

AVALIAÇÃO DA RESISTÊNCIA GASTROINTESTINAL DE *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* ADICIONADO EM MATRIZ DE FRUTA

Grazielly Rodrigues Silva ¹; Sérgio Roberto Mendes da Costa ²; Beatriz Morais Roson ²; Cynthia Jurkiewicz Kunigk ³

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

² Aluno de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT);

³ Professor da Escola de Engenharia Mauá (EEM/CEUN-IMT).

Resumo A aplicação de culturas probióticas em frutas, como ameixa, resulta em um produto funcional com os benefícios das bactérias probióticas e da fruta, auxiliando no bom funcionamento do intestino. O presente trabalho teve como objetivo, avaliar a resistência gastrointestinal *in vitro* de *Bifidobacterium animalis* encapsulado e livre, aplicado a matriz de ameixa. A matriz de ameixa foi produzida com ameixa seca, sacarose, xarope de glicose, água, cloreto de cálcio, bicarbonato de sódio e pectina BTM. A cultura probiótica foi adicionada livre e encapsulada em alginato de cálcio, de modo que a população inicial no produto fosse 10^8 UFC·g⁻¹. A mistura foi fracionada, embalada a vácuo e armazenada a 4 °C por 42 dias. A cada 15 dias as amostras de matrizes de ameixa com o probiótico livre e encapsulado foram submetidas ao teste de resistência gastrointestinal “*in vitro*”. A simulação consistiu nas etapas: fase gástrica, com 30 min (FG30) e 90 min (FG 90) e fase intestinal, com 30 min (FI30) e 90 min (FI90). As análises microbiológicas executadas após os testes de resistência gastrointestinal realizadas durante o período estipulado, foi de 10^6 UFC na formulação contendo microrganismo livre e 10^5 UFC na formulação com microrganismo encapsulado. A matriz de fruta com microrganismo encapsulado obteve melhor desempenho após o teste de resistência quando comparado a matriz de fruta com microrganismo livre.

Introdução

A definição de alimento funcional surgiu no Japão na década de oitenta, e foi descrita como: “alimentos que geram benefícios fisiológicos ou auxiliam na diminuição de riscos de doenças crônicas além de suas funções básicas nutricionais, quando utilizados como parte de uma dieta balanceada” (Costa *et al.*, 2016).

Os critérios para aprovação e alegação de propriedades funcionais dos alimentos, são distintos em diversos países, sendo a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa) o órgão público responsável no Brasil.

Dentre os alimentos classificados como funcionais, destacam-se aqueles contendo microrganismos probióticos. Os microrganismos probióticos são definidos como, culturas de microrganismos vivos que ao serem ingeridos, afetam de forma benéfica o hospedeiro por meio de melhoria do balanço da microbiota intestinal (Ziemer, Gibson 1998; Lee *et al.*, 1999; Stanton *et al.*, 2001; Domingo, 2017).

Pesquisas apontam a importância da saúde intestinal para modular várias funções no organismo (Stanton *et al.*, 2001; Sidhu *et al.*, 2017). O trato gastrointestinal humano é um biosistema cinético que favorece o desempenho normal das funções fisiológicas do hospedeiro, a menos que os microrganismos prejudiciais e potencialmente patogênicos dominem. A manutenção da microbiota intestinal pode ser assegurada por suplementação da dieta com probióticos, prebióticos e simbióticos. (Bielecka *et al.*, 2002; Saad, 2006).

As culturas probióticas aplicadas em produtos alimentícios devem ser de origem humana, devendo ser selecionadas com base no seu desempenho tecnológico, como

promover características sensoriais adequadas ao produto, além de manter a viabilidade e funcionalidade durante a produção e armazenamento. A sobrevivência das bactérias probióticas nos alimentos é fundamental para que gere benefícios à saúde do consumidor (Saad, 2006).

O produto probiótico deve conter elevadas populações do microrganismo. Recomenda-se no mínimo 10^7 Unidades formadoras de colônias por grama (UFC·g⁻¹), e uma dose mínima diária de 10^8 e 10^9 UFC, o que equivale ao consumo de 100 g de produto contendo entre 10^6 e 10^7 UFC·g⁻¹ (Lee, Salminen, 1995; Blanchette *et al.*, 1996; Hoier *et al.*, 1999).

