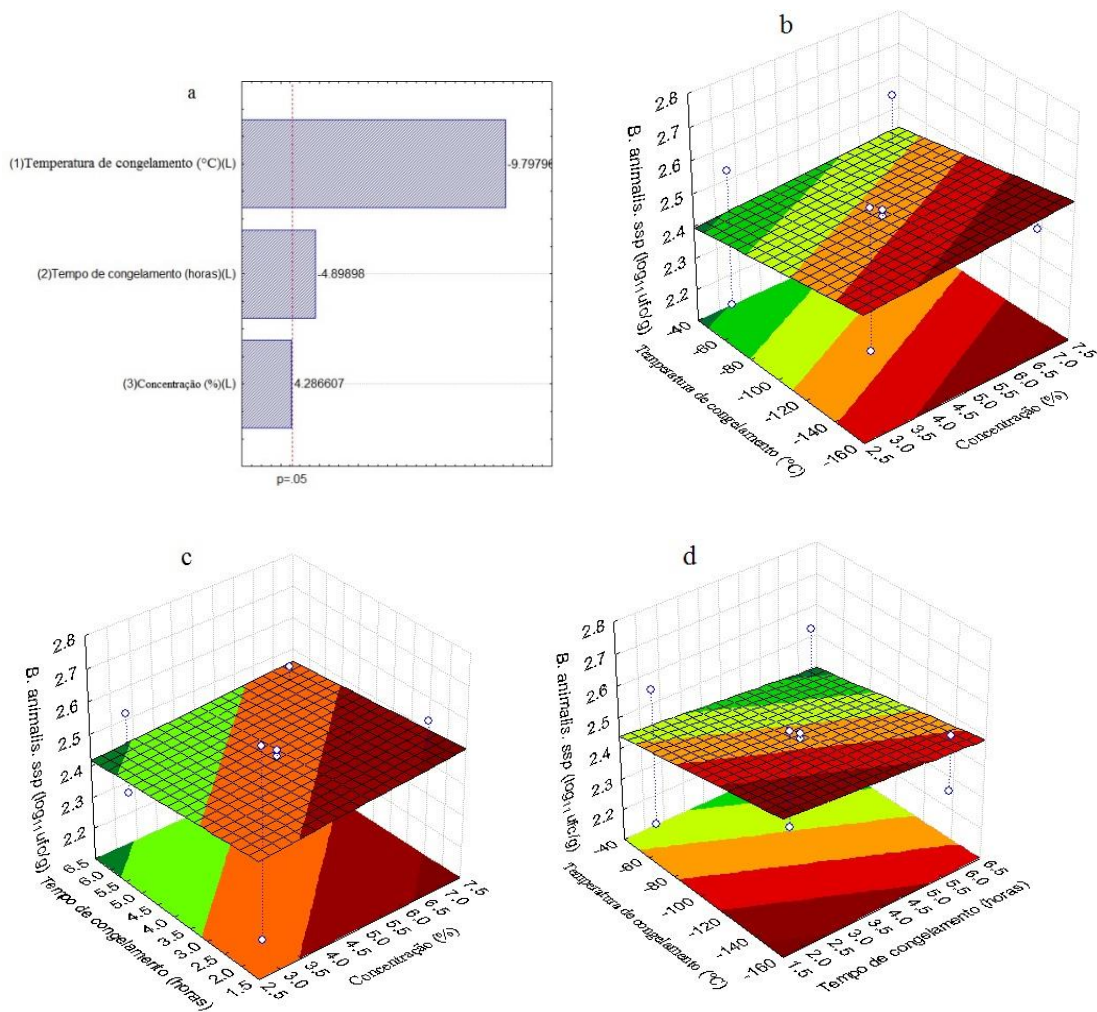
### **3.4 Otimização do processo de microencapsulação da polpa da ameixa probiótica**

As microcápsulas da ameixa probiótica por liofilização foram elaboradas seguindo 11 experimentos de três variáveis independentes (temperatura de congelamento, tempo de congelamento e concentração dos agentes carreadores de acordo a Tabela 1 e tendo com variáveis de respostas viabilidade da célula da *Bifidobacterium animalis spp*, rendimento do processo e a eficiência da microencapsulação por liofilização. Para cada variável de resposta foram gerados gráficos de superfície.

