

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO
DOUTORADO EM NUTRIÇÃO

**APLICAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULADOS COM
ALGINATO DE CÁLCIO E QUITOSANA EM LEITE EM PÓ E UHT**

RECIFE-PE

2019

ANA JÚLIA A. A. ATHAYDE

**APLICAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULADOS COM
ALGINATO DE CÁLCIO E QUITOSANA EM LEITE EM PÓ E UHT**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
em Nutrição do Centro de Ciências da Saúde da
Universidade Federal de Pernambuco para
obtenção da aprovação na qualificação.

Orientadora: Profa. Dra. Thayza C. M. Stamford

Co-orientadora: Profa. Dra. Lúcia Raquel Ramos Berger

**RECIFE-PE
2019**

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do programa de geração automática do SIB/UFPE

ATHAYDE, ANA JÚLIA ALVES AGUIAR.

APLICAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULADOS COM ALGINATO DE CÁLCIO E QUITOSANA EM LEITE EM PÓ E UHT / ANA JÚLIA ALVES AGUIAR ATHAYDE. - Recife, 2019.

124 : il., tab.

Orientador(a): Thayza Christina Montenegro Stamford

Coorientador(a): LÚCIA RAQUEL RAMOS BERGER

Tese (Doutorado) - Universidade Federal de Pernambuco, Centro de Ciências da Saúde, , 2019.

Inclui referências, apêndices.

1. ALIMENTOS. 2. PROBIÓTICOS. 3. MICROENCAPSULAÇÃO. 4. NUTRIÇÃO. 5. MICROENCAPSULAÇÃO. I. Stamford, Thayza Christina Montenegro . (Orientação). II. BERGER, LÚCIA RAQUEL RAMOS. (Coorientação). IV. Título.

610 CDD (22.ed.)

ANA JÚLIA ALVES AGUIAR ATHAYDE

**APLICAÇÃO DE *Lactobacillus rhamnosus* MICROENCAPSULADOS COM
ALGINATO DE CÁLCIO E QUITOSANA EM LEITE EM PÓ E UHT**

TESE _____ em 27/02/2019

BANCA EXAMINADORA

Profª. Dra Thayza Christina Montenegro Stamford
Departamento de Medicina Tropical/UFPE
Orientador

Profª. Dra. Sarah Romini de Lima Basto
UFRPE

Prof. Dra. Profª. Jossana Pereira de Sousa Guedes
Departamento de gestão e tecnologia agroindustrial/UFPB

Profª. Dra. Thatiana Montenegro Stamford Arnaud

Prof. Dra. Tânia Lúcia Montenegro Stamford
Departamento de nutrição/UFPE

À Deus e a minha família,

Dedico

AGRADECIMENTOS

A Deus e Nossa Senhora por tudo que consegui, pela coragem que me foi concedida e pela superação a cada dia.

Agradeço a minha mãe por ter me dado apoio incondicional e me sustentado em cada momento. Às minhas irmãs (meus sobrinhos Cecília, Elisa e Tobias) e meu irmão pelo amor a mim depositado e por terem sempre acreditado em mim. Rebecca, se não fosse sua ajuda nas estatísticas, sua doação mesmo no meio da doença de seu esposo, nada disso teria sido possível, eu te amo, minha irmã! A painho por todo orgulho, por todos os exageros sobre minhas conquistas acadêmicas. Eu amo muito vocês!

Agradeço a toda a minha família, em especial a minha avó (*in memorian*) e tia Graça (*in memorian*) que mesmo não estando mais conosco, foram a minha fonte de inspiração, a quem eu me apeguei nas lembranças para conseguir superar cada desafio, na certeza que elas estão olhando por mim lá do céu. A todos os meus familiares e amigos que não estão mais presentes, mas que eu levo no coração e queria muito compartilhar essas conquistas com eles, meu muito obrigada!

À minha orientadora, Profa. Thayza, sem a qual eu não estaria onde estou. Obrigada pela oportunidade e pela confiança a mim depositada, por ter sido tão dócil mesmo quando tudo parecia que não ia dar certo. Agradeço a Deus por tê-la colocado como minha orientadora nessa jornada. À professora Maria Lúcia da Conceição, por todo carinho, paciência, dedicação, por ter me apoiado em cada momento que eu achava que não ia conseguir, por cada palavra dita e por cada oração no momento de maior desespero. Professora Lúcia, nunca vou me esquecer das suas palavras quando mais precisei. Ao professor Evandro Leite de Souza por toda disponibilidade, ajuda, paciência e por ter me permitido realizar meus experimentos pertinho da minha casa.

Aos professores que se disponibilizaram fazer parte da minha banca, Marcos, Thatiana, Sarah e Jossana. Muito obrigada.

A Thaís, Carlinha, Karla e Polyana por serem minhas eternas amigas, dando força e não me deixando desistir. Polys, te dedico em especial essa conquista, sem você tudo teria sido mais difícil. Mais que o título eu ganhei uma amiga que me ajudou em cada etapa, chorou comigo, riu comigo, me fez escutar raça negra por no mínimo 4 anos consecutivos (kkkkkk) Te amo, amiguinha!

Aos meus cunhados, Ronaldinho e Daniel. Meus primos Andrei, Heli, Germana, Gustavo, Felyphe e minhas tias, Célia, Lulu e Marli que sempre estiveram torcendo por mim, me ajudando a alcançar meus objetivos e acreditando que eu conseguiria.

Aos meus amigos e companheiros do Laboratório de Microbiologia e Bioquímica dos Alimentos, Bella, Karina (minha estagiária favorita, que me salvou em tantos momentos, um pedacinho dessa tese é dela), Aldeir, Thaty, Eduardo, Laênia, Sônia e Heloisa, pelo tempo dedicado, pelos ensinamentos, pelos fins de semana e feriados compartilhados no laboratório, enfim, pela amizade e confiança que vocês compartilharam comigo. Agradeço a todos, por terem tornado os meus dias mais felizes em meio a tantas preocupações! Vocês são demais!

Aos meus irmãos da Comunidade Fraternal amor por toda compreensão da minha ausência e por terem sido meu suporte espiritual nos momentos mais difíceis. Meus irmãos, vocês tornaram o peso mais leve com suas orações e desejos de que tudo desse certo. Obrigada por terem feito minha análise sensorial, vocês não sabem o quanto isso representou para mim.

À pós-graduação em nutrição-UFPE, em especial Cecília, por ter me ajudado com dedicação e paciência ao longo desse caminho.

A Facepe por ter financiado a pesquisa.

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho

“ Demore na dúvida... E descubra a sabedoria que insiste em se esconder na ausência de palavras. ”

Padre Fábio de Melo

RESUMO

A encapsulação é uma técnica que pode ser empregada para a proteção de probióticos, conferindo resistência ao ambiente ácido do trato gastrointestinal, bem como viabilizando sua aplicação em matrizes alimentares. O presente estudo teve como objetivo avaliar duas técnicas de encapsulação de *L. rhamnosus* utilizando matriz encapsulante de alginato-quitosana para aplicação das cápsulas em leite em pó e UHT. Inicialmente, foram realizadas análises de variância para a observação da eficiência e viabilidade da encapsulação pelas metodologias de extrusão e emulsificação de *L. rhamnosus*, ao longo de 21 dias, sob condições de armazenamento em temperatura ambiente (28⁰C) e refrigerada (4⁰C). A eficiência da encapsulação foi de 82,89% e 70,88% para *L. rhamnosus* no tempo zero, pelas metodologias de extrusão e emulsificação, respectivamente. Quanto à viabilidade das microcápsulas em temperatura refrigerada observou-se que *L. rhamnosus*, no último dia de armazenamento, apresentou eficiência de 69,56% e 90,13% pelas metodologias de extrusão e emulsificação, respectivamente. A avaliação dos parâmetros tecnológicos e fisiológicos das cápsulas foram satisfatórios, mostrando boa viabilidade quando submetidas a tratamentos térmicos em temperaturas medianas e altas, além de boa sobrevivência a diferentes condições de pH, sal (NaCl) e sais biliares. Apesar de terem apresentado taxas medianas de tolerância a enzimas digestivas, as bactérias microencapsuladas apresentaram boa resistência às condições gastrointestinais simuladas. As qualidades tecnológicas são importantes na incorporação das microcápsulas em matrizes alimentares submetidas a tratamentos térmicos e condições de baixa acidez. Quanto à análise sensorial e vida de prateleira, essas também foram satisfatórias, apresentando altas pontuações na escala de aceitação e intenção de compra. Portanto, as técnicas de microencapsulação, extrusão e emulsificação podem ser consideradas boas alternativas para aplicação de probióticos em alimentos, em especial nas matrizes de leite em pó e UHT. A técnica de emulsificação merece destaque maior por ter obtido os melhores resultados quanto às análises tecnológicas, fisiológicas e sensoriais, além de apresentar um tamanho menor, o que favorece a aplicação em alimentos, com impacto sensorial reduzido.

Palavras-chave: gelificação iônica interna; gelificação iônica externa; alginato-quitosana, lactobacilos.

ABSTRACT

Encapsulation is a technique that can be used to protect probiotics, conferring resistance to the acidic environment of the gastrointestinal tract, as well as making it possible to apply it to food matrices. The present study had as objective to evaluate two techniques of encapsulation of *L. rhamnosus* using encapsulating matrix of alginate-chitosan for application of the capsules in milk powder and UHT. Initially, variance analyzes were performed to observe the efficiency and viability of encapsulation by extrusion and emulsification methodologies of *L. rhamnosus* over 21 days under storage conditions at room temperature (28°C) and refrigeration (4°C). The efficiency of the encapsulation was 82.89% and 70.88% for *L. rhamnosus* at time zero, by the extrusion and emulsification methodologies, respectively. As for the viability of the microcapsules in refrigerated temperature, it was observed that *L. rhamnosus*, on the last day of storage, presented efficiency of 69.56% and 90.13% by the extrusion and emulsification methodologies, respectively. The evaluation of the technological and physiological parameters of the capsules was satisfactory, showing good viability when submitted to heat treatments at medium and high temperatures, besides good survival at different pH, salt (NaCl) and bile salts conditions. Despite having presented medium rates of tolerance to digestive enzymes, the microencapsulated bacteria presented good resistance to the simulated gastrointestinal conditions. The technological qualities are important in the incorporation of the microcapsules in food matrices submitted to thermal treatments and conditions of low acidity. As for sensory analysis and shelf life, these were also satisfactory, presenting high scores on the acceptance scale and purchase intention. Therefore, microencapsulation, extrusion and emulsification techniques can be considered as good alternatives for the application of probiotics in foods, especially in the milk powder and UHT matrices. The emulsification technique deserves greater attention because it has obtained the best results in terms of technological, physiological and sensorial analyzes, besides being smaller in size, which favors the application in foods with reduced sensorial impact.

Keywords: internal ionic gelation; external ionic gelling; alginate-chitosan, lactobacilli.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Pag.
Figura 1. Principais ações dos probióticos	24
Figura 2. Diferentes estágios de preparação de cápsulas de alginato pelo método de gelificação iônica interna (Adaptado de PONCELET et al, 1999)	36
Figura 3. Estrutura química do alginato	40
Figura 4. Desacetilação da quitina em quitosana	41
Figura 5. Microcápsula de alginato de cálcio revestida com quitosana	43
Figura 6. Tamanho das microcápsulas (por extrusão e emulsificação) avaliadas com auxílio de paquímetro	63
Figura 7. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , temperatura ambiente (28°C) e refrigerada (4 °C), encapsulada por extrusão e emulsificação	65
Figura 8. Propriedades tecnológicas da cepa <i>L. rhamnosus</i>	69
Figura 9. Viabilidade de livre e encapsulado por extrusão e emulsificação de <i>L. rhamnosus</i> após exposição a condições gastrointestinais simuladas.	79
Figura 10. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição a condições gastrointestinais simuladas.	82
Figura 11. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, incorporado ao leite em pó e UHT, armazenados a 4 ° C.	86

LISTA DE TABELAS

	Pag.
Tabela 1. Técnicas de microencapsulação	29
Tabela 2. Matrizes alimentares incorporadas de probióticos microencapsulados	47
Tabela 3. Tolerância de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à NaCl.	71
Tabela 4. Tolerância de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à tratamentos térmicos.	73
Tabela 5. Tolerância de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à ácidos.	74
Tabela 6. Tolerância de <i>L. rhamnosus</i> , livres e encapsulada por extrusão e emulsificação a sais biliares	76
Tabela 7. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição à enzimas digestivas	77
Tabela 8. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição a condições gastrointestinais simuladas.	81
Tabela 9. Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> , livres e encapsulados por extrusão e emulsificação, incorporados ao leite em pó e UHT, armazenados a 4 °C durante 28 dias.	85
Tabela 10. Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos em leite UHT e leite em pó, contendo <i>L. rhamonus</i> encapsulados por extrusão e emulsificação, armazenados a 4°C por 28 dias.	89
Tabela 11. Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros sensoriais em leite UHT e leite em pó, contendo <i>L. rhamnosus</i> encapsulados por extrusão e emulsificação	91

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

TGI	Trato gastro-intestinal
°C	Graus Celsius
cm	Centímetros
g	Gramas
mg	Miligramas
mL	Mililitros
µL	Microlitros
NaCl	Cloreto de Sódio
NaOH	Hidróxido de Sódio
pH	Potencial Hidrogeniônico
v/v	Volume por volume
p/v	Peso por volume
%	Percentual

SUMÁRIO

	Página
1	INTRODUÇÃO..... 16
2	OBJETIVOS..... 20
2.1	Objetivo geral..... 13
2.2	Objetivos específicos..... 13
3	REVISÃO DA LITERATURA..... 22
3.1	Probióticos..... 22
3.1.1	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> 25
3.2	Microencapsulação..... 26
3.2.1	Extrusão/Gelificação iônica externa..... 34
3.2.2	Emulsificação/ Gelificação iônica interna..... 35
3.3	Revestimento de microcápsulas..... 38
3.3.1	Alginato..... 38
3.3.2	Quitosana..... 40
3.3.3	Microcápsulas de alginato-quitosana..... 42
3.4	Aplicação de probióticos microencapsulados em alimentos..... 45
4	MATERIAIS E MÉTODOS..... 53
4.1	Encapsulação das cepas..... 53
4.1.1	Preparo das células das bactérias para microencapsulação..... 53
4.1.2	Preparo das microcápsulas de alginato-quitosana..... 53
4.1.2.1	Extrusão..... 53
4.1.2.2	Emulsificação..... 54
4.2	Caracterização das microcápsulas..... 54
4.3	Eficiência da encapsulação e viabilidade..... 54
4.4	Propriedades tecnológicas de células livres e microencapsuladas de <i>L. Rhamnosus</i> 55
4.4.1	Atividade proteolítica de <i>L. rhamnosus</i> 55
4.4.2	Atividade lipolítica de <i>L. rhamnosus</i> 55

4.4.3	Produção de diacetil por <i>L. rhamnosus</i>	56
4.4.4	Produção de exopolissacarídeo (EPS) por <i>L. Rhamnosus</i>	56
4.4.5	Tolerância a NaCl (<i>L. Rhamnosus e microcápsulas</i>)	56
4.4.6	Tolerância a tratamentos térmicos (<i>L. Rhamnosus e microcápsulas</i>).....	57
4.5	Propriedades de funcionalidades fisiológicas.....	57
4.5.1	Tolerância a diferentes valores do pH.....	57
4.5.2	Tolerância a diferentes concentrações de sais biliares.....	57
4.5.3	Ensaio de sobrevivências das células probióticas sob condições gastrointestinais simuladas.....	58
4.5.3.1	Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em suco gástrico simulado(SGS).....	58
4.5.3.2	Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em solução biliar simulada.....	58
4.5.3.3	Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em suco intestinal simulado (SIS).....	59
4.5.4	Ensaio de sobrevivências das células probióticas sob condições gastrointestinais simuladas	59
4.6	Viabilidade das cepas e estabilidade do leite em pó e UHT durante o armazenamento.....	61
4.7	Análise sensorial.....	61
4.8	Análise estatística.....	61
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
5.1	Caracterização das cápsulas.....	63
5.2	Eficiência da encapsulação e viabilidade.....	64
5.3	Propriedades tecnológicas de células livres e microencapsuladas de <i>L.</i> <i>Rhamnosus</i>	68
5.4	Propriedades de funcionalidades fisiológicas.....	73
5.5	Viabilidade e estabilidade das cápsulas aplicadas em leite em pó e UHT (vida	84
5.6	prateleira).....	90
6	Análise sensorial.....	
	Conclusão	
	REFERÊNCIAS	

APÊNDICES.....	93
	95
	112

Introdução

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, a população tem demonstrado maior preocupação com a saúde e a qualidade de vida, resultando em mudanças nos hábitos alimentares e no aumento do consumo de alimentos mais saudáveis (GOMES et al, 2007; OZEN; PONS; TUR, 2012), inclusive os que apresentam propriedades funcionais (HASLER, 2001; NIELSEN GLOBAL SERVICES, 2008).