A cepa probiótica, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12, é muito utilizada em alimentos devido à alta capacidade de sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal e adesão as células de absorção que revestem a mucosa intestinal do intestino delgado. A cepa Bb12 também possui características tecnológicas adequadas, pois sobrevive em diversos alimentos por longos períodos de armazenamento, sem que alterações sensoriais sejam percebidas.

Os alimentos probióticos comumente encontrados no Brasil são produtos lácteos, devido a facilidade de adaptação do microrganismo ao meio, no caso o leite. No desenvolvimento de alimentos que contenham bactérias probióticas, inúmeros fatores devem ser levados em conta como, temperatura de processamento e armazenamento, atividade de água, tempo de estocagem, pH, quantidade de oxigênio disponível, e composição química, de forma a favorecer a sobrevivência de um número expressivo da cultura probiótica no produto durante a vida de prateleira (Reid *et al.*, 2003).

Durante a digestão do alimento, as bactérias probióticas reduzem a viabilidade, devido à diversas barreiras de proteção existentes no trato gastrointestinal, como o pH entre 1,5 e 2 do suco gástrico, enzimas digestivas, sais biliares e a movimentação peristáltica que dificulta a aderência do microrganismo (Oliveira, 2011).

Com o intuito de prolongar a sobrevivência do microrganismo, protegê-los das condições adversas do ambiente, diminuir a morte celular durante a passagem pelo trato gastrointestinal, a tecnologia de microencapsulação tem sido empregada (Oliveira, Pedroso 2011; Cozínhe *et al.*, 2012). A encapsulação é uma tecnologia que tem como objetivo realizar uma cobertura polimérica envolvendo o material de interesse (Oliveira, Pedroso, 2011).

A escolha adequada do processo de microencapsulação é baseada em sua finalidade e uso, além das propriedades químicas e físicas do material encapsulado denominado núcleo ou recheio e do material encapsulante denominado cobertura ou parede. Há três tamanhos de cápsulas, sendo classificadas como: nano (< 0,2 µm), micro (0,2 - 5.000 µm) e macrocápsulas (> 5.000 µm) (Azeredo, 2005).

O alginato de sódio é muito utilizado como encapsulante de probióticos, pois é um material polimérico não tóxico, é um agente formador de filme, além de ser um aditivo alimentar de baixo custo, permitido para aplicação em alimentos. O alginato de sódio, associado ao cloreto de cálcio, forma um gel com capacidade de formação de esferas gelatinosas, possibilitando a incorporação de materiais sensíveis como, células microbianas (Azeredo, 2005).

A proteção de probióticos em uma matriz polimérica, é uma alternativa para proteger os microrganismos, bem como viabilizar sua utilização em alimentos não lácteos, como por exemplo, em matrizes de fruta, tornando-se um produto alternativo para os alérgicos e intolerantes ao consumo de produtos lácteos.

A ameixa preta seca da espécie *Prunus domestica* do gênero *Prunus* da família *Rosaceae* possui alto teor de pectina na casca, uma fibra solúvel que gera efeitos fisiológicos benéficos, como a sensação de saciedade, redução do colesterol plasmático,

e aumento da viscosidade do bolo alimentar no trato intestinal. Possui também fibras de caráter insolúvel que contribuem para a melhoria do trânsito intestinal. Além desses benefícios, a pectina da fruta é considerada um ingrediente prebiótico, ou seja, carboidrato não-digerível que estimula seletivamente a proliferação e/ou atividade de populações de bactérias desejáveis no colón, assim é degradada pelos microrganismos presentes no intestino, produzindo ácidos graxos de cadeia curta, favorecendo a saúde intestinal (Consultoria nutricional, 2016).

Contribuindo com o estudo do desenvolvimento de novos produtos probióticos, o seguinte trabalho teve como objetivo avaliar a resistência gastrointestinal *in vitro* do microrganismo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* - Bb12 encapsulado em alginato de cálcio e livre adicionado à uma matriz de ameixa preta seca, armazenado a vácuo em temperatura controlada de 4 °C por 42 dias.