### **3.5 Viabilidade celular na polpa probiótica**

De acordo com os resultados obtidos, as diferentes variáveis independentes utilizadas nesta pesquisa apresentaram efeitos significativos em relação a viabilidade

celular da *B. animalis spp* nas microcápsulas da ameixa probiótica como pode ser observado na Figura 1 A.



**Figura 1.** Gráfico de pareto e superfície de resposta para viabilidade celular da *B. animalis spp*: (a) Gráfico de pareto; (b) temperatura de congelamento e concentração dos agentes carreadores; (c) tempo de congelamento e concentração dos agentes carreadores, (d) temperatura de congelamento e tempo de congelamento.

Nota-se que o maior efeito sobre a concentração das células foi por meio da influência da temperatura de congelamento, em que as amostras que foram submetidas a temperatura de -150°C (Figura 1B e D), apresentaram maior concentração, variando de 2.32 a 2.72 (log<sub>11</sub> ufc/g). WANG et al., 2020a estudando a influência da temperatura de congelamento na sobrevivência *Lactobacillus plantarum* strains após liofilização, conclui

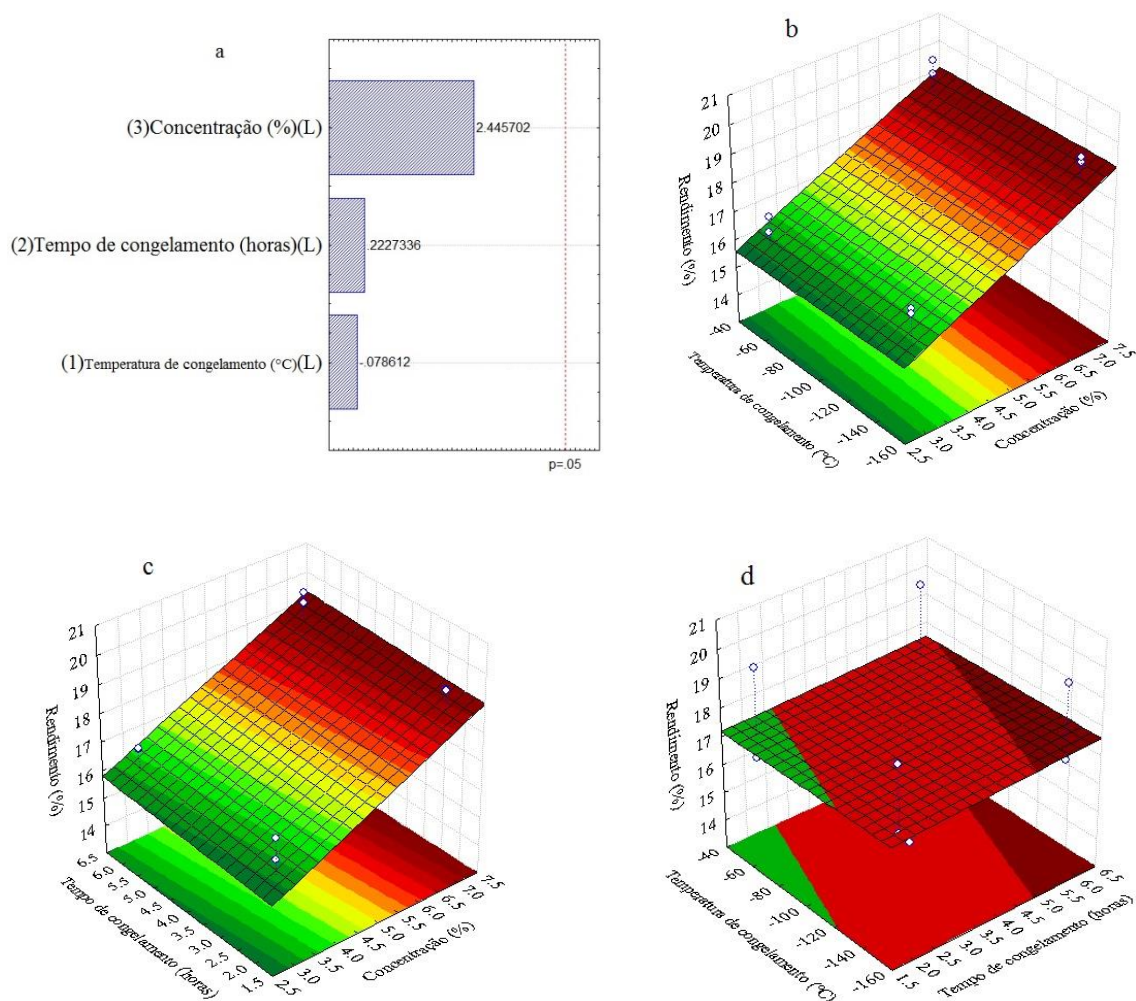
que a temperatura de  $-196^{\circ}\text{C}$  obteve maior taxa de sobrevivência. Resultados semelhantes foram encontrados por Dias et al., 2020b com concentração de *B. animalis* spp em bebida não láctea microencapsulada por atomização.

