

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO TECNOLÓGICO DA UFSC
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA QUÍMICA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

Raiane Silva Manarim

Proteína de *Tenebrio molitor* como agente encapsulante na co-encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG com compostos bioativos de beterraba

Florianópolis

2023

Raiane Silva Manarim

Proteína de *Tenebrio molitor* como agente encapsulante na co-encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG com compostos bioativos de beterraba

Trabalho de Conclusão de Curso submetido ao curso de Engenharia de Alimentos do Centro Tecnológico da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Engenharia de Alimentos.

Orientador(a): Prof. Dr. Marco Di Luccio
Coorientador(a): Prof.^a Dra. Silvani Verruck

Florianópolis

2023

Manarim, Raiane Silva

Proteína de *Tenebrio molitor* como agente encapsulante na co-encapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG com compostos bioativos de beterraba. / Raiane Silva Manarim ; orientador, Marco Di Luccio, coorientadora, Silvani Verruck, 2023.

51 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro Tecnológico, Graduação em Engenharia de Alimentos, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Engenharia de Alimentos. 2. Proteína de *Tenebrio molitor*. 3. Probiótico. 4. Compostos bioativos. 5. Co-encapsulação. I. Di Luccio, Marco. II. Verruck, Silvani . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Engenharia de Alimentos. IV. Título.

Raiane Silva Manarim

Proteína de *Tenebrio molitor* como agente encapsulante na co-encapsulação de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG com compostos bioativos de beterraba

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de “Bacharel” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Engenharia de Alimentos.

Florianópolis, 08 de Dezembro de 2023.

Coordenação do Curso

Banca examinadora

Prof. Dr. Marco Di Luccio

Orientador

Prof. Dr. Alan Ambrosi

Avaliador UFSC

Prof.(a) Dr.(a) Katia Rezzadori

Avaliadora UFSC

Florianópolis, 2023.

Dedico esse trabalho a minha mãe e minhas amigas, por todo apoio e incentivo durante essa trajetória.

AGRADECIMENTOS

Aos meus orientadores Marco Di Luccio e Silvani Verruck que forneceram todo auxílio necessário para elaboração do projeto.

À Giordana Arend que me acompanhou durante todo o projeto na obtenção dos dados e realização do trabalho.

Ao Callebe Camelo, cuja a colaboração e fornecimentos de informações foram essenciais para a execução do projeto.

A todos do LabSEM e Laboratório de Carnes que me ajudaram na realização do trabalho, em especial a Renata.

À minha família, em especial minha mãe por todo o apoio, incentivo e suporte dado durante esses meses na elaboração do trabalho.

Às minhas amigas de curso que compartilharam comigo desse momento e a Lara que me forneceu todo o apoio e incentivo durante esse período.

RESUMO

A busca por alimentos funcionais contendo probióticos e compostos bioativos está cada vez maior visto que a população de maneira geral está mais preocupada com a sua saúde. Neste sentido, o presente trabalho de conclusão de curso teve como finalidade avaliar a possibilidade de usar as proteínas solúveis de *Tenebrio molitor* como agente encapsulante na co-encapsulação de uma bactéria probiótica e compostos bioativos extraídos do resíduo de beterraba. A farinha de tenébrio foi produzida a partir da larva de tenébrio desidratada. A partir da farinha foi realizada a extração de proteínas solúveis a fim de obter um concentrado de proteínas liofilizado. A larva, farinha e o concentrado de proteína de tenébrio foram então caracterizados em relação ao teor de proteína, teor de gordura, a_w , umidade e capacidade emulsificante. Posteriormente, houve a tentativa de produzir as microcápsulas co-encapsulando bactérias probióticas com compostos bioativos usando o concentrado proteico de tenébrio como agente encapsulante pelo método de encapsulação por membranas. Como resultados, teve-se valores condizentes com a literatura, para o teor de proteína da larva (45%), farinha (57%) e concentrado de proteína (79%); teor de gordura da larva (39%) e farinha (20%). Além disso, a a_w da larva e da farinha foi de 0,63 e 0,66, respectivamente, enquanto o concentrado de proteína apresentou 0,32. Em concordância com estes dados, a umidade da larva, farinha e concentrado de proteína foi de 7%, 8% e 3%, respectivamente. A capacidade emulsificante da farinha e do concentrado de proteína de tenébrio foi de 75% e 82%, respectivamente. Estes resultados estavam em concordância com relatos da literatura, no entanto, permaneceram abaixo da proteína do soro de leite isolada (93%) quando testadas na mesma concentração. No entanto, com o aumento da concentração de 4,5% (m/v) da proteína de tenébrio obteve-se a mesma capacidade emulsificante de aproximadamente 93% da proteína do soro de leite isolada, enquanto 5,5% (m/v) apresentou 100,0% de capacidade emulsificante. Na tentativa de produzir as microcápsulas de bactérias probióticas com compostos bioativos usando a proteína de tenébrio como agente encapsulante, a fase dispersa que continha o extrato aquoso do resíduo de beterraba, alginato a 1% (m/v) e a proteína de tenébrio a 2,75% (m/v) e 4% (m/v) formou gel e não foi possível continuar o processo. A formação de gel pode ter ocorrido pelo pH do meio estar diferente de 7,0, ou pelas concentrações dos componentes estarem em proporções não ideais. Para trabalhos futuros é sugerido a realização do ajuste de pH na fase dispersa, bem como testar concentrações acima de 4,5% (m/v) de proteína de tenébrio que apresentou uma capacidade emulsificante mais próxima ao da proteína do soro de leite isolada, bem como variar a concentração de alginato.

Palavras-chave: Tenébrio; Probiótico; Composto bioativo; Encapsulação; Capacidade Emulsificante.

ABSTRACT

The search for functional foods containing probiotics and bioactive compounds is increasing, as the general population is becoming more concerned about their health. In this context, this undergraduate thesis aimed to evaluate the possibility of using soluble proteins from *Tenebrio molitor* as an encapsulating agent in the co-encapsulation of a probiotic bacterium and bioactive compounds extracted from beet residue. Tenebrio flour was produced from dehydrated Tenebrio larvae. Soluble protein extraction was performed from the flour to obtain a lyophilized protein concentrate. The larva, flour, and Tenebrio protein concentrate were then characterized in terms of protein content, fat content, aw, moisture, and emulsifying capacity. Subsequently, there was an attempt to produce microcapsules by co-encapsulating probiotic bacteria with bioactive compounds using the Tenebrio protein concentrate as the encapsulating agent through the membrane encapsulation method. The results showed values consistent with the literature. For protein content, the larvae, flour, and protein concentrate exhibited 45%, 57%, and 79%, respectively. The larvae had a fat content of 39%, while the flour had 20%. The aw of the larvae and flour was 0.63 and 0.66, respectively, while the protein concentrate had 0.32. The moisture content of the larvae, flour, and protein concentrate was 7%, 8%, and 3%, respectively. The emulsifying capacity of both Tenebrio flour and protein concentrate was 75% and 82%, respectively. These results were in line with literature reports but remained below that of isolated whey protein (93%) when tested at the same concentration. However, with an increase in the concentration of Tenebrio protein to 4.5% (w/v), the emulsifying capacity reached approximately 93% of isolated whey protein, while at 5.5% (w/v), it reached 100.0%. In the attempt to produce microcapsules of probiotic bacteria with bioactive compounds using Tenebrio protein as the encapsulating agent, the dispersed phase containing the aqueous extract of beet residue, 1% (w/v) alginate, and Tenebrio protein at 2.75% (w/v) and 4% (w/v) formed a gel. Gel formation may have occurred due to the pH of the medium being different from 7.0 or the concentrations of components being in non-ideal proportions. For future work, it is suggested to adjust the pH in the dispersed phase and test concentrations above 4.5% (w/v) of Tenebrio protein, which showed emulsifying capacity closer to isolated whey protein, and to vary the alginate concentration.

Keywords: Mealworm; Probiotic; Bioactive Compounds; Encapsulation; Emulsifying Capacity.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|--|----|
| Figura 1: Processo de obtenção de microcápsulas probióticas por emulsificação por membranas..... | 24 |
| Figura 2: Balanço de massa da beterraba vermelha (<i>Beta vulgaris L.</i>)..... | 29 |
| Figura 3: Balanço de massa do <i>Tenebrio molitor</i> | 31 |
| Figura 4: Desengorduramento da farinha de <i>Tenebrio molitor</i> | 32 |
| Figura 5: Extração do concentrado da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 32 |
| Figura 6: Balanço de massa da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 33 |
| Figura 7: Capacidade emulsificante da proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 41 |
| Figura 8: Emulsificação da proteína do soro de leite isolada para comparação..... | 41 |

LISTA DE QUADROS

| | |
|--|----|
| Quadro 1: Composição centesimal das diferentes fases do ciclo de vida de <i>Tenebrio molitor</i> em base seca (g 100g ⁻¹)..... | 26 |
|--|----|

LISTA DE TABELAS

| | |
|---|----|
| Tabela 1: Características da larva, farinha e concentrado de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> em base seca..... | 38 |
| Tabela 2: Capacidade emulsificante de diferentes concentrações de proteína de <i>T. molitor</i> no extrato aquoso de beterraba..... | 40 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|------------------------|--|
| a_w | Atividade de água |
| DCCR | Delineamento composto central rotacional |
| <i>L. rhamnosus</i> GG | <i>Lactocaseibacillus rhamnosus</i> GG |
| MRS | Caldo de Man, Rogosa e Sharpe |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| SDS | Dodecil sulfato de sódio |
| <i>T. molitor</i> | <i>Tenebrio molitor</i> |
| TGI | Trato gastrointestinal |
| UFC | Unidade formadora de colônia |
| WPI | Proteína do soro de leite isolado |

SUMÁRIO

| | |
|---|-----------|
| 1 INTRODUÇÃO | 15 |
| 2 OBJETIVO | 18 |
| 2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS | 18 |
| 3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA | 19 |
| 3.1 PROBIÓTICOS | 19 |
| 3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS | 21 |
| 3.3 CO-ENCAPSULAÇÃO | 23 |
| 3.4 AGENTES ENCAPSULANTES | 25 |
| 3.4.1 Proteínas de inseto como agentes encapsulantes | 25 |
| 3.4.2 <i>Tenebrio molitor</i> | 26 |
| 4 MATERIAIS E MÉTODOS | 28 |
| 4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO PROBIÓTICA..... | 28 |
| 4.2 PREPARO DO EXTRATO DE BETERRABA | 28 |
| 4.2.1 Balanço de massa da beterraba | 28 |
| 4.2.2 Preparo do extrato aquoso do resíduo de beterraba | 29 |
| 4.3 PREPARO DA PROTEÍNA DE INSETO | 30 |
| 4.3.1 Produção da farinha de <i>Tenebrio molitor</i> | 30 |
| 4.3.2 Desengorduramento da farinha de <i>Tenebrio molitor</i> | 31 |
| 4.3.3 Extração de concentrado de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 32 |
| 4.3.4 Caracterização da larva, farinha e do concentrado de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 33 |
| 4.3.4.1 Teor de proteína | 33 |
| 4.3.4.2 Teor de gordura | 34 |
| 4.3.4.3 Atividade de água | 35 |
| 4.3.4.4 Umidade | 35 |
| 4.3.4.5 Capacidade emulsificante da farinha, e do extrato de resíduo de beterraba com o concentrado de proteína de <i>Tenebrio molitor</i> | 35 |
| 4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES PARA A ENCAPSULAÇÃO..... | 36 |
| 4.5 PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO | 36 |
| 4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA | 37 |

| | |
|---|-----------|
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÕES | 38 |
| 5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LARVA, FARINHA E CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i> | 38 |
| 5.2 ENCAPSULAÇÃO USANDO PROTEÍNA DE <i>TENEBRIO MOLITOR</i> | 41 |
| 6 CONCLUSÃO | 43 |
| REFERÊNCIAS..... | 44 |

1 INTRODUÇÃO

O mercado de probióticos vêm se expandindo rapidamente em pesquisas e produtos, principalmente devido aos fatores benéficos à saúde humana relacionados ao seu consumo (Pronutrition, 2019). De acordo com as empresas de consultoria e pesquisa de mercado, o mercado de probióticos deve expandir a uma taxa de crescimento anual de 8,1% entre 2022 e 2027 (Markets and Markets, 2022).