No Brasil, a lista de alimentos com alegação de propriedade funcional inclui substâncias bioativas, como ácidos graxos, carotenoides, fibras alimentares, fitoesteróis, polióis, quitosana, proteína de soja, além de alguns micro-organismos (*Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis*, *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*) (ANVISA, 2016).

Os probióticos têm sido definidos como micro-organismos vivos que transitam no trato gastrointestinal, promovendo benefícios à saúde dos consumidores, quando consumidos em doses adequadas, melhorando o equilíbrio microbiano intestinal (FAO / WHO, 2002; KAILASAPATHY, 2006; Hill, 2014). Um micro-organismo é considerado probiótico se estiver presente normalmente no trato gastrointestinal e sobreviver à passagem pelo estômago mantendo a viabilidade e atividade no intestino (SAAD, 2006; COOK et al, 2012). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando, assim, em um aumento da resistência contra micro-organismos patogênicos (COOK et al, 2012); eficiência no tratamento de vários distúrbios intestinais (KUMAR et al, 2015); estimulação do sistema imunológico (CHEN et al, 2017; KUMAR et al, 2015); regulação da composição da microbiota intestinal (HARATA et al, 2017); inibição do crescimento do patógeno (PACHECO-ORDAZ et al, 2018); e, por fim, redução sérica do colesterol, alívio da intolerância à lactose e proteção completa contra a perda óssea induzida pela deficiência de estrogênio (LI et al, 2016).

Nas últimas décadas, a demanda do mercado por produtos probióticos aumentou significativamente, devido à crescente conscientização pública sobre a importância crucial da microbiota intestinal na saúde. As vendas globais de produtos probióticos alcançaram US\$ 24,23 bilhões, em 2011, e devem chegar a US \$ 44,9 bilhões até 2018, compreendendo entre 60 e 70% do mercado de alimentos funcionais (CHEN et al, 2017; PEDRETTI, 2013). Os probióticos vêm sendo incorporados em grande variedade de alimentos e bebidas que fazem

parte da dieta normal, como iogurtes, queijos, sorvetes, sucos, chocolates, cereais e produtos cárneos (ANAL; SINGH, 2007; MENEZES et al, 2013). Vários fatores, porém, afetam a sobrevivência e colonização dessas bactérias, tais como: temperatura, tempo, teor de oxigênio, condições de processamento, baixo pH, bile e enzimas digestivas (COOK et al, 2012). Existe, também, perda considerável na viabilidade do probiótico durante a fermentação, a preparação e o armazenamento, o que, inevitavelmente, reduz a real eficácia dos alimentos funcionais. Para melhorar a eficácia dos probióticos, a técnica de microencapsulação vem sendo introduzida, sendo realizada por aprisionamento das células microbianas em matriz polimérica (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2013;. DONG et al, 2013).

A microencapsulação consiste em um procedimento mecânico ou físico-químico, que imobiliza e ‘blinda’ os micro-organismos em um material encapsulante, originando partículas de diâmetro muito pequeno, variando de nanômetros a poucos milímetros. Tais métodos são capazes de manter sua estrutura, mesmo sob condições adversas do meio, sendo dissolvidas e liberando o material encapsulado no sítio de ação correspondente para exercer a função desejada. Sendo assim, constitui uma alternativa viável e segura para a preservação de ingredientes biologicamente ativos em sistemas alimentares, incluindo bactérias probióticas (CHANDRAMOULI et al, 2004; KAILASAPATHY; CHAMPAGNE, 2011; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003), não só durante o processamento ou armazenamento das matrizes alimentares, mas também durante o trânsito gastrointestinal, melhorando o fornecimento de estirpes probióticas no intestino grosso (SHORI, 2015; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Os probióticos encapsulados são retidos em uma matriz que deve ser reconhecida como segura (*GRAS-Generally Recognized As Safe*) e insolúvel, para garantir a sua integridade, tanto no alimento quanto na parte superior do trato gastrointestinal. Algumas matrizes encapsulantes podem ser destacadas, como alginato de cálcio e quitosana (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; NAZZARO et al, 2012).

O alginato de cálcio é a matriz mais utilizada para encapsular os probióticos, aumentando a sobrevivência de bactérias probióticas de 80 a 95% (Mandal, Puniya, & Singh, 2006), sendo também o preferido devido à sua simplicidade estrutural, à não toxicidade, à biocompatibilidade e ao baixo custo (CHAVARRI Et al, 2010; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). No entanto, há controvérsias sobre a resistência dessas micropartículas nas condições estomacais, pois o alginato apresenta baixa estabilidade em condições ácidas abaixo de pH 2,0 e também é afetado pela presença de agentes quelantes (COOK et al, 2012; DING; SHAH, 2009; MANDAL et al, 2006).

A quitosana é um polímero biodegradável, catiônico, obtido a partir da quitina, que é extraída do exoesqueleto de crustáceos, ou, ainda, pode ser encontrada na parede celular de alguns fungos (GEORGE; ABRAHAM, 2006). Apresenta biocompatibilidade, hipoalergenicidade e propriedades mucoadesivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras intestinais. Devido a essas propriedades, a quitosana tem sido bastante utilizada na microencapsulação, principalmente no revestimento das microcápsulas (AHN et al, 2002; KANMANI et al, 2011).

Quando são produzidas microcápsulas de alginato de cálcio revestidas com quitosana, as moléculas de quitosana e alginato sofrem uma complexação que reduz a porosidade das microcápsulas, diminuindo a perda do probiótico encapsulado para o meio externo, além de proporcionar estabilidade em vários níveis de pH. Desse modo, as microcápsulas de alginato-quitosana são consideradas alternativa promissora para administrar micro-organismos probióticos oralmente e conduzi-los em níveis desejados para o cólon, mantendo sua sobrevivência durante a passagem pelo trato gastrointestinal (CHÁVARRI et al, 2010; TRABELSI et al, 2013).

Apesar do mercado atual estar apresentando ampla variedade de produtos com alegação funcional probiótica, os produtos lácteos ainda são os mais comumente utilizados como veículos dessas bactérias. No entanto, vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados no leite líquido, incluindo concentrações de açúcares, proteínas e gorduras; valor de pH; concentração de oxigênio; temperatura de armazenamento; interação com outros micro-organismos contidos nos produtos; e a atividade de água (CASTRO-CISLAGHI et al, 2012). Devido a isso, outras matrizes alimentares vêm sendo exploradas para aumentar o consumo de alimentos contendo probióticos, podendo o leite em pó e UHT representarem uma boa alternativa de aplicação, por serem amplamente consumidos. Em 2015, o Brasil foi o segundo maior consumidor de leite em pó no mundo, perdendo apenas para a China. Além disso, esse produto é consumido por todas as faixas etárias, apresenta fácil acesso, boa aceitação e ótima qualidade nutricional, mostrando-se uma excelente matriz alimentar para a adição de probióticos microencapsulados com quitosana (MAPA, 2016).

Objetivos

2 OBJETIVOS

2.1 Obetivo geral

Aplicar *Lactobacillus Rhamnosus*, microencapsulado por dois métodos distintos (extrusão e emulsificação) com alginato de cálcio e quitosana, em leite em pó e UHT.

2.2 Objetivos específicos

- Caracterizar e avaliar a eficiência da encapsulação e viabilidade das cápsulas de alginato-quitosana por duas metodologias, extrusão e emulsificação;
- Selecionar a cepa que apresenta maior viabilidade e melhor estabilidade quando encapsulada;
- Avaliar as propriedades tecnológicas da cepa livre e encapsulada;
- Avaliar as propriedades fisiológicas da cepa livre e encapsulada, bem como o trato gastrointestinal (TGI) simulado *‘in vitro*;
- Fazer análise de vida de prateleira do leite em pó e UHT adicionados de *L. rhamnosus* microencapsulado com alginato-quitosana.
- Avaliar sensorialmente o leite em pó e UHT adicionados de probiótico microencapsulado com alginato-quitosana (teste de aceitação e intenção de compra).

Revisão da Literatura

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 PROBIÓTICOS

O conceito contemporâneo de alimentos funcionais refere-se aos alimentos ou nutrientes cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas no organismo, isoladas ou distintas daquelas associadas ao seu papel nutricional (FDA, 2004). As alegações de propriedade funcional descrevem o papel metabólico ou fisiológico que nutrientes ou outros constituintes (p. ex.: substâncias bioativas e micro-organismos, como os probióticos) possuem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano, além de apresentarem relação entre o alimento ou ingrediente com determinada doença ou condição relacionada à saúde (ANVISA 2016).

Os probióticos têm se destacado no comércio de alimentos funcionais e compreendem entre 60 e 70% de todo o mercado de alimentos funcionais (TRIPATHY; GIRI, 2014). De acordo com uma análise industrial a nível mundial, o mercado global de probióticos apresentou uma arrecadação de mais de 28,8 bilhões de dólares em 2015 (Global Industrial Analysis - Análise Industrial Global, 2013). O setor de laticínios foi pioneiro na introdução de probióticos em produtos lácteos, incluindo leite e queijo, fermentados e não fermentados. Esses produtos continuam a ser a forma mais popular de consumo de probióticos (SANCHEZ, et al, 2012). Atualmente, grande atenção tem sido dada em estender a categoria de alimentos que transportam probióticos, a fim de ampliar os grupos de pessoas com acesso a esses produtos. Devido, pois, à crescente demanda, os probióticos estão sendo incorporados em uma gama de produtos, tais como, bebidas, produtos de panificação, maionese, sopas de legumes, cereais, pastas de azeitona e até mesmo em alguns tipos de produtos cárneos (ALTAMIRANO-FORTOUL et al, 2012; TRUJILLO-DE SANTIAGO et al, 2012; ZANJANI et al, 2012; GAWKOWSKI; CHIKINDAS 2013; FAHIMDANESH et al, 2012; BARBOSA et al, 2012 , ALVES et al,2015).

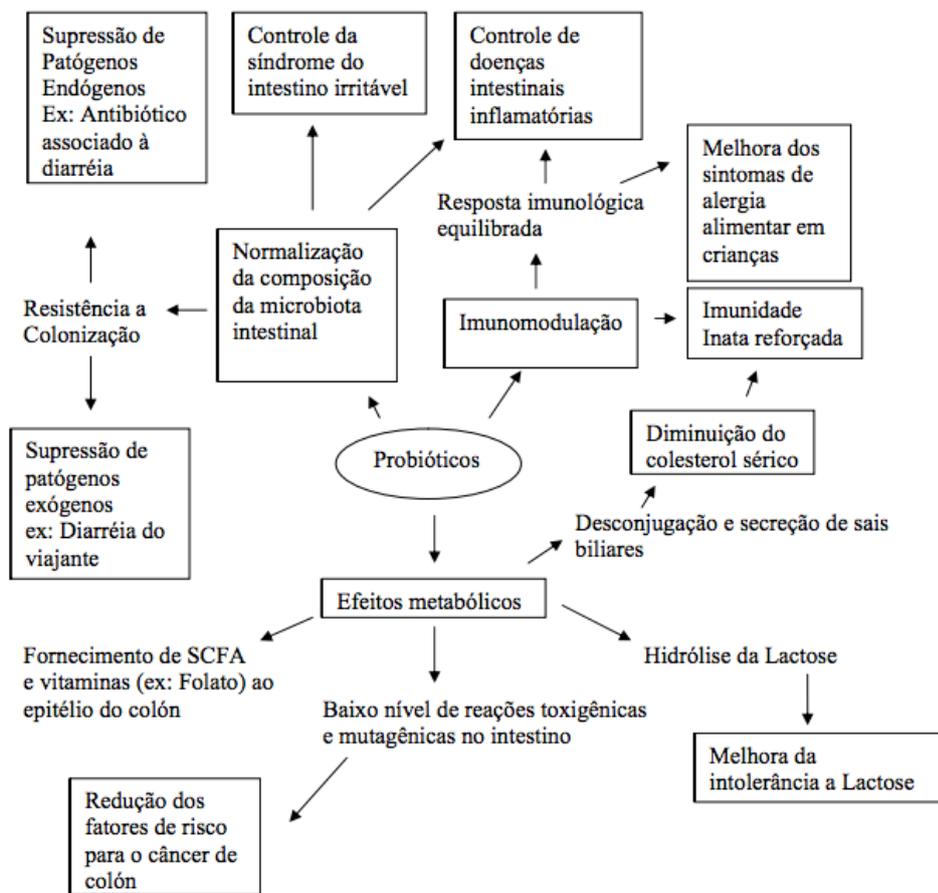
De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), probióticos têm sido definidos como micro-organismos vivos que transitam no trato gastrointestinal, promovendo benefícios à saúde dos consumidores, quando consumidos em doses adequadas. Para exercer os efeitos benéficos à saúde, os probióticos, além da necessidade de estarem viáveis no produto alimentício durante a vida de prateleira, precisam sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, superando as condições ácidas do estômago, os sais biliares e enzimas

pancreáticas no intestino, e, ainda, multiplicarem-se no intestino do hospedeiro (COOK et al, 2012; FAO / WHO, 2014; MARTÍN et al, 2015).

Diversos micro-organismos são utilizados e estudados como probióticos, porém apenas alguns possuem alegação de propriedade funcional aprovada pela ANVISA. São eles: *Lactobacillus acidophilus*; *Lactobacillus casei* variedades *shirota*, *rhamnosus* e *defensis*; *Lactobacillus paracasei*; *Lactobacillus lactis*; *Bifidobacterium bifidum*; *Bifidobacterium animalis*; *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium* (ANVISA, 2008).