Com relação as demais variáveis, tais como a tempo de congelamento e as concentrações dos agentes carreadores, percebe-se que quanto menor for o tempo de exposição do material durante o congelamento, maior será a viabilidade das células. A otimização do processo de congelamento das amostras antes da liofilização é de suma importância, principalmente quando o material em questão contém células vivas (WANG et al., 2019b). Para as diferentes concentrações dos agentes, as microcápsulas elaboradas com maior concentração dos agentes carreadores, apresentaram maiores concentrações de células probióticas. A viabilidade das células das microcápsulas da ameixa probiótica por liofilização possuem valores de célula acima da concentração mínima de  $6,0 \log \text{UFC/g}$ , de acordo com as diretrizes recomendadas pela FAO/OMS (2003) sendo está a quantidade adequada para promover a saúde do hospedeiro.

### **3.6 Rendimento do processo**

O processo de microencapsulação da ameixa probiótica por liofilização demonstrou que as diferentes variáveis do processo culminaram na ineficiência do processo em relação ao rendimento final das microcápsulas, por conter baixo rendimento como pode ser observado na Figura 2A.



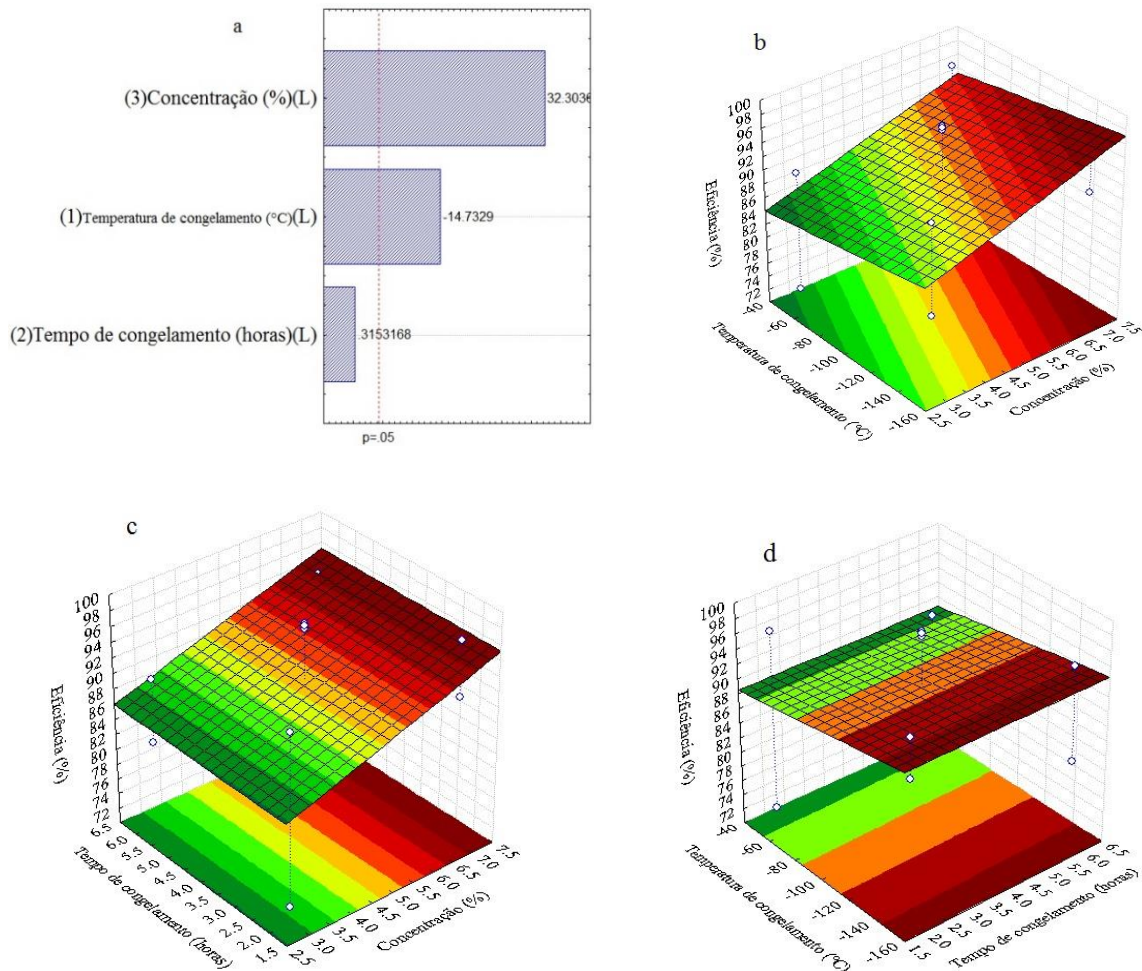


**Figura 2.** Gráfico de pareto e superfície de resposta para rendimento do processo: (a) Gráfico de pareto; (b) temperatura de congelamento e concentração dos agentes carreadores; (c) tempo de congelamento e concentração dos agentes carreadores, (d) temperatura de congelamento e tempo de congelamento.

As variáveis independentes não apresentaram efeitos significativos para este parâmetro. Mesmo sem conter efeito significativo, foi possível obter os gráficos de superfície de resposta para o rendimento do processo. Analisando a Figura 2B e C, percebe-se que as microcápsulas elaboradas com as maiores concentrações dos agentes carreadores, possuem os maiores valores de rendimento para este estudo, variando de 19.36 a 19.89%, respectivamente. Li et al., 2018 encontraram valores superiores para rendimento para microcápsulas elaboradas por spray-dried com valor de 57.36% para amostra com adição de 7:3 de maltodextrina e goma arábica. Hamid et al., 2020 também obteve resultados superiores na obtenção de microcápsulas de romã selvagem por liofilização.

