

Universidade Estadual Paulista

“Júlio de Mesquita Filho”

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Filmes de alginato como carreadores de probióticos

Jackson Andson de Medeiros

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

Área de concentração: Ciência dos
Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Henriette Monteiro
Cordeiro de Azeredo

Coorientadora: Dr^a Katia Sivieri

Araraquara

2021

Filmes de alginato como carreadores de probióticos

Jackson Andson de Medeiros

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

Área de concentração: Ciência dos Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo

Coorientadora: Dr^a Katia Sivieri

Araraquara

2021

M488f

Medeiros, Jackson Andson de.

Filmes de alginato como carreadores de probióticos / Jackson Andson de Medeiros. – Araraquara: [S.n.], 2021.
56 f. : il.

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

Orientadora: Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo.

Coorientadora: Kátia Sivieri.

1. Alginato. 2. Filme comestível. 3. Bactérias probióticas. 4. *Bacillus coagulans*. I. Azeredo, Henriette Monteiro Cordeiro de, orient. II. Sivieri, Kátia, coorient. III. Título.

CERTIFICADO DE APROVAÇÃO

TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: Filmes de alginato como carreadores de probióticos

AUTOR: JACKSON ANDSON DE MEDEIROS

ORIENTADORA: HENRIETTE MONTEIRO CORDEIRO DE AZEREDO

COORIENTADORA: KATIA SIVIERI

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

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

Prof. Dr. CAIO GOMIDE OTONI (Participação Virtual)
Departamento de Engenharia de Materiais / Universidade Federal de São Carlos - UFSCar

Profa. Dra. DANIELA CARDOSO UMBELINO CAVALLINI (Participação Virtual)
Departamento de Análises Clínicas / Faculdade de Ciências Farmacêuticas do Câmpus de Araraquara-UNESP

Araraquara, 25 de agosto de 2021

Dedico este trabalho a minha esposa Wallerya que sempre me ajudou nos momentos difíceis e não mediu esforços para que eu chegasse até aqui. Também dedico aos meus pais Neusa e Ialmir, que sempre acreditaram em mim e me ajudaram a superar todos os desafios que a vida me mostrou. Sem vocês não teria conseguido concluir.

AGRADECIMENTOS

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

Agradeço a Universidade Estadual Paulista (UNESP), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Araraquara – SP pela oportunidade de participação no mestrado de Alimentos e nutrição.

Ao Instituto de Física de São Carlos (USP) pela disponibilização das instalações do Laboratório Multiusuário e do Microscópio Confocal (Projeto FAPESP 2009/54035-4).

Ao Laboratório Nacional de Nanotecnologia (LNNano) pelo uso das instalações e do AFM (proposta AFM 27482).

A minha orientadora Prof^a Dr^a Henriette Monteiro Cordeiro de Azeredo, por ter acreditado no meu potencial de desenvolver este projeto, a todos os ensinamentos que me foram repassados e a paciência a mim confiada.

A minha coorientadora Dr^a Katia Sivieri pela disponibilização de seus ensinamentos e estrutura laboratorial e ao Dr. Caio Gomide Otoni pelo acompanhamento durante a realização deste projeto.

Agradeço a minha colega de laboratório Carolina M. Niro e a todos os participantes do grupo de pesquisa.

À Embrapa Instrumentação por disponibilizar toda sua estrutura para realização desta pesquisa.

RESUMO

Com o crescimento no consumo alimentos probióticos, existe uma necessidade no desenvolvimento de produtos alimentícios não lácteos, tendo em vista que a maioria dos produtos existentes no mercado são de derivados do leite. Entre esses produtos, podem-se incluir filmes comestíveis a serem incorporados como parte dos alimentos. Os filmes são geralmente formulados a partir de polissacarídeos, que têm baixa barreira a vapor de água; para melhorar essa barreira, pode-se adicionar uma fase lipídica (na forma de emulsão). **Objetivo:** produzir filmes probióticos comestíveis à base de alginato, com barreira melhorada a vapor de água. **Métodos:** Foi produzida uma emulsão Pickering de óleo de palma estabilizada por nanocristais de celulose bacteriana (NCCB), para tentar melhorar a barreira dos filmes ao vapor de água. A bactéria probiótica escolhida foi *Bacillus coagulans*, pela sua estabilidade a condições adversas (graças à capacidade de formação de esporos). Cinco filmes foram produzidos: (1) alginato (Alg), ou controle; (2) alginato com probiótico (Alg-Prob); (3) alginato com emulsão Pickering (Alg-Oil); (4) alginato com NCCB (Alg-NCCB); (5) alginato com probiótico e emulsão Pickering (Alg-Oil-Prob). Os filmes foram avaliados em termos de propriedades físicas, estruturais e de viabilidade da cepa probiótica (ao processamento, armazenamento e passagem simulada *in vitro* pelo trato gastrointestinal). **Resultados e conclusões:** Foi possível produzir filmes de alginato contendo a emulsão de Pickering e/ou os probióticos. No entanto, a presença da emulsão, ao contrário do esperado, aumentou a permeabilidade dos filmes a vapor de água e reduziu a hidrofobicidade da superfície. Por outro lado, a emulsão melhorou a elongação do filme. A incorporação do probiótico não interferiu na permeabilidade ao vapor de água, porém aumentou a hidrofobicidade da superfície e o módulo elástico. Os filmes de alginato mantiveram a viabilidade do probiótico em armazenamento por 138 dias e foram capazes de entregar os probióticos no intestino delgado.

Palavras-chave: Alginato; Filme comestível; Bactérias probióticas; *Bacillus coagulans*.

ABSTRACT

With the growth in the consumption of probiotic foods, there is a need for the development of non-dairy food products, considering that most products on the market are dairy products. Among these products, one can include edible films to be incorporated as part of the food. Those films are usually formulated from polysaccharides, which have low water vapor barrier properties; the addition of lipids (as an emulsion) may enhance this barrier. **Objective:** to produce edible probiotic films from alginate, with an enhanced barrier to water vapor. **Methods:** A Pickering emulsion of palm oil stabilized by bacterial cellulose nanocrystals (BCNC) was produced to try to improve the barrier of the films to water vapor. The probiotic bacteria of choice was *Bacillus coagulans*, due to its stability to adverse conditions (thanks to its spore-forming ability). Five films were produced: (1) alginate (Alg), or control; (2) alginate with probiotic (Alg-Prob); (3) alginate with Pickering emulsion (Alg-Oil); (4) alginate with BCNC (Alg-BCNC); (5) alginate with probiotic and Pickering emulsion (Alg-Oil-Prob). The films were evaluated in terms of physical, structural and viability properties of the probiotic strain (on processing, storage and simulated *in vitro* passage through the gastrointestinal tract). **Results and conclusions:** It was possible to produce alginate films containing Pickering emulsion and/or probiotics. However, the effect of the emulsion on the water vapor permeability (WVP) and contact angles was the opposite of what was expected: it increased the WVP and decreased the surface hydrophobicity (contact angles). On the other hand, it improved the film elongation. The incorporation of the probiotic did not interfere with the water vapor permeability, but it increased the surface hydrophobicity and the elastic modulus. The alginate films maintained the viability of the probiotic in storage for 138 days and were able to deliver the probiotics into the small intestine.

Keywords: Alginate; Edible film; probiotic bacteria; *Bacillus coagulans*.

SUMÁRIO

1. Introdução	10
2. Revisão de literatura	12
2.1 Probióticos	12
2.2 <i>Bacillus coagulans</i>	13
2.3 Filmes e revestimentos comestíveis	13
2.4 Alginato	14
2.5 Emulsões Pickering	16
3. Objetivos	17
4. Material e Métodos	18
4.1. Preparação da emulsão	18
4.1.1. Obtenção dos nanocristais de celulose bacteriana	18
4.1.1.1 Difração de raio x	18
4.1.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR dos NCCBs	19
4.1.1.3 Microscopia de força atômica	19
4.1.2. Elaboração da emulsão Pickering	20
4.1.3. Estudo de estabilidade e caracterização da emulsão	20
4.1.3.1. Diâmetro médio e Potencial Zeta	20
4.1.3.2. Estabilidade visual	21
4.1.3.3. Microscopia confocal de fluorescência	21
4.2. Elaboração dos filmes	21
4.3. Caracterização dos filmes	23
4.3.1. Permeabilidade a vapor de água (PVA)	23
4.3.2. Ângulo de contato	24
4.3.3. Ensaio mecânicos	24
4.3.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR dos filmes de alginato	24
4.3.5. Microscopia eletrônica de varredura	24
4.3.6. Opacidade	25
4.3.7 Avaliação quantidade de <i>Bacillus coagulans</i> na dispersão filmogênica e após a secagem	25
4.3.8 Avaliação da estabilidade das cepas probióticas nos filmes	26
4.3.9 Avaliação da viabilidade de <i>B. coagulans</i> durante passagem simulada pelo TGI	26
4.4 Análise estatística	28
5. Resultados e Discussão	29
5.1. Difração de raio x, FT-IR e Microscopia de força atômica dos NCCBs	29
5.2. Caracterização da Emulsão Pickering	31
5.2.1. Potencial Zeta e tamanho de gotículas	31
5.2.2. Estabilidade da emulsão em bancada	32
5.2.3. Microscopia confocal de fluorescência	32
5.3. Caracterização dos filmes	33
5.3.1. FT-IR dos filmes	33
5.3.2. Opacidade e imagens dos filmes	34

5.3.3. Permeabilidade a vapor de água (PVA)	35
5.3.4. Ângulo de contato	36
5.3.5. Microscopia eletrônica de varredura	37
5.3.6. Propriedades mecânicas	39
5.3.7. Avaliação da estabilidade das cepas probióticas nos filmes	40
5.3.8. Viabilidade de <i>B. coagulans</i> durante passagem simulada pelo TGI	41
6. Conclusão	43
7. Referências	44

1. Introdução

O mercado de alimentos probióticos vem aumentando consideravelmente nos dias atuais, gerando uma grande demanda pelo desenvolvimento desse tipo de produtos. A FAO/WHO (1) define probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem um benefício à saúde do indivíduo. Segundo Marketsandmarkets (2), o mercado de probióticos era estimado em US\$ 49,4 bilhões em 2018 e é projetado para crescer a uma taxa anual de 7%, para atingir US\$ 69,3 bilhões em 2023. O aumento da procura por probióticos está na nova rotina dos consumidores que buscam dietas que promovam saúde e bem-estar (3).

Com o crescimento no consumo de alimentos probióticos, existe uma necessidade no desenvolvimento de produtos alimentícios não lácteos, tendo em vista que a maioria dos produtos existentes no mercado são de derivados do leite, o que limita o consumo por pessoas com intolerância à lactose, alergia a proteínas do leite, ou mesmo veganos ou pessoas que não apreciam leite e derivados.

Uma alternativa seria a veiculação de probióticos em filmes e revestimentos comestíveis, que podem ser aplicados sobre vários alimentos, geralmente como adjuvantes de embalagem. Os filmes e revestimentos são formados por matrizes geralmente adequadas para carrear componentes bioativos (como probióticos), podendo mesmo promover liberação controlada e entrega em alvo específico (4).

Quando se pensa em um veículo para probióticos, é importante avaliar a capacidade da matriz para manter a viabilidade dos probióticos durante o processamento, a estocagem e a passagem pelo trato gastrointestinal (5). E dentro dessas características o alginato se destaca. Foi demonstrado que microcápsulas de alginato aumentam a viabilidade de bactérias probióticas durante a passagem pelo pH ácido do estômago (6,7), permitindo sua liberação no intestino(6), além de protegê-las em condições ambientais adversas (8). O alginato é um copolímero aniônico formado por monômeros de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G), e sua natureza aniônica explica esse comportamento no trato gastrointestinal. Em pH baixo (abaixo do pKa, que é de 3,38 para as unidades M e

3,65 para as unidades G), os grupos carboxilato do alginato se mantêm protonados e a repulsão entre as cadeias diminui, o que faz com que as cadeias de alginato se mantenham mais compactas no estômago, retendo o conteúdo. Quando o pH aumenta (como no intestino), os grupos carboxilato se desprotonam e a estrutura se expande, liberando o conteúdo (9).

Apesar das vantagens do alginato, uma de suas limitações para filmes (assim como outros polissacarídeos) é sua pobre barreira a vapor de água, devido à sua alta polaridade. A barreira a vapor de água é uma das propriedades mais importantes de filmes para aplicações em vários alimentos, para minimizar perda de água em frutas, hortaliças e queijos, entre outros, e para minimizar absorção de água por produtos desidratados. Nesse contexto, filmes de emulsão de polissacarídeos com substâncias hidrofóbicas têm a vantagem de exercer melhor barreira à água em relação aos polissacarídeos puros (10,11). O óleo de palma é comumente usado pela indústria de alimentos, e sua inserção como agente hidrofobizante em filmes comestíveis é encontrado na literatura. Pratama et al. (12) verificaram o efeito da incorporação de emulsão Pickering de oleína de palma estabilizada por quitosana em filmes de amido de tapioca, encontrando uma redução significativa nos valores de permeabilidade de água quando comparado com o filme controle.