Material e Métodos

Produção da matriz de ameixa

Tabela 1 - Formulação da matriz de fruta

Ingredientes (%)	Formulação
Ameixa seca	58,40
Sacarose	4,95
Glucose de milho	4,95
Água	1,00
Cloreto de cálcio	0,10
Bicarbonato	0,60
Pectina BTM	30,00

A formulação da matriz de ameixa está apresentada na Tabela 1. A ameixa seca sem caroço de origem Chilena (MARCA) foi homogeneizada com 25 % do total de sacarose (UNIÃO) e 50 % do total da água no equipamento Thermomix (VORWERK) por 5 minutos, na velocidade 4 (1100 rpm) a 37 °C. Logo após, foi adicionado glicose de milho (ARCOR), pectina com baixo teor de metoxilação (Danisco) que foram homogeneizados por 2 minutos, na velocidade 4 a 50 °C. Em seguida, foi adicionado o restante da sacarose e da água, que foram misturados por 2 minutos, na velocidade 4 a 50 °C.

Preparo da cultura probiótica

Foi adicionado 0,1 g de cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 (Chr. Hansen) em 100 mL de solução salina 0,85 % e homogeneizado no equipamento Stomacher (Seward) por 1 minuto, à 260 rpm. Em seguida, 1 mL da suspensão foi adicionada em 100 mL de caldo MRS (Oxoid) contendo 0,5 % de solução de cisteína a 10 %, e incubada à 37 °C durante 20 horas. O caldo foi centrifugado (Mega 21R, Hanil) por 15 minutos, à 6000 rpm e 4 °C. Após o descarte do sobrenadante, foi adicionada solução salina para lavagem das células e novamente centrifugado nas mesmas condições.

Encapsulação do microrganismo em alginato de cálcio

As células obtidas após a centrifugação e lavagem foram suspensas em 20 mL de solução salina 0,85 % estéril e o volume adicionado em 180 mL de solução de alginato de sódio 1,1 %. A suspensão foi aspergida através de um de bico aspersor de diâmetro

1,5 mm, com vazão de 7,0 mL / min, utilizando uma bomba peristáltica e vazão de ar comprimido de 6,20 mL / min, em solução de cloreto de cálcio 0,1 M. A distância do bico aspersor e da superfície da solução de cloreto de cálcio foi mantida 9 cm.

As cápsulas de alginato de cálcio formadas foram mantidas em agitação, com agitador magnético, durante o processo de encapsulação, e em repouso após o término da aspersão com o intuito de aumentar o grau da gelificação. Em seguida, as cápsulas foram separadas com o auxílio de peneiras com aberturas de malha de 710 e 255 μm , e lavadas com solução salina 0,85 % estéril. A peneira com abertura de malha de 255 μm foi sobreposta em papel toalha estéril a fim de diminuir ligeiramente a umidade das cápsulas que foram adicionadas à matriz de fruta.

Adição do microrganismo encapsulado à matriz de fruta

Para a incorporação do microrganismo, foram adicionados 2,5 % de cápsulas de *Bifidobacterium animalis* à matriz de ameixa, que foi homogeneizado com o auxílio de uma espátula estéril. A mistura foi fracionada em copos plásticos de poliestireno (Altacoppo) em porções com cerca de 16 gramas e embaladas em sacos de polipropileno a vácuo e armazenados à 4 °C.

Adição do microrganismo livre à matriz de fruta

Para a incorporação do microrganismo livre, 1,0 % da suspensão da bactéria foi adicionada à matriz de ameixa e homogeneizada com o auxílio de uma espátula estéril. A mistura foi fracionada em porções de cerca de 16 gramas e embalada em sacos de polipropileno a vácuo e armazenada à 4 °C.

Teste de resistência gastrointestinal

Após a incorporação dos microrganismos encapsulados e livres na matriz de ameixa foi realizado o teste de resistência gastrointestinal in vitro conforme metodologia descrita por Madureira *et al.* (2010) com modificações. Durante o armazenamento, as amostras foram submetidas ao teste a cada 14 dias, durante o período de 42 dias.