### 3.7 Eficiência da microencapsulação por liofilização

A avaliação da eficiência da microencapsulação foi realizada por meio de uma relação da concentração inicial das células probióticas com a concentração após o processo de liofilização. A adição das diferentes concentrações dos agentes carreadores e da temperatura de congelamento promoveu efeito significativo em relação a eficiência da encapsulação da *B. animalis spp* nesta matriz alimentar como apresentado na Figura 3A.



**Figura 3.** Gráfico de pareto e superfície de resposta para eficiência do processo: (a) Gráfico de pareto; (b) temperatura de congelamento e concentração dos agentes carreadores; (c) tempo de congelamento e concentração dos agentes carreadores, (d) temperatura de congelamento e tempo de congelamento.

Os resultados comprovam excelência do processo, uma vez que a eficiência obteve valores variando de 72.10 a 97.50%. Conforme apresentado na Figura 3B e C, as microcápsulas elaboradas com as maiores concentrações dos agentes carreadores

apresentaram os melhores índices de eficiência. Além da influência exercida da maltodextrina no processo de encapsulação, inulina é um frutooligossacarídeo sendo considerado um ótimo substrato para o desenvolvimento de bactérias probióticas, pois fornece todos os nutrientes necessários. Estudo analisou o crescimento de bactérias do gênero das bifidobactérias em diferentes fontes de fibras, incluindo a inulina e cepas de *B. animalis subsp. Animalis*, e *B. bidifum*, *B. longum* desenvolveram com quantidade suficiente para ser classificados como produtos probióticos, com valores acima de 6,0 log UFC/ g (SELAK et al., 2016).

Assim com os agentes carreadores, experimentos submetidos as temperaturas mais críticas, apresentaram os melhores resultados em termo de eficiência do processo de encapsulação por liofilização. Menores taxa de eficiência foram obtidos por Viker et al., 2021b para microcápsulas de fruta Sohiong probiótico por pulverização. Resultados semelhantes foram encontrados por Namia et al., 2020 estudando o impacto da microencapsulação *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 em suco de laranja, com taxa de eficiência acima de 98,4% por liofilização.

### 3.8 Armazenamento da polpa em pó probiótica

A Tabela 5 mostra os valores médios obtidos para as alterações na viabilidade da *B. animalis subsp* durante o período 28 dias de armazenamento a uma temperatura de 25°C.