Filmes de emulsão podem ser formados por emulsão convencional (estabilizada por surfactantes) ou por emulsões Pickering (EP), que envolvem adsorção de partículas coloidais na interface óleo-água, formando uma monocamada que evita coalescência (13). Nanocristais de celulose bacteriana (NCCB) têm se mostrado efetivos na estabilização de EP (14–16), já que, além de formarem uma monocamada robusta circundando as gotículas, ainda podem ser considerados anfifílicos, devido à presença de grupos hidroxila (hidrofílicos) na superfície, sendo a organização cristalina associada a interações hidrofóbicas (16). Além disso, Pereda et al. (17) já demonstraram a efetividade de nanocristais de celulose para estabilizar emulsões em filmes de quitosana com óleo de oliva, além de agir como reforço.

Neste trabalho, foram desenvolvidos filmes de alginato com adição de probióticos e/ou emulsão de Pickering, com objetivo de verificar o efeito de diferentes formulações de filmes sobre suas propriedades funcionais de importância para aplicação em alimentos.

2. Revisão de Literatura

2.1. Probióticos

O termo probiótico é uma palavra que significa "para a vida", sendo atualmente usado para se referir a microrganismos associados a efeitos benéficos para humanos e animais (18). Segundo a FAO/WHO (1), probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde. Estes microrganismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (19).

Muitos benefícios à saúde estão envolvidos na ingestão de alimentos probióticos, dentre eles a manutenção da barreira epitelial, inibição da adesão do patógeno às superfícies intestinais, modulação e adequado desenvolvimento do sistema imunológico, degradação de fontes de carbono não digeríveis (como polissacarídeos vegetais) e produção de diferentes metabólitos (20). Além disso, sua ingestão pode até mesmo melhorar o estado de depressão em humanos (21).

As principais fontes de probióticos encontrados no mercado são de matrizes lácteas, o que limita seu consumo por pessoas que não consomem leite e derivados. Os produtos probióticos não lácteos têm uma grande importância mundial devido à tendência contínua da alimentação sem produtos de origem animal (por consumidores vegetarianos e veganos) e a uma alta prevalência de intolerância à lactose em muitas populações ao redor do mundo(22), além de pessoas com alguma alergia a proteínas do leite.

Os microrganismos utilizados na maioria das formulações probióticas são dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, porém a viabilidade dessas bactérias a condições adversas (ex: altas temperaturas, baixo pH) geralmente é reduzida. É importante quando tratamos de microrganismos probióticos que eles mantenham

sua viabilidade durante a produção industrial, bem como durante a estocagem do produto final (23).

O uso de cepas probióticas formadoras de esporos trazem grandes benefícios em termos de resistência à produção industrial, armazenamento e proteção contra condições gástricas (pH baixo) do hospedeiro. As bactérias probióticas formadoras de esporos são resistentes ao calor e oferecem uma série de vantagens sobre outras não formadoras de esporos, como os gêneros *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (24).

2.2. *Bacillus coagulans*

B. coagulans é um bacilo Gram-positivo, formador de esporos, microaerofílico e produtor de ácido láctico (25). Os esporos de *Bacillus* spp. Podem sobreviver na acidez extrema do estômago e tolerar os sais biliares e outras condições hostis do trato gastrointestinal. Além disso, os bacilos são mais estáveis durante o processamento e armazenamento de alimentos e preparações farmacêuticas, o que os torna probióticos mais adequados para formulações promotoras de saúde(26). *B. coagulans* tem uma longa história de uso seguro em alimentos, tendo recebido o status “Geralmente reconhecido como seguro” (*Generally Recognized As Safe* - GRAS) pela Food and Drug Administration (27).

O uso de *B. coagulans* como probióticos já vem evidenciando bons resultados na saúde humana, aliviando a dor abdominal e distensão abdominal em pacientes com síndrome do intestino irritável (28), ajudando na digestão de carboidratos e proteínas (29,30), no tratamento de vaginoses (31), entre outros.

2.3. Filmes e revestimentos comestíveis

Filmes e revestimentos comestíveis têm sido propostos em vários estudos como adjuvantes de embalagens, contribuindo para a estabilidade de alimentos. Tanto filmes quanto revestimentos são produzidos a partir de formulações filmogênicas (dispersas em um solvente, geralmente água), porém diferem na sua aplicação ao substrato. No caso dos revestimentos, as formulações são aplicadas diretamente sobre a superfície dos alimentos, geralmente por imersão ou aspersão, secando já sobre essa superfície. Já os filmes comestíveis são pré-formados sobre

uma superfície plana e, após secagem, são destacados e usados como estruturas independentes, como embalagens primárias, sachês ou inseridos como camada de barreira entre componentes de alimentos (32). Como exercem funções de barreira, podem promover uma redução do uso de embalagens secundárias. Filmes e revestimentos podem ainda funcionar como transportadores de componentes ativos, como agentes antimicrobianos e antioxidantes (33).

Guimarães et al. (34) desenvolveram um doce revestido com uma cobertura probiótica de pectina contendo *Bifidobacterium animalis* ssp. Lactis e verificaram a estabilidade do microrganismo por 28 dias em temperatura de 4 °C, onde notou-se que o revestimento foi capaz de manter a viabilidade do probiótico. Soukoulis et al. (35) verificaram a interação entre a capacidade de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG e as propriedades estruturais e físico-químicas entre filmes comestíveis de diferentes matrizes poliméricas com a adição de concentrado de proteína de soro de leite. Os autores verificaram que os filmes de pectina tinham a maior contagem probiótica inicial, porém os filmes compostos de carragenina / goma de alfarroba ofereceram a maior estabilidade aos probióticos durante a estocagem. Isso indica que a viabilidade probiótica pode variar conforme a matriz biopolimérica, necessitando de mais estudos a fim de verificar qual a melhor matriz para filmes probióticos.

2.4. Alginato

O alginato é um biopolímero derivado de algas marinhas. É um copolímero em bloco linear de ácido β -D-manurônico (M) e ácido α -L-gulurônico (G)(36). Sua estrutura se encontra representada na Figura 1.

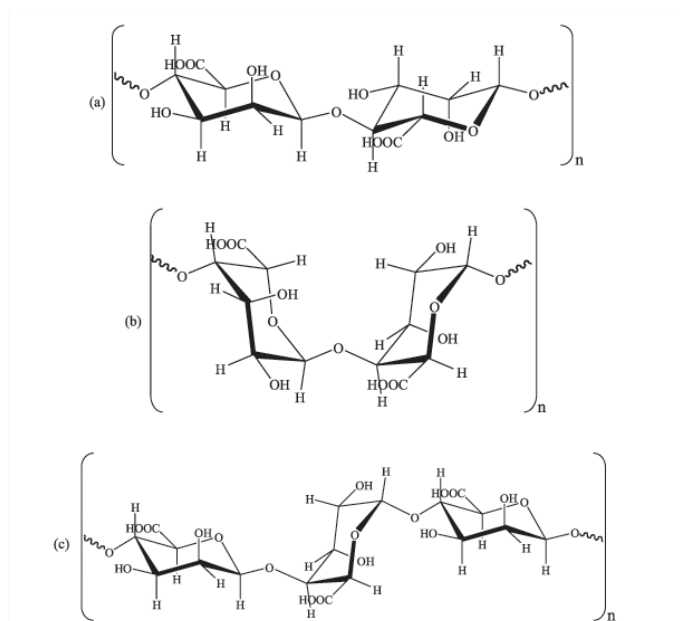


Figura 1: Estrutura do Alginato (a) Cadeia de ácido manurônico; (b) Cadeia de ácido gulurônico (c) Cadeia do Alginato (37)

O alginato tem um amplo potencial na indústria farmacêutica e de alimentos destinados a saúde, devido à sua extensa aplicação como aditivos alimentares e sua reconhecida falta de toxicidade(38). Em pH baixo (como no estômago), os grupos carboxilato do alginato se mantêm protonados e a repulsão entre as cadeias diminui. Quando o pH aumenta, os grupos carboxilato se desprotonam e a estrutura se expande, liberando o conteúdo no intestino (9). Devido a essas características químicas, o alginato se destaca como uma promissora matriz para formulação de filmes com o intuito de proteção de ativos no estômago e posterior entrega no intestino. Zactiti e Kieckbusch (39) estudaram a liberação de sorbato de potássio de filmes ativos de alginato de sódio, verificando uma boa liberação do constituinte ativo pelo filme no teste realizado *in vitro*. Filmes de alginato e carboximetilcelulose foram preparados com a adição de *Lactococcus lactis*, tendo sido observada a ação antimicrobiana da bactéria frente a *Staphylococcus aureus*. O filme teve ação contra o patógeno, tornando o filme uma alternativa na preservação antibacteriana de alimentos(40). Filmes de alginato e gelano foram eficientes em carrear *Bifidobacterium lactis* BB-12 em maçã e mamão minimamente processados, mantendo-se viáveis por 10 dias a 2 °C (41).

2.5. Emulsões pickering (EP)

Uma grande variedade de produtos alimentícios frescos e processados são emulsões óleo-em-água nas quais uma fase oleosa é dispersa em uma fase aquosa contínua (42). As emulsões são, em essência, sistemas instáveis, e podem se desestabilizar fisicamente por meio de diversos fenômenos, sendo os principais: floculação, coalescência, separação gravitacional e inversão de fase (43). Emulsões podem ser convencionais (estabilizadas por surfactantes) ou Pickering (EP), que envolvem adsorção de partículas coloidais na interface óleo-água, formando uma monocamada que evita coalescência (13).

As EP são definidas como emulsões que são estabilizadas por uma camada adsorvida de partículas sólidas na superfície da gota da emulsão (44). Elas retêm as propriedades básicas das emulsões clássicas estabilizadas por surfactantes (emulsificantes), de modo que uma EP pode substituir uma emulsão clássica na maioria das aplicações de emulsões (45), sendo que as EP têm sido reportadas como mais estáveis, graças à robustez e ordenação da interface (46).

As emulsões desempenham um papel importante em vários processos industriais e produtos comerciais onde coexistem fases líquidas imiscíveis (47). Na indústria de alimentos, tem-se um vasto potencial de uso, sendo as EP vantajosas do ponto de vista de não requererem o uso de surfactantes, além de ótima estabilidade quando comparadas com as emulsões convencionais (48)

A adição de agentes hidrofóbicos na constituição da dispersão formadora de filme pode ajudar a reduzir a permeabilidade a vapor de água e a solubilidade em água da maioria dos polissacarídeos comumente usados na elaboração. A incorporação de compostos hidrofóbicos emulsionados, como ceras, óleos e óleos essenciais, é estratégia amplamente utilizada para diminuir a permeabilidade ao vapor de água de filmes(49).

3. Objetivos

3.1. Objetivo geral: produzir filmes comestíveis probióticos a partir de alginato, com barreira melhorada a vapor de água.

3.2. Objetivos específicos:

3.2.1. Avaliar o efeito de diferentes formulações de filmes sobre suas propriedades físicas de importância para aplicação em alimentos;

3.2.2. Avaliar a estabilidade das bactérias probióticas durante o processamento, estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal *in vitro*.

4. Material e Métodos

4.1. Preparação da emulsão

4.1.1. Obtenção dos nanocristais de celulose bacteriana

As membranas de celulose bacteriana (BC) (previamente purificadas e secas) foram gentilmente cedidas pelo Grupo Empresarial Seven (Londrina, PR, Brasil). As membranas foram moídas em pó por meio de Moinho Analítico IKA A11 (Marca: IKA Works) por 20 minutos, em ciclos de 1 minuto intercalados por pausas de 10 min a 28.000 rpm.

Os nanocristais de celulose bacteriana (NCCB) foram produzidos por hidrólise ácida com H_2SO_4 a 60% por 60 min (proporção 1 g de CB seca e moída para 100 mL de solução ácida), que foi interrompida por diluição com água deionizada gelada (razão volumétrica 1:10 solução ácida: água gelada). A suspensão foi centrifugada (26000 g, 15 min) para precipitação dos NCCB, que foram lavados com água deionizada, centrifugados novamente e a suspensão resultante foi sonicada por 3 min (60 kHz, 300 W), com 3 repetições das etapas de centrifugação e sonicação. Após este processo, a suspensão foi dialisada em água deionizada até pH neutro. A suspensão final continha 1% de nanocristais.

4.1.1.1 Difração de raios-X

Para realização da análise, adicionou-se 40 mL de suspensão de nanocristais de celulose bacteriana em um tubo Falcon de 50 mL e acondicionou-se a amostra em ultra-freezer marca Liobras a -25 °C por 24 h. Após realizado este procedimento, encaminhou-se a amostra congelada para um liofilizador (Liotop, modelo L101), a -41 °C por 72 h.

A estrutura dos NCCB foi caracterizada por difratometria de raios X (DRX) utilizando um equipamento XRD 6000 (Shimadzu Corporation) operando com radiação $\text{Cu K}\alpha$ ($\lambda = 1,5405 \text{ \AA}$). O ânodo de cobre foi excitado com uma tensão de 30 kV e corrente de 30 mA. A intensidade do feixe difratado foi coletada a 25°C na

faixa de ângulos de Bragg de 4 – 70° utilizando uma velocidade de varredura de 1° min⁻¹.

