

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA GASTRINTESTINAL DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ENCAPSULADAS EM ALGINATO DE CÁLCIO

Mayra Suster Maia ¹; Keiti Pereira Vidal de Souza ², Cynthia Jurkiewicz Kunigk ²

¹ Aluno de Iniciação Científica da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

² Professora da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo. *Os probióticos fazem parte do grupo de alimentos denominados funcionais, ou seja, além do aspecto nutricional, exercem efeito benéfico à saúde do consumidor. Para o alimento ser considerado probiótico, o microrganismo presente deve manter a viabilidade durante o armazenamento do produto. Além disso, para que efeitos benéficos sejam exercidos sobre a saúde do consumidor, o probiótico deve sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e chegar ao intestino em número elevado. Este trabalho teve como objetivo avaliar a influência do processo de encapsulação de *Bifidobacterium animalis* em matriz de alginato de cálcio, e em matriz de alginato de cálcio com farinha de banana verde na sobrevivência do microrganismo adicionado em smoothie de frutas comercial, durante o armazenamento do produto e durante o teste de simulação de resistência gastrointestinal. Os resultados mostraram que a contagem de *Bifidobacterium* no smoothie permaneceu em 10^8 UFC/g durante os 21 dias de armazenamento a 4 °C, não havendo diferença significativa entre o produto com células livres ou encapsuladas. No teste de simulação gastrointestinal, os microrganismos encapsulados presentes no smoothie com 21 dias de armazenamento, apresentaram maior resistência, independentemente da presença de farinha de banana verde. A contagem de microrganismo probiótico encapsulado em todas as fases do teste in vitro após 21 dias de armazenamento apresentou diferença de cerca de 2 log UFC/g em relação ao microrganismo livre no produto.*

Introdução

A busca por produtos saborosos, atrativos e que ao mesmo tempo proporcionem uma vida saudável para o consumidor é um dos desafios que as indústrias de alimentos enfrentam nos dias atuais. Dessa forma, as empresas investem em estudos tecnológicos relacionados a alimentos funcionais, que por meio de mecanismos não previstos na nutrição convencional, proporcionam efeitos benéficos à saúde. Como exemplo de atuais alimentos funcionais destacam-se os probióticos.

Os probióticos são microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidade adequada trazem benefícios à saúde do hospedeiro (SATHYABANA et al., 2014). As bactérias do gênero *Bifidobacterium* estão entre os microrganismos mais utilizados em alimentos funcionais (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011). Estas bactérias fazem parte da microbiota intestinal do ser humano, e quando presentes em número elevado, auxiliam a manutenção do equilíbrio e bom funcionamento do intestino (SUN; GRIFFITHS, 2000). A dose diária de microrganismos viáveis na porção do alimento para efeitos funcionais deve ser no mínimo de 10^8 a 10^9 UFC (AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA, 2008).

Os prebióticos são ingredientes alimentares seletivamente fermentados e não digeridos no intestino delgado que permitem alterações específicas na composição e/ou na atividade da microbiota gastrointestinal, o que permite o bem-estar e a saúde do hospedeiro (SAAD et al.; 2013).

Uma das frutas tropicais produzidas nacionalmente é a Banana, a qual apresenta cor verde antes da sua fase de maturação. Nessa fase, a polpa de banana não apresenta sabor, porém trata-se de uma massa com elevada concentração de tanino, o que resulta na sensação de adstringência. A produção de farinha de banana verde é uma alternativa industrial que permite a utilização desse produto como fonte de fibra alimentar, devido à presença

significativa de amido resistente (LEAL et al, 2006 e RAMOS, LEONEL, LEONEL, 2009). O amido resistente é considerado um ingrediente prebiótico, já que é um carboidrato não digerido no intestino delgado e fermentado no intestino grosso principalmente pelas bifidobactérias. O amido atua como substrato na fermentação feita por essas bactérias, e assim resulta na formação de ácidos graxos de cadeia curta, (acetatos, propionatos e butiratos), sendo o butirato o principal responsável por promover a saúde do cólon (PEREIRA, 2007).