Os probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem um benefício à saúde do hospedeiro (FAO, 2001; HILL *et al.*, 2014). Estudos realizados nos últimos anos evidenciam os inúmeros benefícios à saúde humana que os probióticos proporcionam, dentre eles a alteração da composição da microbiota intestinal e ação de imunomoduladores, melhorando o sistema imunológico (VARSHA; MAHESHWARI; NAMPOOTHIRI, 2021), a melhora dos parâmetros de controle glicêmico em indivíduos com pré-diabetes e diabetes mellitus tipo 2 (NASERI *et al.*, 2022), prevenção e tratamento de câncer colorretal (WEI *et al.*, 2022), potencial terapêutico na redução de complicações reprodutivas femininas (RANI; KAUR; ALI, 2023), e o beneficiamento de múltiplos comportamentos neurais (FEI *et al.*, 2023).

Além dos probióticos, os compostos bioativos também vêm sendo amplamente estudados devido à ação benéfica sobre a saúde (SIDDIQUI *et al.*, 2023). Os compostos bioativos podem ser extraídos de inúmeras fontes vegetais e são de grande interesse devido as suas atividades biológicas e funcionais. Nesse âmbito, os extratos dos resíduos da beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*) se mostram interessantes para serem aplicados na encapsulação de probióticos. Isto se deve à ampla produção e consumo do tubérculo no país, o que gera uma grande quantidade de resíduo que é em geral descartado, como talos, casca e folhas. A beterraba (*Beta vulgaris L.*) contém os pigmentos do tipo betalaínas e carotenoides, compostos fenólicos, vitaminas, minerais, nitrato inorgânico, fibra dietética, que são considerados compostos bioativos responsáveis por diversas ações, como por exemplo antioxidante, antimicrobiana, anticancerígena, hipocolesterolêmica e anti-inflamatória (PUNIA BANGAR *et al.*, 2022).

A co-encapsulação de compostos bioativos e bactérias probióticas em um único produto pode fornecer benefícios sinérgicos à saúde e aumentar a bioatividade de componentes individuais, melhorando assim a aderência de bactérias probióticas

à parede intestinal durante a digestão (MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021). Assim, a microencapsulação tem como principal objetivo reter os probióticos e compostos bioativos dentro de uma única matriz encapsulante (SILVA, Marluci Palazzolli *et al.*, 2022). Além disso, o processo visa proteger os probióticos e compostos bioativos da degradação e aumenta a estabilidade durante o armazenamento e processamento (MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021).

Esta abordagem se mostra como uma possibilidade para contornar limitações que os probióticos apresentam, como perda notável de viabilidade após passar pelo trato digestivo, devido à sua baixa tolerância ao pH estomacal, enzimas digestivas e à alta concentração de sais biliares no intestino delgado (LI *et al.*, 2023). Além disso, quando incorporado em produtos comerciais, os fatores intrínsecos ou de processo, como luz, baixo pH, alta atividade de água ou altas temperaturas de cocção podem afetar negativamente a biodisponibilidade de compostos bioativos e a viabilidade dos microrganismos quando não encapsulados (CAMELO-SILVA *et al.*, 2022).

Algumas das técnicas de microencapsulação utilizadas em probióticos são coacervação, extrusão, emulsificação, cocristalização, secagem por pulverização (*spray-drying*) e a liofilização (VIVEK *et al.*, 2023). Porém, essas técnicas trazem como principal problema microcápsulas de tamanhos variados, geralmente com tamanho superior ao recomendado ($>100 \mu\text{m}$), impactando nas características sensoriais, principalmente conferindo aspecto arenoso ao produto em que será adicionado (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012). Considerando esses fatores, a emulsificação por membranas pode ser uma alternativa interessante, visto que a técnica tem como principais vantagens o tamanho pequeno (1 – 100 μm) e uniforme de partículas (MA, 2003).

Agentes encapsulantes variados têm sido usados para proteger probióticos e compostos bioativos nas diferentes técnicas citadas, incluindo as proteínas de insetos (OKAGU *et al.*, 2020). Ainda, entre as proteínas de origem animal, a produção de insetos vem se destacando dentro do contexto da sustentabilidade (QUEIROZ *et al.*, 2023). A criação de insetos apresenta um impacto consideravelmente menor ao meio ambiente em termos de uso da terra, água, desmatamento e produção de gases de efeito estufa (HALLORAN *et al.*, 2016). Além disso, o uso de proteínas de inseto como agentes encapsulantes pode ser uma boa alternativa a outros encapsulantes devido às propriedades funcionais destas proteínas, como espumabilidade, capacidade de emulsificação e capacidade de gelificação (QUEIROZ *et al.*, 2023).

Desta forma, este trabalho propõe avaliar a viabilidade da proteína de tenébrio como agente encapsulante na co-encapsulação da cultura probiótica *Lactobacillus rhamnosus* GG com compostos bioativos de resíduos do processamento de beterraba.

2 OBJETIVO

Avaliar a eficiência da proteína de tenébrio como agente encapsulante na co-encapsulação da cultura probiótica *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG com extrato do resíduo de beterraba.

2.1 Objetivos específicos

- Produzir farinha de tenébrio com alto teor de proteínas;
- Produzir concentrado de proteína de tenébrio;
- Comparar as capacidades emulsificantes do concentrado proteico de tenébrio e da proteína do soro de leite isolada;
- Avaliar a aplicação do concentrado proteico de tenébrio como agente encapsulante.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 PROBIÓTICOS

Os probióticos são bactérias ativas que colonizam o corpo do hospedeiro e regulam o equilíbrio da microbiota intestinal. A microbiota humana é formada por diferentes microrganismos intestinais, onde a idade, sexo, raça, dieta e estilo de vida são fatores que afetam essa microbiota intestinal em termos de população e diversidade desses microrganismos (SNIGDHA *et al.*, 2022). Os probióticos representam intervenções terapêuticas potenciais para manter ou, pelo menos, restaurar parcialmente a diversidade do microbioma (LEE *et al.*, 2023).

Os gêneros mais estudados como probióticos são *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, enquanto outros como *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Streptococcus thermophilus* e algumas leveduras, também são aceitos como probióticos (DAS *et al.*, 2022). O gênero *Lactobacillus* é anaeróbico facultativo, com uma temperatura ótima de 35 – 40 °C e pH ótimo de 4,5 – 6,4 (XIE *et al.*, 2023). Já o gênero *Bifidobacterium* é estritamente anaeróbico, com uma temperatura ótima de 37 – 42 °C e pH ótimo entre 6,5 – 7 (XIE *et al.*, 2023). Alguns dos potenciais benefícios que *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* trazem a saúde humana são propriedades anti-inflamatórias e imunomodulatórias, redução do risco de doenças cardiovasculares, melhora do sistema imunológico, propriedades anticarcinogênicas, competição com patógenos resistentes a antibióticos, controle do peso e obesidade, melhora da saúde bucal e melhora do bem estar mental (CAMELO-SILVA *et al.*, 2022).

A família *Lactobacillaceae* é formada por células em forma de bastonetes regulares e cocobacilos medindo entre 0,5 - 1,2 µm de largura e 1,0 - 10 µm de comprimento (BERGEY; HOLT, 1994). A maior parte é imóvel, catalase negativa, com atividade pseudocatalase em algumas cepas, oxidase negativa, não redutores de nitrato, indol ou H₂S negativos, e não esporulantes (PEREZ, 2021). Recentemente, foram propostas alterações na taxonomia do gênero 25 *Lactobacillus*, com a reclassificação surgiram novos gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus* (ZHENG *et al.*, 2020). *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG que será utilizada neste trabalho é uma bactéria Gram-positiva, com tolerâncias gastrointestinais superiores a outros probióticos, e que apresenta excelente atividade fisiológica, bem como, colonização

intestinal (CHEN *et al.*, 2023). Além disso, *L. rhamnosus* GG melhora a função da barreira intestinal (BAI *et al.*, 2022), regula a disbiose intestinal (ZHU *et al.*, 2022), inibe alergias e inflamações (FELESZKO *et al.*, 2007), e regula a imunidade (OWENS *et al.*, 2021).

Para exercerem suas propriedades funcionais *in vivo*, os microrganismos devem chegar ao intestino humano de forma ativa e viável (CAMELO-SILVA *et al.*, 2022). Para isso, os produtos contendo probióticos geralmente devem ter pelo menos 6 logs UFC g⁻¹ de células viáveis para exercer benefícios à saúde humana (HILL *et al.*, 2014). A avaliação de sobrevivência desses microrganismos vem sendo feita por método de simulação gastrointestinal *in vitro*, substituindo o método *in vivo* devido sua simplicidade, baixo custo e fácil avaliação de cada fase da digestão (BRODKORB *et al.*, 2019). Pesquisadores estabeleceram um protocolo padronizado (INFOGEST 2.0) para simular condições gastrointestinais *in vitro*. Refere-se a um método de digestão estática que usa proporções constantes de amostras para fluidos digestivos e um pH constante para cada etapa da digestão. Usando este método, amostras de alimentos são submetidas à digestão oral, gástrica e intestinal sequencial, enquanto parâmetros como eletrólitos, enzimas, bile, diluição, pH e tempo de digestão são baseados em dados fisiológicos disponíveis (BRODKORB *et al.*, 2019).

A maior dificuldade é manter os probióticos com alta quantidade de células viáveis durante o processamento e armazenamento do alimento e garantir a chegada segura destes microrganismos no local de ação, onde desempenham suas funções benéficas (TRIPATHI; GIRI, 2014). No decorrer do processamento os probióticos precisam ser estáveis à temperatura de fermentação e tratamentos térmicos, como secagem por pulverização, liofilização, congelamento e descongelamento (VIVEK *et al.*, 2023). Ao longo do armazenamento, os probióticos devem ser resistentes a fatores como baixo pH, presença de aditivos alimentares, alta atividade de água, diferentes aspectos de embalagens, temperatura de armazenamento e oxigênio (TRIPATHI; GIRI, 2014). Quando o local de ação do probiótico é o trato gastrointestinal (TGI), além do processamento e armazenamento, os probióticos precisam se manter estáveis frente as condições extremas encontradas no TGI, que conta com baixo pH gástrico, sais biliares e enzimas digestivas (GHIBAUDO *et al.*, 2017). Por esses fatores, métodos que auxiliem na sobrevivência dos probióticos são de suma importância. A microencapsulação por exemplo, armazena os probióticos no interior da microcápsula

mantendo suas propriedades viáveis, e que quando combinado com compostos bioativos traz mais vantagens ao usuário, devidos seus benefícios a saúde humana.