Os difratogramas obtidos tiveram suas curvas determinadas com auxílio do software Origin Pro 8.0 e o índice de cristalinidade (Ic) foi calculado pela equação sugerida por Segal (50)

$$IC\% = \frac{(I_{200} - I_{am})}{I_{200}} \quad (\text{Eq 1})$$

Onde I_{am} é a intensidade da altura do pico da porção amorfa e I₂₀₀ é a intensidade da altura do pico da porção cristalina da celulose correspondente ao plano 200.

4.1.1.2 Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR dos NCCBs)

Para a análise dos nanocristais de celulose bacteriana, usou-se equipamento espectrofotômetro de infravermelho marca Bruker, modelo Vertex 70, acoplado com o acessório ATR (leitura por Reflectância Total Atenuada) com cristal de diamante. Foram feitas 32 varreduras na amostra na resolução de 4 cm⁻¹ na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.1.1.3 . Microscopia de força atômica

Imagens de microscopia de força atômica (AFM) dos NCCBs foram realizados pelo equipamento Bruker MultiMode 8. As amostras utilizadas para AFM foram preparadas por uma suspensão aquosa de NCCBs (0,005 g / mL) e diluída em água na proporção 1:1000 (v/v). As amostras foram sonicadas em Ultrassom (Marca: UNIQUE; Modelo: USC-1400A, frequência: 40kHz e potência: 150VA), durante 1 min, e 10 µL de suspensões de amostra foram deixadas a secar em discos de mica em câmara com atmosfera modificada (N₂) por 3 h. Utilizou-se a técnica de força de pico. As medições empregaram uma sonda de nitreto de silício (ScanAsyst-Air, Bruker), com força nominal constante de 0,4 N/m. As medidas de comprimento e

diâmetro obtidas por AFM foram analisadas com o Software Imagej Versão 1.53. As médias e desvio padrão, foram calculadas no Software BioEstat 5.0.

4.1.2. Elaboração da emulsão Pickering

Utilizou-se como fase apolar oleína de palma (180A, Grupo Agropalma, fornecida pela MasterSense Ingredientes e Aromas, Jundiaí, SP) e fase polar água na proporção mássica de 1:10 de óleo/água. Paralelamente, agitou-se por 10 min (em agitador magnético a 50 rpm) uma mistura entre a suspensão de NCCB (em volume calculado para conter 5% m/V de NCCB com base no volume de óleo da emulsão) e NaCl (em massa calculada para resultar em uma concentração final de 25 mM na emulsão). Considerando que as cargas negativas dos grupos sulfato na superfície dos NCCB promovem repulsão entre nanocristais, o que prejudicaria o acúmulo de NCCB na interface óleo/água, é necessário o uso de NaCl como fonte de contra-íons para estabilizar a interface.(51)

A emulsão foi então submetida a sonicação em Ultrassom de Ponteira Branson (modelo Sonifier 450, a 400W, frequência 20 kHz), em 6 sessões de 60 s com intervalos de 30 s, a 30% de amplitude (correspondente a 135 W / 25 mL).

Adicionaram-se 6 mL da emulsão a frascos graduados de 10 mL com tampa de rosca, para a análise de estabilidade visual, e o restante da emulsão foi utilizado para o estudo do potencial zeta e diâmetro médio das gotículas.

4.1.3. Estudo de estabilidade e caracterização da emulsão

4.1.3.1. Diâmetro médio e Potencial Zeta

A distribuição do diâmetro das partículas e o potencial zeta foram determinadas em Zetasizer Nano ZS (Malvern modelo: ZEN3600). As emulsões foram diluídas na proporção mássica de 2,5:1000 em água Milli-Q. As análises foram realizadas em triplicata e repetidas em diferentes tempos (0, 24, 72 e 168 h), sendo calculada a média e o desvio-padrão.

4.1.3.2. Estabilidade visual

Após 24 h da elaboração, a emulsão foi observada visualmente, a fim de verificar indícios de instabilidade (ex: separação de fases, presença de gotículas visualmente coalescidas). A emulsão ficou em armazenamento em temperatura ambiente 25 °C e foi medida a altura de fase cremeada em proporção à altura da emulsão, seguindo a metodologia (52), nos tempos 0h, 24h, 72h e 168h.

4.1.3.3. Microscopia confocal de fluorescência

A emulsão foi diluída na proporção mássica de 2,5:1000 em água Milli-Q e adicionou-se 5 µL de solução de curcumina (20 µg de curcumina por mL de etanol) como agente marcador fluorescente, para cada 5 µL de emulsão. O equipamento utilizado para análise foi o microscópio confocal de fluorescência Zeiss (modelo LSM 780 invertido) equipado com um LASER Ti:Safira (emissão: 690-1050 nm) com um aumento de 63X, pertencente ao Laboratório Multiusuário de Microscopia Confocal do IFSC / USP, São Carlos-SP. Realizou-se a captura da imagem com a amostra úmida (figura 8A) e após a amostra secar a temperatura ambiente no microscópio (figura 8B).

4.2. Elaboração dos filmes

Foram preparados 5 filmes (Figura 2): (a) alginato (Alg), ou controle; (b) alginato com probiótico (Alg-Prob); (c) alginato com emulsão Pickering (Alg-Oil); (d) alginato com NCCB (Alg-NCCB); (e) alginato com emulsão Pickering e probiótico (Alg-Oil-Prob).

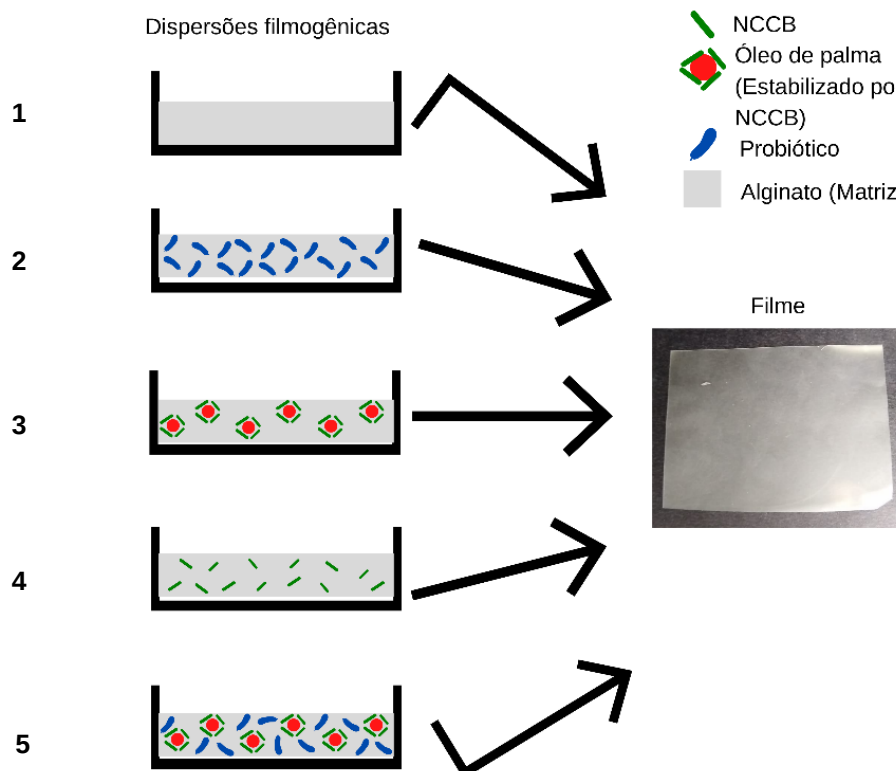


Figura 2. Esquema das diferentes formulações para formação de filmes. **1:** alginato puro. **2:** alginato + probiótico. **3:** alginato + emulsão Pickering. **4:** alginato + nanocristais de celulose. **5:** alginato + probiótico + emulsão Pickering.

Todos os filmes foram formulados a partir de 6 g de alginato e 2,1 g de sorbitol e uma solução reticulante de cloreto de cálcio (0,18g de CaCl_2 em 75 mL de água).

Para o filme Alg, adicionaram-se o alginato e o sorbitol em um becker contendo 225 mL de água destilada a 50 °C. A mistura foi agitada a 2000 rpm por 10 min em agitador mecânico (IKA modelo: EUROSTAR 400 control). Em seguida, com o auxílio de uma bureta, gotejou-se a solução de CaCl_2 (a 2,5 mL/min) à dispersão de alginato, mantendo a agitação por 50 min. A dispersão filmogênica foi então desgaseificada a vácuo em bomba a vácuo (KNF LAB modelo: N860.3 FT.18) por 15 min a uma pressão estimada em -800 mmHg, e depositada sobre placas (com espessura inicial de 2 mm pelo uso de uma barra niveladora para casting). A dispersão foi seca em estufa a 50°C por 24 h. Os filmes secos foram acondicionados em câmara climática (Ethik Technologies serie: 420-CLDTS) com umidade relativa de 50% a 25 ° C.

O filme Alg-NCCB foi feito seguindo o mesmo procedimento, porém incluindo a adição de dispersão de NCCB (em volume tal que contivesse 0,06 g de NCCB) ao final da agitação do alginato e sorbitol, com agitação adicional de 2 min antes da adição do CaCl_2 .

O filme Alg-Prob foi feito seguindo o mesmo procedimento do filme Alg, sendo que, ao final da agitação do alginato e sorbitol, foi adicionado 1 g da cultura comercial de *B. coagulans* BC4 50 MLD Lote: C235515A (Sacco, SRP, Itália), que corresponde a uma concentração de células viáveis de 11 log UFC/g. Após a adição do probiótico, a agitação foi mantida por mais 2 min, antes da adição do CaCl_2 .

Para os filmes contendo a EP de óleo de palma, preparou-se uma emulsão estoque (segundo descrito no item 5.1.2) para posterior adição à dispersão filmogênica.

O Filme Alg-Oil foi feito seguindo o mesmo procedimento do filme Alg, porém com a adição de 12 mL de emulsão de óleo de palma (com 10% de óleo) ao final da agitação do alginato e sorbitol. Após a adição da emulsão, a agitação foi mantida por mais 2 min, antes da adição do CaCl_2 .

Para o Filme Alg-Oil-Prob, seguiu-se a mesma sequência do filme Alg-Oil, porém com o acréscimo de 1 g da cultura comercial de *B. coagulans* juntamente com o acréscimo da emulsão.

Todos os filmes foram condicionados em câmara climática (Ethik Technologies, 420-CLDTS), por pelo menos 48 h a 50% UR e 25°C antes das determinações.

4.3. Caracterização dos filmes

4.3.1. Permeabilidade a vapor de água (PVA)

A determinação de PVA, com oito repetições, foi baseada no método E96 / E96M-16 (53) a 25 ° C, utilizando uma câmara climática 420-CLDTS (Ethik Technologies, Vargem Grande Paulista, SP), a 50% UR e 25°C, em células de permeação em teflon com 2,4 cm de diâmetro, contendo 2 mL de água destilada (100% UR). Foram realizadas 8 pesagens ao longo de cerca de 24 h, com intervalo mínimo de 1 h entre as pesagens.

4.3.2. Ângulo de contato

O ensaio foi realizado em um medidor de contato óptico CAM 101 (KSV Instruments) com câmera digital CCD KSV-5000 e software KSV CAM2008. Foram pipetados 5 μL de água Milli-Q nas superfícies dos filmes, e registradas 60 imagens ao longo de 60 s. As análises foram realizadas nas superfícies superiores dos filmes (a saber, as superfícies da interface filme-ar durante a secagem), para cada amostra, com 7 repetições, conforme a norma ASTM D5725-99 (54).

4.3.3. Ensaios mecânicos

As propriedades mecânicas dos filmes foram determinadas em uma Máquina Universal de Ensaios EMIC DL3000, equipada com célula de carga de 10 kgf (98,06 N). Os experimentos foram realizados seguindo a norma ASTM D882-09 (55) utilizando corpos de prova tipo I (ASTM D638-09) (56), velocidade de estiramento de 10 mm min⁻¹ e separação inicial entre garras de 100 mm. Para cada filme, no mínimo 10 corpos de prova foram utilizados.

4.3.4. Espectroscopia de absorção na região do infravermelho (FT-IR) dos filmes de alginato.

Para a análise, amostras de filmes (3mm²) foram preparadas. Usou-se equipamento espectrofotômetro de infravermelho marca Bruker, modelo Vertex 70, acoplado com o acessório ATR (leitura por Reflectância Total Atenuada) com cristal de diamante. Foram feitas 32 varreduras na amostra na resolução de 4 cm⁻¹ na faixa de 400 a 4000 cm⁻¹.

4.3.5. Microscopia eletrônica de varredura

Amostras de filmes (6mm²) foram preparadas e fixadas em stubs de alumínio com fita de carbono condutora e revestidos por pulverização catódica com uma camada de ouro de 10 nm de espessura usando ACE600 Sputter Coater (Leica

Microsystems, Wetzlar, Alemanha). As superfícies fraturadas foram obtidas submergindo as amostras de filme em nitrogênio líquido por 5 min e fraturando com uma pinça. As amostras foram montadas em stubs de alumínio com a superfície fraturada voltada para cima, usando fita de carbono condutora, e então revestidos por pulverização catódica com uma camada de ouro de 10 nm de espessura. Os espécimes foram observados em um microscópio JSM 6510 (Jeol, Tóquio, Japão) em 10 kV, com ampliações da superfície em (1000 x) e fraturas (1000x e 5000x).