Fatores como pH, disponibilidade de oxigênio e temperatura de armazenamento do alimento são alguns fatores que podem afetar a sobrevivência do microrganismo probiótico. Além disso, para proporcionar efeitos benéficos ao hospedeiro, o probiótico deve sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e atingir o intestino em quantidades suficientes para que exerçam benefícios à saúde do consumidor. Para melhorar a estabilidade de microrganismos probióticos em um produto, como também aumentar a sobrevivência destes durante a passagem pelo trato gastrointestinal, tem sido utilizada a técnica de microencapsulação (MARTIN et al, 2015 e PINTO et al, 2015).

A microencapsulação é o processo que se baseia na liberação sob condições específicas de cápsulas extremamente pequenas, materiais sólidos, líquidos ou gasosos. Dentre as técnicas de microencapsulação existentes, a técnica de extrusão é a mais usada, devido a sua simplicidade e baixo custo. Nessa técnica, as cápsulas com microrganismos são formadas quando uma solução de hidrocolóide, alginato de sódio, é gotejada sobre uma solução de endurecimento, cloreto de cálcio. (FAVARO-TRINDADE et al, 2008 e MARTIN et al, 2015).

Para avaliar o potencial próbiótico do microrganismo, simulações gastrintestinais *in vitro* são realizadas para determinar a resistência da bactéria a ácidos gástricos, enzimas digestivas e sais biliares, constituintes que fazem parte da digestão humana (SAAD et al, 2010 e MADUREIRA et al, 2011).

Os smoothies podem ser classificados como sucos tropicais mistos devido à presença de alta concentração de mais de uma fruta, entretanto apresentam características diferenciais de cremosidade, leveza e frescor. São produtos que possuem boa aceitação pelo consumidor moderno, pois agregam características de saudabilidade e praticidade (TEIXEIRA, 2012).

A fim de unir os benefícios à saúde dos probióticos e do prebiótico e das frutas em um único produto, este trabalho teve como objetivo avaliar a sobrevivência do probiótico *Bifidobacterium animalis* encapsulado em alginato de cálcio e farinha de banana verde adicionado em smoothie de frutas comercial, durante o armazenamento do produto e em condições simuladas do sistema gastrointestinal.

Material e Métodos

Preparo das células de *Bifidobacterium animalis*

A cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* BB-12 (Chr. Hansen) foi cultivada em frascos contendo 99 mL de caldo MRS (De Man Rogosa e Sharpe, Oxoid) e 0,5 mL de solução de cisteína a 10,0 %. Para isto, 0,1 g de cultura liofilizada foi suspensa em 100 mL de solução salina 0,85% estéril e homogeneizada no stomacher (Seward) por 2 minutos a 260 rpm. A partir dessa suspensão, 10 mL foram transferidos para 90 mL de solução salina 0,85% estéril, homogeneizada no stomacher sob as mesmas condições anteriores e 1 mL transferido para cada frasco com caldo MRS. Após o período de incubação a 37 °C durante 20 horas, quando a população atingia 10⁸ UFC/mL, o conteúdo dos frascos foi transferido para tubos estéreis e centrifugados (Mega 21R, Hanil) a 6000 rpm, na temperatura de 4 °C durante 15 minutos. Para cada tubo, o sobrenadante foi descartado e o sedimento de bactéria foi lavado com solução salina 0,85% estéril e centrifugado novamente sob as mesmas condições anteriores. O processo de lavagem e centrifugação foi repetido três vezes.

Farinha de Banana Verde

Foi utilizada farinha de banana verde (*Musa acuminata*), subgrupo *Cavendish*, conhecida como Nanicão com aproximadamente 40% de amido resistente.