**Tabela 5.** Avaliação da viabilidade da *B. animalis subsp* (UFC/g) nas microcápsulas da ameixa probiótica.

Experimentos	DIA 1	DIA 7	DIA 14	DIA 21	DIA 28
P1	2.15 a	1.99 b	1.82c	1.66 d	1.35 e
P2	2.57 a	2.25 b	2.06 c	1.78 d	1.42 e
P3	2.74 a	2.00 b	1.82 c	1.52 d	1.45 d
P4	2.32 a	2.15 b	1.94 c	1.67 d	1.45 e
P5	2.59 a	2.40 b	2.17 c	1.77 d	1.48 e
P6	2.38 a	2.05 b	1.95 b	1.50 c	1.23 d
P7	2.45 a	2.05 b	1.98 b	1.59 c	1.20 d
P8	2.50 a	2.09 b	1.92 c	1.51 d	1.18 e
P9	2.46 a	2.02 b	1.96 b	1.49 c	1.29 d
P10	2.46 a	2.04 b	1.97 b	1.48 c	1.29 d
P11	2.48 a	2.02 b	1.97 b	1.48 c	1.25 d

Log<sub>11</sub> UFC/g. Médias seguidas das mesmas letras nas linhas não diferem estatisticamente pelo teste de

Tukey a 5% de probabilidade ( $p < 0,05$ ).

De maneira geral, nota-se que durante o armazenamento houve uma redução significativa na viabilidade da *B. animalis subsp* nas microcápsulas em todos os experimentos desenvolvidos nesta pesquisa em função dos dias de armazenamento que as amostras foram submetidas ( $p < 0.05$ ). No entanto, os resultados desta pesquisa comprovam que o processo de microencapsulação da polpa da ameixa probiótica por liofilização possui ótimo desempenho, uma vez que durante todo período de armazenamento as microcápsulas apresentaram valores de ( $\log_{11} \text{ufc/g}$ ), ou seja, o sem redução no ciclo logarítmico durante os 28 dias de armazenamento que as amostras foram submetidas.

Nossos resultados foram superiores aos valores médios obtidos por Corpas Iguará et al., 2020 para sobrevivência da *B. animalis subsp* em microcápsulas de banana por atomização, em que ocorreu redução do ciclo logaritmo durante todo processo de armazenamento. Estudo desenvolvido por Cedran et al., 2021 analisaram o comportamento da *B. animalis subsp* microenpasulada em resíduos de jabuticaba por liofilização apresentou resultados semelhante para viabilidade das células probióticas durante o armazenamento.

#### **4. CONCLUSÕES**

O desenvolvimento de microcápsulas da ameixa probiótica por liofilização utilizando diferentes concentrações dos agentes carreadores, diferentes temperaturas de congelamento e tempos de congelamento promoveu ótima estabilidade, uma vez que as microcápsulas apresentaram valores reduzidas de teor de água e atividade de água. Além disso, as análises químicas comprovam que as amostras possuem valores elevados de compostos bioativos, principalmente compostos fenólicos totais e taninos evidenciando as propriedades bioativos das microcápsulas probióticas. As características físicas das microcápsulas foram influenciadas pela adição das diferentes concentrações dos agentes carreadores, uma vez que o aumento na concentração de maltodextrina e inulina promoveu uma redução significativa em relação as densidades aparente e compactada, porém o índice de Carr e fator Hausner classificou as microcápsulas com taxa de fluxo variando de excelente para ótimo. Com relação a viabilidade das células probióticas, todos os experimentos apresentaram valores de  $\log_{11} \text{UFC/g}$  com eficiência

microencapsulação acima de 70%. Durante o armazenamento, as microcápsulas apresentaram uma redução significativa na viabilidade das células probióticas, porém o ciclo logaritmo permaneceu o mesmo durante a etapa do armazenamento.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Regulamento Técnico sobre Aditivos e Aromatizantes**, 2007.

BAJIĆ, A.; PEZO, L. L.; STUPAR, A.; FILIPČEV, B.; CVETKOVIĆ, B. R.; HORECKI, ALEKSANDRA.TEPIĆ.; MASTILOVIĆ, J. Application of lyophilized plum pomace as a functional ingredient in a plum spread: Optimizing texture, colour and phenol antioxidants by ANN modelling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 130, 2020.