A simulação consistiu em duas fases distintas, sendo elas, fase gástrica (FG) e fase intestinal (FI). Para a fase gástrica (FG), foi utilizado solução de pepsina com concentração de 25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em ácido clorídrico, 0,1 M. Para as fases intestinais (FI), foram preparadas soluções contendo pancreatina com concentração de 2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ e solução de sais biliares com concentração 12 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ em bicarbonato de sódio (NaHCO_3), 0,01 M.

Para o teste de resistência gastrointestinal, foram utilizados 6 tubos de ensaio de polipropileno com capacidade para 50 ml, sendo, dois tubos para o monitoramento do pH, dois tubos para as fases gástricas, com 30 minutos (FG30) e 90 minutos (FG90) e dois tubos para as fases intestinais, com 30 minutos (FI30) e 90 minutos (FI90). Em cada tubo, foi adicionado 1,0 g de matriz de fruta e 9,0 mL de solução salina 0,85% estéril.

Os tubos foram homogeneizados em agitador de tubo e levados ao banho termostático com agitação a 37 °C por 10 minutos para a estabilização da temperatura. O início da simulação ocorreu a partir da fase gástrica, com duração de 90 minutos. Nesta fase, o pH foi reduzido para uma faixa de 2,0 a 2,5, com a adição de solução de HCl 1M, e em seguida a solução de pepsina foi adicionada para que a concentração do meio atingisse 1,25 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, mantendo-se os tubos no banho a 37 °C sob 130 rpm de agitação. Após 30 e 90 minutos os tubos FG30 e FG90, respectivamente, foram retirados do banho para que fosse executada a análise microbiológica.

Após 90 minutos da fase gastrointestinal, deu-se o início a fase intestinal de 30 minutos com a adição de solução de NaHCO_3 1M para a elevação do pH a faixa de 5,0 a 6,3. Em seguida, foi adicionada a solução de pancreatina e sais biliares para que as

concentrações do meio atingissem concentrações de $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente. O banho foi mantido a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, porém a velocidade da agitação foi reduzida para 50 rpm. Ao final da fase intestinal de 30 minutos, o tubo FI30 foi retirado do banho para que fosse realizada a análise microbiológica. A última etapa foi a fase intestinal de 90 minutos, no qual o pH foi elevado para faixa de 6,2 a 6,6, com solução de NaHCO_3 1 M, em seguida foi adicionada a solução de pancreatina e sais biliares para que a concentração da solução nos tubos permanecesse em $0,55 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ e $3,3 \text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ respectivamente, mantendo o banho a $37 \text{ }^\circ\text{C}$, a agitação em 50 rpm por 60 minutos. Finalizada a fase intestinal, os tubos FI foram retirados do banho para ser feita a análise microbiológica.

Análise microbiológica

As análises microbiológicas foram realizadas nas amostras antes e durante a simulação gastrointestinal, assim como após a adição da bactéria probiótica na matriz de ameixa e após 14, 28 e 42 dias de armazenamento a $4 \text{ }^\circ\text{C}$. Para tanto, o volume contido em cada tubo foi transferido para um saco estéril, o diluente foi adicionado até completar 100 g, e homogeneizado em Stomacher por 10 minutos à 260 rpm. Solução salina 0,85 % foi utilizada como diluente para as amostras com o microrganismo livre, e solução tampão de hidróxido de sódio e fosfato de potássio estéril (pH 7,5) para as amostras com o microrganismo encapsulado. Após a homogeneização, diluições decimais seriadas foram feitas, transferindo-se 1,0 mL de amostra diluída para 9,0 mL de solução salina. As amostras diluídas foram inoculadas em ágar MRS (Oxoid) contendo 0,5 % de cisteína a 10 %, e incubadas em anaerobiose (Anaerogen, Oxoid) por 72 horas, à $37 \text{ }^\circ\text{C}$.

Análises físico-químicas

Para determinar o pH, amostra contendo 3 g de matriz de ameixa, juntamente com 30 mL de água destilada, foram homogeneizados em agitador de tubos e o pH aferido em pHmetro (FiveEasy – Mettler Toledo).

Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o Teste-t de *Student* para amostras emparelhadas com nível de significância de 5 %, utilizando o Excel.

Resultados e Discussões

A Tabela 2, apresenta os resultados das contagens de *Bifidobacterium animalis* em Log UFC/g durante o armazenamento das matrizes de ameixa e simulação gastrointestinal, bem como as medidas de pH em cada fase.

Tabela 2 – Médias e desvio padrão das contagens em Log UFC·g⁻¹ e pH antes e durante o teste de resistência gastrointestinal realizado em matrizes de ameixa com microrganismo livre e encapsulado, ao longo do tempo de armazenamento.

Tempo (dias)	Fases do teste gastrointestinal	Microrganismo Livre		Microrganismo Encapsulado	
		Log UFC· g ⁻¹	pH	Log UFC· g ⁻¹	pH
0	Início	8,3 ± 0,1	4,7 ± 0,0	7,3 ± 0,1	4,7 ± 0,0
	FG 30	7,9 ± 0,8	2,2 ± 0,2	7,3 ± 0,4	2,2 ± 0,1
	FG 90	8,4 ± 0,1	2,2 ± 0,2	7,2 ± 0,5	2,2 ± 0,1
	FI 30	7,2 ± 0,5	5,4 ± 1,0	6,9 ± 0,5	5,1 ± 0,6
	FI 90	7,3 ± 0,3	6,5 ± 0,2	6,8 ± 0,3	6,6 ± 0,1
14	Início	8,3 ± 0,1	4,6 ± 0,0	7,4 ± 0,4	4,5 ± 0,1
	FG 30	7,4 ± 0,9	2,1 ± 0,1	6,9 ± 0,0	2,0 ± 0,2
	FG 90	7,1 ± 0,7	2,1 ± 0,1	6,8 ± 0,1	2,0 ± 0,2
	FI 30	6,4 ± 0,1	5,6 ± 0,8	6,2 ± 0,6	6,3 ± 0,3
	FI 90	6,0 ± 0,0	6,4 ± 0,1	6,3 ± 0,6	6,5 ± 0,2
28	Início	6,8 ± 0,1	4,6 ± 0,1	6,7 ± 0,3	4,7 ± 0,1
	FG 30	6,7 ± 0,6	2,3 ± 0,2	6,4 ± 0,2	2,2 ± 0,1
	FG 90	6,4 ± 1,2	2,3 ± 0,2	5,9 ± 0,3	2,2 ± 0,1
	FI 30	6,1 ± 0,4	6,1 ± 0,3	5,3 ± 0,3	5,4 ± 0,9
	FI 90	6,2 ± 0,4	6,4 ± 0,1	5,3 ± 2,5	6,3 ± 0,3
42	Início	5,7 ± 0,2	4,7 ± 0,1	5,4 ± 0,6	4,7 ± 0,0
	FG 30	5,3 ± 1,8	2,4 ± 0,1	4,5 ± 1,1	2,3 ± 0,2
	FG 90	4,8 ± 1,5	2,4 ± 0,1	3,5 ± 1,5	2,3 ± 0,2
	FI 30	3,7 ± 0,9	6,1 ± 0,7	2,8 ± 0,1	5,4 ± 0,9
	FI 90	3,5 ± 0,3	6,5 ± 0,1	1,9 ± 2,7	6,2 ± 0,2

Os resultados das contagens realizadas após o teste de resistência gastrointestinal apresentados em Log UFC·g⁻¹ (Tabela 2) mostram que houve diferença de quase 1 log entre as populações iniciais de células livres e encapsuladas nas matrizes de ameixa. Essa percepção, faz-se presente até o 14 ° dia, sendo alterada a partir do 28 ° dia, em que os valores começam a se aproximar, indicando que o uso da encapsulação ajudou na proteção dos microrganismos.