3.2 COMPOSTOS BIOATIVOS

A crescente demanda de produtos alimentícios funcionais para transmitir potenciais benefícios à saúde tem se concentrado na incorporação de compostos bioativos em alimentos de consumo usual (MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021). Os compostos bioativos derivados de plantas como curcumina, betalaínas, fenólicos, capsaicina, quercetina, resveratrol, catequina e lignanas podem regular a microbiota intestinal e têm grande potencial de aplicação na manutenção da saúde intestinal, aumentando a capacidade do hospedeiro de resistir ou diminuir doenças (CHEN *et al.*, 2022). Dentre as doenças que os compostos bioativos podem auxiliar no combate, podemos citar doenças cardiovasculares (UD DIN *et al.*, 2023), distúrbios respiratórios, como asma, tuberculose, pneumonia e câncer de pulmão (SINDHU *et al.*, 2022), câncer de cólon (ESMEETA *et al.*, 2022), e câncer gástrico (YU *et al.*, 2023). Além disso, a capacidade dos compostos bioativos de modular a microbiota intestinal humana, favorece a diversidade de grupos bacterianos benéficos, proporcionando uma redução no ganho de peso, melhora da função de barreira da mucosa do trato gastrointestinal contra patógenos, e diminuição da inflamação crônica (BORGONOV *et al.*, 2022). Adicionalmente, os compostos fenólicos que são bioativos e estão presentes na beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*) atuam como prebióticos no organismo humano, ou seja, um ingrediente alimentar não digerível que afeta benéficamente o hospedeiro já que estimula seletivamente o crescimento de bactérias residentes no cólon (GIBSON *et al.*, 2017; LIU; VINCKEN; DE BRUIJN, 2022). Na co-encapsulação com probióticos, os prebióticos aumentam a viabilidade das bactérias que passam pelo sistema gastrointestinal (SATHYABAMA *et al.*, 2014).

Outro fator com importância na saúde humana é o potencial antioxidante dos alimentos que está diretamente ligado à presença de compostos bioativos na matriz alimentar (PAZINATTO; TEIXEIRA MARQUES; DE LIMA, 2022). Os antioxidantes possuem capacidade de atrasar ou até inibir a oxidação celular e de auxiliar na regulação de radicais livres (VENCESLAU *et al.*, 2022). O efeito protetor exercido aos alimentos é atribuído à presença de compostos antioxidantes, os quais se destacam os compostos fenólicos. As frutas e vegetais possuem várias substâncias com

potencial para fornecer proteção antioxidante ao organismo humano, além dos compostos fenólicos, os carotenoides e vitamina C, atuam como excelentes antioxidantes (VENCESLAU *et al.*, 2022). Dentro deste contexto, a beterraba vermelha (*Beta vulgaris*) é uma fonte rica em betalaínas, que também demonstram elevada capacidade antioxidante (PAZINATTO; TEIXEIRA MARQUES; DE LIMA, 2022).

A beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*) se mostra uma excelente fonte de compostos bioativos, sendo uma das dez principais espécies vegetais em vários países (TAKÁCS-HÁJOS; VARGAS-RUBÓCZKI, 2022). Contendo os compostos fenólicos (flavonoides) e betalaínas como principais compostos bioativos (WANG *et al.*, 2020). As betalaínas são encontradas em abundância na raiz da beterraba, e se destacam em relação a outros compostos por serem relativamente mais estáveis às mudanças de pH, e apresentarem solubilidade única e alta atividade antioxidante, além de um potencial anti-inflamatório e atividades antitumorais (DE DEUS *et al.*, 2023; SPIEGEL; GAMIAN; SROKA, 2021).

De acordo com o Censo agropecuário (IBGE, 2017), no Brasil em 2017 houve uma produção de 134.969 toneladas de beterraba, com 24.870 unidades de produção no país. A beterraba quando processada, gera resíduos como talos, casca e folhas, e a quantidade desses resíduos agroindustriais produzidos é por volta de 40% (CAMELO-SILVA, 2022), na realização desse trabalho a beterraba gerou 35% de resíduos. Estes resíduos apresentam quantidades significativas de compostos bioativos e nutricionais, tendo assim, grande potencialidade de aplicação na encapsulação de probióticos (RODRIGUEZ-AMAYA, 2019).

Siegel; Gamian; Sroka (2021), realizaram a co-encapsulação de *Lactobacillus plantarum* e compostos bioativos extraídos do caule da beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*) por *spray drying*, e obtiveram resultados satisfatórios de viabilidade desses compostos microencapsulados no período de 120 dias, sendo adequados para aplicação em alimentos que não precisem de tratamento térmico antes da embalagem, como sorvetes, bebidas não pasteurizadas e manteiga. Já Sathyabama *et al.* (2014), estudaram a co-encapsulação de probióticos com prebióticos em matriz de alginato e seu efeito na viabilidade em ambiente gástrico simulado, onde, a beterraba, chicória e aveia foram avaliadas quanto ao seu potencial prebiótico, e como resultado, a co-encapsulação de bactérias probióticas com beterraba e chicória resultou em uma sobrevivência de 88,75 – 98,75% no ambiente gástrico simulado.

3.3 CO-ENCAPSULAÇÃO

A co-encapsulação de compostos bioativos e bactérias probióticas em um único produto fornece benefícios sinérgicos à saúde e aumenta a bioatividade de componentes individuais, melhorando assim a aderência de bactérias probióticas à parede intestinal durante a digestão (MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021). Este processo apresenta vantagens de conveniência e custo em relação à microencapsulação de ingredientes individuais, e também apresenta melhor capacidade de armazenamento de produtos alimentícios com uma estabilização a longo prazo de bactérias probióticas e compostos bioativos (MISRA; PANDEY; MISHRA, 2021).

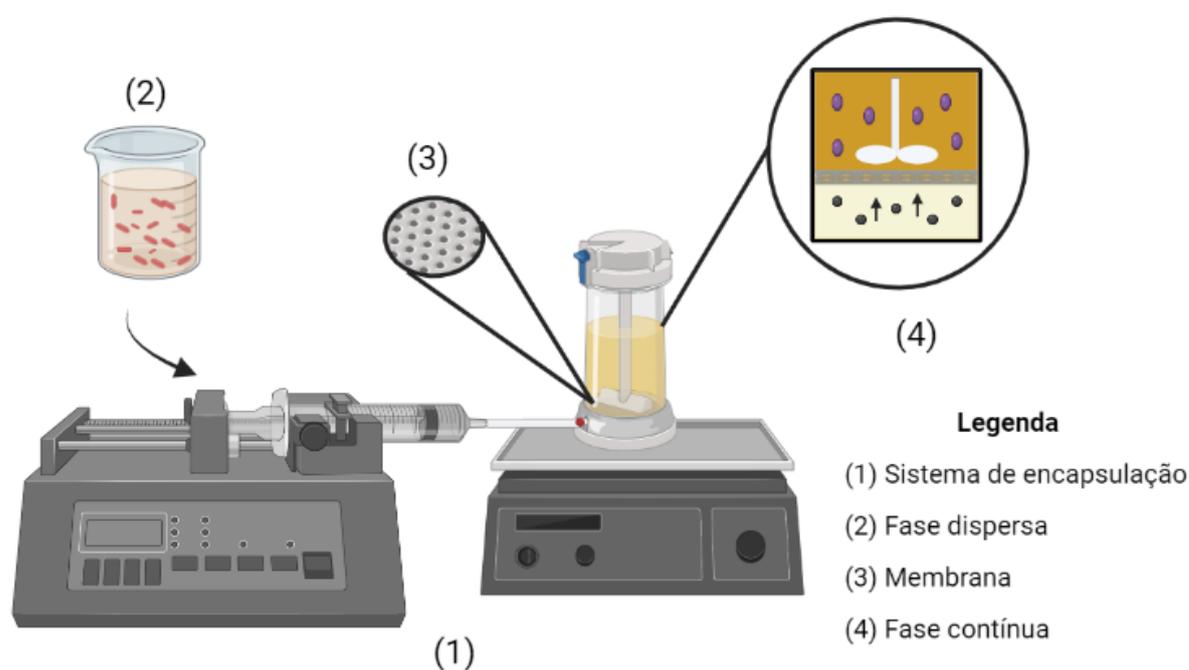
A microencapsulação é uma técnica na qual substâncias sólidas ou líquidas são armazenadas em um invólucro de tamanho microscópico para proteção e posterior liberação em taxas controladas sob condições específicas (MARCILLO-PARRA *et al.*, 2021). O principal objetivo do encapsulamento é proteger com eficiência certas substâncias (materiais do núcleo) de condições adversas ao seu meio ideal como variações de temperatura, umidade, oxigênio e pH, aumentando o prazo de validade do produto e permitindo a liberação controlada das substâncias em questão (MARCILLO-PARRA *et al.*, 2021).

Há diversas técnicas usuais de microencapsulação como coacervação, extrusão, emulsificação, cocristalização, secagem por pulverização (*spray-drying*) e a liofilização (VIVEK *et al.*, 2023). Mas a principal limitação dessas técnicas é a falta de controle do tamanho final das microcápsulas. Considerando esses fatores, a emulsificação por membranas pode ser uma alternativa interessante, visto que a técnica apresenta como principais vantagens: (1) o tamanho uniforme das partículas; (2) o tamanho das partículas formadas é de fácil controle; (3) a ruptura e a coalescência entre as gotas raramente ocorrem devido a monodispersão das gotas; (4) o processo de preparação ocorre em condições amenas, evitando-se o uso de altas forças de cisalhamento; (5) baixo gasto energético; (6) instalação industrial altamente flexível e; (7) operações sob condições brandas de temperatura (MA, 2003; PIACENTINI; DRIOLI; GIORNO, 2014).

O processo de emulsificação por membranas ocorre pela passagem de uma fase dispersa lentamente sob pressão através dos poros da membrana para dentro de uma fase contínua. As gotículas são formadas nas saídas dos poros até atingir um

determinado tamanho, e depois se desprendem. O desprendimento dessas gotas da superfície pode ser favorecido pela aplicação de forças de cisalhamento. O tipo da membrana afeta o mecanismo para obter partículas com a distribuição de tamanho de poros menores e mais regulares, devido à espessura e propriedades hidrofílicas/hidrofóbicas da membrana (KONOVALOVA et al., 2023).

Figura 1: Processo de obtenção de microcápsulas probióticas por emulsificação por membranas



Fonte: Adaptado de Camelo-Silva (2022).

Na microencapsulação através da técnica de emulsificação por membranas, a distribuição dos tamanhos das cápsulas pode ser influenciada por fatores como: (1) parâmetros das membranas (tamanho médio dos poros e distribuição do tamanho dos poros, molhabilidade, porosidade, número de poros ativos, permeabilidade e espessura); (2) parâmetros de fase (tensão interfacial, tipo e concentração de emulsificante, viscosidade e densidade das fases contínua e dispersa); (3) parâmetros de processo (taxa de agitação na superfície da membrana, pressão transmembrana e temperatura) (CHARCOSSET, 2009).

3.4 AGENTES ENCAPSULANTES

Os agentes encapsulantes são utilizados na microencapsulação para criar uma barreira entre o composto de interesse, por exemplo probióticos e compostos bioativos, e o ambiente externo (OKAGU *et al.*, 2020). O alginato, quitosana, proteína de soja, proteína do soro de leite, goma arábica, gelatina, pectina, e diferentes amidos são materiais de parede comumente utilizados na microencapsulação (XU *et al.*, 2022). Além destes, os prebióticos também estão sendo estudados como agentes encapsulantes (APIWATTANASIRI *et al.*, 2022; ISMAIL *et al.*, 2023; TA *et al.*, 2021). Os critérios para selecionar um agente encapsulante (material de parede) baseiam-se principalmente nas propriedades físico-químicas como solubilidade, massa molecular, cristalinidade, temperaturas de transição vítrea, difusibilidade, formação de filme e propriedades emulsificantes (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). O material de parede deve ser fácil de manusear durante o processo de encapsulamento, não pode reagir ou danificar a cepa probiótica durante o encapsulamento e armazenamento, e deve atender às propriedades de solubilidade da microcápsula liberando os probióticos no local de ação (PECH-CANUL *et al.*, 2020).