Em 2008, a Anvisa estipulou que a recomendação para a ingestão dos produtos contendo probióticos deve ser baseada em uma porção diária de micro-organismos viáveis que devem ser ingeridos, sendo o mínimo estipulado de 10^6 - 10^9 UFC/g (ANVISA, 2008). Porém, em 2016, houve uma reformulação da legislação sobre alegação de propriedade funcional dos probióticos. Definiu-se que, para comprovação da segurança e eficácia do produto probiótico, devem ser apresentadas, no mínimo, as seguintes informações: caracterização do micro-organismo; estudos disponíveis na literatura que descrevam efeitos adversos observados com a cepa em questão; demonstração de eficácia (baseada em evidências científicas); viabilidade (laudo de análise que comprove a quantidade mínima viável do micro-organismo para exercer a propriedade funcional, no final do prazo de validade do produto e nas condições de uso, armazenamento e distribuição). Nessa nova definição, não ficou definida a dose mínima de micro-organismos que o produto deve apresentar, contanto que o produto seja comprovadamente probiótico (ANVISA, 2016). Outros autores relatam que, para alcançar o efeito benéfico desejado, os alimentos probióticos devem conter pelo menos 10^6 - 10^7 UFC/g de células viáveis no momento de seu consumo (TIAN et al, 2015; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os principais benefícios (Figura 1) relatados acerca dos probióticos são: equilíbrio da microflora intestinal, inibição do crescimento de bactérias patogênicas, alívio da constipação, estimulação do sistema imunitário (OELSCHLAEGER, 2010; TRIPATHI; GIRI, 2014), prevenção da obesidade (BORGERAAS et al, 2018), síntese de vitaminas e agentes antimicrobianos, melhora na absorção de cálcio, redução do nível de colesterol sérico e da pressão arterial (LI et al, 2016), redução da incidência de urogenital e doenças respiratórias (DE PRISCO; MAURIELLO^[1]_{SFP}, 2016; KHANI et al, 2012), tratamento da intolerância à lactose (PINTO et al, 2015) e prevenção do câncer de cólon (KUMAR et al, 2015).



Fonte: Nutr Clin Pract. 2009; 24:10-14

Figura 1. Principais ações dos probióticos

Os probióticos também promovem a fermentação do carboidrato não digerido no trato gastrointestinal ou resistentes à digestão, além de ajudarem a converter as fibras da dieta e produzir ácidos graxos de cadeia curta (AGCC - butirato, propionato, acetato e lactato) como metabólitos (DUNCAN et al, 2007; MAHADZIR et al, 2017). É reconhecido que os AGCC exercem papel fundamental na fisiologia normal do cólon, constituindo-se a principal fonte de energia para os enterócitos e colonócitos, estimulando a proliferação celular do epitélio, o fluxo sanguíneo visceral e intensificando a absorção de sódio e água, ajudando a reduzir a carga osmótica de carboidrato acumulado (MATHAI, 2002). Atualmente, estudos sugerem que há efeitos sistêmicos de AGCC produzidos por probióticos no hospedeiro, incluindo melhor regulação dos níveis de glicose no sangue, modulação da saciedade e do apetite através da ligação entre os hormônios do intestino e o metabolismo e armazenamento da gordura (SALAZAR et al, 2015).

Além disso, esses micro-organismos podem atenuar ou prevenir o processo infeccioso

em determinados sítios anatômicos, como o intestino, agindo diretamente sobre determinado enteropatógeno. Esse mecanismo incluiria a competição por receptores no tecido alvo ou através da produção de substâncias com atividade antimicrobianas (bacteriocinas) (OHLAND; MACNAUGHTON, 2010). As nisinas, pediocinas, lacticinas, lactococinas, leuconocinas, plantaricinas, enterocinas e carnobacteriocinas são bacteriocinas e podem ser produzidas tanto por bactérias Gram-positivas como por Gram-negativas, diferindo em tamanho, alvo microbiano, modo de ação, liberação e mecanismos de imunidade (OGAKI et al, 2015). Essas bacteriocinas são peptídeos pequenos, termoestáveis e de espectro antibacteriano, podendo inibir o crescimento de bactérias patogênicas Gram-positivas, leveduras e algumas espécies de bactérias Gram-negativas (DHEWA, 2012). Os efeitos inibitórios contra bactérias patogênicas resultam da ação desses peptídeos antimicrobianos na permeabilização da membrana, na inibição da síntese de parede celular ou na inibição da atividade de DNA girase e RNA polimerase da célula-alvo. As bacteriocinas também são de grande interesse clínico e farmacêutico, pois atuam como alternativa aos antibióticos convencionais no tratamento de doenças associadas a patógenos microbianos, como, por exemplo, *Escherichia coli* enterotoxigênica e *Campylobacter jejuni* (YANG et al, 2014).

Entre os probióticos, destacam-se os lactobacilos, que são bactérias gram-positivas e anaeróbicas facultativas, predominantes no intestino delgado. Das suas espécies, podem-se citar os *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*. Os lactobacilos inibem a proliferação de micro-organismos não benéficos, pela competição com locais de ligação e nutrientes, e produzem ácidos orgânicos, que reduzem o pH intestinal, retardando o crescimento de bactérias patogênicas (OMGE, 2012).

3.1.1 *Lactobacillus rhamnosus*

Lactobacillus rhamnosus é uma bactéria Gram-positiva, heteroláctica, não formadora de esporos, anaeróbia facultativa ou microaerófila, não móvel e catalase-negativa, pertencente ao grupo dos micro-organismos mesófilos, com algumas cepas capazes de crescerem em temperaturas inferiores a 15°C ou superiores a 40°C. O desenvolvimento dessas bactérias requer uma grande quantidade de vitaminas e minerais, incluindo ácido fólico, riboflavina, niacina, ácido pantotênico e cálcio mineral. A faixa de pH ótimo para seu desenvolvimento está entre 4,5 e 6,4. A dimensão das células em forma de bastonete é de 0,8-1,0 µm de largura e de 2,0 a 4,0 µm de comprimento (CURRY; CROWN, 2004).

A cepa de origem entérica possui capacidade de inibir a adesão de *Clostridium*

histolyticum, *C. difficile* e *Salmonella enterica* e possui uma alta tolerância às condições ácidas do estômago, sobrevivendo à passagem intestinal, com capacidade de aderir à mucosa e colonizar o trato gastro-intestinal (TGI). Devido à sua reconhecida atividade probiótica e antimicrobiana, *L. rhamnosus* é utilizado na indústria alimentar não só como probiótico, mas também como uma cultura de proteção para produtos lácteos, bebidas, entre outros (RODGERS, 2001; TUOMOLA et al, 2000).

Alguns autores demonstraram que essa cepa apresenta benefícios no sistema imunológico. Avaliando-se proteínas do leite hidrolisadas por *L. rhamnosus*, demonstrou-se que tais bactérias apresentaram efeitos de estímulo e supressão na proliferação de linfócitos, além de induzir o aumento de citocinas anti-inflamatórias e reduzir, de modo paralelo, citocinas pró-inflamatórias e imunoglobulinas produzidas por linfócitos, controlando assim reações alérgicas e inflamatórias de modo sistêmico (DELCENSERIE et al, 2008).

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO

A tecnologia de microencapsulação representa uma alternativa viável e segura para a preservação de ingredientes biologicamente ativos em sistemas alimentares, incluindo bactérias probióticas (CHANDRAMOULI et al, 2004; KAILASAPATHY; CHAMPAGNE, 2011; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003), não só durante processamento ou armazenamento das matrizes alimentares, mas também durante o trânsito gastrointestinal, melhorando o fornecimento de estirpes probióticas no intestino grosso (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; SHORI, 2015). Os probióticos encapsulados são retidos numa matriz que deve ser geralmente reconhecida como segura (GRAS) e insolúvel, para garantir a sua integridade, tanto no alimento, quanto no TGI superior (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; NAZZARO et al, 2012).

Muitas tecnologias de encapsulação vêm sendo relatadas na literatura, tais como: tecnologia de extrusão/gelificação iônica (MENEZES et al, 2015); coacervação complexa (SILVA et al, 2015); *spray freeze drying* (RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015); *spray drying* (NUNES et al, 2015; ANEKELLA; ORSAT, 2013); *freeze drying* (HOLKEM et al, 2016); emulsificação/gelificação iônica interna (HOLKEM et al, 2015); tecnologia de vibração (PRISCO et al, 2015); *electrospraying* (COGHETTO^[L]_[SÉP] et al, 2016; GOMEZ-MASCARAQUE, 2016;).

A microencapsulação consiste no aprisionamento de pequenas partículas dentro de um material secundário (matriz ou reservatório), formando pequenas cápsulas (AUGUSTIN;

HEMAR, 2009). Atualmente, técnicas de encapsulação vêm sendo muito empregadas na indústria de alimentos com o intuito de proteger compostos bioativos, atuar no controle de reações oxidantes, mascarar sabor e aroma provenientes da produção de diferentes compostos metabólicos, a exemplo de ácido acético, produzidos durante a fermentação em alimentos onde não são requeridos, além de promover a liberação controlada do composto, prolongando a vida de prateleira do produto.

Entre os compostos bioativos e funcionais mais comumente encapsulados, os probióticos têm recebido maior atenção (BURGAIN et al, 2011). Porém, as bactérias probióticas apresentam baixa viabilidade em certas condições do meio externo ou interno (do organismo humano), sendo um desafio da microencapsulação proteger e aumentar essa viabilidade em alimentos que não são considerados matrizes ideais (baixa atividade de água e exposição ao oxigênio) para aplicação de culturas probióticas, como produtos cárneos e de panificação ou até mesmo produtos sólidos (MALMO; LA STORIA; MAURIELLO, 2013; WEINBRECK; BODNAR; MARCO, 2010).

Várias tecnologias podem ser aplicadas para a encapsulação de probiótico, e cada uma delas proporciona microcápsulas com características diferentes, em termos de tamanho das partículas e do tipo de cápsula. A seleção de materiais da microcápsula, bem como as metodologias empregadas na sua produção, são de suma importância, pois refletem rigorosamente as propriedades morfológicas e funcionais finais das cápsulas. Os materiais encapsulantes também desempenham um papel importante na determinação do tamanho, textura, porosidade e outras propriedades relevantes das cápsulas que influenciam o sucesso na proteção ou no direcionamento do fornecimento de probióticos (DE PRISCO, 2016).

Entre as várias metodologias de encapsulação utilizadas, destacam-se extrusão e emulsificação, por serem de baixo custo e fácil execução, além de apresentarem cápsulas em tamanhos aceitáveis para uso em alimentos, e, por diversos estudos, terem mostrado alta eficácia de encapsulação (TABELA 1). Alguns autores testaram várias espécies de *Lactobacillus* e, pela utilização da metodologia de emulsificação e matriz encapsulante de alginato de sódio, alcançaram uma eficácia de encapsulação de quase 100% e diâmetro médio das cápsulas de 53.64 μm (SANCHEZ et al, 2017). Outros autores obtiveram resultados semelhantes utilizando a mesma metodologia, com uma eficácia de $95.28 \pm 2.31\%$ e diâmetro de $118.1 \pm 6.7 \mu\text{m}$, utilizando *L. bulgaricus* como bactéria probiótica, e Whey protein e alginato de sódio como material de revestimento das cápsulas (CHEN et al, 2017). Estudo similar também apresentou alta eficácia de encapsulação (aproximadamente 90%) frente a *B. animalis*

utilizando a mesma técnica e alginato de sódio como matriz encapsulante (HOLKEN et al, 2016).

As demais técnicas apresentadas na tabela 1 também se mostraram eficientes, porém a maioria delas apresenta alto custo para produção das cápsulas, o que torna menos viável para uso em escala industrial de produção de alimentos. Na escolha do método adequado, todos os aspectos devem ser considerados, desde o tamanho das cápsulas até a sua eficácia de encapsulação e sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal. Não existe um padrão de eficiência dos métodos, pois há muita variação de acordo com o material encapsulante, micro-organismos utilizados, matriz alimentar utilizada, temperatura de cada método e resistência das bactérias e do material encapsulante.

TABELA 1: Técnicas de microencapsulação

MÉTODO	MICRO-ORGANISMOS	MATERIAL ENCAPSULANTE	TAMANHO DAS CÁPSULAS	EFICÁCIA DA ENCAPSULAÇÃO	CONSIDERAÇÕES	AUTORES
Emulsificação/ Gelificação iônica interna	<i>L.bulgaricus</i>	Proteína Whey isolada (WPI) e alginato de sódio	118.1 ± 6.7 µm	95.28 ± 2.31%	A alta eficiência de encapsulação obtida mostrou que o processo de encapsulação foi suave e os materiais da parede foram compatíveis com a cepa probiótica. As microcápsulas permaneceram intactas durante todo o tratamento do suco gástrico simulado. Mas no suco intestinal simulado, as microcápsulas WPI revestidas com alginato ainda se desintegravam rapidamente, devido à instabilidade do revestimento de alginato em ambiente alcalino e subsequente hidrólise pela tripsina.	Chen et al, 2017

Emulsificação/ Gelificação iônica interna	<i>Lactobacillus</i> spp.	Alginato de sódio	53.64 µm	100%	Microcápsulas conferiram proteção a bactérias probióticas em ambiente ácido com uma sobrevivência de 5 log UFC / g no final do ensaio em comparação com bactérias não encapsuladas cuja viabilidade diminuiu para 0 log UFC / g após 60 min.	Sanchez et al,2017
Emulsificação/ Gelificação iônica interna seguida de liofilização	<i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	Alginato de sódio	77.84 ± 0.54 µm	89.71 ± 9.50%.	O processo de microencapsulação em microcápsulas de alginato mostrou que o processo de encapsulação foi eficiente na proteção dos probióticos em sua passagem por fluidos gastrointestinais simulados e sob condições ácidas. As partículas também foram estáveis durante o armazenamento a 7 ° C e 18 ° C por 120 dias e à temperatura	Holkem et al, 2016

					ambiente (25 ° C) por até 60 dias de armazenamento.	
Spray drying	<i>B. animalis spp. Lactis</i>	Inulina e oligofrutose de maltodextrina)	6.23-9.13 µm	Contagens de células acima de 6.0 log UFC/g	Testes adicionais são necessários para avaliar a estabilidade dessas microcápsulas no armazenamento, como a avaliação da sobrevivência dos probióticos ao longo do tempo em diferentes condições de armazenamento.	Paim et al, 2016
Spray chilling	<i>Lactobacillus acidophilus (LA)</i> e <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis (BL)</i>	Gordura vegetal	Para microcápsulas de BL e LA, 85.9 ± 0.08 µm e 60.9 ± 0.09 µm, respectivamente	O BL encapsulado apresentou contagens superiores a 10 ⁸ UFC / g por 105 dias de armazenamento refrigerado. O LA manteve a mesma contagem por 90 dias.	Os micro-organismos foram altamente resistentes ao processo de spray chilling, pois a viabilidade celular deles não foi afetada.	Bampi et al, 2016
Spray freeze drying	<i>L. plantarum</i>	Proteína Whey isolada; alginate de sódio, and fructooligosacarideo	Diâmetro médio 344.50-381.00 µm	87.92-94.86%	O efeito combinado da pressão do ar de atomização e do mecanismo de congelamento diminuiu ligeiramente a sobrevivência da célula em comparação	Rajam & Anandharamkrishnan, 2015

					com a liofilização, mas as microcápsulas exibiram boa eficiência de encapsulação e melhor estabilidade das células encapsuladas durante o armazenamento do que usando apenas o método de liofilização	
<i>Electrospraying</i>	<i>L. plantarum</i>	Alginato de sódio	Diâmetro médio 109-116 µm	Contagem de células de 10 ⁶ -10 ⁸ UFC/g	Os probióticos mostraram resistência significativa aos sucos gástrico e intestinal simulados e durante o armazenamento a 4 ° C por 21 dias.	Coghetto et al, 2016
Extrusão	<i>L. casei</i>	Alginato de sódio (A), Pectina (P), mistura de diferentes proporções de A e P	710-970 µm	Células encapsuladas na relação A-P 1:6 mostraram 85% de sobrevivência celular	A relação A-P 1: 6 forneceu as melhores propriedades para proteger as células durante o armazenamento em matriz de iogurte e na simulação do TGI.	Sandoval-Castilla et al, 2010
Coacervação complexa	<i>L. acidophilus</i>	Pectina e proteína Whey	253±23 µm	Houve redução de apenas 0.2 log	A presença de cápsulas probióticas não afetou	Ribeiro et al, 2014

					negativamente os parâmetros físico-químicos do iogurte. A matriz pectin-whey foi eficaz em proteger as células durante a digestão simulada do iogurte.	
Tecnologia de vibração	<i>L. reuteri</i>	Alginato de sódio e alginato-quitosana	110 ± 5 µm	92-99%	A coencapsulação do probiótico na matriz quitosana-alginato melhorou a sobrevivência do probiótico. O estudo mostra que esta tecnologia pode produzir microcápsulas probióticas estáveis com características dimensionais e morfológicas adequadas para aplicações em matrizes alimentares.	De Prisco et al, 2015

3.2.1 Extrusão/Gelificação iônica externa

Entre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada para a obtenção de micropartículas de alginato de cálcio (PEDROSO, 2011; DE PRISCO et al, 2015; RIBEIRO et al, 2014). O método físico baseia-se na gelificação externa e consiste em incorporar o material a encapsular numa solução de alginato de sódio, para, depois, a mistura sofrer extrusão gota a gota, através de uma pipeta de calibre reduzido ou de uma seringa, para uma solução de cloreto de cálcio (CaCl_2) (SMRDEL et al, 2008). A não utilização de solventes orgânicos para a produção de microcápsulas torna a técnica de extrusão promissora, especialmente para a encapsulação de fármacos, células vivas imobilizadas (probióticos) e para inclusão de compostos de interesse em alimentos (PATIL et al, 2010).