A banana verde foi adquirida após um dia de colheita, na primeira fase de maturação e submetida ao processo de secagem em leito pulso-fluidizado, triturada em liquidificador doméstico e peneirada para atingir granulometria inferior a 250 µm.

Encapsulação

Conforme descrito por Boscarioli (2010), o método utilizado para a encapsulação de microrganismos teve como base a técnica de extrusão.

Ao total de células centrifugadas obtidas conforme o item anterior foram adicionados 20 mL de solução salina 0,85 % estéril. Essa suspensão de microrganismo foi homogeneizada com 180 mL de uma solução de alginato de sódio 1,1 % (Kimica Chile Ltda-I-3G-150). Para o preparo das cápsulas em matriz de alginato de cálcio com farinha de banana verde, este ingrediente foi acrescentado a suspensão na concentração de 1%

A suspensão foi adicionada por aspersão a uma solução 0,1 M de cloreto de cálcio (Vetec), mantida sob agitação magnética, com o auxílio de uma bomba peristáltica na vazão de 2,5 mL/min e ar comprimido numa vazão de 2,5 m³/min. As cápsulas de alginato de cálcio eram formadas quando a solução de alginato de sódio entrava em contato com a solução de cloreto de cálcio. Finalizado o processo, as cápsulas foram deixadas em repouso por 30 minutos e separadas da solução de cloreto de cálcio por meio de peneiras de aço inoxidável com aberturas de malha de 710, 250 µm e papel de filtro qualitativo. As cápsulas retidas na peneira de 250 µm e no papel de filtro foram lavadas com solução salina 0,85% estéril e adicionadas no smoothie.

Adição do microrganismo no smoothie

Os smoothies de frutas comercial utilizados apresentavam pH de 3,5 e era composto por: damasco, manga, acerola, maracujá, cupuaçu, suco concentrado de maçã, romã, pectina de fruta, fibra natural, zinco, selênio e vitaminas (A, C, D).

Em quatro frascos de smoothie contendo 260 g de produto foram retirados assepticamente 5 mL de cada para homogeneizar as células de *Bifidobacterium*, previamente obtidas conforme descrito no item preparo das células. Essa suspensão foi utilizada para a inoculação dos quatro frascos de smoothie, sendo adicionados 5 mL em cada. Dessa forma, o volume inicial de cada frasco não foi alterado.

Para o microrganismo encapsulado em alginato de cálcio e em farinha de banana verde, em tubos de polipropileno estéreis de 15 mL contendo 10 mL de smoothie, foram adicionados 1,0 g de cápsulas, obtidas conforme descrito anteriormente.

Os frascos e tubos com smoothie contendo células livres ou encapsuladas foram armazenados a 4 °C por 21 dias.

Simulação Gastrointestinal

Os microrganismos livres, os encapsulados em alginato de cálcio e os encapsulados em alginato de cálcio com farinha de banana verde foram adicionados no smoothie de frutas comercial e submetidos ao teste de resistência às condições simuladas do sistema gastrointestinal após 1 e 21 dias de armazenamento a 4 °C. A simulação gastrointestinal teve como referência a metodologia descrita por Madureira et al. (2011) com modificações e foram realizadas em triplicata.

A solução utilizada para simulação da fase gástrica (FG) era composta por 25 g·L⁻¹ de pepsina (Sigma) em HCl 0,1 M. A solução utilizada para a fase do duodeno (FD) e íleo (FI) era composta por 2 g·L⁻¹ de pancreatina (Sigma) e 12 g·L⁻¹ de sais biliares (Sigma) em NaHCO₃ 0,1 M.