3.4.1 Proteínas de inseto como agentes encapsulantes

A proteína de inseto surge como uma alternativa para ser aplicada como agente encapsulante, visto que é uma fonte de proteína com excelente conversão alimentar e com alto valor nutricional (ZHAO *et al.*, 2016). Em geral, as proteínas de insetos atendem a todos os requisitos da OMS para composição de aminoácidos, apresentando altos valores para fenilalanina, tirosina, triptofano, lisina e treonina (HUIS, 2016). Tendo em vista o aumento da população mundial e da demanda da população por proteína, a produção sustentável de proteína com baixo impacto ambiental vem sendo um grande desafio. Nesse sentido, a criação de insetos apresenta um impacto consideravelmente menor ao meio ambiente em termos de uso da terra, água, desmatamento e produção de gases de efeito estufa (HALLORAN *et al.*, 2016). Embora o consumo de proteínas apresente todas essas vantagens relatadas, a aceitação dos consumidores é a principal barreira, principalmente nos países ocidentais (ZHAO *et al.*, 2016). Assim, o uso de proteínas extraídas de insetos em forma de farinha ou pó concentrado é uma maneira que vem sendo mais explorada

para a utilização de proteínas dessa origem como ingrediente em diferentes aplicações alimentícias, dessa forma, pode apresentar uma maior aceitação da população como alimento humano (QUEIROZ *et al.*, 2023).

3.4.2 *Tenebrio molitor*

Tenebrio molitor é uma espécie de inseto que pertence ao gênero *Tenebrio*, a família dos Tenebrionidae, e a ordem Coleoptera (HUIS, 2013). A larva-da-farinha-amarela (*T. molitor*), um inseto comestível, vem ganhando destaque como fonte de proteína para fins alimentícios em todo o mundo (HUIS, 2013). Originalmente utilizada apenas na alimentação de répteis e aves, tornou-se um dos insetos mais comumente criados na Europa para fins alimentares, devido ao seu fácil manuseio e ao seu alto valor nutricional (GARINO *et al.*, 2020; HAN *et al.*, 2016).

O Quadro 1 apresenta uma análise de composição centesimal das diferentes fases do ciclo de vida do inseto *T. molitor*, realizada por (LIMOEIRO; ALMEIDA; FREITAS, 2021). A principal diferença observada entre os estágios do ciclo de vida deste inseto, é a maior quantidade de proteína presente na fase adulta e o maior teor de lipídios nas fases de larva e pupa.

Quadro 1: Composição centesimal das diferentes fases do ciclo de vida de *Tenebrio molitor* em base seca (g 100g⁻¹)

| Nutriente | Larvas | Pupas | Adultos |
|--------------|-------------|-------------|-------------|
| Proteína | 49,1 – 52,0 | 51,0 – 53,1 | 65,3 – 65,6 |
| Lipídios | 31,0 – 35,4 | 32,0 – 36,7 | 7,9 – 14,9 |
| Carboidratos | 5,5 – 6,9 | 0,0 – 1,9 | 0,0 – 2,0 |
| Fibras | 13,0 – 28,2 | 5,1 – 12,0 | 20,1 – 40,0 |

Fonte: Adaptada de Limoeiro (2021).

De acordo com Jajic *et al.* (2020), as larvas da farinha também são fonte de aminoácidos essenciais com um conteúdo (g 100g⁻¹) de 7,38 de isoleucina, 5,31 de leucina, 4,79 de lisina, 3,16 de metionina, 7,7 de fenilalanina, 2,63 de treonina, e 1,17 de valina. Além disso, contém lipídios com maior proporção de ácidos graxos insaturados, vitaminas (vitamina A, vitamina C, vitamina E e niacina) e minerais (potássio, cálcio, ferro, magnésio e zinco) (RUMPOLD; SCHLÜTER, 2013).

As proteínas também possuem propriedades emulsificantes, promovendo a formação da emulsão e estabilização por ação interfacial, isso se deve principalmente à sua natureza anfifílica (DOS REIS, 2011). De acordo com Moyses; Hirata (2021), que avaliaram as propriedades funcionais da farinha do *T. molitor*, a capacidade emulsificante da farinha integral foi de 50,1 mL g⁻¹ e da farinha desengordurada foi de 57,3 mL g⁻¹. Como a farinha desengordurada é o produto da remoção do teor lipídico da farinha integral, é esperado que apresente uma capacidade de absorção de gordura superior em relação sua forma integral. Na literatura, há apenas um estudo sobre encapsulação utilizando proteína de inseto, mas sem resultados efetivos. Okagu *et al.* (2020) estudaram a utilização de proteínas de insetos (*T. molitor*) para formular sistemas de entrega de nutracêuticos, encapsulação e liberação de curcumina usando nanocomplexos de quitosana-proteína de larva. A curcumina foi encapsulada no núcleo da matriz de proteína de inseto carregada negativamente e então estabilizada com quitosana como um revestimento composto, através da complexação de polieletrólitos. Como resultados, obtiveram que a curcumina parece ser mantida dentro desses complexos por interações hidrofóbicas com as proteínas, que a interação moderada entre proteínas de insetos e curcumina resultou em eficiência de encapsulamento moderada, além disso, o revestimento das nanopartículas de proteína com quitosana parece fornecer alguma proteção da curcumina na fase gástrica.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 PREPARO DA SUSPENSÃO PROBIÓTICA

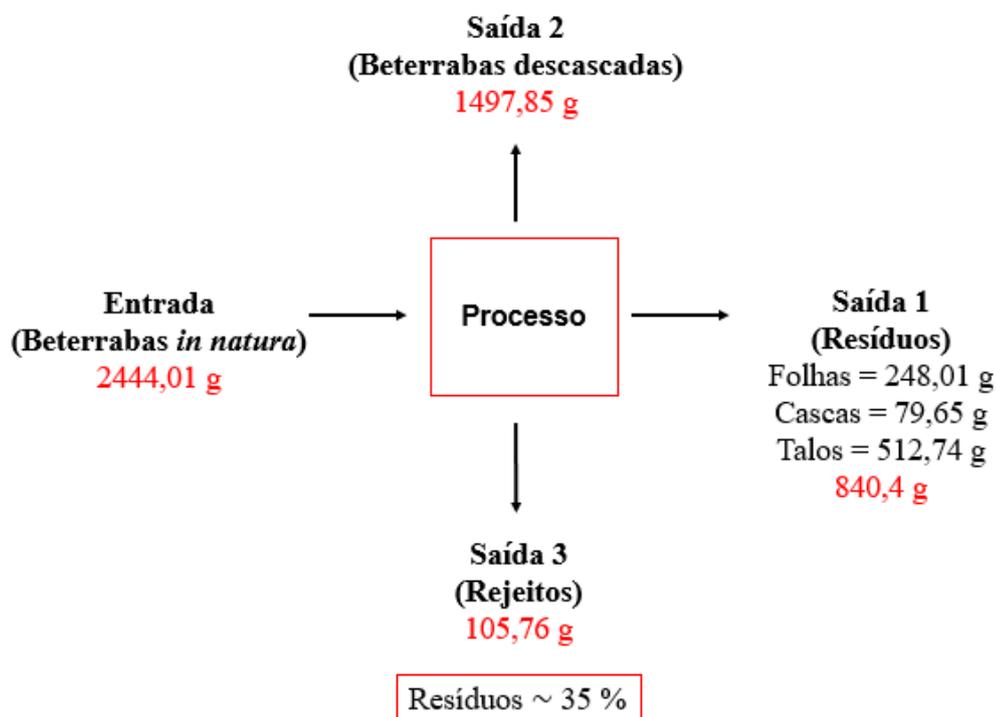
Para obter a solução estoque, células probióticas liofilizadas de *L. rhamnosus* GG foram reidratadas em leite desnatado estéril (25 g L⁻¹) e glicerol (20 g L⁻¹), e armazenadas em frascos Falcon estéreis a -20 ± 2 °C (CAMELO-SILVA *et al.*, 2022). A solução estoque foi adicionada ao caldo MRS e submetida a um período de incubação (37 ± 1 °C por 48 h). Após o período de incubação, as células probióticas foram colhidas por centrifugação (3350 rpm) por 10 min (Centrifuge-SL 700 da Solab, Brasil) a 25 ± 1 °C e lavadas duas vezes com solução salina (0,9 g 100 mL⁻¹). Os pellets de células *L. rhamnosus* GG foram mantidos a 4 ± 1 °C até o processo de encapsulamento.

4.2 PREPARO DO EXTRATO DE BETERRABA

4.2.1 Balanço de massa da beterraba

As beterrabas foram adquiridas em junho de 2023 diretamente com produtores de São João do Sul – SC, e processado em seguida no LABSEM. Inicialmente foi realizada a lavagem em água corrente para a remoção dos rejeitos que incluem sujidades e folhas secas, em seguida o material foi imerso em água clorada a 200 mg/L por 15 minutos. Posteriormente foi lavado novamente em água corrente para a remoção do excesso de cloro e seco em temperatura ambiente. As partes consideradas resíduos, que incluem folhas, talos e cascas (aproximadamente 1 mm de espessura), foram separadas por corte com faca, tendo suas massas registradas para o cálculo do balanço de massa (Figura 2).

Figura 2: Balanço de massa da beterraba vermelha (*Beta vulgaris L.*)



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.2.2 Preparo do extrato aquoso do resíduo de beterraba

O método utilizado para a produção do extrato aquoso do resíduo de beterraba foi descrito e adaptado de outros trabalhos (BATTISTELLA LASTA et al., 2019; REZZADORI et al., 2022). Portanto, as folhas e cascas foram secas em estufa a 45 °C com circulação de ar forçado por 10 h, e os talos por 24 h. Em seguida, os resíduos secos foram moídos em um triturador e armazenados a -18 ± 1 °C em sacos de polietileno protegidos da luz por uma camada de papel alumínio. O pó resultante foi submetido à extração por infusão em água (1:25 m/m) a 55 °C por 30 minutos, sob agitação. Após esse período, o extrato obtido foi filtrado em funil de Buchner com papel de filtro, para remoção de partículas sólidas. Por fim, o extrato obtido foi

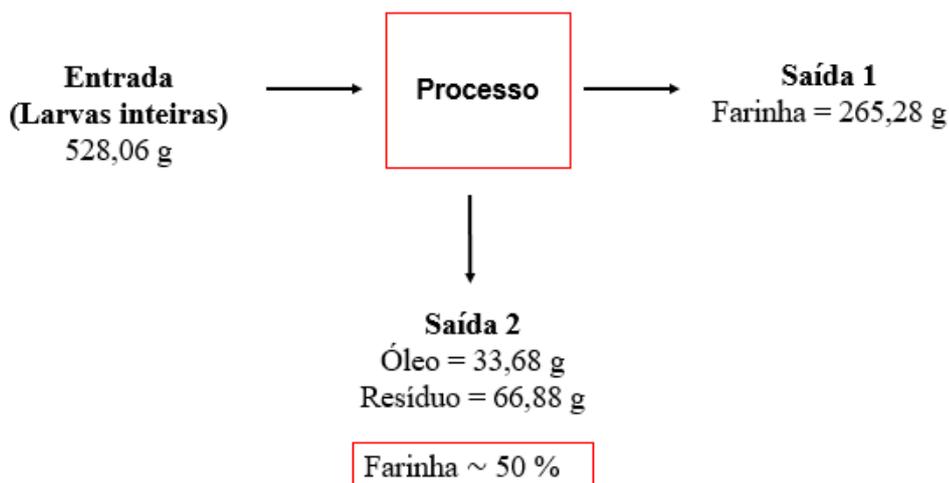
armazenado em tubos Falcon estéreis revestidos com uma camada de alumínio e armazenados a -18 ± 1 °C até o momento das análises.