Utilizando-se um polissacarídeo em presença de cálcio e outros íons divalentes, é desencadeado um processo de ligação cruzada, havendo troca do íon de sua estrutura por um íon divalente, ocasionando gelificação do meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o íon Mg^{2+} não induzem essa gelificação. Íons como Pb^{2+} , Cu^{2+} , Cd^{2+} , Co^{2+} , Ni^{2+} , Zn^{2+} e Mn^{2+} possuem uso limitado, por apresentarem certa toxicidade (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). O alginato de sódio gelifica, após ligação dos íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato, formando uma rede tridimensional, constituindo o modelo da “caixa de ovos”, com alta estabilidade (GOMBOTZ; WEE, 1998).

Partículas produzidas por extrusão normalmente apresentam diâmetros que podem variar de 500 μm a 3 mm (BUREY et al, 2008; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003) sendo o tamanho das partículas formadas dependente do tamanho do diâmetro da agulha usada para gotejar a solução, da viscosidade e concentração da solução de alginato, e ainda da distância entre a seringa e a solução de cloreto de cálcio (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). Para aplicações em alimentos, o diâmetro médio das microcápsulas é uma das características mais importantes, devendo essas partículas serem suficientemente pequenas (com tamanho desejável de aproximadamente 100 μm) para evitar impacto sensorial negativo, o que torna uma limitação do método para aplicação das cápsulas em alimentos (COSTA et al, 2015; HEIDEBACH et al, 2009).

Outra limitação da utilização de cápsulas produzidas com polissacarídeos pela

técnica de extrusão é a formação de poros na superfície, tornando-as sensíveis às condições ácidas do meio (MORTAZAVIAN et al, 2007). Para suprir esse problema, alguns pesquisadores têm recoberto as cápsulas combinando esse polissacarídeo com outros compostos poliméricos, a fim de garantir maior efeito protetor aos micro-organismos (CHÁVARRI et al, 2010). Autores encapsularam *L. acidophilus* e *L. casei* pela técnica de extrusão em cápsulas de alginato revestidas com quitosana. As cápsulas foram adicionadas em iogurte e sumo de fruta e mantiveram viabilidade satisfatória durante armazenamento refrigerado durante 4 semanas (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014).

Outros autores encapsularam *L. acidophilus* por combinação das técnicas de gelificação iônica interna e extrusão com recobrimento de pectina e proteínas do soro do leite. Os autores concluíram que a técnica protegeu os micro-organismos durante o armazenamento, quando esses foram aplicados em iogurte, conferindo menor acidificação e fornecendo um produto com uma boa impressão global (RIBEIRO et al, 2014).

3.2.2 Emulsificação/ Gelificação iônica interna

A técnica de encapsulação denominada emulsificação ou gelificação iônica interna tem sido aplicada com sucesso na microencapsulação de bactérias probióticas (DOLEYRES; LACROIX, 2005). Nesse método, as cápsulas são formadas a partir de duas etapas: (A) dispersão de uma fase aquosa, contendo as células bacterianas; (B) suspensão polimérica dentro de uma fase orgânica, como óleo, resultando em uma emulsão de água em óleo e a solidificação das cápsulas por um agente geleificante. Uma das vantagens desse método é a formação de cápsulas de pequenos diâmetros, além de ser facilmente aplicado em grande escala. O óleo residual nas cápsulas, no entanto, pode não ser adequado para a aplicação em produtos alimentares com baixo teor de gordura (MORTAZAVIAN et al, 2007).

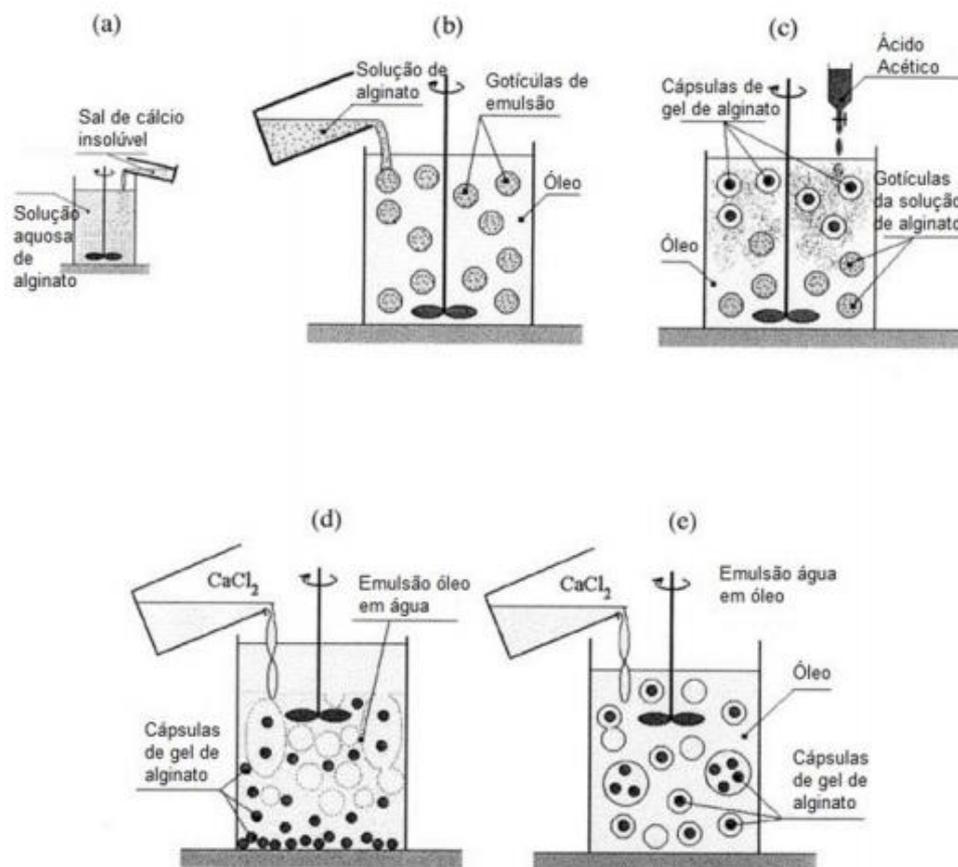


Figura 2. Diferentes estágios de preparação de cápsulas de alginato pelo método de gelificação iônica interna (Adaptado de PONCELET et al, 1999)

Essa técnica de emulsificação adiciona um pequeno volume de uma suspensão hidrocoloide contendo micro-organismos (fase descontínua) a um grande volume de óleo vegetal (fase contínua). A mistura é homogeneizada para formar emulsões de água em óleo utilizando-se um emulsificante. Uma vez formada a emulsão, pode ser insolubilizada para formar cápsulas de gel na fase oleosa (HEIDEBACH et al, 2012).

No preparo das microcápsulas pelo método de emulsificação/gelificação interna, é necessário o conhecimento da concentração de alginato, velocidade de rotação da emulsão e concentração de emulsificante (AHMED et al, 2013). A natureza e a concentração desses fatores influenciam a distribuição e tamanho da partícula e, conseqüentemente, a viabilidade do micro-organismo em estudo (MARTIN et al, 2013).

A principal limitação desse método é o fato de proporcionar cápsulas com tamanhos e formas variados (BURGAIN et al, 2011). O tamanho das cápsulas pode ser ajustado pela velocidade de agitação, podendo esse variar entre 25 μm e 2 mm. Mesmo havendo

essa variação de tamanho das cápsulas, elas ainda apresentam-se bem menores que as formadas pelo método de extrusão, tornando esse método mais viável para uso em alimentos. Para diminuir ainda mais o tamanho das partículas, podem ser adicionados emulsionantes a fim de formar uma emulsão com melhor dispersão, visto que esses agentes diminuem a tensão superficial, resultando em partículas menores (KRASAEKOOPT et al, 2003).

Alguns estudos indicam que a eficiência de encapsulação mostra-se elevada na técnica de emulsificação/gelificação interna. A levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* foi encapsulada em microcápsulas de alginato de cálcio preparadas pelo método de emulsificação, utilizando-se inulina e mucilagem como materiais de revestimento. As células encapsuladas apresentaram eficiência de encapsulação superior a 70% ao longo de 35 dias de armazenamento (ZAMORA-VEGA et al, 2012). Em outro estudo, os autores encapsularam culturas probióticas de *B. bifidum* e *L. acidophilus* por emulsificação e relataram alta viabilidade durante os 90 dias de armazenamento (ÖZER et al, 2008). Takei et al (2008), microencapsularam *S. cerevisiae* pelo mesmo método e obtiveram eficiência de encapsulação superior a 50%.

Em estudo semelhante, *L. casei* e *B. lactis* foram microencapsulados com amido resistente por emulsificação, tendo seus autores concluído que ocorreu uma redução próxima de 1 log, quando as bactérias foram armazenadas por 180 dias a uma temperatura de -20°C (HOMAYOUNI et al, 2008). Zou et al (2011), produziram microcápsulas de alginato contendo *B. bifidum* preparada por esse mesmo método, reforçadas por mistura com amido, pectina e revestimento com quitosana ou poli-L-lisina para proporcionar uma proteção adicional para os micro-organismos, obtendo uma eficiência de encapsulação de 43-50%.

Comparada com extrusão, a emulsificação é o método mais viável quanto ao controle do tamanho de partículas e produção em larga escala (HOESLI et al, 2011; KRASAEKOOPT; BHANDAR; DEETH, 2003). Outro benefício desse método é que o problema da aglomeração das micropartículas não ocorre como encontrado na técnica de extrusão, devido à liberação lenta dos íons Ca^{+2} a partir de fontes de cálcio insolúveis ao invés da adição de cloreto de cálcio solúvel diretamente. Portanto, a técnica de emulsificação produz microcápsulas menores e mais uniformes, ideais para encapsulação de compostos de alto peso molecular (PONCELET et al, 1999).

Normalmente, utilizam-se como material de encapsulação de micro-organismos probióticos, polissacarídeos de diferentes origens, como algas marinhas (alginato e k-carragena), plantas (amido e seus derivados, goma arábica), animais (quitosana) ou bactérias (goma xantana, gelana) e proteínas animais (caseína, gelatina). Na microencapsulação de probióticos, aplicam-se principalmente polissacarídeos como matriz encapsulante, pois esses apresentam degradação favorecida por micro-organismos da microbiota intestinal. Além disso, oferecerem proteção a nível do TGI superior, permitindo obter-se uma liberação dos micro-organismos no órgão alvo (DEVOS et al, 2010).

3.3 REVESTIMENTO DE MICROCÁPSULAS

3.3.1. Alginato

Alginato é um polímero aniônico, extraído de algas marrons, que tem sido amplamente utilizado para a imobilização de probióticos devido à sua natureza atóxica, biodisponibilidade, biocompatibilidade, e por ser de baixo custo e fácil preparo (MOKARRAM et al, 2009; KRASAEKOOPT et al, 2003). Esse polímero é constituído de ácidos β -D-manurónico e α -L-gulurónico, As várias quantidades e distribuição sequencial de ácidos β -D-manurónico e α -L-gulurónico em cadeia podem afetar as propriedades funcionais de alginato como um material de apoio (BURGAIN et al, 2011; COMAPOSADA et al, 2015).

Algumas vantagens no uso desse polissacarídeo como agente encapsulante são atribuídas a certas propriedades, como: (1) não é reativo com o material a ser encapsulado (probióticos); (2) forma matrizes delicadas com cloreto de cálcio para aprisionar os micro-organismos dentro da estrutura da cápsula; (3) não afeta a viabilidade das bactérias durante a vida de prateleira; (4) é liberado completamente no sítio de ação. Além de apresentar baixo custo e fácil obtenção, é atóxico e biodegradável, sendo amplamente utilizado como material encapsulante por não necessitar de solventes orgânicos e altas temperaturas para a formação das partículas (FUJIWARA et al, 2010). Quando utilizado como material de parede na microencapsulação, a viscosidade e a concentração da solução de alginato empregadas estão diretamente relacionadas com o tamanho das micropartículas, visto que, em baixas concentrações, ocorre a redução do tamanho das partículas. Entretanto,

concentrações reduzidas diminuem também a resistência mecânica e a estabilidade das micropartículas em condições gastrointestinais (MARFIL, 2014).

As principais limitações desses polímeros são, por exemplo, sensibilidade a matrizes ou soluções de baixo pH, pois perdem a estabilidade mecânica nessas condições. Além disso, o gel de alginato é formado na presença de íons de cálcio, assim, a sua integridade é deteriorada quando sujeita a íons monovalentes ou quelantes (fosfatos, lactatos e citratos), pois esses desestabilizam o gel formado. As limitações mencionadas podem ser minimizadas através da mistura de alginato com outros polímeros (KRASAEKOOPT et al, 2003; LORENZ et al, 2009).