4.3.6. Opacidade

A opacidade dos filmes foi medida utilizando o colorímetro Chroma Meter CR – 410 (Konica Minolta, EUA) como a razão entre a opacidade medida contra um fundo preto e a opacidade medida contra um fundo branco (57). 5 medidas foram realizadas para cada amostra de filme, e os resultados foram calculados em porcentagem.

4.3.7 Avaliação quantidade de *B. coagulans* na dispersão filmogênica e após a secagem

Para determinação da população de células viáveis em Unidades formadoras de colônia (UFC) por grama de filme em base seca, calculou-se a concentração de sólidos totais nos filmes: Alg-prob (3,05%) e Alg-prob-oil (3,47%).

A perda de viabilidade probiótica na secagem do filme foi avaliada pela contagem das células viáveis em dispersões formadoras de filme (três amostras de 1 mL tomadas antes da secagem) foram imersas em 9 mL de água salina (0,85% NaCl) previamente esterilizada, e homogeneizadas em vórtex por 10 segundos. Após este processo, foram feitas diluições seriadas até 10^8 . As amostras foram inoculadas pelo método de gotas (com gotas de 10 μ L) (58), em triplicata, em placas de Petri contendo meio TGY (em inglês, Tryptone Glucose Yeast) ágar. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h, e foi feita a contagem padrão de colônias. Para os filmes secos (três amostras de 0,1 g), seguiu-se a metodologia descrita no item 4.3.8.

4.3.8 Avaliação da estabilidade das cepas probióticas nos filmes

Para acompanhamento da viabilidade da cepa ao longo da estocagem, os filmes foram estocados em câmara climática 420-CLDTS (Ethik Technologies, Vargem Grande Paulista, SP), a 50% UR e 25°C. Nos tempos 0, 34, 76, 104 e 138 dias, amostras de filme (0,1 g) foram coletadas, em triplicata, imersas em 9,9 mL de água salina (0,85% NaCl) previamente esterilizada, e homogeneizadas sob agitação por 1 h em shaker a 50 rpm. Foram feitas diluições seriadas, e o restante do procedimento foi conduzido como no descrito na seção 4.3.7.

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

4.3.9 Avaliação da viabilidade de *B. coagulans* durante passagem simulada pelo TGI

Para avaliar o desempenho funcional dos filmes de alginato e a viabilidade das bactérias durante a passagem pelo TGI e sua posterior liberação no intestino, foi utilizado o protocolo INFOGEST de digestão simulada *in vitro* descrito por Minekus et al.(59), com algumas adaptações. O experimento foi realizado na Faculdade de Ciências Farmacêuticas (Departamento de Ciências Biológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Unesp, Araraquara, Brasil).

Para a realização do experimento, foram preparados três fluidos digestivos: fluido simulado salivar (FSS), fluido simulado gástrico (FSG) e fluido simulado intestinal (FSI), de acordo com a Tabela 1.

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

Tabela 1 Formulações dos fluidos digestivos: fluido simulado salivar (FSS), fluido simulado gástrico (FSG) e fluido simulado intestinal (FSI)

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

Para a simulação da fase oral, 4 mL da solução FSS, 25 µL CaCl₂ 0,3 M e 975 µL de água destilada foram misturados com 0,2 g de filme. Então, as amostras foram mantidas em banho metabólico tipo Dubnoff (MA 093, Marconi, Piracicaba, Brasil) a 37 °C por 2 min sob agitação a 180 rpm. Após a incubação, 0,1 mL do fluido foi retirado e adicionado em 0,9 mL de solução salina (0,85% de NaCl) previamente esterilizada, para realização das diluições seriadas e plaqueamento pelo método de gotas, como descrito no item 4.3.7.

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

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

O experimento foi feito em triplicata (para cada fase) para os filmes Alg-Prob e Alg-Prob-Oil. Como controle, um experimento branco (sem amostra) foi realizado simultaneamente.

Antes da realização do experimento, os filmes foram produzidos de acordo com o item 4.2 e a quantidade inicial de probióticos nas fitas foram estimadas de acordo com o item 4.3.7.

Os resultados foram calculados em UFC g⁻¹ de filme (base em massa seca do filme inicialmente usado) liberadas em cada fase.

4.4. Análise estatística

Os dados das análises (propriedades mecânicas, permeabilidade ao vapor de água, ângulo de contato e opacidade) foram analisados via software Minitab 19, e aplicando uma análise de variância (Anova, 1 fator) seguida do teste de Tukey para comparações múltiplas ($p < 0,05$).

5. Resultados e Discussão

5.1. Difração de raios-X, FT-IR e Microscopia de força atômica dos NCCBs.

Os resultados da análise de DRX se encontram na figura 3, sendo possível notar a predominância de picos no ângulo de Bragg 2θ : 14,7, 16,9 e 22,8 padrão conhecido na literatura como característicos de celulose I e são geralmente atribuídos a planos cristalográficos de [101] (região amorfa), [10 $\bar{1}$] (região amorfa) e [002] (região cristalina). A presença desses picos de difração caracteriza a celulose tipo Ia, que é prevalente na celulose bacteriana (60–62). Os NCCB apresentaram cristalinidade de 69%.

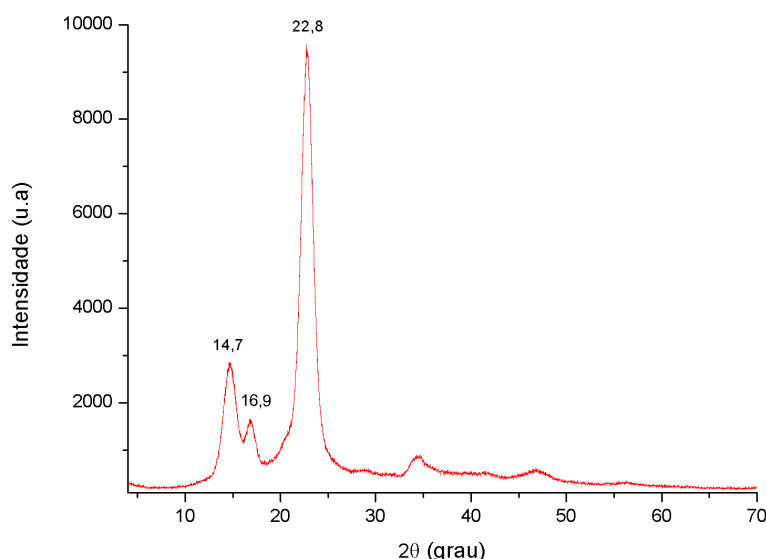


Figura 3. Difratoograma de raios-X dos NCCB.

A fim de verificar a estrutura química dos NCCBs, efetuou-se análise de FT-IR. Na figura 4 encontram-se os espectros. Bandas características de grupos hidroxila (OH)(62) foram observadas entre 3650 a 2892 cm^{-1} , a banda 2889 cm^{-1} é atribuída à vibração de alongamento de CH(60,63) o pico em 1645 cm^{-1} é atribuído a água absorvida (H-O-H) os picos 1051, 1311 e 1423 cm^{-1} estão associados a (curvatura simétrica CH_2 e curvatura OH) 665 cm^{-1} (C-OH fora do plano de curvatura) e 900 cm^{-1} (CH fora do plano de curvatura) dados muito próximos aos encontrados por Arserim-Uçar et. al. (62) indicando bandas típicas de celulose bacteriana.

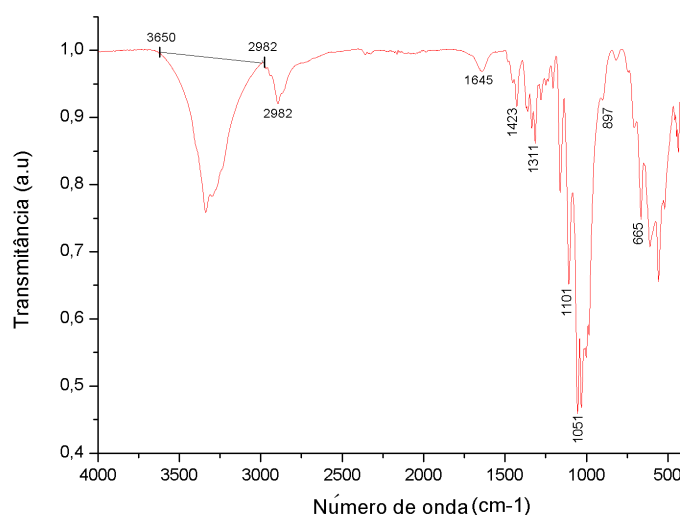


Figura 4. Espectro de FT-IR dos NCCBs.

Na figura 5, encontra-se a imagem de AFM dos NCCBs. Pode-se notar que os nanocristais encontram-se no formato de bastonete, morfologia característica de nanocristais de celulose (64). O diâmetro e o comprimento médios desses NCCBs foram encontrados em 34 ± 12 nm e 320 ± 120 nm, respectivamente. George e Siddaramaiah (64), analisaram as medidas dos nanocristais de celulose bacteriana, obtendo valores de diâmetro médio 20 ± 5 nm e de comprimento 290 ± 130 nm, valores próximos aos encontrados neste trabalho, tendo em vista que as dimensões dos nanocristais de celulose variam amplamente, dependendo da fonte do material celulósico e das condições sob as quais a hidrólise foi realizada (65).

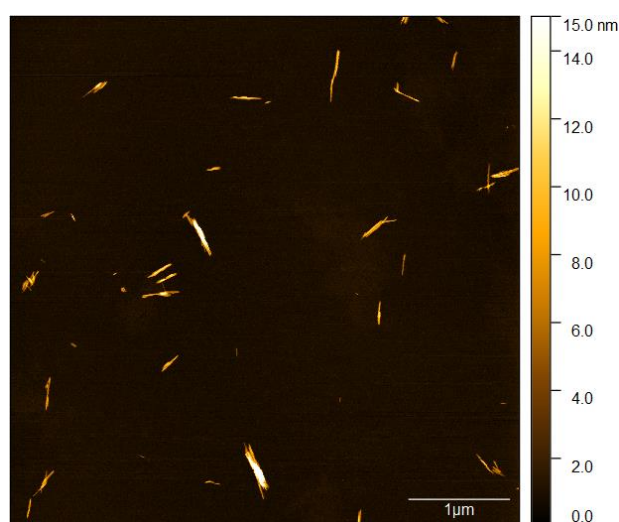


Figura 5. Imagens de AFM de nanocristais de celulose bacteriana obtidos após o tratamento de hidrólise ácida.

5.2. Caracterização da Emulsão Pickering

5.2.1. Potencial Zeta e tamanho de gotículas

Os dados de potencial Zeta da emulsão se encontram na figura 6, onde é possível observar que em todas as faixas de tempo as emulsões se mantiveram com potencial de módulo maior que 30 mV (com exceção do tempo 0, em que a medida foi de -28 mV), indicando relativa estabilidade cinética das emulsões a coalescência (66).

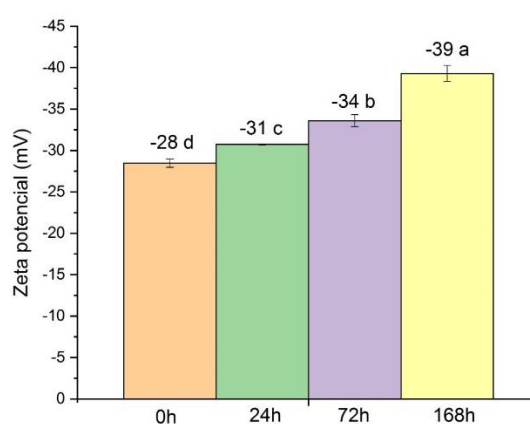


Figura 6. Dados de potencial zeta da emulsão Pickering, para diferentes tempos de estocagem a 25°C.

O perfil de tamanhos das gotículas da emulsão se encontra na figura 7. O tamanho médio aumentou significativamente no tempo 24h, porém já em 72 h o valor voltou a ficar dentro da faixa do tempo 0, mantendo-se após as 168 h do teste. Este resultado corrobora com os dados encontrados com o potencial zeta da emulsão indicando que não está havendo coalescência das gotículas.