4.3 PREPARO DA PROTEÍNA DE INSETO

4.3.1 Produção da farinha de *Tenebrio molitor*

As larvas de *T. molitor* secas foram fornecidas pelo Prof. Carlos Peres Silva do Laboratório de Bioquímica de Insetos da UFSC. A produção da farinha foi realizada no Laboratório de Óleos e Gorduras do Centro de Ciências Agrárias da UFSC. As larvas foram prensadas em uma prensa hidráulica (TE-098 Tecnal) formando uma torta. Nesta etapa já ocorre de maneira simultânea a extração de parte da gordura das larvas. Em seguida, a torta de larvas foi triturada em um moinho de facas (Moinho Analítico Básico A 11, IKA), e a farinha de larvas foi embalada em sacos plásticos opacos multicamadas e hermeticamente fechados e armazenados a -18 ± 1 °C até o momento das análises (KOOH *et al.*, 2020).

Figura 3: Balanço de massa do *Tenebrio molitor*



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.3.2 Desengorduramento da farinha de *Tenebrio molitor*

O desengorduramento da farinha de inseto foi realizado de acordo com o método descrito por Wang et al. (2021a), com modificações. Em resumo, a farinha de inseto (100 g) foi misturada com hexano em uma proporção de 1:5 (m/v) e a mistura foi agitada a 600 rpm em um agitador magnético (IKA® Color Squid White) por 1 h. Em seguida, a mistura foi deixada em repouso até a completa separação de fases. O precipitado restante foi misturado novamente com hexano em uma proporção de 1:5 (m/v) e o processo de separação-extração foi realizado mais duas vezes. No final do processo de desengorduramento, o solvente restante no precipitado, foi evaporado durante a noite por secagem ao ar em uma capela de exaustão. O pó de inseto seco e desengordurado foi então usado para a extração de proteínas.

Figura 4: Desengorduramento da farinha de *Tenebrio molitor*

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

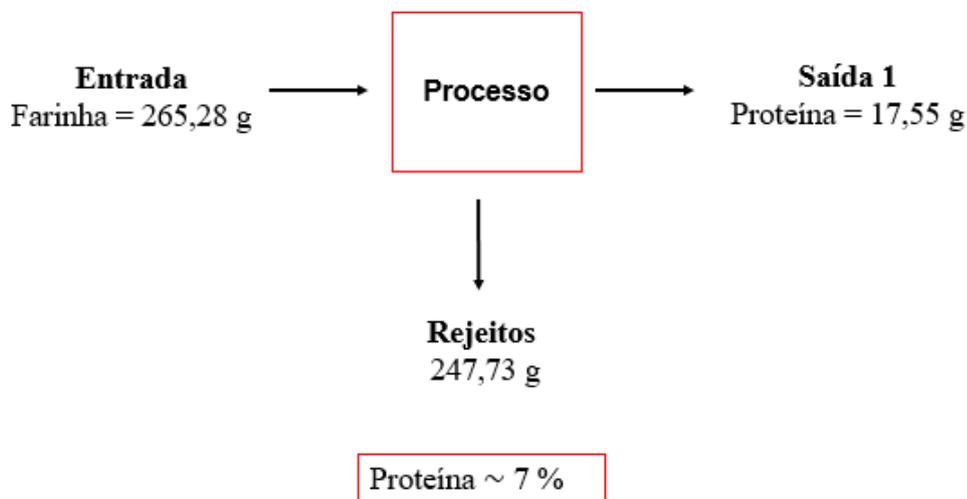
4.3.3 Extração de concentrado de proteína de *Tenebrio molitor*

O processo de extração de proteína do pó de inseto para obter o concentrado de proteína foi baseado no método de Wang et al. (2021b), com modificações. O pó de inseto desengordurado (30 g) foi misturado com solução de NaOH 0,25 mol/L em uma proporção de 1:10 (300 mL de NaOH) (m/v), e a mistura foi aquecida a 40 °C por uma hora com agitação constante a 600 rpm em um agitador magnético (IKA® C-MAG HS 7). Em seguida, a mistura foi transferida para tubos falcon e centrifugada (Centrífuga SL-700, Solab) a 6.000 rpm por 15 minutos e o sobrenadante foi separado para continuar a extração de proteínas. O pH do sobrenadante foi ajustado para atingir um valor entre 4,0 - 4,2 com a adição de ácido clorídrico a 37%, seguida de centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos. Após a centrifugação, os pellets foram coletados em placas de Petri e mantidos a -60 °C. Todo o processo foi repetido duas vezes com os grânulos que permaneceram após a primeira etapa de centrifugação. Os pellets dos três processos de centrifugação foram combinados, congelados por 24 h a -80°C e liofilizados (Liotop 101) por 48 horas a 20 mmHg e -50°C. O concentrado de proteína liofilizado foi armazenado congelado até o uso posterior.

Figura 5: Extração do concentrado da proteína de *Tenebrio molitor*

Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 6: Balanço de massa da proteína de *Tenebrio molitor*



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

4.3.4 Caracterização da larva, farinha e do concentrado de proteína de *Tenebrio molitor*

4.3.4.1 Teor de proteína

Para determinar o teor de proteína da larva e da farinha de *T. molitor* foi utilizado o Método de Kjeldahl, que consiste em 3 etapas, sendo elas a digestão, destilação e titulação. Durante a fase de digestão, colocou-se no balão Kjeldahl 0,5 g da amostra embrulhada em papel manteiga, juntamente com 0,5 g da mistura catalítica e 25 mL de H₂SO₄ concentrado e adaptou-se o tubo ao sistema de digestão (na capela), regulando a temperatura do sistema de digestão até chegar em 400 °C e procedendo a digestão da amostra durante 3 horas e 30 minutos. Nesta etapa, é observado o escurecimento do líquido e à medida que o tempo passa, o sistema adquire uma coloração que varia de verde claro a incolor. Ao fim desta fase, desligou-se o sistema de digestão e aguardou-se resfriar até temperatura ambiente.

Em seguida, a mistura foi adicionada ao tubo de destilação, já em temperatura ambiente, juntamente com cerca de 10 mL de água destilada e 3 gotas do indicador fenolftaleína. O tubo foi conectado ao sistema de destilação, adicionando-se cuidadosamente uma solução de hidróxido de sódio 50% (m/v) até que o líquido passe de azul a pardo, o que indica que o meio está alcalino. Em seguida, foi realizada a

destilação recolhendo-se o destilado em 50 mL de solução de ácido bórico 4% (m/v) contendo um indicador misto. Continuou-se a destilação até que aproximadamente 75 mL tivessem sido recolhidos na solução de ácido bórico.

Por último foi realizado a titulação do destilado com solução de HCl 0,1 mol/L padronizado. O experimento foi realizado em duplicata para larvas e triplicata para a farinha de *T. molitor*. Foi possível obter a quantidade de proteína bruta da larva e da farinha através das Equações (1) e (2).

$$g\% N = \frac{vol.HCl \times fator \times 0,0014 g N \times 100}{massa da amostra} \quad (1)$$

$$Proteína bruta = g\% N \times 6,25 \text{ (fator de conversão geral)} \quad (2)$$

4.3.4.2 Teor de gordura

O teor de gordura da larva e da farinha de *T. molitor* foi analisado pelo método de Bligh Dyer. As amostras foram secas inicialmente a 105 °C em estufa, e uma alíquota de 2,5 g de cada amostra (farinha de *T. molitor* e larvas trituradas) foi transferida para Erlenmeyer, adicionando-se 10 mL de clorofórmio, 20 mL de metanol e 8 mL de água destilada. A mistura foi agitada em agitador orbital durante 30 min. Em seguida, foram adicionados 10 mL de clorofórmio e 10 mL de solução de sulfato de sódio a 1,5% e a mistura foi agitada por mais 2 min e transferida para funil de separação para a separação das fases. Em seguida, a camada inferior que continha o óleo e clorofórmio foi filtrada e seca com adição de 1 g de sulfato de sódio anidro. Após esse procedimento, 5 mL do filtrado foram transferidos para um béquer previamente seco e pesado. O excesso de solvente foi evaporado em placa de aquecimento, e o residual de solvente eliminado em estufa a 105 °C por 1 h. Após resfriamento em dessecador foi realizada nova pesagem. A análise foi realizada em duplicata para cada amostra.

A porcentagem de lipídeos totais é definida pela Equação (3):

$$Lipídeos totais (\%) = \frac{peso do lipídeo no extraído \times 4 \times 100}{peso da amostra (g)} \quad (3)$$

4.3.4.3 Atividade de água

A atividade de água da larva, farinha e concentrado de proteína do *T. molitor* foi medida em triplicata a 25 ± 1 °C usando um analisador de atividade de água (Aqualab, modelo 4TE).

4.3.4.4 Umidade

Para a análise de umidade inicialmente os cadinhos foram secos por 1 hora a 105 °C em estufa (Quimis® modelo Q317M-32). Em seguida, estes foram resfriados no dessecador até temperatura ambiente. Pesou-se 2,5 g de amostra (larva, farinha e concentrado de proteína do *T. molitor*), que foram dessecados em estufa por 24 h a 105°C. Após, foram resfriados no dessecador até temperatura ambiente e pesados novamente. As análises de umidade foram realizadas em quadruplicata para cada amostra.

A porcentagem de umidade presente em 100 g de amostra, é definido com a Equação (4) a seguir:

$$U (\%) = \frac{m_{\text{água}} \times 100}{P_1} \quad (4)$$

P_0 = massa do cadinho vazio (g)

P_1 = massa da amostra úmida (g)

P_2 = massa do cadinho + amostra seca (g)

P_3 = massa da amostra seca = $P_2 - P_0$

$m_{\text{água}}$ = $P_1 - P_3$

4.3.4.5 Capacidade emulsificante da farinha, e do extrato de resíduo de beterraba com o concentrado de proteína de *Tenebrio molitor*

A capacidade emulsificante da farinha e do extrato de resíduo de beterraba com a proteína concentrada de *T. molitor* foi realizada de acordo com o método turbidimétrico (PEARCE; KINSELLA, 1978), com algumas modificações. Para a análise em que a farinha e concentrado de proteína foram as amostras, 20 mL de

solução de amostra a 1% em tampão fosfato 0,2 mol/L (pH 7) foram misturados com 2 mL de óleo de soja e transferido para um cilindro de medição graduado de 50 mL. Para a análise em que foi utilizado o extrato aquoso de beterraba e o concentrado de proteína de tenébrio, 20 mL de amostra a diferentes concentrações em extrato aquoso de resíduo de beterraba foram misturados com 2 mL de óleo de soja e transferidos para um cilindro graduado de 50 mL. A análise do concentrado de proteína de *T. molitor* com o extrato aquoso de beterraba foi realizado em 7 concentrações diferentes (2,5; 3,0; 3,5; 4; 4,5; 5; 5,5) do concentrado de proteína.

As misturas foram homogeneizadas com um homogeneizador (T 25, IKA) a 18.000 rpm por 2 min. O volume da camada de óleo emulsionado foi medido após 10 min de incubação à temperatura ambiente, e a capacidade emulsificante foi calculada de acordo com a Equação (5), sendo que H_i é o volume inicial da solução no cilindro antes da homogeneização, H_f é o volume da camada emulsionada.

$$\text{Capacidade de Emulsificação (\%)} = \frac{H_f}{H_i} \times 100 \quad (5)$$

4.4 PREPARO E CARACTERIZAÇÃO DAS SUSPENSÕES PARA A ENCAPSULAÇÃO

As suspensões com diferentes concentrações de proteína de *T. molitor* para a encapsulação foram preparadas baseadas em um delineamento experimental que é baseado na proteína de soro de leite (CAMELO-SILVA, 2022). Concentrações de (1,5; 2,75; 4) % (m/v) de proteína de tenébrio com o alginato de sódio a 1% (m/v) foram homogeneizados no extrato aquoso do resíduo de beterraba, para realizar o encapsulamento a diferentes taxas de alimentação e sob mesma agitação.