O alginato de cálcio apresenta instabilidade diante de fosfatos e citratos, o que acaba por se tornar vantagem para liberação e enumeração de células das microcápsulas, uma vez que esses compostos apresentam alta afinidade por Ca^{2+} , sequestram os íons das ligações cruzadas e, conseqüentemente, desestabilizam o gel e liberam as células no meio (SMIDSROD; SKJAK-BREAK, 1990). A técnica de microencapsulação com alginato de cálcio tem grande potencial para aplicação em culturas probióticas, uma vez que aumenta a viabilidade do probiótico em aproximadamente 80% (AMINE et al, 2014). Autores estudaram a viabilidade de bactérias probióticas em seis tipos de polímeros a fim de determinar a eficácia dos materiais para imobilização dos micro-organismos. Os mesmos encontraram resultados positivos de sobrevivência para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 em alginato de sódio (2 - 4%) (RODRIGUES et al, 2011). Grosso; Favaro-Trindade (2004) avaliaram a estabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis*, imobilizada com alginato de cálcio, aplicada em iogurte (pH 4,2). Os referidos autores observaram gradual declínio da viabilidade da linhagem probiótica durante o armazenamento refrigerado. Também nesse estudo foi avaliada a estabilidade de *B. lactis* em leite acidificado com ácido láctico (pH 6,4; 5,0; 4,4 e 3,8) e a concentração de células foi apenas levemente afetada durante o armazenamento, chegando em 28 dias com contagens superiores a $6,0 \log \text{UFC mL}^{-1}$ para todas as faixas de pH.

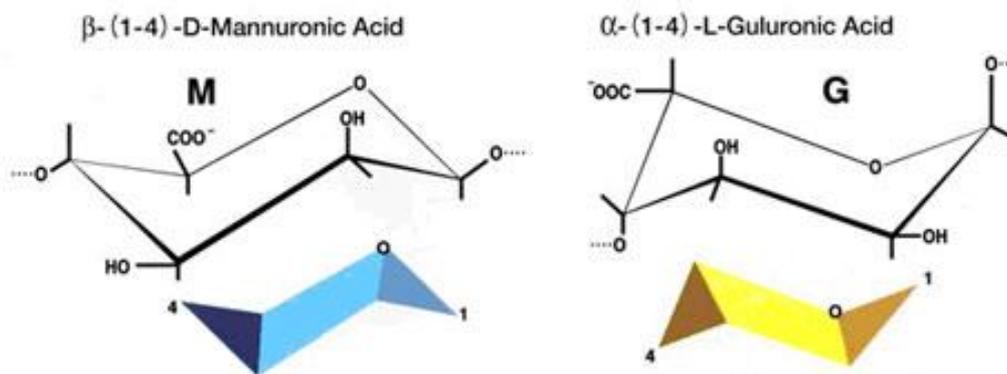


Figura 3. Estrutura química do alginato

Fonte: <http://www.iroalginat.com/sp/alginate.htm>

3.3.2 Quitosana

Os polímeros naturais apresentam ampla aplicabilidade em diversas áreas de estudo devido a sua fácil obtenção e as suas propriedades, tais como, biocompatibilidade e biodegradabilidade (AZEVEDO et. al, 2007). A quitosana é um polímero natural biodegradável obtido pelo processo de desacetilação da quitina, sua estrutura (Figura 3) é linear, com unidades de 2-amino2-desoxi-D-glicose, através de ligações glicosídicas β -1,4. No processo de desacetilação, os grupamentos acetoamido ($-\text{NHCOCH}_3$) da quitina são transformados em vários grupos aminos ($-\text{NH}_2$) de graus variados, originando a quitosana. A quitina é encontrada principalmente no exoesqueleto de crustáceos, moluscos, insetos e na parede celular de fungos (JORGE, 2010; LUVIELMO, 2013; OLIVEIRA, 2015).

A quitosana destaca-se por ser pouco solúvel em água, sendo sua diluição, em soluções aquosas, realizada mediante a presença de ácidos orgânicos e inorgânicos. Entre as características biológicas e físicas, encontram-se: exibir alta bioatividade, permeabilidade seletiva, ação polieletrólítica, atividade antimicrobiana, habilidade em formar gel e filme, habilidade de quelação, capacidade adsortiva, ser biodegradável, biocompatível e apresentar baixa toxicidade ao ser humano e animais (AHMAD et al, 2017; OLIVEIRA et al, 2015; DASH et al, 2011). Com relação a propriedades físico-químicas, a quitosana é afetada por vários fatores, tais como: grau de acetilação, peso molecular, cristalinidade, degradação, etc. (GHOSH; ALI, 2012)

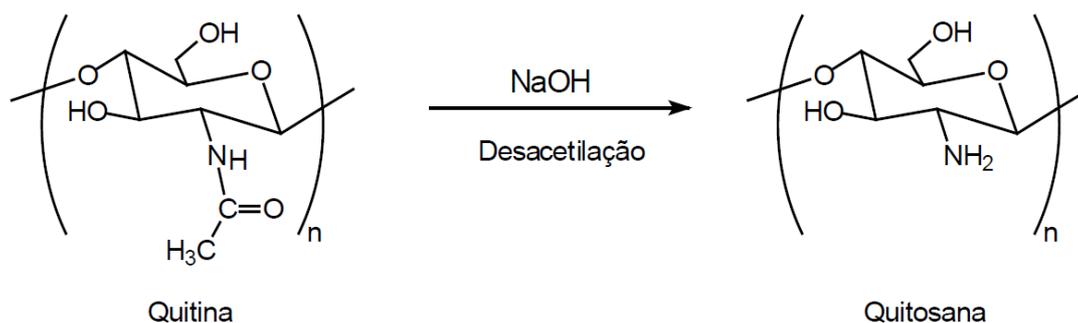


Figura 4. Desacetilação da quitina em quitosana

A toxicidade da quitosana mostra-se menor do que a glicose ou sacarose, visto que a dose letal de glicose em mamíferos é da ordem de 8 a 12 gramas por Kg de peso corporal, enquanto, para a quitosana, 18 gramas por Kg de peso corporal não apresenta qualquer sinal de toxicidade ou mortalidade (BORDERÍAS; ALONZO; MATEO, 2005). Estudos indicam que a quitosana é benéfica e segura para o consumo humano, entretanto, como qualquer outra substância, se utilizada de forma inadequada ou em excesso, pode ser nociva ao organismo (QIN; LI; XIAO, 2006). Os problemas referidos, decorrentes de doses excessivas da quitosana, foram desidratação gástrica e impacto, em decorrência do aumento do seu volume, uma vez que a quitosana consiste em uma fibra natural que, em meio ácido, expande-se para formar um gel no estômago (COSTA; SANTOS; FERREIRA, 2006). A quitosana é biodegradada pela enzima lisozima, gerando compostos aminados atóxicos, não imunogênicos e não carcinogênicos, que são completamente eliminados pelo organismo (BALDRICK, 2009; KEAN; THANOU, 2010).

Apesar da sua procedência a partir de carapaça de crustáceos, a relação com alergias alimentares ainda não está clara. Ressalta-se que, uma vez que a quitosana passa por um processo de purificação, o polímero obtido não é mais considerado um resíduo de camarão, pois os procedimentos para a sua obtenção retiram as proteínas, lipídeos e outros contaminantes da matéria bruta, reduzindo ou extinguindo seu potencial alergênico (MUZZARELLI, 2010).

No caso de utilizar quitosana como matriz encapsulante, as células microbianas aprisionadas podem ser liberadas excessivamente durante a fermentação (na presença de ácido láctico) e causar redução da carga inicial para a fermentação seguinte. Portanto, é preferencialmente utilizada como revestimento e não como microcápsulas. Cápsulas revestidas não só vão prevenir liberação das células, mas também aumentam

a sua estabilidade mecânica e química (KRASAEKOOPT et al, 2003). Revestimento de microcápsulas com quitosana promovem proteção das células em soluções de sais biliares, visto que uma reação de troca iônica acontece quando as microcápsulas absorvem os sais biliares formando um complexo insolúvel entre ambos, o que impede a difusão de sais biliares para o interior, ajudando na proteção das células microbianas (KRASAEKOOPT et al, 2004).

3.3.3 Microcápsulas de alginato-quitosana

Diferentes agentes encapsulantes têm sido utilizados, sozinhos ou em conjunto, para microencapsular culturas probióticas, tais como alginato (GBASSI et al, 2009), goma arábica (RODRÍGUEZ-HUEZO et al, 2007), goma gelana (NAG; HAN; SINGH, 2011), quitosana (CHÁVARRI et al, 2010), maltodextrina (SEMYONOV et al, 2010), amido (YING et al, 2013), derivados do leite, como proteínas (caseínas e proteínas do soro), leite em pó desnatado e soro de leite (CASTRO-CISLAGHI et al, 2012; DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2013), prebióticos (inulina, oligofrutose, polidextrose) (OKURO et al, 2013). A disponibilidade, baixo custo e biocompatibilidade desses agentes encapsulantes também são requisitos relevantes para aplicação em matrizes alimentares (DE PRISCO, 2016).

Estudos relatam que as microcápsulas de alginato de cálcio revestidas de quitosana apresentam melhor estabilidade química, mecânica e quando estão na presença de alguns agentes quelantes; e proporcionam maior viabilidade dos organismos probióticos em ambientes hostis, como o suco gástrico, quando comparados às células livres desses micro-organismos (CHANDRAMOULI et al, 2004; CHAVARRI et al, 2010; HANSEN et al, 2002; JIANG et al, 2014; KAILASAPATHY, 2002; KRASAEKOOPT et al, 2006; KRASAEKOOPT et al, 2003; SONG et al, 2014).

A liberação do probiótico encapsulado após a ingestão do alimento pode ocorrer em duas etapas: primeiramente, a quitosana inicia sua dissolução no estômago, devido ao pH ácido, e termina de ser degradada pela microbiota que está disponível no cólon; em seguida, ocorre a solubilização do gel de alginato, pelo sequestro dos íons de cálcio no mesmo local (CHÁVARRI et al, 2010; HEJAZI; AMIJI, 2003). Segundo Hejazi; Amiji (2003), considerando as propriedades biomucoadesivas de polímeros naturais, o sistema de microcápsulas de alginato-quitosana apresenta potencialidade para atingir diretamente o cólon sem perdas significativas de bactérias.

A proteção oferecida pelo revestimento de quitosana também pode ser explicada pelas interações eletrostáticas entre quitosana e alginato. Por ser carregada positivamente, a quitosana forma uma membrana semipermeável em volta de um polímero carregado negativamente, como alginato, que não se dissolve na presença de Ca^{2+} e que restringe a difusão da secreção gástrica (COOK et al, 2012; ETCHEPARE et al, 2016). Essas moléculas de quitosana e alginato sofrem uma complexação que reduz a porosidade das microcápsulas, e, conseqüentemente, diminui a perda do probiótico encapsulado para o meio externo, proporcionando estabilidade em vários níveis de pH. Desse modo, as microcápsulas de alginato-quitosana são consideradas alternativa promissora para administrar micro-organismos probióticos oralmente, e conduzi-los em níveis desejados para o cólon, mantendo sua sobrevivência durante a passagem pelo TGI (TRABELSI et al, 2013; WU et al, 2016). A Figura 5 mostra a microcápsula de alginato revestida de quitosana e o probiótico aprisionado.

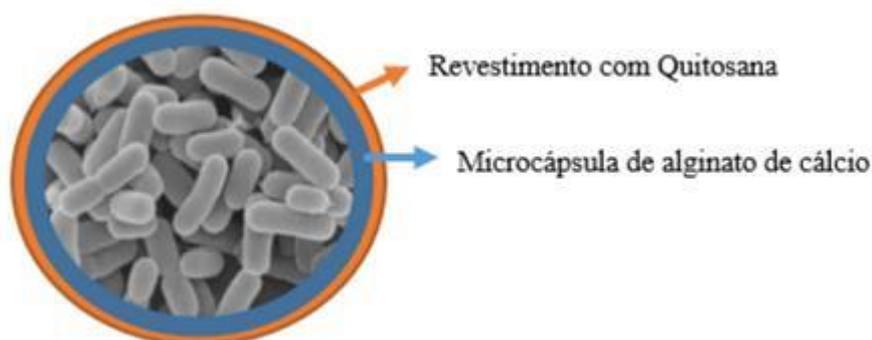


Figura 5. Microcápsula de alginato de cálcio revestida com quitosana

Para escolha do material, deve-se, no entanto, atentar para o fato de que quitosana de baixo peso molecular se difunde mais facilmente na matriz de alginato, resultando em uma membrana densa, ao contrário de quitosana de alto peso molecular (KRASAEKOOPT et al, 2003).

Chávarri et al (2010), com o objetivo de melhorar a eficiência de alginato na proteção das células, revestiram as microcápsulas com quitosana e avaliaram a capacidade das mesmas em melhorar a sobrevivência de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri*, durante o armazenamento refrigerado (28 dias a 4 °C) e na exposição a condições simuladas do trato gastrintestinal. Ambos os micro-organismos mantiveram-se estáveis e *B. bifidum* permaneceu com contagens superiores a 7,0 log UFC mL⁻¹ até o fim do armazenamento e mostrou-se resistente à exposição por 120

minutos a pH 2,0 e concentração de sais biliares de 3,0 g L⁻¹. As microcápsulas de alginato revestidas de quitosana foram produzidas por extrusão e desidratadas por liofilização. Krasaekoopt et al (2006) estudaram a viabilidade de *B. bifidum* ATTC 1994, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, encapsulados pela técnica de extrusão em alginato revestido com quitosana, durante o armazenamento (4°C/ 4 semanas), em iogurte convencional (leite pasteurizado) e UHT. Em ambos os iogurtes, as células apresentaram maior viabilidade quando encapsuladas, com contagens de 1 ciclo logarítmico maior do que as células livres, durante os dias de análise. Alginato revestido de quitosana foi capaz de manter o número de células viáveis, dentro do mínimo terapêutico recomendado, por duas semanas para *B. bifidum* e durante todo armazenamento para as demais culturas, em ambos os iogurtes.

Gandomi et al (2016), avaliando o encapsulamento do *L. rhamnosus* com alginato revestidos de quitosana, mostraram que as microcápsulas proporcionaram a sobrevivência bacteriana durante 90 dias de estocagem, quando aplicadas em sucos de maçã a temperaturas de 4 e 25°C. Além disso, as bactérias microencapsuladas apresentaram maior taxa de sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas, em comparação com as bactérias livres. Estudo similar investigou os efeitos protetores do encapsulamento de quitosana combinada com alginato e as propriedades probióticas das bactérias após exposição a condições gastrointestinais simuladas, em *L. reuteri*. Os resultados mostraram que, em comparação com as células bacterianas livres, o encapsulamento com alginato e quitosana melhora a sobrevivência de *L. reuteri* em presença de ácido e sais de bile, reduz lesão da membrana celular, e conserva as propriedades probióticas de adesividade e antagonismo a bactérias patogênicas (HUANG et al, 2015).

Outro estudo avaliando a encapsulação de *L. rhamnosus* com alginato e quitosana observou o aumento da taxa de sobrevivência das células durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Além disso, a microencapsulação aumentou a tolerância das bactérias diante de um tratamento térmico aplicado a diferentes temperaturas (55, 60 e 65°C por 30 min). Os resultados mostraram ainda que a resistência a temperaturas elevadas pode ser útil na proteção de culturas probióticas durante o processamento (ABBASZADEH et al, 2014).