Para o teste de resistência às condições simuladas gastrintestinais foram utilizados para cada amostra 5 tubos de polipropileno com 10 mL de smoothie contendo *Bifidobacterium* livre ou encapsulado. Um dos tubos foi utilizado para o monitoramento do pH, enquanto os outros tubos foram divididos por fases da simulação, sendo dois deles para a fase gástrica, um para a fase duodeno e o outro para a fase íleo. Os tubos foram colocados no banho termostático (Dubnoff) a 37 °C por 10 minutos para a estabilização da temperatura. A simulação gastrointestinal teve início com a fase gástrica, com duração de 90 minutos. Primeiramente, para a redução do pH em torno de 2,0, foi adicionado em todos os tubos HCl 1 M e solução de pepsina para que a concentração atingisse 1,25 g·L⁻¹. Os tubos foram mantidos em banho com agitação de 130 rpm e 37 °C. Após 30 e 90 minutos, os tubos FG30 e FG90 foram retirados do banho para a quantificação de *Bifidobacterium*.

Para a etapa do duodeno com duração de 30 minutos, foram adicionados nos tubos restantes, solução de NaHCO₃ 1 M para o aumento do pH em torno de 5,5 e solução de pancreatina e sais biliares para que a concentração atingisse 0,55 g·L⁻¹ e 3,3 g·L⁻¹ respectivamente. A temperatura do banho foi mantida em 37 °C, porém com agitação reduzida para 50 rpm. O número de *Bifidobacterium* foi determinado ao final dessa fase com a retirada do tubo FD do banho.

Para a etapa do Íleo, foi adicionado NaHCO₃ 1 M para o aumento do pH em torno de 6,5 e posteriormente a solução de pancreatina com sais biliares para que a concentração fosse mantida em 0,55 g·L⁻¹ e 3,3 g·L⁻¹ respectivamente. Essa fase teve duração de 60 minutos e o tubo permaneceu no banho sob as mesmas condições da fase do duodeno. Ao término dessa fase, o tubo (FI) foi retirado para análise microbiológica.

Análise Microbiológica

As análises microbiológicas de *Bifidobacterium animalis* foram realizadas no smoothie após 1, 7, 14 e 21 dias de armazenamento a 4°C e também durante as fases da simulação gastrointestinal. Para cada análise foram utilizados frascos independentes.

Para o microrganismo livre no smoothie, 10 g da amostra foram diluídas em 90 mL de solução salina 0,85 % e em seguida, sucessivas diluições decimais foram realizadas. Para a quebra das cápsulas e liberação do microrganismo encapsulado, foi utilizado 90 ml de solução tampão fosfato pH 7,3 juntamente com 10 g da amostra que foram homogeneizados no stomacher (Seward) por 10 minutos a 230 rpm. A partir desta suspensão foram feitas sucessivas diluições decimais em solução salina 0,85%.

Para o plaqueamento, alíquotas de 1 mL de diluições adequadas foram transferidas para as placas de Petri e o meio de cultura MRS ágar (Oxoid) contendo 0,5% de cisteína foi adicionado. As placas foram incubadas a 37 °C por 72 horas em jarras de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose (Anaerogen, Oxoid). A contagem de *Bifidobacterium animalis* foi realizada em duplicata.

Planejamento Experimental e Análise Estatística

Foram avaliados três tratamentos, smoothie de frutas com células de *Bifidobacterium* livre (T1), encapsulado em matriz de alginato de cálcio (T2) e encapsulado em matriz de alginato de cálcio com farinha de banana verde (T3). Os tratamentos foram realizados em triplicatas.

Como variáveis respostas foram determinadas as contagens de probiótico em 1, 7, 15 e 21 dias de armazenamento do smoothie a 4 °C, e a contagem do microrganismo quando submetido ao teste de simulação das condições gastrintestinais, realizadas com 1 e 21 dias de armazenamento do smoothie.

Os resultados foram avaliados por Análise de Variância (ANOVA) e teste de Tukey para comparação de médias, considerando um nível de significância de 5 %.

Resultados e Discussão

A contagem do microrganismo livre no smoothie (T1), encapsulado em alginato de cálcio (T2), encapsulado em alginato de cálcio com farinha de banana verde (T3) e suas respectivas variações de pH ao longo de 1, 7, 14 e 21 dias estão representados nas tabelas 1 e 2, respectivamente.