CAMPANIELLO, D.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate- and Gelatin-Coated Apple Pieces as Carriers for *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DSM 10140. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 2020.

CAPARINO, O. A.; TANG, J.; NINDO, C. I.; SABLANI, S. S.; POWERS, J. R.; FELLMAN, J. K. Effect of drying methods on the physical properties and microstructures of mango (Philippine ‘Carabao’ var.) powder. **Journal of Food Engineering, Oxford**, v.111, n.1, p.135-148, 2012.

CEDRAN, M. F.; RODRIGUES, F. J.; BICAS, J. L. Encapsulation of *Bifidobacterium* BB12® in alginate-jaboticaba peel blend increases encapsulation efficiency and bacterial survival under adverse conditions. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 105, p. 119–127, 2021.

CORPAS IGUARÁN, E.; TRIVIÑO-VALENCIA, J.; RODRÍGUEZ-BARONA, S. Effect of storage and stress conditions on the counts of *Bifidobacterium animalis* microencapsulated and incorporated in plantain flour. **Brazilian Journal of Food Technology**, 23, 2020.

DADI, D. W.; EMIRE, S. A.; HAGOS, A. D.; EUN, J. B. Physical and Functional Properties, Digestibility, and Storage Stability of Spray- and Freeze-Dried Microencapsulated Bioactive Products from *Moringa stenopetala* Leaves Extract. **Industrial Crops & Products**, v. 156, 2020.

DIAS, C. O.; ALMEIDA, J. D. S. O.; PINTO, S. S.; OLIVEIRA, F. C.; VERRUCK, S.; MÜLLER, C. M. O. Development and physicochemical characterization of

microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Biosci**, v. 24, p. 26-36, 2018a.

DIAS, C. O.; SCARIOT, M. C.; DE MELLO CASTANHO AMBONI, R. D.; ARISI, A. C. M. Application of propidium monoazide coupled with quantitative PCR to evaluate cell viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a non-dairy probiotic beverage. **Annals of Microbiology**, v.70, n.22, 2020b.

FAO/WHO. Standard for fermented milks. **Codex standard**. 243. p. 1-8, 2003.

FRAGA, C. G.; CROFT, K. V.; KENNEDY, F. A.; TOMÁS-BARBERÁN. The effects of polyphenols and other bioactives on human health. **Food Funct**, v. 10, p. 514-528, 2019.

FRANCIS, F. J. Analysis of anthocyanins. *Anthocyanins as Food Colors*, v. 1, p. 280, 1982.

GOLDSTEIN, J. L., SWAIN, T. Changes in tannins in ripening fruits. **Phytochemistry, Cambridge**, v. 2, p. 371-383, 1963

GONZÁLEZ, C. M.; LLORCA, E.; QUILES, A.; HERNANDO, I.; MORAGA, G. Water sorption and glass transition in freeze-dried persimmon slices. Effect on physical properties and bioactive compounds. **LWT - Food Science and Technology**, v.130, 2020.

HAMID N. S. T.; THAKUR. A. Microencapsulation of wild pomegranate flavonoid phenolics by lyophilization: Effect of maltodextrin concentration, structural morphology, functional properties, elemental composition and ingredient for development of functional beverage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 133, 2020.

HAUSNER, H. H. Friction conditions in a mass of metal powder. **Powder Metall**, v.3, p.7-13, 1967.

HOLKEM, A. T.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; LACROIX, M. Study of anticancer properties of proanthocyanidin-rich cinnamon extract in combination with *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BLC1 and resistance of these free and co-encapsulated materials under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food**

**Research International**, v. 134, 2020.

IAL, Instituto Adolfo Lutz. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 1020 p, 2008

INTERNATIONAL ORGANIZATION FOR STANDARDIZATION; INTERNATIONAL DAIRY FEDERATION. **ISO 20128/IDF 192: Milk products – Enumeration of presumptive *Lactobacillus acidophilus* on a selective medium – Colony-count technique at 37°C**. Geneva: ISO, p.11, 2006.

KONG, C.; GAO, R.; YAN, X.; HUANG, L., & QIN, H. Probiotics improve gut microbiota dysbiosis in obese mice fed a high-fat or high-sucrose diet. **Nutrition**, v.60, p.175–184, 2019.