4.5 PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO

As microcápsulas probióticas foram preparadas por emulsificação por membranas seguindo o método proposto por Camelo-Silva (2022), com modificações. A fase dispersa foi preparada misturando 1,0 % (m/v) de alginato de sódio, suspensão probiótica ($\sim 9 \log \text{ UFC mL}^{-1}$), 50 mL de extrato aquoso de beterraba e diferentes concentrações (1,5; 2,75; 4) de proteína de inseto em relação ao volume

do extrato aquoso de beterraba. A fase contínua consistiu em óleo de soja 3:1 (m/m) em relação à fase dispersa, com 3 % (v/v) de SPAN 80. O molhamento da membrana com a fase dispersa precisa ser evitado, ou a fase dispersa se espalhará sobre a superfície da membrana. Assim, a membrana foi embebida na fase contínua e tratada por 30 min em banho ultrassônico antes do processo de microencapsulação.

As microcápsulas foram obtidas por meio de um sistema de emulsificação por membranas acoplado a um módulo especialmente projetado, com uma membrana porosa de aço inoxidável (~ 20 μm) com 181 cm^2 de área efetiva. A taxa de alimentação da fase dispersa e a taxa de agitação foram ajustadas de acordo com a melhor condição definida no planejamento experimental, usando uma bomba de infusão (EFF 311, Insight). Quando a emulsificação foi concluída, a bomba e o agitador foram desligados e a emulsão produzida foi vertida do cilindro de vidro para um béquer. Em seguida, uma solução a 1,5 % (m/v) de cloreto de cálcio foi lentamente adicionada à emulsão (sob agitação a 250 rpm) e deixada em repouso por 30 min. Logo após, a emulsão foi centrifugada (3350 rpm por 10 min), e o sobrenadante foi descartado. As microcápsulas gelificadas foram separadas por filtração a vácuo, lavadas com solução salina (0,9 g 100 mL^{-1}) e analisadas quanto ao rendimento de encapsulamento.

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A média e o desvio padrão (DP) foram calculados a partir dos dados obtidos em triplicata. A análise de variância unidirecional (ANOVA) foi realizada usando o software STATISTICA versão 13.3 (TIBCO Software Inc., EUA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÕES

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA LARVA, FARINHA E CONCENTRADO DE PROTEÍNA DE *Tenebrio molitor*

A larva, farinha e concentrado de proteína de *T. molitor* foram caracterizados em relação ao teor de proteína, gordura, atividade de água, umidade e capacidade emulsificante. Os valores estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1: Características da larva, farinha e concentrado de proteína de *Tenebrio molitor* em base seca.

| Parâmetro | Resultados | | | |
|------------------------------|---------------------------|---------------------------|-------------------------------------|-----------------------------------|
| | Larva | Farinha | Concentrado de proteína de tenébrio | Proteína de soro de leite isolada |
| Teor de Proteína (%) | 45,33 ^c ± 0,09 | 57,28 ^b ± 2,00 | 78,97 ^a ± 3,85 | |
| Teor de Gordura (%) | 39,00 ^a ± 4,09 | 20,67 ^b ± 2,34 | - | |
| a _w | 0,63 ^b ± 0,01 | 0,66 ^a ± 0,01 | 0,32 ^c ± 0,01 | |
| Umidade (%) | 7,38 ^b ± 0,07 | 8,14 ^a ± 0,05 | 2,88 ^c ± 0,26 | |
| Capacidade emulsificante (%) | - | 74,46 ^b ± 0,77 | 82,31 ^{ab} ± 6,96 | 92,71 ^a ± 1,47 |

Resultados expressos como média ± desvio padrão. ^{a-c} Letras diferentes na mesma linha indicam diferença estatística ($p < 0,05$).

a_w: atividade de água

O teor de proteína é importante por ser a principal característica para o consumo humano de *T. molitor* atualmente, sendo uma alternativa diante das proteínas tradicionais. Limoeiro (2021) relata que a larva tem entre 49,1 – 52,0% (base seca) de proteína, enquanto Moyses e Hirata (2021) relatam que o teor de proteína da farinha de *T. molitor* integral foi de 45,3% e da farinha desengordurada foi de 60,5%, assim, observamos que a farinha analisada que estava parcialmente desengordurada apresentou valores próximos aos estabelecidos na literatura. Para o concentrado de proteína de tenébrio foi obtido 79% (base seca), que quando comparado com o teor de proteína obtido para a larva e para a farinha observa-se um aumento ($p < 0,05$) de 74,2% e 37,8%, respectivamente.

O segundo maior componente presente no tenébrio é a gordura. Limoeiro (2021) relata que a larva tem entre 31,0 – 35,4% (base seca) de gordura. No presente trabalho, obteve-se 39% (base seca) na larva, caracterizando um maior teor de gordura em relação à literatura. Moyses e Hirata (2021) relataram que o teor de

gordura da farinha integral avaliada por eles foi de 30,9% e da farinha desengordurada foi de 7,9%. O alto teor de gordura presente na farinha é desinteressante na maioria dos casos já que a proteína em alta concentração é o composto de maior interesse para utilização de tenébrios em formulações alimentícias.

De acordo com Seho (2020), as larvas frescas apresentam um teor de umidade de 68% e atividade de água de 0,98. A larva e a farinha analisadas estavam previamente secas e apresentaram a_w de 0,63 e 0,66, respectivamente, já o concentrado de proteína de tenébrio apresentou a_w de 0,32, aproximadamente a metade dos valores obtidos pela larva e a farinha. Moyses e Hirata (2021), relataram que o teor de umidade da farinha integral foi de 9,4% e para a farinha desengordurada foi 12,2%, valores acima dos observados no presente estudo. E a umidade do concentrado de proteína de tenébrio diminuiu ($p < 0,05$) aproximadamente 60% em relação a larva e a farinha. Baixos valores de umidade e a_w são importantes para manter a qualidade e vida útil do tenébrio, uma vez que nas faixas de valores encontrados ocorre uma diminuição da velocidade das reações químicas e bioquímicas e inibição do crescimento de microrganismos deteriorantes (SEHO, 2020).

A conversão da farinha em concentrado de proteína é interessante porque aumenta características funcionais como solubilidade, capacidade emulsificante e estabilidade de emulsão (LIMOEIRO, 2021). A capacidade de emulsificação da farinha foi de aproximadamente 74%. De acordo com Moyses e Hirata (2021), que avaliaram as propriedades funcionais da farinha do *T. molitor*, a capacidade emulsificante da farinha integral foi de 50,1% e da farinha desengordurada foi de 57,3%, valores abaixo dos observados no presente estudo. Vale ressaltar que a capacidade de emulsificação observada no presente estudo para a farinha de tenébrio está mais baixa ($p < 0,05$) em relação à capacidade de emulsificação da proteína do soro de leite isolada. Então, o desengorduramento da farinha com hexano, seguido da extração da proteína com NaOH e ácido clorídrico a 37% para se ter o concentrado de proteína de tenébrio foi realizado afim de se obter um melhor percentual da capacidade emulsificante, bem como um maior teor de proteína, um menor teor de gordura e uma redução da granulometria, parâmetros importantes para este trabalho visto que facilita a solubilização da fase dispersa e a passagem pela membrana no processo de emulsificação por membranas. Com isto, a capacidade emulsificante do concentrado proteico de tenébrio e da proteína do soro de leite isolada não apresentaram diferença

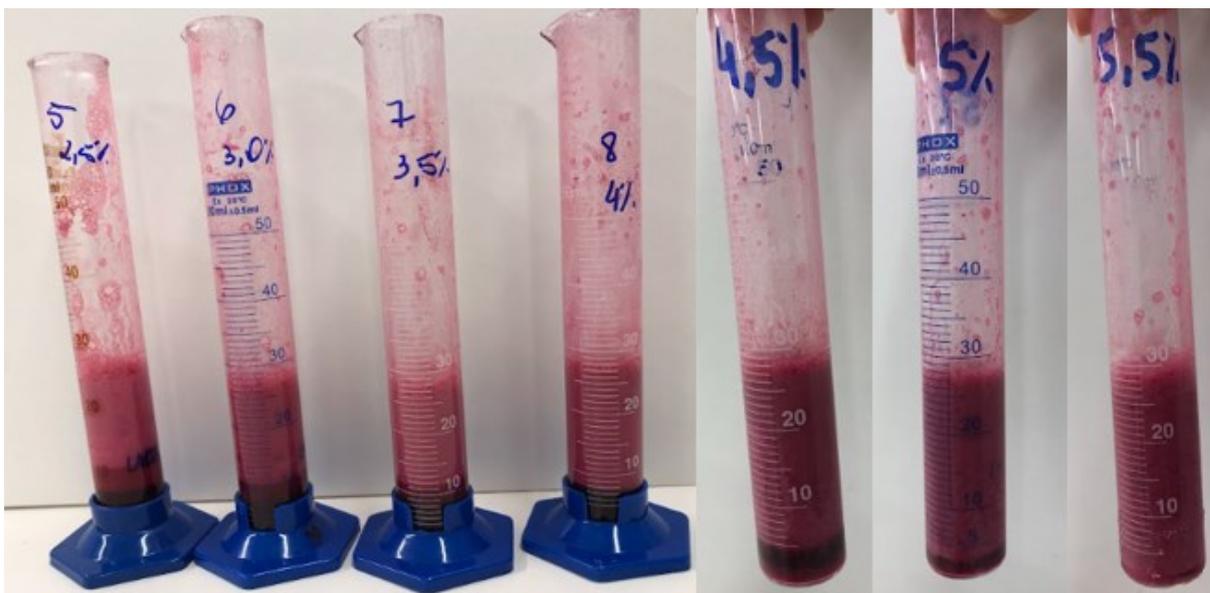
estatística ($p>0,05$). Como o objetivo do trabalho é usar a proteína de tenébrio como agente encapsulante, a fase dispersa deve formar uma emulsão, sendo um parâmetro de suma importância neste trabalho (CAMELO-SILVA, 2022).

Para se obter uma concentração de proteína de tenébrio com capacidade emulsificante igual ou superior à proteína do soro de leite isolada foi realizado o teste de capacidade emulsificante em diferentes concentrações do concentrado de proteína de *T. molitor*, sendo os resultados apresentados na Tabela 2 e mostrados nas figuras 7 e 8. Com os dados da Tabela 2 pode-se observar que uma concentração de 4,5% de concentrado proteico de tenébrio possui uma capacidade emulsificante igual à da proteína do soro de leite isolada (93%), e que com 5,5% pode se alcançar 100% de capacidade emulsificante. Assim, foi possível visualizar que para obter uma capacidade emulsificante igual à proteína do soro de leite isolada é preciso utilizar concentrações maiores de proteína de tenébrio. No entanto, o uso de maior concentração desse tipo de proteína pode interferir no preparo da fase dispersa, causando um desbalanceamento entre os componentes. Sendo assim, todas as concentrações testadas devem ser avaliadas no preparo das fases dispersas.

Tabela 2: Capacidade emulsificante de diferentes concentrações de proteína de *T. molitor* no extrato aquoso de beterraba.

| Concentração de proteína de <i>T. molitor</i> (%) | Capacidade Emulsificante do concentrado de proteína de tenébrio (%) | Capacidade Emulsificante da proteína do soro de leite isolada (%) |
|--|--|--|
| 2,5 | 65,2 | 93,2 |
| 3,0 | 65,9 | 90,9 |
| 3,5 | 65,2 | 91,3 |
| 4,0 | 82,6 | 93,0 |
| 4,5 | 93,3 | - |
| 5,0 | 95,6 | - |
| 5,5 | 100,0 | - |

Figura 7: Capacidade emulsificante da proteína de *Tenebrio molitor*



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

Figura 8: Emulsificação da proteína do soro de leite isolada para comparação



Fonte: Elaborado pelo autor (2023).