Observa-se ainda na Tabela 2 que no teste de resistência gastrintestinal a redução na contagem do probiótico aumentou com o tempo de armazenamento, tanto para as células livres como encapsuladas. No primeiro dia de armazenamento, a redução na contagem da bactéria do início da simulação até o final da fase FI90 foi de 1 log para as células livres e 0,5 log para células encapsuladas. Por outro lado, com 42 dias de armazenamento, a redução no mesmo período foi de 2,2 log e 3,5 log para células livres e encapsuladas, respectivamente.

A diferença entre a contagem de *Bifidobacterium* na matriz de ameixa logo após a adição das cápsulas e a contagem em determinado tempo de armazenamento (Δ Log) foi calculada e o Teste-t de *Student* para dados emparelhados foi utilizado para a comparação da redução das células livres e encapsuladas. Os resultados mostraram maior redução no número de probióticos durante o armazenamento ($p < 0,05$) nas matrizes de ameixa com microrganismo livre (Figura 1).

Os valores de ΔLog também foram calculados considerando a diferença entre a contagem inicial do microrganismo em determinado tempo de armazenamento e as contagens nas diferentes fases do teste de resistência gastrointestinal. O Teste-t de *Student* para dados emparelhados foi utilizado para a comparação da redução das células livres e encapsuladas. Os resultados mostraram que apenas com 14 dias de armazenamento a redução da contagem de *Bifidobacterium* no teste de resistência gastrointestinal diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre células livres e encapsuladas.

Figura 1 - Variação da contagem de *Bifidobacterium animalis* ($\Delta\text{Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$) ao longo do tempo de armazenamento.

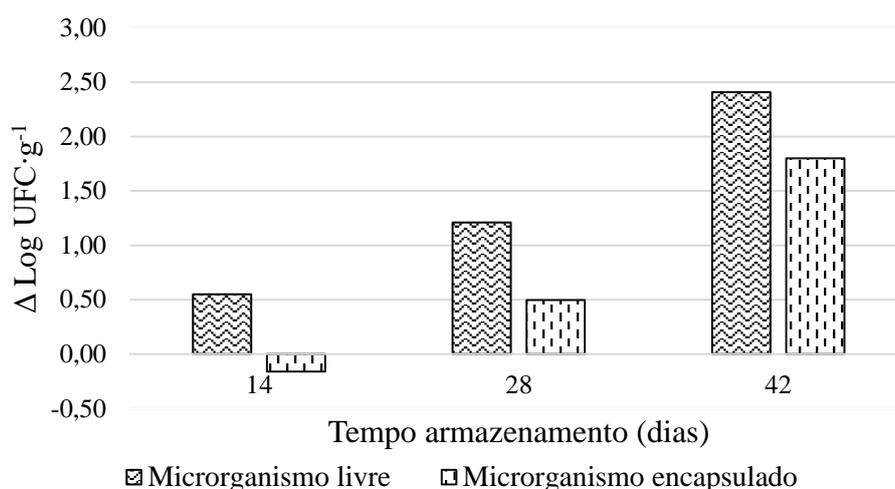
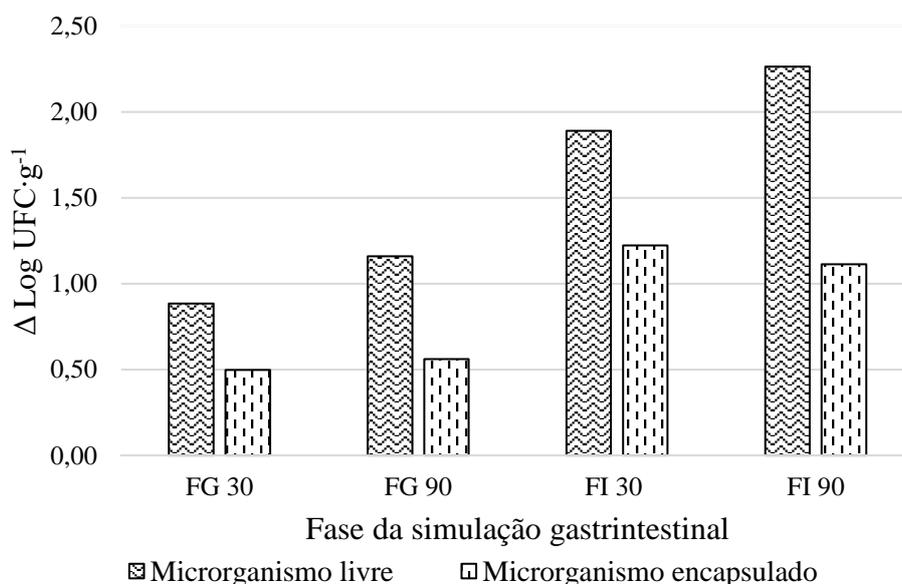