3.4 APLICAÇÃO DE PROBIÓTICOS MICROENCAPSULADOS EM ALIMENTOS

Na Europa uma ampla variedade de produtos probióticos vem sendo introduzidas no mercado, sendo eles, produtos de panificação, como pães, bolos, biscoitos e doces, que têm sido bastante consumidos por desempenharem papel importante na dieta europeia, e, por conseguinte, tornam-se matrizes ideais pela praticidade e acessibilidade ao consumidor (VITAGLIONE et al, 2012). Outras matrizes alimentares, como bebidas de frutas e vegetais, também estão sendo adicionadas de culturas probióticas, devido ao alto consumo por parte da população mundial. O alto teor de vitaminas, sais minerais, fibras e antioxidantes torna esses produtos matrizes ideais para a adição de probióticos (ANTUNES et al, 2013;. YOON; WOODAMS; HANG, 2006). Entretanto, a maioria dos alimentos probióticos no mercado atual são produtos lácteos refrigerados.

Além disso, a viabilidade dos probióticos na matriz alimentar é afetada por fatores como pH, acidificação durante o armazenamento de produtos fermentados, produção de peróxido de hidrogênio, oxidação, temperaturas de processamento e armazenamento, atividade de água, capacidade de tamponamento, umidade relativa, taxa e proporção de inoculação, microencapsulação e estabilidade durante o armazenamento (MORTAZAVIAN et al, 2012).

Ressalta-se que as matrizes alimentares devem auxiliar os probióticos na passagem pelo TGI e regular a colonização do TGI. Portanto, a seleção de sistemas alimentares adequados para administrar probióticos é um fator essencial que deve ser considerado no desenvolvimento de alimentos probióticos funcionais. Sendo assim, a microencapsulação pode melhorar a viabilidade dos probióticos em algumas matrizes alimentares, além de aumentar as chances de sobrevivência dos micro-organismos na passagem pelo TGI (BURGAIN et al, 2011).

Mesmo que a microencapsulação seja o principal sistema para preservar a viabilidade probiótica contra diferentes estressores encontrados durante o processamento e armazenamento de alimentos, poucas pesquisas investigam a funcionalidade das microcápsulas na proteção de células durante sua aplicação em alguns alimentos (por exemplo, produtos de panificação e fermentados), o que pode ser a causa de alimentos não lácteos ainda representarem apenas uma parte no mercado de alimentos probióticos (DE PRISCO, 2016). De Prisco et al (2016), realizaram uma revisão de literatura sobre a aplicação de microcápsulas probióticas em diferentes categorias de alimentos, encontrando uma distribuição de 49% em produtos à base de

leite, 28% em produtos à base de frutas e vegetais, 13% de derivados de carne e 10% produtos de panificação.

Os produtos de panificação (pães, bolos, biscoitos) desempenham um papel fundamental na dieta europeia, conseqüentemente, são uma matriz ideal de se ter como alimento funcional. Porém alguns fatores afetam a sobrevivência dos probióticos, devido às reações químicas complexas que ocorrem nesse tipo de matriz alimentar (mudanças no pH, água atividade, produção de etanol, produtos de reação Maillard), além das altas temperaturas empregadas na formulação de tais produtos (VITAGLIONE et al, 2012).

Os derivados de leite representam a categoria de alimentos mais amplamente investigada para adição de probióticos (quase 50% dos produtos). Os produtos lácteos mais utilizados como matriz para aplicação de probióticos são iogurtes, queijos, sorvetes, sobremesas lácteas, fórmulas infantis (KENT; DOHERTY, 2014). Alguns derivados de leite são considerados veículo ideal para transportar células vivas, devido a uma série de fatores, como a estrutura de gel no queijo e alto teor de gordura. No entanto, esses fatores muitas vezes não são suficientes para a manutenção da viabilidade probiótica até o intestino. Outros fatores relacionados a essas matrizes de derivados de leite, tais como, sais, compostos aromáticos (diacetil, acetaldeído, acetoin), aromas naturais ou artificiais, bacteriocinas produzidas por bactérias ácido-láticas e pH baixo representam um desafio à sobrevivência probiótica (TRIPATHY; GIRI, 2014).

Cepas probióticas microencapsuladas foram incorporados com sucesso em iogurte antes (EL-DIEB et al, 2012; RIBEIRO et al, 2014; SHOJI et al, 2013) e após a fermentação do leite (BRINQUES; AYUB, 2011; SANDOVAL-CASTILLA et al, 2010), com os principais resultados de baixa acidificação e alto nível de sobrevivência durante o armazenamento refrigerado e trânsito gastrointestinal simulado. Pavunc et al (2011) relataram que a microencapsulação afeta a taxa de crescimento e o tempo de fermentação *Lactobacillus helveticus* em iogurte. Em particular, eles mostraram um tempo de fermentação reduzido de cerca de 1 h em comparação com o iogurte normal e sugeriram que o crescimento mais rápido da estirpe microencapsulada era provavelmente devido ao papel de proteção da matriz de caseinato de sódio das microcápsulas, o que assegurou a entrada dos nutrientes.

Kearney et al (1990) foram os primeiros pesquisadores a experimentarem fermentação de carne com bactérias ácido lácticas imobilizadas por microencapsulação,

indicando que elas são capazes de fermentar mais rapidamente e têm maior sobrevivência do que culturas livres. Muthukumarasamy; Holley (2007) produziram salsichas probióticas potenciais com *L. reuteri* e *B. longum* microencapsuladas, demonstrando que as microcápsulas asseguram alta viabilidade das cepas probióticas ao longo da fabricação, fermentação e secagem de salsichas. As tecnologias de microencapsulação e imobilização, ainda que pouco exploradas em produtos cárneos, poderiam ser uma estratégia promissora para a incorporação de culturas probióticas em produtos cárneos devido às propriedades físicas da matriz alimentar que poderiam ajudar a mascarar micropartículas com um diâmetro maior (DE PRISCO et al, 2016).

A Tabela 2 mostra algumas matrizes alimentares incorporadas de bactérias probióticas microencapsuladas. Pode-se notar que a maioria das matrizes utilizadas são lácteas ou em forma de sucos. São poucos os produtos não lácteos adicionados de probióticos, pois o processamento de tais produtos, uso de altas temperaturas, pH, atividade de água, afetam diretamente a viabilidade e estabilidade das cepas probióticas.

TABELA 2: Matrizes alimentares incorporadas de probióticos microencapsulados

MATRIZ ALIMENTAR	MICRO-ORGANISMOS	CONSIDERAÇÕES	AUTORES
Barras de Cereais Salgadas	<i>L. acidophilus</i> (LA) e <i>Bifidobacterium animalis</i> (BL)	O BL encapsulado apresentou contagens superiores a 10 ⁸ UFC / g durante 105 dias de armazenamento refrigerado. O LA manteve a mesma contagem por 90 dias.	Bampi et al, 2016
Iogurte e suco de laranja	<i>L. acidophilus</i> e <i>L. casei</i>	A encapsulação proporcionou proteção e também aumentou o crescimento de probióticos microencapsulados em iogurte e suco de frutas durante o armazenamento a 4°C por 4 semanas.	Krasaekoopt & Watcharapoka ^[1] , 2014
Iogurte	<i>L. acidophilus</i>	O encapsulamento protegeu os micro-organismos durante o	Ribeiro et al, 2014

		armazenamento e consumo dos iogurtes e proporcionou um produto com boa impressão geral e sensorial.	
Suco de fruta romã (<i>Punica granatum</i> L.)	<i>L. rhamnosus</i>	O encapsulamento protegeu os micro-organismos sob condições ácidas e manteve satisfatoriamente as propriedades físico-químicas do suco.	Mishra & Athmaselvi, 2016
Suco de romã	<i>L. plantarum</i>	No geral, este estudo indicou que o encapsulamento aumenta a proteção proporcionada pelas cápsulas de alginato e é uma abordagem que pode ser aplicada para aumentar a sobrevivência das células probióticas em sistemas alimentares altamente ácidos, como o suco de romã.	Nualkaekul et al, 2012
Iogurte UHT- e leite convencionalmente tratado	<i>L. acidophilus</i> , <i>L. casei</i> e <i>B. bifidum</i>	O número de bactérias probióticas permaneceu acima do mínimo terapêutico recomendado durante todo o período de armazenamento, exceto para <i>B. bifidum</i> , que diminuiu abaixo deste nível após 2 semanas de armazenamento. O tratamento UHT da pré-mistura de iogurte não alterou a viabilidade das bactérias probióticas em comparação com o tratamento térmico convencional.	Krasaekoopt, Bhandari & Deeth ^[1] _{SÉP} , 2006
Queijo tipo <i>curd</i>	<i>L. casei</i>	O queijo com microencapsulado de <i>L.</i>	Lima et al, 2014

		<i>casei</i> apresentou contagem de bactérias lácticas abaixo do queijo com células livres, mas houve aumento da resistência a condições simuladas gastrointestinais.	
Sufê de Chocolate	<i>L. reuteri</i>	Embora as células bacterianas microencapsuladas tenham apresentado considerável resistência ao estresse térmico, houve baixa sobrevivência, taxa de 10% após a confecção do suflê de chocolate, sendo obtido um nível muito baixo de probióticos no alimento para ser considerado um produto probiótico.	Malmo, La Storia & Mauriello, 2013
Leite Tofu fresco e suco de abacaxi	<i>B. Longum</i> com <i>Eleutherine americana</i>	<i>Bifidobacterium longum</i> microencapsulado com extrato de <i>Eleutherine americana</i> e seus oligossacarídeos em tofu de leite fresco e suco de abacaxi apresentaram melhor sobrevivência que células livres após incubação sequencial em sucos simulados gástricos e intestinais e armazenamento refrigerado. As células microencapsuladas parecem ser eficazes na melhoria da qualidade sensorial dos produtos alimentares. As células microencapsuladas apresentaram melhor sobrevivência que as células livres após incubação sequencial em suco gástrico e intestinal	Phoem, Chanthachum & Voravuthikunchai, 2015

		simulado e armazenamento refrigerado. As células microencapsuladas parecem ser eficazes na melhoria da qualidade sensorial dos produtos alimentares.	
--	--	--	--

Bampi et al (2016), em estudo aplicando *L. acidophilus* e *B. animalis* encapsulados pela técnica de spray chilling em barras de cereais salgadas, mostrou que o *B. animalis* encapsulado exibiu contagens superiores a 10^8 UFC/g durante 105 dias de armazenamento em temperatura refrigerada, enquanto o *L. acidophilus* manteve as mesmas contagens por 90 dias. A contagem de células viáveis nas barras mostrou a vantagem da microencapsulação em relação a outros métodos. Demonstrou também um mercado potencial para esse novo produto, visto que as barras de cereais com e sem probióticos não apresentaram diferenças sensoriais, o que indica que a inclusão de micro-organismos encapsulados por arrefecimento por aspersão não afeta as características sensoriais dos produtos.

Alguns estudos não obtiveram resultados satisfatórias quando se aplicaram microcápsulas de probióticos em matrizes não lácticas. Malmo; La Stora; Mauriello (2013) adicionaram microcápsulas de quitosana-alginato com *L. reuteri* em suflê de chocolate, antes do cozimento a 180 °C, durante 10 min (80 °C no núcleo do produto). Os autores mostraram que a taxa de sobrevivência das bactérias encapsuladas foi de apenas 10% e de 1% para as células livres, o que foi atribuído ao tempo/temperatura de cozimento, o que não caracterizou o produto como probiótico. Lima et al (2014), em estudo para aplicação de *L. casei* microencapsulado em queijo coalho, mostrou que, apesar das bactérias microencapsuladas terem apresentado aumento da resistência a condições gastrointestinais simuladas quando comparadas a células livres, a contagem dessas bactérias encapsuladas na matriz alimentar de queijo foi menor que as de células livres.

Poucos são os estudos que aplicam probióticos microencapsulados em matrizes alimentares sólidas. Essa tecnologia, no Brasil, ainda não está sendo utilizada a nível industrial. Devido à limitação de produtos contendo probióticos, esse estudo visa elaborar um produto acessível à grande parte da população, visto que o leite em pó é

um produto amplamente consumido e não há relatos na literatura do uso de probióticos microencapsulados na elaboração de tais produtos.

Materiais e Métodos

4 MATERIAIS E MÉTODOS

Lactobacillus acidophilus (LA5) e *Lactobacillus rhamnosus* foram obtidas no banco de cepas do Laboratório de Bioquímica e Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal da Paraíba, Campus I (UFPB).

Qitosana de baixo peso molecular (5mg/mL) (Sigma-Aldrich®) foi dissolvida em 100 mL de solução de ácido láctico (1% v/v), água destilada acidificada com ácido láctico (pH ajustado com NaOH 1 mol/L para 5,7 - 6,0). A solução de qitosana foi autoclavada a 121° C por 15 min (KRASAEKOOPT et al, 2006).

4.1 ENCAPSULAÇÃO DAS CEPAS

4.1.1 Preparo das células das bactérias para microencapsulação

Inicialmente, as cepas de *L. acidophilus* (LA5) e *L. rhamnosus* foram inoculadas em 9mL de caldo de Man, Rogosa e Sharpe (MRS) (Oxoid, Melbourne, Austrália) e incubadas a 37°C por 24 horas sob condições aeróbicas. O inóculo inicial foi padronizado em uma concentração celular de 10⁹ UFC / mL. Após a encapsulação, a concentração de células diminuiu e variou de 7 a 9 log UFCU / g, dependendo da metodologia de encapsulação. Em seguida, o inóculo foi coletado por centrifugação a 5.000 rpm por 15 minutos a 4°C e lavado duas vezes com água destilada estéril. Finalmente, as células foram suspensas em 4 mL de água destilada estéril para posterior aplicação nas microcápsulas (KRASAEKOOPT et al, 2006 com modificações).

4.1.2 Preparo das microcápsulas de alginato-qitosana

4.1.2.1 Extrusão

As células suspensas foram misturadas com 40 mL de solução de alginato de sódio (2% p/v) (D 3247 AJAX Chemicals Ltd., Sydney, Austrália) esterilizada a 121°C durante 15 minutos. A suspensão de células foi colocada em seringa estéril e injetada através de agulha (0,11 mm) em solução de CaCl₂ estéril a 0,05 mol/L contendo Span 80® (0,5%). Quando se formaram as cápsulas, essas foram deixadas em repouso na solução de CaCl₂ por 30 minutos para otimizar o processo de gelificação. Em seguida, foram lavadas com água destilada estéril e filtradas para aplicação na solução de qitosana (40 minutos em agitador magnético sob velocidade média). Após o revestimento com qitosana, as cápsulas foram novamente lavadas e filtradas, sendo armazenadas sob refrigeração (4°C) em solução estéril de CaCl₂ 0,05 mol/L

(KRASAEKOOPT et al, 2006 com modificações).

4.1.2.2 Emulsificação

As células suspensas foram misturadas com 40 mL de solução de alginato de sódio (2% p / v) (D 3247 AJAX Chemicals Ltd., Sydney, Austrália) adicionada de 2 mL da solução de CaCO_3 (500 mM), previamente esterilizados a 121°C durante 15 minutos. Após homogeneização, a mistura foi dispersa em óleo de soja (200 mL) sob agitação em agitador magnético. Após 15 minutos de emulsificação sob agitação, 40 mL de óleo de soja contendo ácido acético glacial (7 mL) foram adicionados à emulsão, utilizando-se seringa estéril, sendo injectados através de uma agulha (0,11 mm) na mistura ainda sob agitação, para permitir a solubilização do carbonato de cálcio. Em seguida, 300 mL de CaCl_2 (0,05 mol/L) foram adicionados pelas paredes do recipiente e agitados em agitador magnético por mais 10 minutos para separação da fase oleosa da fase aquosa. Em seguida, as microcápsulas foram deixadas em repouso para sedimentação das mesmas. A fase oleosa da camada superior foi removida por aspiração, e as microcápsulas foram recolhidas por filtração (Whatman No. 4), com lavagens subsequentes até remoção completa do óleo remanescente. Após esse processo, as microcápsulas foram colocadas em solução de quitosana (40 minutos em agitador magnético sob velocidade média). Feito o revestimento com quitosana, as cápsulas foram novamente lavadas e filtradas, sendo armazenadas sob refrigeração (4°C) em solução estéril de CaCl_2 0,05 mol/L (KRASAEKOOPT et al, 2006 com modificações).