Tabela 1 – Contagem de *Bifidobacterium animalis* no smoothie durante o armazenamento (Log UFC/g).

Tempo (dias)	Log UFC/g		
	T1	T2	T3
1	8,6 ^{aA} ± 0,2	8,8 ^{aA} ± 0,3	8,72 ^{aA} ± 0,09
7	8,59 ^{aA} ± 0,09	8,7 ^{aA} ± 0,2	8,5 ^{aAB} ± 0,2
14	8,5 ^{aA} ± 0,3	8,5 ^{aA} ± 0,3	8,4 ^{aAB} ± 0,2
21	8,4 ^{aA} ± 0,4	8,3 ^{aA} ± 0,5	8,2 ^{aB} ± 0,4

a. Médias com pelo menos uma letra igual na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

A,B. Médias com pelo menos uma letra igual na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$).

Tabela 2 - pH do smoothie durante o armazenamento

Tempo (dias)	pH		
	T1	T2	T3
1	3,4 ^a ± 0,1	3,5 ^a ± 0,1	3,51 ^a ± 0,07
7	3,45 ^a ± 0,07	3,56 ^a ± 0,05	3,49 ^a ± 0,06
14	3,5 ^a ± 0,1	3,6 ^a ± 0,2	3,52 ^a ± 0,06
21	3,40 ^a ± 0,09	3,5 ^a ± 0,2	3,4 ^a ± 0,1

a. Médias com letras iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p > 0,05$)

Observa-se na tabela 1 que a encapsulação da bactéria probiótica e a adição de farinha de banana verde não influenciaram significativamente ($p > 0,05$) a sobrevivência do microrganismo durante os 21 dias de armazenamento do smoothie a 4 °C. Ao final do armazenamento, o produto apresentou contagem de *Bifidobacterium* maior que 10^8 UFC/g nos três tratamentos, o que confirma sua propriedade funcional de acordo com a ANVISA, (2008). Nos três tratamentos, houve apenas uma redução de aproximadamente 0,3 log UFC/g da contagem da bactéria após 21 dias de armazenamento, entretanto apenas para o tratamento T3 (encapsulação em alginato com farinha de banana verde) a redução foi significativa, ($p < 0,05$) o que comprova que mesmo encapsulada, a célula probiótica ainda sofre reduções significativas ao longo do armazenamento a 4 °C.

As variações de pH do produto não mostraram diferença significativa ($p > 0,05$) ao longo dos dias de armazenamento e também entre os tratamentos. Esses resultados mostram que embora a contagem de probiótico tenha sido elevada, sua atividade metabólica não foi significativa para reduzir o pH do smoothie.

Contagem de *Bifidobacterium animalis* durante Simulação gastrointestinal após 1 dia de armazenamento do smoothie

As contagens do microrganismo livre (T1), encapsulado em alginato de cálcio (T2) e encapsulado em alginato de cálcio com farinha de banana verde (T3) em 1 dia de armazenamento do smoothie, submetido às fases gástrica após 30 e 90 minutos (FG 30 e FG 90), duodeno (FD) e íleo (FI) da simulação gastrointestinal estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Contagem de *Bifidobacterium animalis* (Log UFC/g)

Fase	Log UFC/g			Média
	T1	T2	T3	
Início	8,6 ^{Aa} ± 0,2	8,8 ^{Aa} ± 0,2	8,8 ^{Aa} ± 0,3	8,7 ^a
FG 30	8,5 ^{Aa} ± 0,2	8,5 ^{Aab} ± 0,3	8,5 ^{Aab} ± 0,2	8,5 ^a
FG 90	8,0 ^{Ab} ± 0,2	8,3 ^{Ab} ± 0,3	8,3 ^{Ab} ± 0,3	8,2 ^b
FD	7,78 ^{Ab} ± 0,09	7,9 ^{Abc} ± 0,4	8,2 ^{Abc} ± 0,3	7,9 ^b
FI	7,46 ^{ABc} ± 0,09	7,3 ^{Bc} ± 0,5	7,8 ^{Ac} ± 0,5	7,5 ^c
Média	8,1 ^A	8,2 ^{AB}	8,3 ^B	

a,b,c. médias com letras minúsculas iguais na coluna não apresentam diferença significativa (p > 0,05).