Figura 2 – Variação da contagem de *Bifidobacterium animalis* ($\Delta\text{Log UFC}\cdot\text{g}^{-1}$) em cada etapa da fase gastrointestinal em 14 dias de armazenamento.



Analisando a Figura 2, pode-se perceber que a redução da contagem do microrganismo livre foi maior em todas as fases, quando comparadas com as reduções do microrganismo encapsulado. Porém, a maior variação ocorreu na etapa FI90, cerca 1 log,

indicando que encapsulação foi eficiente na proteção do microrganismo em 14 dias de armazenamento. Entretanto, nos demais tempos de armazenamento a resistência do microrganismo às condições gastrointestinais não diferiu significativamente ($p > 0,05$) entre células livres e encapsuladas em alginato de cálcio.

Conclusões

A encapsulação de *Bifidobacterium animalis* Bb12 em alginato de cálcio aumentou a viabilidade da bactéria em cerca de 0,7 log quando comparado ao microrganismo não encapsulado, adicionado em uma matriz de ameixa e armazenada em refrigeração por 42 dias.

A matriz de ameixa até o 28 ° dia de armazenamento apresentou contagem de *Bifidobacterium animalis* Bb12 necessária para o produto ser considerado probiótico.

A resistência às condições simuladas do sistema gastrointestinal das células encapsuladas adicionadas em matriz de ameixa foi maior que das células livres, apenas no 14 ° dia de armazenamento.

Embora o processo de encapsulação em alginato de cálcio tenha apresentado certa proteção ao microrganismo probiótico na matriz de ameixa e nas condições simuladas do sistema gastrointestinal, a perda de viabilidade foi significativa, sugerindo que outros materiais encapsulantes devam ser estudados para maior proteção da bactéria.

Referências Bibliográficas

- AZEREDO, H. M. C. **Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos**. Alimentos e Nutrição, Araraquara, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.
- BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. **Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness**. Food Res. Int., Amsterdam, v.35, n.2/3, p.125-131, 2002.
- BLANCHETTE, L.; ROY, D.; BELANGER, G.; GAUTHIER, S.F. **Production of cottage cheese using dressing fermented by bifidobacteria**. J. Dairy Sci., Lancaster, v.79, p.8-15, 1996.
- CONSULTORIA NUTRICIONAL. **Ameixa: Efeitos sobre a saúde intestinal. Consultoria Nutricional**, São Paulo, v. 1, n. 1, p. 1-3, jan. 2016. Disponível em: <http://www.juxx.com.br/public/pdf/pesquisa/fibras-e-suco-de-ameixa.pdf>. Acesso em: 17 maio 2020.
- COSTA, Neuza Maria Brunoro *et al.* **Alimentos Funcionais: componentes bioativos e efeitos fisiológicos**. 2. ed. Rio de Janeiro: Rubio, 2016. 504 p. Disponível em: <https://books.google.com.br/books?hl=pt-BR&lr=&id=RLy-DAAAQBAJ&oi=fnd&pg=PA407&dq=alimento+funcional+anvisa&ots=rJvOdTidh2&sig=zZNgmkaVioeBcx3VnEwZx-nL3eE#v=onepage&q&f=true>. Acesso em: 07 jul. 2020.
- COZINHE, Michael T. *et al.* Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal Of Controlled Release**, Desconhecido, v. 1, n. 162, p. 56-67, 20 ago. 2012. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0168365912004968?via%3Dihub#aep-abstract-id19>. Acesso em: 20 jun. 2020.
- DOMINGO, J.J.S. **Review of the role of probiotics in gastrointestinal diseases in adults**. Gastroenterología y Hepatología, 2017.