LACERDA MASSA, N. M.; DANTAS DUARTE MENEZES, F. N.; DE ALBUQUERQUE, T. M. R, DE OLIVEIRA, S. P. A.; LIMA, M. S.; MAGNANI, M., DE SOUZA, E. L. Effects of digested jaboticaba (*Myrciaria jaboticaba* (Vell.) Berg) by-product on growth and metabolism of *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* indicate prebiotic properties. **LWT - Food Science and Technology**, v.131, 2020.

LI, Y.; TANG, B.; CHEN, J.; LAI, P. Microencapsulation of plum (*Prunus salicina* Lindl.) phenolics by spray drying technology and storage stability. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 530-536, 2018.

LICHTENTHALER, H. K. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembranes. **Methods in Enzymology**, v. 148, n. C, p. 350–382, 1 jan. 1987.

MASSOUNGA BORA, A. F.; LI, X.; ZHU, Y.; DU, L. Improved Viability of Microencapsulated Probiotics in a Freeze-Dried Banana Powder During Storage and Under Simulated Gastrointestinal Tract. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, n. 11, p. 1330–1339, 2019.

NAMIA, Y.; LORNEZHADB. G.; KIANIC, A.; ABDULLAHD. N.; HAGHSHENAS, B. Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 in orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 124, 2020.



PAIM, D. R. S. F.; COSTA, S. D. O.; WALTER, E. H. M.; TONON, R. V. Microencapsulation of probiotic jussara (*Euterpe edulis* M.) juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.74, p. 21-25, 2016.

REDDY, R. S.; RAMACHANDRA, C.T.; HIREGOUDAR, S.; NIDONI, U.; RAM, J.; KAMMAR, M. Influence of processing conditions on functional and reconstitution properties of milk powder made from Osmanabadi goat milk by spray drying. **Small Ruminant Research**, v. 119, n.3, p. 130-137, 2014.

SANTOS MONTEIRO, S.; ALBERTINA SILVA BESERRA, Y.; MIGUEL LISBOA OLIVEIRA, H.; PASQUALI, MADB. Production of Probiotic Passion Fruit (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa* Deg.) Drink Using *Lactobacillus reuteri* and Microencapsulation via Spray Drying. **Foods**, v.9, n.3, 2020.

SELAK, M.; RIVIÈRE, A.; MOENS, F.; VAN DEN ABBEELE, P.; GEIRNAERT, A.; ROGELJ, I.; DE VUYST, L. Inulin-type fructan fermentation by bifidobacteria depends on the strain rather than the species and region in the human intestine. *Appl. Microbiol. Biotechnol*, v.100, n.9, p. 4097–4107, 2016.

SWALLAH, M. S.; SUN, A.; AFFOH, H.; FU, H.; YU. Antioxidant potential overviews of secondary metabolites (polyphenols) in fruits **Int. J. Food Sci**, 2020.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, n. 10, p. 1950-1958, 2009.

VIVEK, K.; MISHRA, S.; PRADHAN, R. C. Characterization of spray dried probiotic Sohiong fruit powder with *Lactobacillus plantarum*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 117, 2019a.

VIVEK, K.; MISHRA, S.; PRADHAN, R. C. Optimization of Spray Drying Conditions for Developing Nondairy Based Probiotic Sohiong Fruit Powder. **International Journal of Fruit Science**, 2021b.

WANG, G. Q.; PU, J.; YU, X. Q.; XIA, Y. J.; AI, L. Z. Influence of freezing temperature before freeze-drying on the viability of various *Lactobacillus plantarum* strains. **Journal**

**of Dairy Science**, v. 103, n. 4, p. 3066-3075, 2020a.

WANG, G.; X. YU, Z. LU.; Y. YANG, Y. XIA.; P. F. H.; LAI, L. AI. Optimal combination of multiple cryoprotectants and freezing-thawing conditions for high lactobacilli survival rate during freezing and frozen storage. **Lebensm. Wiss. Technol.**, v.99, p.217–223, 2019b.

WATERHOUSE, A. Folin-ciocalteau micro method for total phenol in wine. **American journal of Enology and Viticulture**. v. 48, p. 357-363, 2006.

WELLS, J. I. Pharmaceutical preformulation: the physicochemical properties of drug substances. **New York: Ellis Horwood Limited**, p. 553, 1988.

YEMN, E. W.; WILLIS, A. J. The estimation of carbohydrate in plant extracts by anthrone. **Biochemical Journal**, London, v.57, n.2, p.508-14, 1954.