4.2 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROCÁPSULAS

Realizou-se a observação a olho nu da aparência global das cápsulas, bem como com o auxílio de um paquímetro.

4.3 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO E VIABILIDADE

A eficiência de encapsulação foi avaliada ao longo de 28 dias (tempos 0, 7, 14 e 21 dias) em temperatura refrigerada (4°C) e ambiente (28°C) ([17] com modificações). Para contagem das bactérias viáveis (abertura das microcápsulas), 1 g de microcápsulas foi adicionada a 10mL de solução de citrato de sódio (3% p/v). A suspensão foi agitada num vortex até completa dissolução das microcápsulas; depois disso, alíquotas de 0,1 mL das diluições foram plaqueadas em agar MRS. Todas as

placas foram incubadas em aerobiose a 37°C por 48 horas para enumeração de bactérias encapsuladas como UFC/g. Todas as amostras foram analisadas em triplicata (SANCHEZ et al, 2017 com modificação).

A incorporação de bactérias às micropartículas foi expressa em termos de Eficiência de encapsulação (EE) e foi calculada aplicando a seguinte fórmula:

$$EE = (N / N_0) \times 100$$

onde N é o número de células encapsuladas viáveis liberadas das microcápsulas e N₀ é a carga celular antes da microencapsulação. O ensaio foi realizado em triplicata.

4.4 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE CÉLULAS LIVRES E MICROENCAPSULADAS DE *L. Rhamnosus*

4.4.1 Atividade proteolítica de *L. rhamnosus*

Para avaliação da atividade proteolítica, após o crescimento de cada cepa de *Lactobacillus* testada, uma alíquota de 10 µL das culturas foi transferida para placas contendo *plate count agar* (PCA; HiMedia, Mumbai, Índia) suplementado com 10% de leite desnatado sem lactose (Camponesa, Minas Gerais, Brasil) adicionado após a autoclavagem (121 °C por 15 minutos, 1 atm). As placas foram incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 30 °C por 72 horas. Resultante disso, a formação de um halo transparente ao redor das colônias foi considerada positiva para atividade proteolítica (ALBUQUERQUE et al, 2017).

4.4.2 Atividade lipolítica de *L. rhamnosus*

Para avaliação da atividade lipolítica, após o crescimento da cepa de *L. rhamnosus*, uma alíquota de 10 µL das culturas foi transferida para placas contendo ágar Tributirina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), com posterior incubação anaeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 30°C por 72 horas. Após a incubação, o aparecimento de uma zona clara ao redor das colônias foi interpretada como atividade lipolítica positiva para as cepas testadas (ALBUQUERQUE et al, 2017).

4.4.3 Produção de diacetil por *L. rhamnosus*

As células de cada cepa de *Lactobacillus*, após o crescimento, foram centrifugadas (4,000 g × 15 min, 4 °C) e o sedimento foi lavado e ressuspensão em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada. Posteriormente, 100 µL da suspensão foram inoculados em 10 mL de leite integral UHT (Cemil, Minas Gerais, Brasil), seguido de incubação a 37°C por 24 horas. Então, 0.5 mL de KOH (16%, p/v) foi primeiramente adicionado a 1 mL da suspensão e homogeneizado. Em seguida, foi adicionado 0.5 mL de solução de α -naftol (1%, v/v), e incubado a 37 °C durante 10 minutos. A produção de diacetil foi indicada pela formação de um anel vermelho na superfície dos tubos (KING, 1948; ALMEIDA JÚNIOR et al, 2015). Os resultados foram classificados como fraco (+), médio (++) ou forte (+++) de acordo com a intensidade da cor do anel formado (ALBUQUERQUE et al, 2017).

4.4.4 Produção de exopolissacarídeo (EPS) por *L. Rhamnosus*

A produção de EPS a partir dos isolados e das microcápsulas foi testada baseando-se nos métodos descritos por Van Geel-Schütten et al,(1998) e Almeida Júnior (2015), com modificações. A cepa de *L. rhamnosus* (1%, v/v) foi adicionada em 10 mL de caldo MRS contendo 2% de glicose (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e incubada a 37°C durante três dias em condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK). Os resultados foram avaliados de forma qualitativa como positivo ou negativo para produção de EPS (ALBUQUERQUE et al, 2017, com modificações).

4.4.5 Tolerância a NaCl (*L. Rhamnosus* e microcápsulas)

Após o crescimento, cada cepa de *Lactobacillus* (1%, v/v) e as microcápsulas (1% p/v) foram transferidas para tubos contendo 10 mL de caldo MRS com diferentes concentrações (0%, 1%, 3% e 5%) de cloreto de sódio (NaCl), e incubadas aerobicamente a 37 °C. A contagem viável em caldo MRS com e sem NaCl foi determinada após 24 horas de incubação. Os resultados foram expressos como percentual de sobrevivência, isto é, a diferença entre a contagem viável observada no caldo MRS suplementado com cada concentração de NaCl em relação à observada no controle (ALBUQUERQUE et al, 2017, com modificações).

4.4.6 Tolerância a tratamentos térmicos (*L. Rhamnosus* e microcápsulas)

A resistência do *L. rhamnosus* livre e microencapsulado (extrusão e emulsificação) a tratamentos térmicos (55, 65, 75, 85 e 95 ° C por 30 segundos) foi realizada utilizando-se água destilada como meio de suspensão. Para as células livres, 1 mL da suspensão foi coletada, e para as diferentes microcápsulas, 1 g foi coletado e transferidos para tubos de ensaio contendo cada um 9 mL de água destilada estéril. Essas amostras foram submetidas a tratamentos térmicos em banho-maria (Dist DI950 M, Florianópolis SC, Brasil). Após as amostras serem rapidamente resfriadas (1 minuto em recipiente com gelo) até a temperatura ambiente (~28°C), foi realizada a contagem de células viáveis e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células, conforme descrito anteriormente no item 4.3 (ALVES et al, 2015; CARVALHO et al, 2017).

4.5 PROPRIEDADES DE FUNCIONALIDADES FISIOLÓGICAS

4.5.1 Tolerância a diferentes valores de pH

Para o desenvolvimento do teste, 1 mL da cultura de *L. rhamnosus* (controle) e as microcápsulas (extrusão e emulsificação-1% p/v) contendo esses mesmos micro-organismos foram inoculadas em 10 mL de solução tampão fosfato (STF; 50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄) esterilizada. O ajuste do pH foi feito com ácido clorídrico a 1 M para 2, 3 ou 5 com posterior incubação aeróbica (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) sob agitação de 150 rpm em incubadora com agitação orbital (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil). Em diferentes períodos de incubação (1, 2 e 3 horas), alíquota de 1 mL da suspensão controle foi tomada, e, para as microcápsulas, foi realizado conforme descrito anteriormente no item 4.3. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C em aerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada, sendo os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células. Como controle, a cepa de *L. rhamnosus* e as microcápsulas foram cultivadas em STF com pH 7.2 ajustado usando-se 1 M de NaOH (ALBUQUERQUE et al, 2017, com modificações)

4.5.2 Tolerância a diferentes concentrações de sais biliares

Inicialmente, 1 mL da cultura de *L. rhamnosus* (controle) e as microcápsulas (1% p/v) contendo esses mesmos micro-organismos foram inoculadas em 10 mL de STF (50 mM K₂HPO₄/KH₂PO₄) com concentrações de 0% (controle), 0.1%, 0.2% e 0,3% (p/v) de sais biliares (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA). As suspensões foram incubadas a 37 °C por 48 horas em aerobiose sob agitação de 150 rpm por um período

de incubação de 1 hora. Terminado o tempo de exposição, alíquota de 1 mL da suspensão controle foi tomada, e para as microcápsulas foi realizado conforme descrito anteriormente no item 4.3.. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C em aerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células (ALBUQUERQUE et al, 2017 com modificações).

4.5.3 Ensaios de sobrevivências das células probióticas sob exposição à enzimas digestivas

4.5.3.1 Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em suco gástrico simulado (SGS)

A sobrevivência das bactérias livres e microencapsuladas com alginato-quitosana no ambiente gástrico foi avaliada pela contagem das células viáveis após o tratamento com um suco gástrico simulado (SGS). O SGS foi feito a partir de uma solução de cloreto de sódio (0,2%, p / v) previamente esterilizado e o pH foi ajustado para 2,0 (Tian et al, 2015). A enzima pepsina foi adicionada na solução para atingir uma concentração de 3,2 g/L. Em seguida, 1g de microcápsulas (extrusão e emulsificação) ou 1 mL de solução de células livres foram suspensas em 9,5 mL de SGS e incubadas a 37 ° C por 120 minutos sob agitação orbital a 150 rpm. O pH do SGS foi sendo diminuído gradualmente (3,0, 2,5 e 2,0) a cada 40 min, e em cada mudança de pH, as amostras foram coletadas para contagem. Esse procedimento foi usado para simular a acidez variável no estômago. A cada tempo, alíquota de 1 mL da suspensão controle foi tomada, e para as microcápsulas foi realizado conforme descrito no tópico conforme descrito anteriormente no item 4.3. Após o período de incubação de 48 horas a 37°C em aerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células (CHEN et al, 2017)

4.5.3.2 Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em solução biliar simulada

A solução biliar simulada foi preparada dissolvendo-se o sal biliar em água destilada, previamente estéril, até uma concentração final de 0,6% (p / v). A solução foi ajustada para um pH de 6,8 (Xing et al, 2015). Em seguida, 0,5 g de microcápsulas (extrusão e emulsificação) ou 0,5 mL de solução de células livres foram adicionadas a 4,5 mL de solução biliar e incubadas a 37 ° C por 1 hora sob agitação orbital a 150 rpm.

Finalmente, alíquota de 1 mL da suspensão controle foi tomada, e para as microcápsulas, foi realizado conforme descrito anteriormente no item 4.3. Após o período de incubação de 48 horas a 37 °C em aerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células (CHEN et al, 2017).

4.5.3.3 Viabilidade de bactérias livres e microencapsuladas em suco intestinal simulado (SIS)

O SIS foi preparado em solução de bicarbonato de sódio a 0.1 M (NaHCO₃) previamente esterilizado (ALBUQUERQUE et al, 2017). A pancreatina foi adicionada à solução para atingir uma concentração final de 12 g/L. Então, adicionou-se 0,5 g de microcápsulas (extrusão e emulsificação) ou 0,5 mL de solução de células livres em 4,5 mL de SIS e incubou-se a mistura a 37 °C por 2 horas, sob agitação orbital a 150 rpm. Finalmente, alíquota de 1 mL da suspensão controle foi tomada, e para as microcápsulas, foi realizado conforme descrito anteriormente no item 4.3. Após o período de incubação de 48 horas a 37 °C em aerobiose, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células (CHEN et al, 2017).

4.5.4 Ensaio de sobrevivências das células probióticas sob condições gastrointestinais simuladas

A cepa de *L. rhamnosus* em vida livre e encapsuladas por extrusão e emulsificação, foi submetidas a condições simuladas ao trato gastrointestinal, a citar, esôfago-estômago (25 mg/mL de pepsina, pH ajustado para 2,0 e tempo de exposição de 90 minutos), duodeno (2 g/L de pancreatina e 12 g/L de sais biliares bovino e tempo de exposição de 20 minutos) e íleo (pH ajustado para 6,5), de acordo com a metodologia descrita por Madureira et al (2011). A agitação mecânica foi utilizada para simular os movimentos peristálticos e o sistema será incubado a 37°C. A simulação foi contínua, de modo que o volume do frasco aumentou gradualmente a partir dos 10 mL da amostra inicial.

Após o crescimento de *L. rhamnosus*, as culturas foram centrifugadas (7,000 g × 10 min, 4°C), lavadas em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada, ressuspensas e diluídas em solução salina para a suspensão alcançar uma concentração média de 10⁹ UFC/mL. Então, 1 mL da suspensão de células livres e 1g das microcápsulas foram

incorporados em frascos de vidro contendo 10 mL de leite integral UHT (Camponesa, Minas Gerais, Brasil) esterilizados por autoclavagem (121°C por 15 minutos, 1 atm).

O experimento foi realizado em fases que simularam condições no esôfago-estômago, duodeno e íleo. As amostras iniciaram sendo expostas a condições simuladas do esôfago-estômago com o uso de 0.05 mL/mL de pepsina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), pH diminuído gradualmente usando-se HCl a 1 M (pH 5.5/10 minutos; pH 3.8/20 minutos; e pH 2.0/60 minutos) sob agitação de 130 rpm; do duodeno com o uso de 0.25 mL/mL de pancreatina (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA), 0.25 mL/mL de sais biliares bovino (Sigma-Aldrich, Saint Louis, EUA) e tempo de exposição de 30 minutos, sob agitação de 45 rpm, com pH ajustado para 5.0 com NaHCO₃ a 1 M; e, por fim, do íleo com tempo de exposição de 60 minutos, sob agitação de 45 rpm e pH ajustado para 6.5 com NaHCO₃ a 1 M.

Durante todo o teste, as amostras foram mantidas em incubadora com agitação orbital (TECNAL TE-424, São Paulo, Brasil) a 37°C para simular as condições de temperatura e peristaltismo do corpo humano. A simulação foi contínua, de modo que o volume de trabalho aumentou gradualmente a partir dos 10 mL da amostra inicial. O preparo das soluções com as enzimas foi realizado assepticamente, utilizando-se 25 mg/mL de pepsina diluídas em HCl a 0.1 M, 2 g/L de pancreatina diluídas em NaHCO₃ a 0.1 M, e 12 g/L de sais biliares diluídos também em NaHCO₃ a 0.1 M. Todas as soluções foram mantidas sob refrigeração durante o período da simulação.

Após cada condição gastrointestinal simulada, uma alíquota de 100 µL de leite UHT foi coletada para as células livres, e 1g das microcápsulas foi filtrada e coletada e diluída seriadamente em solução salina (NaCl 0.85%, p/v) esterilizada conforme descrito no item 4.3. Em seguida, cada diluição foi transferida para placas contendo ágar MRS através da técnica de microgota e incubadas anaerobicamente (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid, Hampshire, UK) a 37°C por 48 horas. Após o período de incubação, a contagem de células viáveis foi realizada e os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células (OLIVEIRA et al, 2014; MEIRA et al, 2015).

4.6 VIABILIDADE E ESTABILIDADE DAS CÁPSULAS APLICADAS EM LEITE EM PÓ E UHT (VIDA DE PRATELEIRA)

O leite em pó e UHT foram inoculados com *L. rhamnosus* microencapsuladas com alginato-quitosana sendo, em seguida, incubados a 4 °C durante quatro semanas. Em diferentes intervalos ao longo do armazenamento (0, 7, 14, 21, 28 dias) alíquotas

do produto foram tomadas para contagem do número de células viáveis (item 4.3, sendo os resultados expressos em percentual de sobrevivência das células) (NUALKAEKUL et al, 2011), bem como avaliação de características físicas e físico-químicas, a citar: cor (CIE, 2004), pH e acidez total titulável (AOAC 2005).