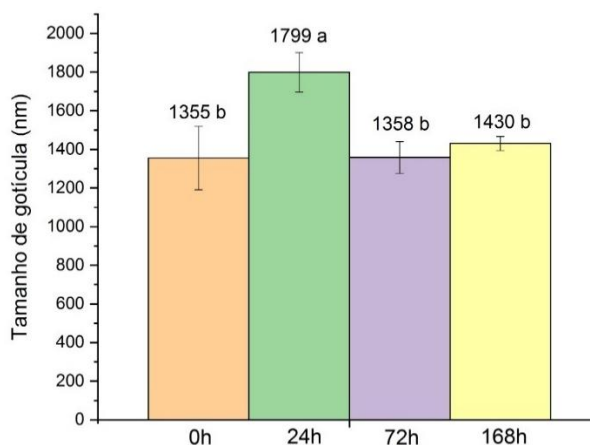


Figura 7. Dados de tamanho de gotícula da emulsão em diferentes tempos

5.2.2. Estabilidade da emulsão em bancada

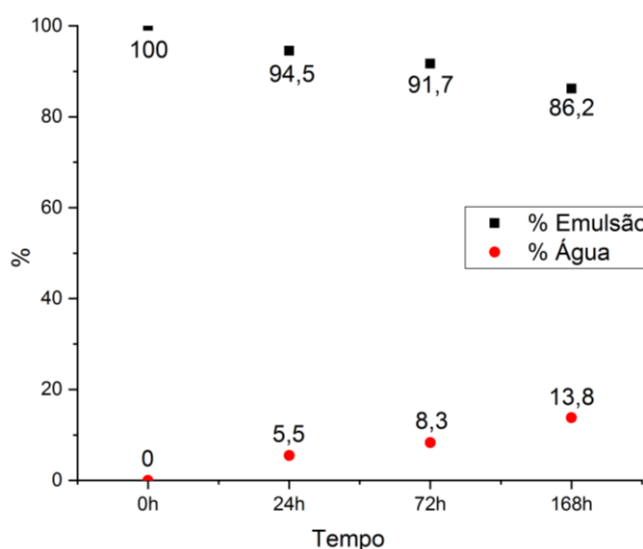


Figura 8. Percentual de emulsão e água liberada da emulsão em diferentes tempos

A fim de verificar a ação do tempo no volume total da emulsão, realizou-se um teste de estabilidade em bancada, verificando o volume de emulsão e de fase aquosa (soro) separada (Figura 8). Logo após a elaboração da emulsão, o sistema apresentava-se completamente emulsionado, iniciando uma pequena liberação de água com o passar do tempo. Após as 168 h, a porção visualmente emulsionada ainda representava 86,2% do volume, não tendo sido verificadas evidências visuais de coalescência ou separação de fase oleosa.

A visualização foi verificada após 24 h da elaboração e não observou-se a presença de óleo não emulsionado na superfície do sistema, havendo apenas uma pequena liberação de água, corroborando os dados de estabilidade, onde houve uma liberação de uma pequena quantidade de água não emulsionada.

5.2.3. Microscopia confocal de fluorescência

As imagens da microscopia confocal das EP de óleo de palma podem ser notadas na figura 9. Analisando as imagens nota-se que existe uma distribuição uniforme entre as gotículas (A), o núcleo de coloração azul representando o óleo de palma emulsionado. Em condições apolares, a curcumina fluoresce com maior

intensidade a 425 nm, onde o efeito do ambiente hidrofóbico intensificou a emissão de cor azul. Essa preferência pelo meio apolar pode ser devida às porções fenólicas da curcumina, que interagem com a região hidrofóbica da emulsão (67). Já quando a curcumina estava localizada na interface nanocristais/meio aquoso, ela emitiu cor amarela na região 550 nm indicando a camada estabilizante característica de uma EP. Ali et al. (68) encontrou pico de emissão de fluorescência de curcuminóide em amostras úmidas em 571 nm. Na imagem (B) encontram-se uma imagem da emulsão seca, sendo ainda possível notar a formação da EP de óleo de palma estabilizada com os NCCB.

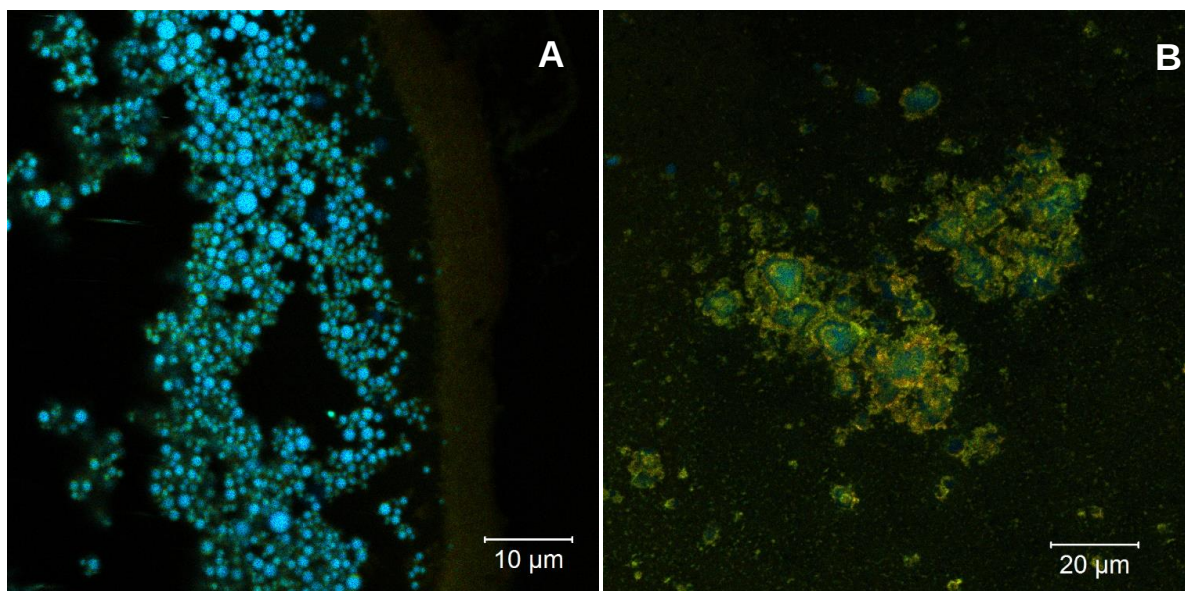


Figura 9: Micrografias fluorescentes da emulsão estabilizada por NCCB. (a) Emulsão na fase líquida; (b) gotículas de emulsão secas.

5.3. Caracterização dos filmes

5.3.1. FT-IR dos filmes

Os espectros de infravermelho dos filmes se encontram na figura 10, pode-se notar a presença das bandas 3297 (OH), 2918 (CH), 1593 e 1409 (COO-) e 1025 cm^{-1} (C-C e C-O) em todos os filmes analisados, corroborando com os dados

encontrados por Badita et al. (69) que traçou o perfil de infravermelho de filmes de alginato de sódio. Não houve alteração perceptível nos espectros quando adicionaram-se os probióticos, resultado próximo ao encontrado por Oliveira-Alcântara (70) que observaram que a adição do *B. coagulans* em filmes de celulose bacteriana e goma de caju pouco alterou os espectros. Já os filmes contendo EP de óleo de palma evidenciaram a presença das bandas 2925 e 2850 cm^{-1} características de vibração de alongamento assimétrico e simétrico do C-H alifático nos grupos CH_2 e CH_3 , grupos conhecidos por fazerem parte das moléculas de triacilglicerol presentes no óleo de palma (71) e também a banda 1743 cm^{-1} característica da ligação C=O do grupo carbonil éster, atribuída principalmente às vibrações de ligação dos lipídeos (72,73).

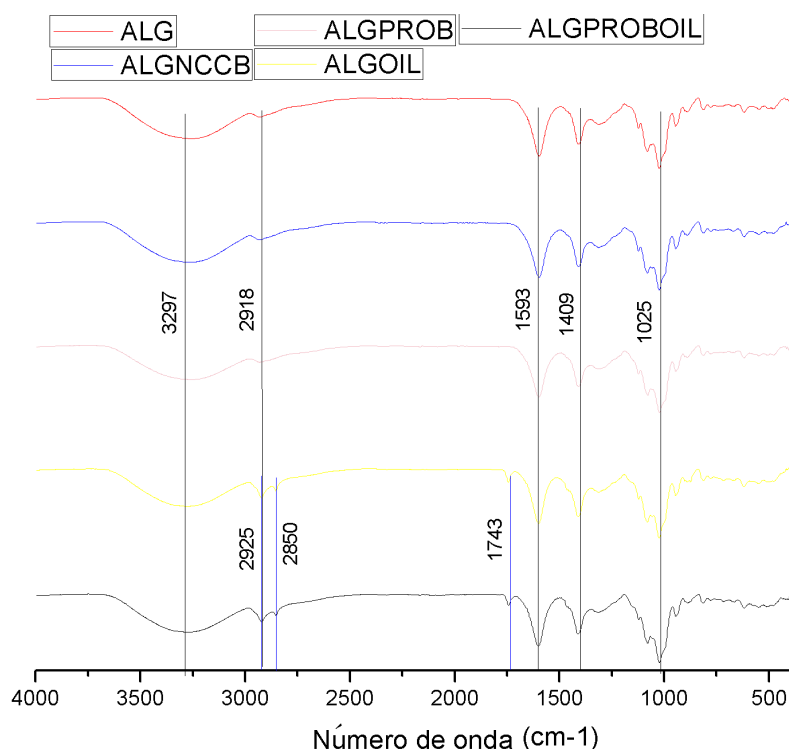


Figura 10. Espectros de infravermelho dos filmes de alginato

5.3.2. Opacidade e imagens dos filmes

As imagens obtidas para os filmes com diferentes formulações estão na figura 11. Os filmes Alg, Alg-NCCB e Alg-Prob se apresentaram razoavelmente transparentes, enquanto que a presença de óleo conferiu certa opacidade. Os filmes

Alg, Alg-NCCB, Alg-Oil e Alg-Prob não mostraram diferença quando comparados a olho nu, apenas encontrando diferença para o filme contendo EP e probiótico. Já quando verificamos os resultados de opacidade os filmes Alg-oil (16%) e Alg-prob-oil (15%) diferiram significativamente com os demais, mostrando que a adição de EP aumentou a opacidade do filme, provavelmente devido ao aumento da dispersão de luz pelas gotículas de óleo dispersas na matriz (74).

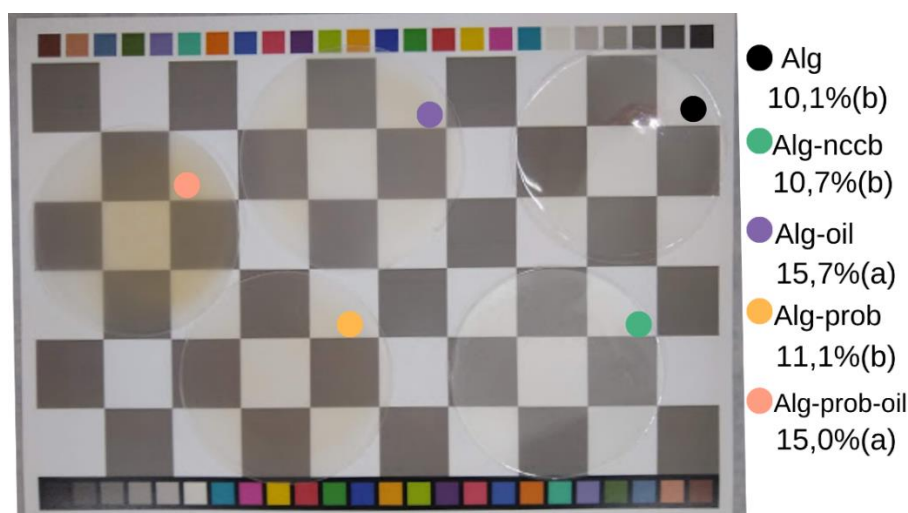


Figura 11. Imagens dos filmes, seguido da média de opacidade. Para opacidade, valores seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem significativamente ($p > 0,05$). Desvios-padrão: (N=5): Alg: $\pm 0,15$; Alg-nccb $\pm 0,44$; Alg-oil $\pm 0,25$; Alg-prob $\pm 1,71$ e Alg-prob-oil $\pm 0,21$.

5.3.3. Permeabilidade a vapor de água (PVA)

Na figura 12 encontram-se os resultados de permeabilidade ao vapor de água dos filmes. Os filmes Alg-Oil e Alg-Prob-Oil tiveram uma maior permeabilidade ao vapor de água quando comparados ao filme controle, verificando assim que a adição da emulsão Pickering nos filmes teve resultado oposto ao esperado (melhorar as propriedades de barreira). Pratama et al. (12) verificou o efeito da incorporação da EP de oleína de palma estabilizada com quitosana em filmes de amido, encontrando uma redução significativa nos valores de permeabilidade de água quando comparado com o filme controle. Já Liu et al. (75), ao aplicar EP de óleo misto (óleo essencial de orégano e óleo de soja) estabilizadas por coacervados complexos de proteína de soja solúvel em ácido e polissacarídeo de soja solúvel (SSPS) em filmes à base de SSPS, observaram um aumento da PVA ao aumentar a concentração de óleo. O aumento de PVA nos filmes contendo EP, observado

neste estudo, provavelmente se explica pela ocorrência de descontinuidades na rede polimérica, promovidas pelas gotículas da emulsão, o que pode facilitar a permeação das moléculas de água(49). Por outro lado, a adição do probiótico não resultou em aumento da permeabilidade, em contraste com o trabalho de Tapia et al (41), em que a adição de probiótico (*Bifidobacterium lactis* BB12) aumentou a permeabilidade, o que foi atribuído a um aumento no espaçamento entre as cadeias poliméricas, promovendo maior difusividade e, conseqüentemente, a permeação dos vapores de água.