A, B. médias com letras maiúsculas iguais linha não apresentam diferença significativa (p > 0,05).

Nos três tratamentos observa-se que após a simulação gastrointestinal *in vitro*, o microrganismo apresentou redução significativa (p < 0,05) de 1,2 log UFC/g (em média), porém permaneceu em valores acima de 10⁷ UFC/g de smoothie, o que confirma sua elevada resistência.

Estudos *in vitro* feitos por Wang et. al (1999), avaliaram que o amido resistente pode proteger algumas espécies de bifidobactérias durante o armazenamento do produto e também durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. No presente estudo, também foi verificada uma contagem de *Bifidobacterium* mais elevada (p < 0,05) ao final da simulação gastrointestinal, quando o microrganismo estava encapsulado na presença de farinha de banana verde, que contém elevado teor de amido resistente.

Contagem de *Bifidobacterium animalis* durante Simulação gastrointestinal após 21 dias de armazenamento do smoothie

A contagem do microrganismo livre (T1) e encapsulado em alginato de cálcio (T2) em 21 dias de armazenamento do smoothie submetido às fases gástrica (FG 30 e FG 90), duodeno (FD) e íleo (FI) da simulação gastrointestinal está representado na Tabela 4.

Tabela 4 - Contagem de *Bifidobacterium animalis* (Log UFC/g)

Fase	Log UFC/g		
	T1	T2	T3
Início	8,2 ^{Aa} ± 0,5	8,3 ^{Aa} ± 0,5	8,2 ^{Aa} ± 0,3
FG 30	4,8 ^{Bb} ± 0,7	6,6 ^{Aab} ± 0,5	6,8 ^{Aab} ± 0,6
FG 90	4,1 ^{Bbc} ± 0,7	5,2 ^{ABbc} ± 1,0	6,2 ^{Abc} ± 0,8
FD	3,9 ^{Abc} ± 0,7	4,7 ^{Ac} ± 1,0	5,4 ^{Abc} ± 0,9
FI	2,5 ^{Bc} ± 0,4	4,2 ^{Ac} ± 0,8	4,8 ^{Ac} ± 0,8

a, b, c médias com pelo menos uma letra minúscula igual na mesma coluna não apresentam diferença significativa (p > 0,05).

A, B. médias com pelo menos uma letra maiúscula igual na mesma linha não apresentam diferença significativa (p > 0,05).

Homayouni et al (2008) avaliaram a viabilidade probiótica do *Lactobacillus casei* (Lc-01) e *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) livres e encapsuladas em matriz alginato com 2% de amido resistente em sorvetes e concluíram que a sobrevivência das células encapsuladas foi maior em relação as células livres. Já no presente trabalho, é observado na Tabela 4 que a presença de farinha de banana verde, após 21 dias de armazenamento do smoothie, não influenciou significativamente (p > 0,05) a sobrevivência da bactéria probiótica quando comparado com o microrganismo encapsulado sem farinha de banana verde. Entretanto

verificou-se diferença significativa ($p < 0,05$) nas contagens da bactéria livre e encapsulada em alginato de cálcio com farinha de banana verde. Após 90 minutos da fase gástrica, observa-se que a população de *Bifidobacterium* foi reduzida em 4,1 log UFC/g, quando inseridas livres no smoothie, enquanto que a população encapsulada em alginato foi reduzida em 3,1 log e na presença de farinha de banana verde a redução foi de apenas 2,0 log UFC/g, o que confirma a proteção em relação a presença de amido resistente. Ao final da fase Íleo, a população de microrganismo livre no smoothie foi significativamente ($p < 0,05$) menor se comparada com o microrganismo encapsulado em alginato e em alginato com farinha de banana verde. De acordo com a Tabela 4, ao final da simulação gastrointestinal in vitro observa-se que enquanto as células livres apresentaram redução de 5,7 log UFC/g, as células encapsuladas em alginato e em alginato com farinha de banana verde resultaram em reduções de apenas 4,1 e 3,4 log UFC/g, respectivamente.