5.2 ENCAPSULAÇÃO USANDO PROTEÍNA DE *Tenebrio molitor*

Com a caracterização do concentrado de proteína foi iniciado o processo de produção das cápsulas. No dia anterior à encapsulação foi preparada a fase dispersa que continha inicialmente o extrato aquoso de resíduos de beterraba, alginato de sódio a 1% (m/v) e proteína de tenébrio (2,75% (m/v) e 4% (m/v)) e foi deixado em agitação até o momento da encapsulação. No entanto, a fase dispersa tanto para a

concentração de proteína de tenébrio de 2,75% quanto para a de 4% formaram gel, ou seja, não houve a solubilização da proteína de tenébrio no meio. Por esse motivo não foi possível dar continuidade na produção de co-encapsulados de bactérias probióticas com compostos bioativos com a proteína de tenébrio, pois a membrana possui poros de 20 μm e a passagem da fase dispersa não iria ocorrer, formando incrustação na membrana.

A formação desse gel pode ter ocorrido pela interação do alginato com a proteína de tenébrio, que quando combinados em uma solução que tenha presença de íons de cálcio, pH ácido, ou concentrações altas dos componentes podem influenciar na formação do gel (LIN; KELLY; MIAO, 2021; WANG et al., 2022). Na solução analisada os fatores mais prováveis para a formação de gel são o pH, e a concentração do alginato estar alta em relação a concentração de proteína no meio. Algumas alternativas para a solubilização da proteína seriam ajustar o pH da fase dispersa, ou adicionar sais já que a presença de sais como cloreto de sódio ou fosfato de sódio evita a formação de gel em algumas proteínas (LIN; KELLY; MIAO, 2022), além de testar diferentes concentrações do alginato para observar o comportamento da solução.

Camelo-Silva (2022) utilizou a proteína do soro de leite isolada como agente encapsulante na co-encapsulação de bactérias probióticas com compostos bioativos extraídos do resíduo de beterraba, onde a proteína do soro de leite isolada solubilizou na fase dispersa e foi possível produzir as microcápsulas, sendo a concentração ótima da proteína 4% (m/v). Este estudo foi utilizado como base para a escolha da concentração da proteína de tenébrio, mas como observado, as concentrações de 2,75% (m/v) e 4% (m/v) de tenébrio não foram solúveis na fase aquosa com a concentração de alginato a 1% (m/v), impossibilitando a co-encapsulação já que não passaria pela membrana. Concentrações de tenébrio acima de 4% (m/v) devem ser testadas em uma próxima etapa, mas para isso seria necessário mais concentrado de proteína de tenébrio, bem como concentrações diferentes de alginato também devem ser testadas. O presente estudo mostra que a extrapolação de um método descrito para um tipo de proteína não apresenta reprodutibilidade para outra proteína, sendo que apenas a capacidade emulsificante não foi suficiente para estabelecer essa relação.

6 CONCLUSÃO

Este estudo analisou a larva e a farinha de *T. molitor* em relação ao teor de proteína, gordura, a_w , umidade, capacidade emulsificante e obteve resultados condizentes com os dados da literatura. Para atingir um maior teor proteico, menor teor de gordura e maior capacidade emulsificante foi realizada a extração da proteína da farinha, gerando um concentrado proteico que foi caracterizado quanto ao teor de proteína, a_w , umidade e capacidade emulsificante. Como esperado, os resultados da caracterização com o concentrado proteico foram superiores aos obtidos com a larva e a farinha, porém a capacidade emulsificante ainda foi inferior quando comparado com a proteína do soro de leite isolada. A fim de avaliar qual concentração de proteína de tenébrio teria a capacidade emulsificante igual ou superior à proteína do soro de leite isolada foi realizado o teste de capacidade emulsificante em diferentes concentrações do concentrado de proteína de *T. molitor*. Mostrou-se que a concentração de 4,5% (m/v) apresenta a mesma capacidade emulsificante da proteína do soro de leite isolada. Contudo, mais estudos para caracterização da capacidade emulsificante devem ser conduzidos, para confirmação desse resultado.

Nos testes de produção de microcápsulas, observou-se que as concentrações de 2,75% (m/v) e 4% (m/v) de concentrado proteico formaram gel junto com o alginato a 1% (m/v) e o extrato aquoso do resíduo de beterraba, inviabilizando o processo de encapsulamento por membrana.

Como conclusão geral, pode-se afirmar que foi possível obter um concentrado de proteína a partir de larvas de tenébrio por um método relativamente simples, e que pode atingir alta capacidade emulsificante a uma concentração acima de 4,5%. No entanto, a co-encapsulação de bactérias probióticas com compostos bioativos usando proteína de tenébrio como agente encapsulante não foi possível dentro das condições estudadas, sendo necessário estudo mais aprofundado envolvendo variação de pH e composição da fase dispersa.

REFERÊNCIAS

- AREND, Giordana D. *et al.* Gravitational and microwave-assisted multi-stages block freeze concentration process to obtain enriched concentrated beet (*Beta vulgaris* L.) by-products extract: bioactive compounds and simulated gastrointestinal profile. **Food and Bioproducts Processing**, v. 133, p. 77–86, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2022.03.004>.
- ARÉVALO, Helbert Antonio *et al.* Implementation of the HACCP system for production of *Tenebrio molitor* larvae meal. **Food Control**, v. 138, 2022.
- BAI, Yongsong *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG ameliorates DON-induced intestinal damage depending on the enrichment of beneficial bacteria in weaned piglets. **Journal of Animal Science and Biotechnology**, v. 13, n. 1, p. 1–17, 2022.
- BATTISTELLA LASTA, Heloísa Fabian *et al.* Pressurized liquid extraction applied for the recovery of phenolic compounds from beetroot waste. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 21, n. September, 2019.
- BORGONOVI, Tais Fernanda *et al.* Fruit bioactive compounds: Effect on lactic acid bacteria and on intestinal microbiota. **Food Research International**, v. 161, 2022.
- BRODKORB, André *et al.* INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion. **Nature Protocols**, v. 14, n. 4, p. 991–1014, 2019.
- CAMELO-SILVA, Callebe *et al.* Influence of buriti pulp (*Mauritia Flexuosa* L.) concentration on thermophysical properties and antioxidant capacity. **Lwt**, v. 151, p. 112098, 2021. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112098>.
- CAMELO-SILVA, Callebe *et al.* Innovation and Trends in Probiotic Microencapsulation by Emulsification Techniques. **Food Engineering Reviews**, v. 14, p. 462–490, 2022. Disponível em: <https://doi.org/10.1007/s12393-022-09315-1>.
- CHARCOSSET, Catherine. Preparation of emulsions and particles by membrane emulsification for the food processing industry. **Journal of Food Engineering**, v. 92, p. 241–249, 2009.
- CHEN, Baiyan *et al.* Exploring the protective effects of freeze-dried *Lactobacillus rhamnosus* under optimized cryoprotectants formulation. **LWT**, v. 173, 2023.
- CHEN, Xinyu *et al.* Plant-Derived Bioactive Compounds and Potential Health Benefits: Involvement of the Gut Microbiota and Its Metabolic Activity. **Biomolecules**, 2022.
- COLÍN-CRUZ, M. A. *et al.* Co-encapsulation of bioactive compounds from blackberry juice and probiotic bacteria in biopolymeric matrices. **LWT**, v. 110, p. 94–101, 2019.
- DAS, Tridip K. *et al.* Current status of probiotic and related health benefits. **Applied Food Research**, v. 2, p. 100185, 2022.

DE DEUS, Cassandra *et al.* Co-encapsulation of *Lactobacillus plantarum* and bioactive compounds extracted from red beet stem (*Beta vulgaris* L.) by spray dryer. **Food Research International**, v. 167, 2023.

DOS SANTOS ALVES, Maria Jaízia *et al.* Impact of the Acidified Hydroethanolic Solution on the Physicochemical Properties of Starch Nanoparticles Produced by Anti-Solvent Precipitation. **Starch**, v. 73, n. 11–12, 2021.

ESMEETA, Akanksha *et al.* Plant-derived bioactive compounds in colon cancer treatment: An updated review. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 153, p. 113384, 2022.

FAO. PROBIOTICS IN ANIMAL NUTRITION. 2001.

FEI, Yuzhe *et al.* Probiotic intervention benefits multiple neural behaviors in older adults with mild cognitive impairment. **Geriatric Nursing**, v. 51, p. 167–175, 2023.

FELESZKO, W. *et al.* Probiotic-induced suppression of allergic sensitization and airway inflammation is associated with an increase of T regulatory-dependent mechanisms in a murine model of asthma. **Clinical and Experimental Allergy**, v. 37, n. 4, p. 498–505, 2007.

FINKE, Mark D. Complete nutrient content of four species of commercially available feeder insects fed enhanced diets during growth. **Zoo Biology**, v. 34, n. 6, p. 554–564, 2015.

GARINO, Cristiano *et al.* Quantitative allergenicity risk assessment of food products containing yellow mealworm (*Tenebrio molitor*). **Food and Chemical Toxicology**, v. 142, p. 111460, 2020.

GHARSALLAOUI, Adem *et al.* Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GHIBAUDO, Florencia *et al.* Pectin-iron capsules: Novel system to stabilise and deliver lactic acid bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 39, p. 299–305, 2017.

GIBSON, Glenn R. *et al.* Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

HALLORAN, Afton *et al.* Life cycle assessment of edible insects for food protein: A review. **Agronomy for Sustainable Development**, v. 36, n. 4, 2016.

HAN, So Ri *et al.* Safety assessment of freeze-dried powdered *Tenebrio molitor* larvae (yellow mealworm) as novel food source: Evaluation of 90-day toxicity in Sprague-Dawley rats. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 77, p. 206–212, 2016.

HEIDEBACH, Thomas; FÖRST, Petra; KULOZIK, Ulrich. Microencapsulation of Probiotic Cells for Food Applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, n. 4, p. 291–311, 2012.

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

HUANG, Dongjie *et al.* Effect of high-intensity ultrasound on the physicochemical properties of *Tenebrio Molitor* Protein. **Food Hydrocolloids**, v. 134, n. July 2022, p. 108056, 2023.

HUIS, Arnold van. Edible insects: future prospects for food and feed security. **FAO FORESTRY PAPER**, 2013.

ISMAIL, Shaymaa A. *et al.* The production of stirred yogurt fortified with prebiotic xylooligosaccharide, probiotic and synbiotic microcapsules. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 50, p. 102729, 2023.

JI, Rui *et al.* Extending viability of bifidobacterium longumin chitosan-coated alginate microcapsules using emulsification and internal gelation encapsulation technology. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 2019.

KIM, Tae Kyung *et al.* Changes of amino acid composition and protein technical functionality of edible insects by extracting steps. **Journal of Asia-Pacific Entomology**, v. 23, n. 2, p. 298–305, 2020.

KLUNDER, H. C. *et al.* Microbiological aspects of processing and storage of edible insects. **Food Control**, v. 26, n. 2, p. 628–631, 2012.

KOOH, Pauline *et al.* Control of biological hazards in insect processing: Application of HACCP method for yellow mealworm (*Tenebrio molitor*) powders. **Foods**, v. 9, n. 11, 2020.

LEE, Zheng Yii *et al.* Benefits and harm of probiotics and synbiotics in adult critically ill patients. A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials with trial sequential analysis. **Clinical Nutrition**, v. 42, n. 4, p. 519–531, 2023.

LI, Qian *et al.* Improving probiotic (*Lactobacillus casei*) viability by encapsulation in alginate-based microgels: Impact of polymeric and colloidal fillers. **Food Hydrocolloids**, v. 134, p. 108028, 2023.

LIMOEIRO, Raphael; ALMEIDA, Eveline Lopes; FREITAS, Suely Pereira. USO DE INSETOS E SEUS SUBPRODUTOS NA PRODUÇÃO DE ALIMENTOS. **Projeto de Final de Curso - UFRJ**, 2021.