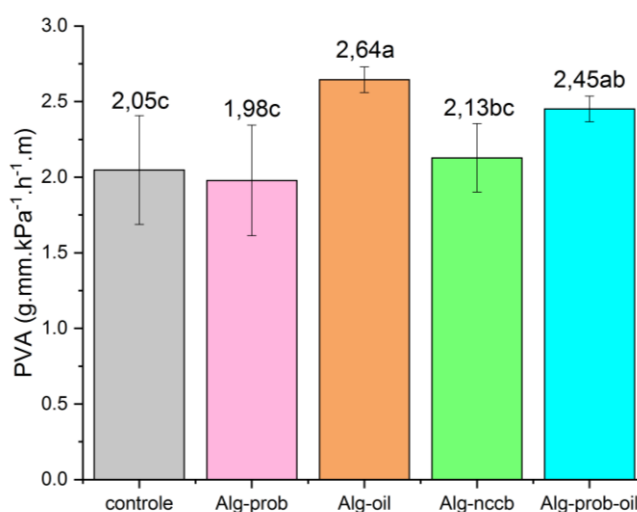


Figura 12. Permeabilidade ao vapor de água dos filmes. valores seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem significativamente ($p>0,05$). Desvios-padrão: (N=5): (Alg: $\pm 0,36$; Alg-nccb $\pm 0,22$; Alg-oil $\pm 0,08$; Alg-prob $\pm 0,36$ e Alg-prob-oil $\pm 0,08$).

5.3.4. Ângulo de contato

Os dados encontrados para o ângulo de contato dos filmes estão representados na figura 13. A presença de emulsão Pickering (por si só) não conferiu aumento de hidrofobicidade aos filmes, o que pode ser explicado pela robustez da camada de NCCB, mantendo a fase oleosa sem interação com os demais componentes do filme, e portanto não afetando sua hidrofobicidade. Já para os filmes contendo probióticos, houve um aumento significativo da hidrofobicidade da matriz, com ângulo de contato 49% maior quando comparado com o filme controle, em contraste com os filmes de CB/goma de cajueiro adicionados da mesma espécie de probiótico (57), que não apresentaram aumento do ângulo de contato em

relação ao filme controle. Esse aumento do ângulo de contato dos filmes contendo probióticos pode estar relacionado à presença de rugosidades na superfície dos filmes, conforme evidenciado nas micrografias (Figura 13). A presença de rugosidade superficial pode aumentar a hidrofobicidade da superfície (76,77).

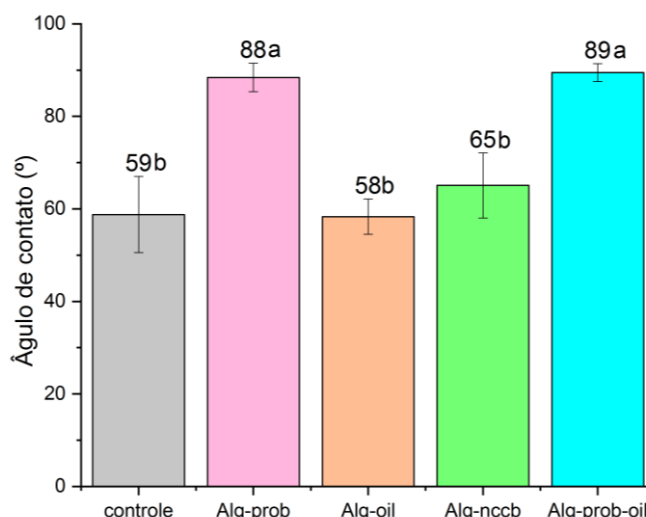


Figura 13. Dados de ângulo de contato dos filmes. Valores seguidos de pelo menos uma letra em comum não diferem significativamente ($p > 0,05$). Desvios-padrão: (N=5): (Alg: $\pm 8,23$; Alg-nccb $\pm 7,03$; Alg-oil $\pm 3,82$; Alg-prob $\pm 3,10$ e Alg-prob-oil $\pm 1,94$).

5.3.5. Microscopia eletrônica de varredura

As imagens transversais dos filmes e da superfície foram examinadas (figura 14). Os filmes Alg e Alg-NCCB apresentaram uma superfície lisa e homogênea característica de filmes puros de alginato, corroborando com as características encontradas por Ionita et. al (78). Também é possível notar através das imagens transversais, a presença de estrutura compacta dos filmes.

Para os filmes contendo EP de óleo de palma (Alg-oil e Alg-prob-oil), verificou-se a presença de esferas características de gotículas de emulsão distribuídas pela superfície e na região da fratura, também é possível notar microporos na superfície dos filmes, provavelmente devido à presença de microbolhas de ar formadas durante o processo e não eliminadas durante a extração a vácuo (79).

Para os filmes contendo probióticos (Alg-prob-oil e Alg-prob), as imagens transversais evidenciaram a presença de orifícios, no filme Alg-prob foi possível identificar as células de *B. coagulans* preenchendo esses espaços. Este resultado corrobora os achados de Ebrahimi et. al (80), em que as micrografias mostraram orifícios no interior dos filmes de carboximetilcelulose contendo probióticos. Também é possível notar o contorno de células probióticas na superfície do filme Alg-prob.

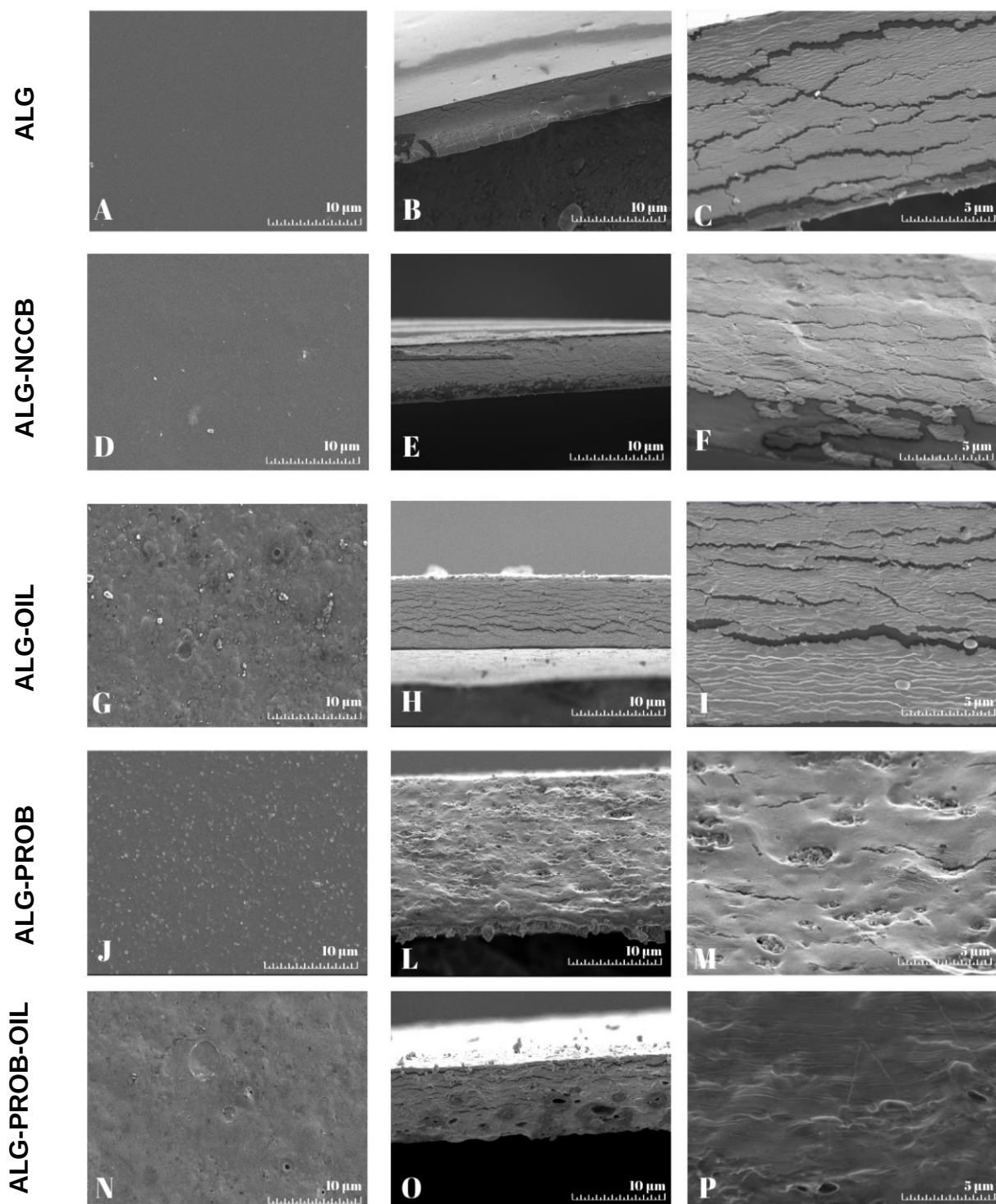


Figura 14. Microscopia eletrônica de varredura para os filmes de alginato. Para as imagens de superfície com aumento de 1000x considerar: **A, D, G, J e N**. Para imagens transversais do filme com aumento de 1000X considerar: **B, E, H, L e O**, Já com aumento de 5000X considerar: **C, F, I, M e P**.

5.3.6. Propriedades mecânicas

A tabela 2 mostra resistência a tração, alongação e módulo elástico. Os valores de resistência a tração não foram significativamente afetados pela presença de NCCB, emulsão e/ou probiótico, e os valores ficaram cerca de 6 vezes maiores que 4 MPa, que é considerado o valor mínimo para embalagens de alimentos (81).

Os valores de alongação foram bastante baixos, porém o filme adicionado apenas de EP (Alg-Oil) teve alongação significativamente aumentada. Este aumento seria devido à presença das gotículas de EP na rede polimérica melhorando a mobilidade molecular das cadeias de alginato, agindo assim como um agente plastificante (82). A presença de EP reduziu o módulo de elasticidade, podendo estar associado a presença gotículas lipídicas entre a cadeia polimérica, reduzindo as forças intermoleculares e reduzindo a rigidez do material (83). Por outro lado, a adição de probiótico resultou em aumento do módulo, possivelmente sendo influenciado por interações eletrostáticas envolvendo probiótico, cálcio e matriz, melhorando a rigidez do material.

Tabela 2. Propriedades mecânicas dos filmes.

	Resistência a tração (MPa)	Elongação (%)	Módulo (MPa)
Alg	25,93 ± 4,64	2,85 ± 1,09 b	1513 ± 152 b
Alg-Prob	29,57 ± 7,00	2,57 ± 0,96 b	1850 ± 227 a
Alg-Oil	29,06 ± 5,18	6,55 ± 1,71 a	1175 ± 57,0 c
Alg-NCCB	24,50 ± 5,07	2,40 ± 0,79 b	1588 ± 200 ab
Alg-Oil-Prob	29,03 ± 7,67	2,72 ± 1,10 b	1610 ± 403 ab

Os dados representam média e desvio padrão (n=10). Valores seguidos por pelo menos uma letra em comum (ou não seguidos por letras) não apresentam diferença significativa (Tukey, $p>0,05$).

5.3.7. Avaliação da estabilidade das cepas probióticas nos filmes

Os dados apresentados na figura 15 evidenciam os resultados da avaliação da estabilidade dos probióticos ao processo de secagem do filme e ao tempo de armazenamento.

Não houve diferenças significativas entre a contagem inicial da dispersão e a contagem do filme após secagem, mostrando que, mesmo passando por tratamento térmico, a contagem de *B. coagulans* não foi significativamente afetada. Em contraste, Oliveira et. al. (84) reportou que a contagem de probióticos em morangos com revestimento de alginato contendo *B. coagulans*, foi reduzida em 1,2 log UFC/g⁻¹ por secagem em estufa (50 °C por 48h). A diferença para este estudo poderia ser parcialmente explicada pelo maior tempo de secagem usado para os morangos. Oliveira-Alcântara et. al. (70) também notou redução na viabilidade do *B. coagulans* (-1,2 log UFC/g⁻¹) em filme de celulose bacteriana com goma de cajueiro após secagem em estufa (80 °C por 2,5h). Naquele trabalho, apesar de o tempo de secagem ter sido curto, a temperatura foi bem mais alta, o que poderia explicar a diferença para o presente estudo. Os resultados encontrados neste trabalho, possivelmente estão relacionados a fatores da resistência do *B. coagulans*, tendo em vista que sua temperatura de crescimento perfeita é de 35 a 50 ° C (85), e também a interações eletrostáticas bactéria/Ca²⁺/alginato conferindo uma proteção melhorada ao probiótico promovida pelo filme. Jurić et.al (86) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus seikei* e íons de cálcio encapsulados em microesferas de alginato, onde verificaram que a sobrevivência do probiótico era melhorada com a presença dos íons de cálcio, que foi considerado um componente ativo na fermentação, beneficiando a sobrevivência, atividade e crescimento de bactérias produtoras de ácido láctico.

Quando comparamos a viabilidade de células probióticas, após o tempo de armazenagem (0-138 dias), apesar de ter havido alguma queda (significativa), elas foram pequenas (no filme Alg-prob, a redução na viabilidade foi de 0,6 log UFC/g⁻¹, e para o Alg-prob-oil, 0,4 log UFC/g⁻¹). Os filmes de alginato se mostraram eficientes na armazenagem dos probióticos, não houve alteração da viabilidade dos probióticos com a adição da EP de óleo de palma.