Conclusão

A encapsulação de *Bifidobacterium animalis* em matriz de alginato de cálcio e em matriz de alginato de cálcio com farinha de banana verde mostrou ser efetiva no aumento da sobrevivência do microrganismo presente no smoothie com 21 dias de armazenamento, quando submetido à simulação das condições gastrintestinais. O smoothie de frutas avaliado apresentou potencial como alimento probiótico para o veículo de *Bifidobacterium animalis*.

Referências Bibliográficas

- ANVISA. (2008) **Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.** Disponível em http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em 15.07.2014
- BOSCARIOLI, M. P. M. (2010) **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete.** Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia - Dissertação de Mestrado.
- FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. (2008) **Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios.** Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, p. 103-112.
- HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, MS.; RAZAVI, S.H. (2008) **Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream.** Food chemistry, 111(1), 50-55, 2008.
- LEAL, E. L.; CASARES, F. R.; SAMESHIMA, M.; DE PAULA, M. P.; LEITÃO, T. P. (2006) **Industrialização de banana verde.** Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia – Trabalho de conclusão de curso.
- MADUREIRA, R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X (2011) **Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions.** Food Research International, v. 44, p. 465-470.
- MARTIN, J. M.; VILLOSLADA, F. L.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. (2015) **Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects.** Innovative Food Science and Emerging Technologies, v.27, p. 20-25.
- PEREIRA, K. D. (2007) Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável. Ciência e Tecnologia de Alimentos. V. 27, p. 88-92.

- PINTO, S.S.; FREIRE, C. B. F.; BENEDETTI, S.; MURAKAMI, F. S.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C (2015) **Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying**. Food Research International, v.27, p. 400-408.
- RAMOS, D. P.; LEONEL, M.; LEONEL, S. (2009) **Amido Resistente em farinhas de banana verde**. Alim. Nutr., Araraquara, v.20, n.3, p. 479-483.
- SAAD N.; DELATTRE C.; URDACI M.; SCHMITTER J.M.; BRESSOLLIER P. (2013) **An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field**. LWT- Food Science and technology. V. 50, ed. 1, p. 1-16.
- SAAD S. M. I.; CRUZ A.G.; FARIA J. A. F. (2011) **Probióticos e Prebióticos em alimentos: Fundamentos e Aplicações Tecnológicas**. São Paulo: Livraria Varela.
- SAAD, S. M. U.; BURITI, F. C. A.; CASTRO, I. A. (2010) **Viability of Lactobacillus acidophilus in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions**. International Journal of Food Microbiology, v.137, p. 121-129.
- SATHYABANA S.; RANJITH K.; BRUTHA P.; VIJAYABHARATHI R.; BRINDHA V. (2014) **Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment**. Trends in food science and technology. V. 57, p. 419-425.
- SUN W.; GRIFFITHS M. W. (2000) **Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan–xanthan beads**. International Journal of Food Microbiology. V. 61, ed. 1, p. 17-25.
- TEIXEIRA, N. J. F. T (2012) **Estudo da influência de amido resistente e do tempo de aeração na viabilidade de microrganismos probióticos em smoothie de frutas**. Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia - Dissertação de Mestrado.
- WANG, X. et al. In vitro utilization of amylopectin and high-amylose maize (Amylomaize) starch granules by human colonic bacteria. **Journal of Applied Microbiology**. 87: 631-9, 1999.