LIN, D.; KELLY, A. L.; MIAO, S. Formation and creaming stability of alginate/micro-gel particle-induced gel-like emulsions stabilized by soy protein isolate. **Food Hydrocolloids**, v. 121, p. 107040, 2021.

LIN, D.; KELLY, A. L.; MIAO, S. The impact of pH on mechanical properties, storage stability and digestion of alginate-based and soy protein isolate-stabilized emulsion gel beads with encapsulated lycopene. **Food Chemistry**, v. 372, p. 131262, 2022.

LIU, Zhibin; VINCKEN, Jean Paul; DE BRUIJN, Wouter J.C. Tea phenolics as prebiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 127, p. 156–168, 2022.

MA, Guanghui. Control of polymer particle size using porous glass membrane emulsification. **China Particuology**, v. 1, n. 3, p. 105–114, 2003.

MANCINI, Simone *et al.* *Tenebrio molitor* reared on different substrates: is it gluten free?. **Food Control**, v. 110, 2020.

MARCILLO-PARRA, Verónica *et al.* Encapsulation of bioactive compounds from fruit and vegetable by-products for food application – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 116, p. 11–23, 2021.

MELLO DA SILVEIRA, Sheila *et al.* Composição química e atividade antimicrobiana de óleos essenciais de plantas selecionadas cultivadas no Sul do Brasil contra micro-organismos patogênicos e deteriorantes de alimentos. **Ciência Rural**, n. 7, p. 1300–1306, 2011.

MIRMAZLOUM, Iman *et al.* Co-encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* and Reishi medicinal mushroom (*Ganoderma lingzhi*) extract in moist calcium alginate beads. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 192, p. 461–470, 2021.

MISRA, Sourav; PANDEY, Pooja; MISHRA, Hari Niwas. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 109, p. 340–351, 2021.

MORELLI, S.; HOLDICH, R. G.; DRAGOSAVAC, M. M. Microparticles for cell encapsulation and colonic delivery produced by membrane emulsification. **Journal of Membrane Science**, v. 524, p. 377–388, 2017.

NASERI, Kaveh *et al.* Probiotics and synbiotics supplementation improve glycemic control parameters in subjects with prediabetes and type 2 diabetes mellitus: A GRADE-assessed systematic review, meta-analysis, and meta-regression of randomized clinical trials. **Pharmacological Research**, v. 184, p. 106399, 2022.

OKAGU, Ogadimma D. *et al.* Utilization of insect proteins to formulate nutraceutical delivery systems: Encapsulation and release of curcumin using mealworm protein-chitosan nano-complexes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 151, p. 333–343, 2020.

OWENS, Joshua A. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG Orchestrates an Antitumor Immune Response. **Cmgh**, v. 12, n. 4, p. 1311–1327, 2021.

PAZINATTO, Bruna Caroline; TEIXEIRA MARQUES, Dhiennefer; DE LIMA, Cristina Peitz. Avaliação Da Atividade Antioxidante E Compostos Bioativos Presentes Em Extratos De Beterraba. **Cadernos da Escola de Saúde**, v. 21, n. 1, p. 44–56, 2022.

PEARCE, Kevin N.; KINSELLA, John E. Emulsifying Properties of Proteins: Evaluation of a Turbidimetric Technique. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 26, n. 3, p. 716–723, 1978.

PECH-CANUL, Angel De Cruz *et al.* A Brief Review of Edible Coating Materials for the. **Coating**, v. 10, n. 197, p. 1–34, 2020.

PIACENTINI, Emma; DRIOLI, Enrico; GIORNO, Lidietta. Membrane emulsification technology: Twenty-five years of inventions and research through patent survey. **Journal of Membrane Science**, v. 468, p. 410–422, 2014.

PUNIA BANGAR, Sneha *et al.* Bioactive potential of beetroot (*Beta vulgaris*). **Food Research International**, v. 158, p. 111556, 2022.

PURSCHE, Benedict *et al.* Effect of pre-treatment and drying method on physico-chemical properties and dry fractionation behaviour of mealworm larvae (*Tenebrio molitor L.*). **European Food Research and Technology**, v. 244, n. 2, p. 269–280, 2018.

QI, Xiaoxi *et al.* The viability of complex coacervate encapsulated probiotics during simulated sequential gastrointestinal digestion affected by wall materials and drying methods. **Food and Function**, v. 12, n. 19, p. 8907–8919, 2021.

QUEIROZ, Lucas Sales *et al.* Edible insect as an alternative protein source: a review on the chemistry and functionalities of proteins under different processing methods. **Heliyon**, v. 9, p. 14831, 2023.

RABANAL, R M *et al.* Antimicrobial studies on three species of *Hypericum* from the Canary Islands. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 81, p. 287-292, 2002.

RANASINGHE, Madushika *et al.* Ultrafiltration of Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) and Mealworm (*Tenebrio molitor*) Protein Concentrates to Enhance Emulsifying and Foaming Properties. **Membranes**, v.13, p. 137, 2023.

RANI, Kavita; KAUR, Gurjeet; ALI, Syed Azmal. Probiotic-prebiotic therapeutic potential: A new horizon of microbial biotherapy to reduce female reproductive complications. **Pharma Nutrition**, 2023.

REZZADORI, K. *et al.* Bioavailability of bioactive compounds of guava leaves (*Psidium guajava*) aqueous extract concentrated by gravitational and microwave-assisted cryoconcentration. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 46, n. 2, p. 1–11, 2022.

RODRIGUEZ-AMAYA, Delia B. Update on natural food pigments - A mini-review on carotenoids, anthocyanins, and betalains. **Food Research International**, v. 124, p. 200–205, 2019.

RUMPOLD, Birgit A.; SCHLÜTER, Oliver K. Nutritional composition and safety aspects of edible insects. **Mol. Nutr. Food Res**, v. 57, p. 802–823, 2013.

SATHYABAMA, S. *et al.* Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **Lwt**, v. 57, n. 1, p. 419–425, 2014.

SEHO, R. E. Drying *Tenebrio molitor* larvae by vacuum and multi-flash dryings: effects on the microbiota and color. **UFSC**, 2020.

SIDDIQUI, Shahida Anusha *et al.* Application of micro/nano-fluidics for encapsulation of food bioactive compounds - principles, applications, and challenges. **Trends in Food Science and Technology**, v. 136, p. 64–75, 2023.

SILVA, Marlucci Palazzolli *et al.* Co-encapsulation of guaraná extracts and probiotics increases probiotic survivability and simultaneously delivers bioactive compounds in simulated gastrointestinal fluids. **Lwt**, v. 161, p. 113351, 2022.

SILVA, Marlucci P. *et al.* Fortification of yoghurt drink with microcapsules loaded with *Lactobacillus paracasei* BGP-1 and guaraná seed extract. **International Dairy Journal**, v. 125, 2022.

SINDHU, Rakesh K. *et al.* Nanodelivery based Chinese medicine's bioactive compounds for treatment of respiratory disorders. **Pharmacological Research - Modern Chinese Medicine**, v. 5, p. 100180, 2022.

SNIGDHA, Shikha *et al.* Probiotics: Potential novel therapeutics for microbiota-gut-brain axis dysfunction across gender and lifespan. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 231, p. 107978, 2022.

SPIEGEL, Maciej; GAMIAN, Andrzej; SROKA, Zbigniew. Antiradical activity of beetroot (*Beta vulgaris* L.) betalains. **Molecules**, v. 26, n. 9, p. 1–20, 2021.

TA, Linh Phuong *et al.* Effects of various polysaccharides (alginate, carrageenan, gums, chitosan) and their combination with prebiotic saccharides (resistant starch, lactosucrose, lactulose) on the encapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus casei* 01 strain. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 183, p. 1136–1144, 2021.

TAKÁCS-HÁJOS, Mária; VARGAS-RUBÓCZKI, Tímea. Evaluation of bioactive compounds in leaf and root of five beetroot varieties. **Journal of Agriculture and Food Research**, v. 7, 2022.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225–241, 2014.

UD DIN, Syed Riaz *et al.* Bioactive Compounds (BACs): A Novel Approach to Treat and Prevent Cardiovascular Diseases. **Current Problems in Cardiology**, p. 101664, 2023.

VARSHA, Kontham Kulangara; MAHESHWARI, Arun Padmakumar; NAMPOOTHIRI, Kesavan Madhavan. Accomplishment of probiotics in human health pertaining to immunoregulation and disease control. **Clinical Nutrition**, v. 44, p. 26-37, 2021.

VERRUCK, Silvani *et al.* Survival of Bifidobacterium BB-12 microencapsulated with full-fat goat's milk and prebiotics when exposed to simulated gastrointestinal conditions and thermal treatments. **Small Ruminant Research**, v. 153, p. 48–56, 2017.

VERRUCK, Silvani *et al.* Thermal and water sorption properties of Bifidobacterium BB-12 microcapsules obtained from goat's milk and prebiotics. **LWT**, v. 98, p. 314–321, 2018.

VINNER, Gurinder K. *et al.* Microencapsulation of enteric bacteriophages in a pH-Responsive solid oral dosage formulation using a scalable membrane emulsification process. **Pharmaceutics**, v. 11, n. 9, 2019.

VIVEK, Kambhampati *et al.* A comprehensive review on microencapsulation of probiotics: technology, carriers and current trends. **Applied Food Research**, v. 3, p. 100248, 2023.

WANG, H. *et al.* Effect of calcium ions on rheological properties and structure of *Lycium barbarum* L. polysaccharide and its gelation mechanism. **Food Hydrocolloids**, v. 122, p. 107079, 2022.

WANG, Jiawei *et al.* Entrapment, survival and release of Bifidobacterium adolescentis within chickpea protein-based microcapsules. **Food Research International**, v. 55, p. 20–27, 2014.

WANG, Junjing *et al.* Black Soldier Fly (*Hermetia illucens*) Protein Concentrates as a Sustainable Source to Stabilize O/W Emulsions Produced by a Low-Energy High-Throughput Emulsification Technology. **Foods**, v. 10, p. 1048, 2021.

WANG, Tao *et al.* Stability of bioactive compounds and in vitro gastrointestinal digestion of red beetroot jam: Effect of processing and storage. **Food Bioscience**, v. 38, p. 100788, 2020.

WEI, Lijuan *et al.* Role of a mixed probiotic product, VSL#3, in the prevention and treatment of colorectal cancer. **European Journal of Pharmacology**, v. 930, p. 175152, 2022.

XIE, Aijun *et al.* Polysaccharides, proteins, and their complex as microencapsulation carriers for delivery of probiotics: A review on carrier types and encapsulation techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, p. 124784, 2023.

XU, Cong *et al.* Novel nano-encapsulated probiotic agents: Encapsulate materials, delivery, and encapsulation systems. **Journal of Controlled Release**, v. 349, p. 184–205, 2022.

YAN, Wenjia *et al.* Interpenetrating polymer network hydrogels of soy protein isolate and sugar beet pectin as a potential carrier for probiotics. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 2021.

YI, Liya *et al.* Extraction and characterisation of protein fractions from five insect species. **Food Chemistry**, v. 141, p. 3341–3348, 2013.

YU, Lei *et al.* Bioactive compounds and mechanism of Xianglian pill in the treatment of gastric cancer: Network pharmacology analysis and experimental validation. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 314, p. 116573, 2023.

ZHAO, Xue *et al.* Yellow mealworm protein for food purposes - Extraction and functional properties. **PLOS ONE**, v. 11, 2016.

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

ZHU, Yin *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG combined with inosine ameliorates alcohol-induced liver injury through regulation of intestinal barrier and Treg/Th1 cells. **Toxicology and Applied Pharmacology**, v. 439, p. 115923, 2022.