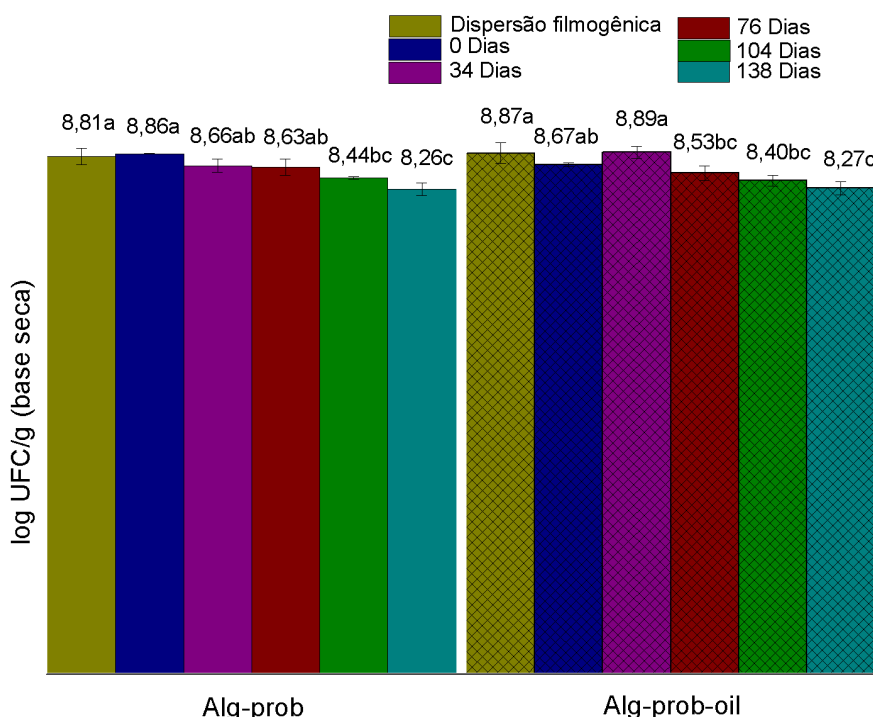


Figura 15. Viabilidade do probiótico durante processamento e estocagem. Apresentados como média e desvio padrão

5.3.8. Viabilidade de *B. coagulans* durante passagem simulada pelo TGI

Os resultados para o comportamento dos filmes probióticos após cada estágio do modelo gastrointestinal são mostrados na tabela 3. É possível notar que o *B. coagulans* contido nos filmes (Alg-prob e Alg-prob-oil) sobreviveram bem à passagem simulada pelo trato gastrointestinal, notando-se que não houve diferença significativa entre a contagem inicial dos filmes e a contagem da fase intestinal, mantendo sua viabilidade mesmo com a ação do pH ou à ação de enzimas gástricas e intestinais, corroborando com dados da literatura que apontam a resistência do *B. coagulans* à passagem do trato gastrointestinal (84,87). Os esporos de *Bacillus* podem sobreviver na acidez extrema do estômago e tolerar os sais biliares e outras condições hostis do trato gastrointestinal (26).

Aparentemente, houve alguma liberação de probióticos na boca. No caso do filme Alg-Prob, parece ter havido uma liberação adicional no estômago, já que a contagem aumentou, o que indica que o alginato não foi tão eficaz em reter as bactérias em sua estrutura durante a passagem pelo estômago. O filme Alg-Prob-

Oil, não parece ter havido liberação adicional no estômago diferindo significativamente do Alg-prob, mantendo aparentemente a sobrevivência das bactérias liberadas na boca, o que sugere que a emulsão Pickering pode ter exercido alguma ação protetora aos probióticos no ambiente do estômago.

Apesar de ter havido alguma liberação dos probióticos antes do intestino, as contagens finais no intestino não diferiram significativamente das contagens iniciais nos filmes.

Tabela 3. Viabilidade do probiótico durante passagem simulada pelo trato gastrointestinal, os resultados são apresentados log UFC/g (em base seca do filme).

Local	Filmes	
	Alg-prob	Alg-prob-oil
Filme (inicial)	9,37 ± 0,006 a	9,47 ± 0,074 a
Boca	8,61 ± 0,072 b	8,47 ± 0,036 b
Estômago	*9,10 ± 0,062 ab	*8,30 ± 0,162 b
Intestino	9,53 ± 0,403 a	9,32 ± 0,181 a

Os dados apresentam média e desvio padrão (n=3). Valores na mesma coluna seguidos por pelo menos uma letra em comum não apresentam diferença significativa (Tukey, $p > 0,05$). * diferenças significativas, ($p \leq 0,05$) no teste t pareado entre tratamentos.

6. Conclusão

Em conclusão, no presente estudo foi demonstrado que é possível adicionar emulsão Pickering de óleo de palma e imobilizar *Bacillus coagulans* em filmes de alginato. Para os filmes adicionados apenas de emulsão, houve aumento da elongação, entretanto a adição da emulsão resultou (ao contrário do esperado) em redução da hidrofobicidade e aumento da permeabilidade dos filmes ao vapor de água. Por outro lado, a presença do probiótico aumentou o caráter hidrofóbico dos filmes (provavelmente pelo efeito de rugosidade) e aumentou o módulo elástico. A viabilidade dos *Bacillus coagulans* nos filmes foi bem mantida ao longo do processamento e estocagem por 138 dias. Quando os filmes passaram pelo trato gastrointestinal simulado, não se observou perda da viabilidade do probiótico, mesmo com a ação do pH ou de enzimas gástricas e intestinais.

Estes resultados demonstram um papel importante do filme de alginato como carreador de probióticos, trazendo a necessidade de estudos de aplicação em alimentos e a possibilidade de testar a dispersão filmogênica como revestimento.

7. Referências:

1. FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Prevention. 2001;5(1):1–34.
2. Marketsandmarkets. Probiotics Market by Application (Functional Food & Beverages [Dairy Products, Non-dairy Beverages, Infant Formula, Cereals], Dietary Supplements, Feed), Ingredient (Bacteria, Yeast), Form (Dry, Liquid), End User, and Region – Global Forecast to 2023 [Internet]. 2017 [cited 2020 Dec 22]. Available from: <https://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/probiotic-market-advanced-technologies-and-global-market-69.html>
3. Martins EMF, Ramos AM, Vanzela ESL, Stringheta PC, de Oliveira Pinto CL, Martins JM. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. Food Res Int [Internet]. 2013;51(2):764–70. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.01.047>
4. Singh P, Magalhães S, Alves L, Antunes F, Miguel M, Lindman B, et al. Cellulose-based edible films for probiotic entrapment. Food Hydrocoll [Internet]. 2019;88(September 2018):68–74. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.057>
5. Doherty SB, Gee VL, Ross RP, Stanton C, Fitzgerald GF, Brodkorb A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. Food Hydrocoll [Internet]. 2011;25(6):1604–17. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2010.12.012>
6. Annan NT, Borza AD, Hansen LT. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Res Int. 2008;41(2):184–93.
7. Ramos PE, Silva P, Alario MM, Pastrana LM, Teixeira JA, Cerqueira MA, et al. Effect of alginate molecular weight and M/G ratio in beads properties foreseeing the protection of probiotics. Food Hydrocoll. 2018;77:8–16.
8. Yeung TW, Arroyo-Maya IJ, McClements DJ, Sela DA. Microencapsulation of

- probiotics in hydrogel particles: Enhancing: *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 viability using calcium alginate beads. *Food Funct.* 2016;7(4):1797–804.
9. Mei L, He F, Zhou RQ, Wu C De, Liang R, Xie R, et al. Novel intestinal-targeted Ca-alginate-based carrier for pH-responsive protection and release of lactic acid bacteria. *ACS Appl Mater Interfaces.* 2014;6(8):5962–70.
 10. Hajji S, Younes I, Affes S, Boufi S, Nasri M. Optimization of the formulation of chitosan edible coatings supplemented with carotenoproteins and their use for extending strawberries postharvest life. *Food Hydrocoll.* 2018;83:375–92.
 11. Rodrigues DC, Cunha AP, Silva LMA, Rodrigues THS, Gallão MI, Azeredo HMC. Emulsion films from tamarind kernel xyloglucan and sesame seed oil by different emulsification techniques. *Food Hydrocoll.* 2018;77:270–6.
 12. Pratama Y, Abduh SBM, Legowo AM, Hintono A. Effect of chitosan-palm olein emulsion incorporation on tapioca starch-based edible film properties. *Int Food Res J.* 2019;26(1):203–8.
 13. Hu Z, Ballinger S, Pelton R, Cranston ED. Surfactant-enhanced cellulose nanocrystal Pickering emulsions. *J Colloid Interface Sci* [Internet]. 2015;439:139–48. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcis.2014.10.034>
 14. Paximada P, Tsouko E, Kopsahelis N, Koutinas AA, Mandala I. Bacterial cellulose as stabilizer of o/w emulsions. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2016;53:225–32. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.12.003>
 15. Yan H, Chen X, Song H, Li J, Feng Y, Shi Z, et al. Synthesis of bacterial cellulose and bacterial cellulose nanocrystals for their applications in the stabilization of olive oil pickering emulsion. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2017;72:127–35. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.044>
 16. Yan H, Chen X, Feng M, Shi Z, Zhang W, Wang Y, et al. Entrapment of bacterial cellulose nanocrystals stabilized Pickering emulsions droplets in alginate beads for hydrophobic drug delivery. *Colloids Surfaces B*

- Biointerfaces [Internet]. 2019;177(July 2018):112–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2019.01.057>
17. Pereda M, Dufresne A, Aranguren MI, Marcovich NE. Polyelectrolyte films based on chitosan/olive oil and reinforced with cellulose nanocrystals. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2014;101(1):1018–26. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.046>
 18. Bielecka M. Probiotics in food. *Chem Funct Prop Food Components*, Third Ed. 2006;413–26.
 19. Saad SMI. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Rev Bras Ciências Farm*. 2006;42(1):1–16.
 20. Sánchez B, Delgado S, Blanco-Míguez A, Lourenço A, Gueimonde M, Margolles A. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. *Mol Nutr Food Res*. 2017;61(1):1–15.
 21. Logan AC, Katzman M. Major depressive disorder: Probiotics may be an adjuvant therapy. *Med Hypotheses*. 2005;64(3):533–8.
 22. Granato D, Branco GF, Nazzaro F, Cruz AG, Faria JAF. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. *Compr Rev Food Sci Food Saf*. 2010;9(3):292–302.
 23. Kailasapathy K, Chin J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Immunol Cell Biol*. 2000;78(1):80–8.
 24. Majeed M, Majeed S, Nagabhushanam K, Arumugam S, Beede K, Ali F. Evaluation of probiotic *Bacillus coagulans* MTCC 5856 viability after tea and coffee brewing and its growth in GIT hostile environment. *Food Res Int* [Internet]. 2019;121(December 2018):497–505. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.003>
 25. Jurenka JS. *Bacillus coagulans* [Internet]. *Alternative Medicine Review*; 2012. Available from: gale.com/apps/doc/A286390908/AONE?u=unesp_br&sid=AONE&xid=64bfda

fb

26. Elshaghabee FMF, Rokana N, Gulhane RD, Sharma C, Panwar H. *Bacillus* as potential probiotics: Status, concerns, and future perspectives. *Front Microbiol.* 2017;8(AUG):1–15.
27. Mu Y, Cong Y. *Bacillus coagulans* and its applications in medicine. *Benef Microbes.* 2019;10(6):679–88.
28. Hun L. Original research: *Bacillus coagulans* significantly improved abdominal pain and bloating in patients with IBS. *Postgrad Med.* 2009;121(2):119–24.
29. Jäger R, Purpura M, Farmer S, Cash HA, Keller D. Probiotic *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves protein absorption and utilization. *Probiotics Antimicrob Proteins.* 2018;10(4):611–5.
30. Stecker RA, Moon JM, Russo TJ, Ratliff KM, Mumford PW, Jäger R, et al. *Bacillus coagulans* GBI-30, 6086 improves amino acid absorption from milk protein. *Nutr Metab.* 2020;17(1):1–11.
31. Rani VU, Rao SR, Grisha P, Sharma A V., Usha MS. The efficacy of probiotic b. *Coagulans* (snz-1969) tablets in the treatment of recurrent bacterial vaginosis. *Int J Probiotics Prebiotics.* 2017;12(4):175–82.
32. McHugh TH. Protein-lipid interactions in edible films and coatings. *Nahrung - Food.* 2000;44(3):148–51.
33. Bourtoom T. Edible films and coatings : characteristics and properties. *Int Food Res J.* 2008;15(3):237–48.
34. Guimarães RR, Vendramini AL do A, Leite SGF, Santos AC dos, Miguel MAL. *Bifidobacterium animalis* aprisionada em filme comestível para produção de doce probiótico à base de surimi. In: *Ciência e Tecnologia do Pescado: Uma Análise Pluralista* [Internet]. 2020. p. 128–41. Available from: 10.37885/201001843
35. Soukoulis C, Behboudi-Jobbehdar S, Macnaughtan W, Parmenter C, Fisk ID. Stability of *Lactobacillus rhamnosus* GG incorporated in edible films: Impact of anionic biopolymers and whey protein concentrate. *Food Hydrocoll*

- [Internet]. 2017;70:345–55. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.04.014>
36. LeRoux MA, Guilak F, Setton LA. Compressive and shear properties of alginate gel: Effects of sodium ions and alginate concentration. *J Biomed Mater Res*. 1999;47(1):46–53.
 37. Kawaguti HY, Sato HH. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando glicosiltransferase microbiana. *Quim Nova*. 2008;31(1):134–43.
 38. Tønnesen HH, Karlsen J. Alginate in drug delivery systems. *Drug Dev Ind Pharm*. 2002;28(6):621–30.
 39. Zactiti EM, Kieckbusch TG. Release of potassium sorbate from active films of sodium alginate crosslinked with calcium chloride. *Packag Technol Sci*. 2009;22(6):349–58.
 40. Ye J, Ma D, Qin W, Liu Y. Physical and antibacterial properties of sodium alginate-sodium carboxymethylcellulose films containing lactococcus lactis. *Molecules*. 2018;23(10).
 41. Tapia MS, Rojas-Graü MA, Rodríguez FJ, Ramírez J, Carmona A, Martín-Belloso O. Alginate- and gellan-based edible films for probiotic coatings on fresh-cut fruits. *J Food Sci*. 2007;72(4):190–6.
 42. Fredrick E, Walstra P, Dewettinck K. Factors governing partial coalescence in oil-in-water emulsions. *Adv Colloid Interface Sci* [Internet]. 2010;153(1–2):30–42. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cis.2009.10.003>
 43. Berton-Carabin C, Schroën K. Towards new food emulsions: designing the interface and beyond. *Curr Opin Food Sci*. 2019;27:74–81.
 44. Murray BS. Pickering emulsions for food and drinks. *Curr Opin Food Sci* [Internet]. 2019;27:57–63. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.cofs.2019.05.004>
 45. Chevalier Y, Bolzinger MA. Emulsions stabilized with solid nanoparticles: Pickering emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp* [Internet].

- 2013;439:23–34. Available from:
<http://dx.doi.org/10.1016/j.colsurfa.2013.02.054>
46. Zhou FZ, Huang XN, Wu ZL, Yin SW, Zhu JH, Tang CH, et al. Fabrication of Zein/Pectin Hybrid Particle-Stabilized Pickering High Internal Phase Emulsions with Robust and Ordered Interface Architecture. *J Agric Food Chem.* 2018;66(42):11113–23.
 47. Tang J, Quinlan PJ, Tam KC. Stimuli-responsive Pickering emulsions: Recent advances and potential applications. *Soft Matter.* 2015;11(18):3512–29.
 48. Chen L, Ao F, Ge X, Shen W. Food-grade pickering emulsions: Preparation, stabilization and applications. *Molecules.* 2020;25(14).
 49. Niro CM, Medeiros JA, Freitas JAM, Azeredo HMC. Advantages and challenges of Pickering emulsions applied to <scp>bio-based</scp> films: a <scp>mini-review</scp>. *J Sci Food Agric [Internet].* 2021 Jan 3;(October):jsfa.11029. Available from:
<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jsfa.11029>
 50. Segal L, Creely JJ, A.E. Martin J, Conrad CM. An Empirical Method for Estimating the Degree of Crystallinity of Native Cellulose Using the X-Ray Diffractometer: <http://dx.doi.org/10.1177/004051755902901003> [Internet]. 1959 Jul 2 [cited 2021 Jul 14];29(10):786–94. Available from:
<https://journals.sagepub.com/doi/10.1177/004051755902901003>
 51. Esparza Y, Ngo TD, Boluk Y. Preparation of powdered oil particles by spray drying of cellulose nanocrystals stabilized Pickering hempseed oil emulsions. *Colloids Surfaces A Physicochem Eng Asp [Internet].* 2020;598(January):124823. Available from:
<https://doi.org/10.1016/j.colsurfa.2020.124823>
 52. Kalashnikova I, Bizot H, Cathala B, Capron I. New pickering emulsions stabilized by bacterial cellulose nanocrystals. *Langmuir.* 2011;27(12):7471–9.
 53. M. Kumaran. Interlaboratory Comparison of the ASTM Standard Test Methods for Water Vapor Transmission of Materials (E 96-95). *J Test Eval*

- [Internet]. 1998;83–8. Available from: <https://doi.org/10.1520/JTE11977J>
54. American A, Standard N. Standard Test Method for Surface Wettability and Absorbency of Sheeted Materials Using an Automated Contact Angle Tester. 2003;99(Reapproved):1–7. Available from: [file:///D:/Users/Ibrahim/AppData/Local/Mendeley Ltd./Mendeley Desktop/Downloaded/American, Standard - 2003 - Standard Test Method for Surface Wettability and Absorbency of Sheeted Materials Using an Automated Contact Angle Tester.pdf](file:///D:/Users/Ibrahim/AppData/Local/Mendeley%20Ltd./Mendeley%20Desktop/Downloaded/American,%20Standard%20-%202003%20-%20Standard%20Test%20Method%20for%20Surface%20Wettability%20and%20Absorbency%20of%20Sheeted%20Materials%20Using%20an%20Automated%20Contact%20Angle%20Tester.pdf)
 55. ASTM. Standard Test Method for Tensile Properties of Thin Plastic Sheeting, ASTM International. WwwAstmOrg [Internet]. 2002;1–12. Available from: <http://www.ansi.org>.
 56. ASTM International. Standard Practice for Preparation of Metallographic Specimens. ASTM Int [Internet]. 2016;82(C):1–15. Available from: <http://www.astm.org/cgi-bin/resolver.cgi?E140%0Ahttp://www.astm.org/Standards/E8.htm>
 57. Oliveira-Alcântara AV, Abreu AAS, Gonçalves C, Fuciños P, Cerqueira MA, Gama FMP, et al. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. Lwt [Internet]. 2020;130(March):109699. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109699>
 58. Herigstad B, Hamilton M, Heersink J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. J Microbiol Methods. 2001;44(2):121–9.
 59. Minekus M, Alming M, Alvito P, Ballance S, Bohn T, Bourlieu C, et al. A standardised static in vitro digestion method suitable for food-an international consensus. Food Funct. 2014;5(6):1113–24.
 60. Vasconcelos NF, Feitosa JPA, da Gama FMP, Morais JPS, Andrade FK, de Souza Filho M de SM, et al. Bacterial cellulose nanocrystals produced under different hydrolysis conditions: Properties and morphological features. Carbohydr Polym. 2017 Jan 2;155:425–31.
 61. Ruka DR, Simon GP, Dean KM. Altering the growth conditions of *Gluconacetobacter xylinus* to maximize the yield of bacterial cellulose.

- Carbohydr Polym. 2012 Jun 20;89(2):613–22.
62. Arserim-Uçar DK, Korel F, Liu LS, Yam KL. Characterization of bacterial cellulose nanocrystals: Effect of acid treatments and neutralization. Food Chem. 2021 Jan 30;336:127597.
 63. Modi S, Fulekar MH. Methylene blue dye adsorption using Cellulose Nanosrystals (CNCs) isolated from garlic skin. J Emerg Technol Innov Res [Internet]. 2019;(May 2019). Available from: https://www.researchgate.net/profile/Shreya-Modi/publication/349761183_Methylene_blue_dye_adsorption_using_Cellulose_Nanosrystals_CNCs_isolated_from_garlic_skin/links/60408a1392851c077f15fcff/Methylene-blue-dye-adsorption-using-Cellulose-Nanosrystals-CNCs
 64. George J, Siddaramaiah S. High performance edible nanocomposite films containing bacterial cellulose nanocrystals. Carbohydr Polym [Internet]. 2012;87(3):2031–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.10.019>
 65. Habibi Y, Lucia LA, Rojas OJ. Cellulose nanocrystals: Chemistry, self-assembly, and applications. Chem Rev. 2010;110(6):3479–500.
 66. Albertino Freitas Santana Neto. OBTENÇÃO DE FORMULAÇÕES GALÊNICAS CONTENDO NANO E MICROCAPSULAS DE ÁCIDOS TRITERPÊNICOS [Internet]. Universidade Federal da Bahia; 2015. Available from: <http://weekly.cnbnews.com/news/article.html?no=124000>
 67. Began G, Sudharshan E, Udaya Sankar K, Rao AGA. Interaction of Curcumin with Phosphatidylcholine: A Spectrofluorometric Study. 1999; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
 68. Ali Z, Saleem M, Atta BM, Khan SS, Hammad G. Determination of curcuminoid content in turmeric using fluorescence spectroscopy. Spectrochim Acta - Part A Mol Biomol Spectrosc. 2019;213:192–8.
 69. Badita CR, Aranghel D, Burducea C, Mereuta P. CHARACTERIZATION OF SODIUM ALGINATE BASED FILMS. Rom J Phys. 2020;65:602.

70. Oliveira-Alcântara AV, Abreu AAS, Gonçalves C, Fuciños P, Cerqueira MA, Gama FMP, et al. Bacterial cellulose/cashew gum films as probiotic carriers. *Lwt* [Internet]. 2020;130(June):109699. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.109699>
71. Karimi Khorrami N, Radi M, Amiri S, McClements DJ. Fabrication and characterization of alginate-based films functionalized with nanostructured lipid carriers. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2021;182:373–84. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2021.03.159>
72. Wang C, Chang T, Dong S, Zhang D, Ma C, Chen S, et al. Biopolymer films based on chitosan/potato protein/linseed oil/ZnO NPs to maintain the storage quality of raw meat. *Food Chem* [Internet]. 2020;332(January):127375. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127375>
73. Wang L, Yang Q, Zhao H. Sub-regional identification of peanuts from Shandong Province of China based on Fourier transform infrared (FT-IR) spectroscopy. *Food Control* [Internet]. 2021;124(January):107879. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.107879>
74. Aydogdu A, Radke CJ, Bezci S, Kirtil E. Characterization of curcumin incorporated guar gum/orange oil antimicrobial emulsion films. *Int J Biol Macromol* [Internet]. 2020;148:110–20. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.12.255>
75. Liu QR, Wang W, Qi J, Huang Q, Xiao J. Oregano essential oil loaded soybean polysaccharide films: Effect of Pickering type immobilization on physical and antimicrobial properties. *Food Hydrocoll* [Internet]. 2019;87(August 2018):165–72. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2018.08.011>
76. Nilsson MA, Daniello RJ, Rothstein JP. A novel and inexpensive technique for creating superhydrophobic surfaces using Teflon and sandpaper. *J Phys D Appl Phys*. 2010;43(4).
77. Wang J, Wu Y, Cao Y, Li G, Liao Y. Influence of surface roughness on contact angle hysteresis and spreading work. *Colloid Polym Sci*.

2020;298(8):1107–12.

78. Ionita M, Pandele MA, Iovu H. Sodium alginate/graphene oxide composite films with enhanced thermal and mechanical properties. *Carbohydr Polym* [Internet]. 2013;94(1):339–44. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.01.065>
79. Colla E, Do PJ, Sobral A, Ceci F, Menegalli Ä. *Amaranthus cruentus* Flour Edible Films: Influence of Stearic Acid Addition, Plasticizer Concentration, and Emulsion Stirring Speed on Water Vapor Permeability and Mechanical Properties. 2006 [cited 2021 Jul 21]; Available from: <https://pubs.acs.org/sharingguidelines>
80. Ebrahimi B, Mohammadi R, Rouhi M, Mortazavian AM, Shojaaee-Aliabadi S, Koushki MR. Survival of probiotic bacteria in carboxymethyl cellulose-based edible film and assessment of quality parameters. *LWT - Food Sci Technol*. 2018 Jan;87:54–60.
81. Tajeddin B, Rahman RA, Abdulah LC. The effect of polyethylene glycol on the characteristics of kenaf cellulose/low-density polyethylene biocomposites. *Int J Biol Macromol*. 2010;47(2):292–7.
82. Alexandre EMC, Lourenço RV, Bittante AMQB, Moraes ICF, Sobral PJ do A. Gelatin-based films reinforced with montmorillonite and activated with nanoemulsion of ginger essential oil for food packaging applications. *Food Packag Shelf Life* [Internet]. 2016;10:87–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.10.004>
83. Shi WJ, Tang CH, Yin SW, Yin Y, Yang XQ, Wu LY, et al. Development and characterization of novel chitosan emulsion films via pickering emulsions incorporation approach. *Food Hydrocoll*. 2016;52:253–64.
84. Oliveira AS, Niro CM, Bresolin JD, Soares VF, Ferreira MD, Sivieri K, et al. Dehydrated strawberries for probiotic delivery: Influence of dehydration and probiotic incorporation methods. *Lwt* [Internet]. 2021;144(November 2020):111105. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.111105>
85. Zhou Y, Zeng Z, Xu Y, Ying J, Wang B, Majeed M, et al. Application of

- Bacillus coagulans* in animal husbandry and its underlying mechanisms. *Animals*. 2020;10(3):1–9.
86. Jurić S, Tanuwidjaja I, Fuka MM, Kahlina KV, Marijan M, Boras A, et al. Encapsulation of two fermentation agents, *Lactobacillus sakei* and calcium ions in microspheres. *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2021;197(August 2020):1–11.
 87. Marcial-Coba MS, Pjaca AS, Andersen CJ, Knøchel S, Nielsen DS. Dried date paste as carrier of the proposed probiotic *Bacillus coagulans* BC4 and viability assessment during storage and simulated gastric passage. *Lwt* [Internet]. 2019;99(September 2018):197–201. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.09.052>