4.7 ANÁLISE SENSORIAL

Análises sensoriais do leite em pó e UHT foram realizadas com avaliação dos seguintes atributos: aparência, cor, sabor, aroma, sabor residual e avaliação global (Teste de Perfil de Características, com escala de 9 pontos) e intenção de compra (escala de 5 pontos). Os testes foram feitos em cabines individuais, sendo o painel de degustadores composto de 100 provadores não treinados, recrutados por divulgação e convite pessoal (CECCHI, 2001).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os ensaios foram realizados em triplicata, e os resultados expressos como uma média dos ensaios. As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se testes de estatística descritiva (média e desvio padrão) e inferencial ANOVA (análise de variância para amostras independentes) para determinação de diferenças significantes ($p < 0,05$) entre as médias dos resultados obtidos. Para o tratamento estatístico, utilizar-se-á o software SPSS 21.

Resultados e Discussão

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS

Observando-se as microcápsulas tanto a olho nu quanto com auxílio de um paquímetro, pode-se notar cápsulas homogêneas, de aproximadamente, 2 mm de diâmetro para a metodologia de extrusão (Figura 6). As microcápsulas apresentaram grânulos com características semi-translúcidas, de cor branca, sendo a maioria esféricas. Em estudos similares, autores observaram as mesmas características a olho nu em microcápsulas. Avaliando microcápsulas de alginato/gelatina, os autores observaram que as cápsulas apresentaram forma esférica, homogênea e coloração opaca (LUO et al, 2016; LOPES, 2016).

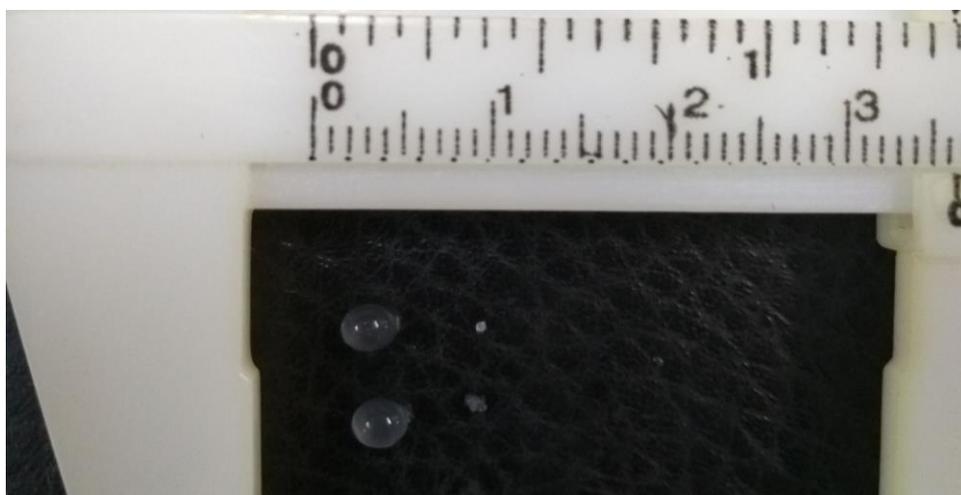


Figura 6. Tamanho das microcápsulas (por extrusão e emulsificação) avaliadas com auxílio de paquímetro

O tamanho das microcápsulas tem influência importante sobre a viabilidade dos probióticos e o efeito sensorial nos alimentos. Geralmente, microcápsulas maiores oferecem melhor proteção para probióticos, mas pior efeito sensorial, principalmente no que diz respeito à textura dos alimentos (BURGAIN et al, 2011; RAJAM et al, 2015). É mostrado que as microcápsulas dentro da faixa de tamanho de 100 a 200 μm fornecem um equilíbrio ideal, protegendo as bactérias sob condições gástricas e melhor aceitação sensorial (CHEN et al, 2017; NAG et al, 2011).

Alguns autores realizaram elaboração das microcápsulas pela metodologia de extrusão, encontrando diâmetros variados das microcápsulas (entre 1,38 mm a 3,7 mm), dependendo da matriz encapsulante utilizada. Estudo avaliando microcápsulas de

alginato, contendo *L. Rhamnosus* pelo método de extrusão, apresentaram cápsulas com tamanho médio de 1,9 mm (SOHAIL et al, 2011). Similarmente, outros autores observando cápsulas de alginato de cálcio, encontraram distribuição homogênea das cápsulas e com valor médio de diâmetro 3,7 mm, tendo alto grau de esfericidade (CÓRDOBA et al, 2013). No estudo de Abbaszadeh et al (2014), foi observado o efeito de diferentes concentrações de alginato e quitosana sobre o tamanho e aspecto dos grânulos. Em relação ao tamanho, esse variou de 1,38 mm para concentrações maiores de alginato e quitosana e 1,64 mm para concentrações menores de alginato e quitosana. Embora a concentração de quitosana não tivesse nenhum efeito significativo em relação ao tamanho do grânulo, o diâmetro do grânulo diminuiu significativamente com o aumento da concentração de alginato. Os autores concluíram que isso pode ser devido à ligação entre o grupo COO⁻ de alginato e o Ca²⁺, resultando em encolhimento do grânulo de alginato e dando uma estrutura rígida e firme que evita o inchaço do grânulo. Quanto ao aspecto das cápsulas, autores observaram que microcápsulas de alginato de sódio com bactérias lácticas, apresentaram uma superfície enrugada, ondulada, macia e de formato irregular. Isso ocorre devido aos géis ionotrópicos formados por íons de cálcio, possuírem uma maior concentração de polímero na superfície, resultando em uma superfície irregular (TOTASAUS et al, 2013). Chan et al (2011) similarmente, obtiveram grânulos de alginato de cálcio com algumas fissuras sobre a superfície.

5.2 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO E VIABILIDADE

Inicialmente, foram realizadas análises de variância para a observação da eficiência da encapsulação pelas metodologias de extrusão e emulsificação de *L. rhamnosus*. A eficiência da encapsulação para *L. rhamnosus* foi de 86,01 % (8 logs) e 74,43% (6,7 logs) pelas metodologias de extrusão e emulsificação, respectivamente (Figura 7). Em estudo similar, alguns autores, avaliando a eficiência de encapsulação (%) das microcápsulas de proteína whey isolada por emulsificação, revestidas com alginato e não revestidas, obtiveram resultados de 96,35 e 95,28 %, respectivamente, não encontrando diferença significativa (CHEN et al, 2017). Outros autores encontraram baixa eficiência de encapsulação (25-53,2%) quando encapsularam *L. rhamnosus* em cápsulas de alginato-quitosana em diferentes concentrações (ABBASZADEH et al, 2014).

Outros autores observaram que as interações entre as bactérias e os materiais da parede das cápsulas são essenciais para determinar a eficiência da encapsulação. Os experimentos mostraram que as macromoléculas na superfície das bactérias podem interagir com os materiais da parede de várias maneiras, incluindo forças de van der Waals, interações eletrostáticas e hidrofóbicas. Os mesmos autores obtiveram alta eficiência de encapsulação em cápsulas de *L. rhamnosus* produzidas com proteínas do leite, mostrando que o processo de encapsulação foi suave e os materiais da parede foram compatíveis com a cepa probiótica (BURGAIN et al, 2013). Cai et al (2014) obtiveram baixa eficiência de encapsulação (36,9%) pela técnica de emulsificação. Huiyi et al (2013), microencapsularam células de levedura em cápsulas de alginato-quitosana, obtendo uma eficiência de encapsulação de 77%. Em estudo similar, autores encapsularam *Bifidobacterium bifidum* em microcápsulas de amido-alginato, obtendo eficiência de encapsulação variando de 43% a 50%. (ZOU et al, 2011). Dimitrellou et al (2016) encontraram valores de eficiência de encapsulação iguais a 72,5% quando as células *L. casei* foram encapsuladas com leite desnatado. Resultados semelhantes foram observados durante a microencapsulação de *Bifidobacterium* BB-12 com proteína Whey e prebióticos, onde os valores da eficiência de encapsulação variaram de 88,30-95,43% (PINTO et al, 2015).

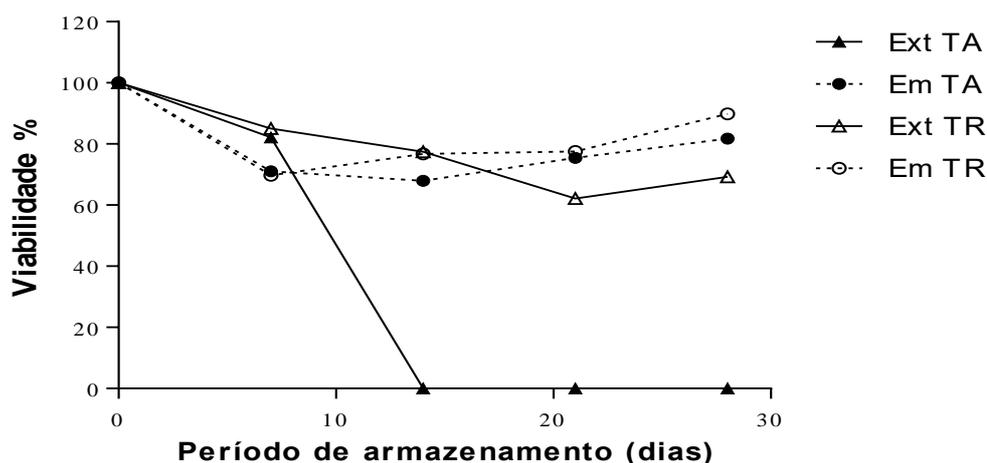


Figura 7. Viabilidade de *L. rhamnosus*, temperatura ambiente (28°C) e refrigerada (4°C), encapsulada por extrusão e emulsificação. TA ext (metodologia de extrusão, temperatura ambiente); Ext TR (metodologia de extrusão, temperatura refrigerada); Em

TA (metodologia de emulsificação, temperatura ambiente); Em TR (metodologia de emulsificação, temperatura refrigerada)

Avaliou-se também a viabilidade de *L. rhamnosus*, em temperatura ambiente (28°C) e refrigerada (4°C), encapsulados por extrusão e emulsificação ao longo de 28 dias. Com relação à temperatura ambiente, os resultados de análises de variância (ANOVA) mostraram que houve diferença estatisticamente significativa ($P < 0,05$), ao longo do armazenamento, quanto às metodologias de extrusão e emulsificação e tempo de armazenamento. No último dia de armazenamento sob temperatura ambiente (28 dias), a viabilidade de *L. rhamnosus* foi de 0% e 82,54%, por extrusão e emulsificação, respectivamente, mostrando que a metodologia de emulsificação foi mais eficiente em proteger as bactérias por um período maior de tempo que por extrusão, o que fica bem evidente na figura 7. Na extrusão, houve diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre o tempo inicial e após 7, 14 e 21 dias. Entre 14 e 21 dias, no entanto, não houve diferença estatisticamente significativa. Na metodologia de emulsificação, não foi possível verificar diferença ao longo do tempo. Alguns autores observaram que, em temperaturas próximas a 22°C, a atividade metabólica é muito alta nas bactérias e resulta em morte celular e perda de viabilidade celular (SOTO et al, 2011). Esse resultado vai de acordo com o observado na metodologia de extrusão em temperatura ambiente, porém está em desacordo com o observado na metodologia de emulsificação. Esse comportamento da bactéria encapsulada por emulsificação demonstra a eficiência da encapsulação em proteger a bactéria contra situações adversas e de estresse.

Com relação à temperatura refrigerada, pode-se perceber que houve um decréscimo gradual, ao longo do tempo, para a metodologia de extrusão, e um decréscimo, com posterior aumento, para emulsificação, o mesmo comportamento que houve em temperatura ambiente. No último dia de armazenamento sob temperatura refrigerada (28 dias), a viabilidade foi de 69,56% e 90,13% por extrusão e emulsificação, respectivamente, mostrando que a metodologia de emulsificação, mais uma vez, foi mais eficiente em proteger as bactérias por um período maior de tempo que por extrusão, o que fica bem evidente na figura 7. Também houve diferença significativa ($P < 0,05$) nos dias 21 e 28 entre as metodologias, tanto em temperatura ambiente quanto refrigerada. Alguns autores atribuem a viabilidade estendida das

microcápsulas em temperatura refrigerada à baixa atividade metabólica nessas temperaturas (SOTO et al, 2011).

Em estudo similar, o efeito da temperatura de armazenamento na sobrevivência de cepas probióticas também foi avaliada. Os autores avaliaram células de *Lactobacillus plantarum* e *Lactobacillus casei* Shirota encapsuladas com alginato de sódio e armazenadas sob refrigeração (4°C) e temperatura ambiente (22°C), sendo a viabilidade avaliada ao longo de 30 dias. A 22°C, a viabilidade, após 12 dias de armazenamento, mostrou que as taxas de sobrevivência das células revestidas com alginato de sódio diminuíram 0,5 (log), enquanto as células livres sofreram uma redução de 1–2 ciclos de log de suas contagens iniciais para *L. plantarum* e *L. casei*, respectivamente. Ao final do período de armazenamento de 30 dias, foram observadas reduções de 3 e 4 (log), para microcápsulas de alginato e células livres de *L. plantarum* e *L. casei*, respectivamente. Os resultados em temperatura refrigerada foram mais satisfatórios, mostrando que as taxas de sobrevivência das bactérias microencapsuladas com alginato e células livres de *L. plantarum* e *L. casei*, permaneceram estáveis durante os primeiros 12 dias para ambas as estirpes. Após 30 dias de armazenamento a 4°C, houve redução significativa na viabilidade de células *L. casei*, porém, a contagem das bactérias ainda ficou na faixa recomendada como dose terapêutica (ALVES, 2015).

CHAVARRI et al,(2010) utilizando o método de extrusão para encapsular *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium bifidum*, ambos misturados com quercetina, relataram perda de viabilidade de 3,34 log UFC/mL e 4,11 log UFC/mL, respectivamente, após 11 dias em temperatura refrigerada (4°C), e nenhuma sobrevivência foi observada após 14 dias. Xu et al,(2016), encapsularam *Lactobacillus casei* por extrusão, relatando baixa estabilidade a 4°C, com uma diminuição da estabilidade de cerca de 80% para 20%, após 84 dias. Para encapsulação de *L. rhamnosus*, estudo recente verificou que as melhores concentrações de células viáveis foram obtidas para concentrações de 1% de alginato, indicando que a concentração de células viáveis diminui com o aumento da concentração de polímeros (LOPES, 2016).

5.3 PROPRIEDADES TECNOLÓGICAS DE CÉLULAS LIVRES E MICROENCAPSULADAS DE *L. Rhamnosus*

5.3.1 Atividade proteolítica e lipolítica de *L. rhamnosus*

A cepa de *L. rhamnosus* testada apresentou resultado positivo para atividade proteolítica, com formação de alo translúcido ao redor do inóculo e negativa para atividade lipolítica, com alo opaco ao redor do inóculo (Figuras 8A e 8B respectivamente). A proteólise consiste na degradação da proteína, com formação de peptídeos de médio e baixo peso molecular e aminoácidos livres, através da ação de enzimas, resultando no sabor e aroma específicos de queijos, bem como na modificação na textura do produto (BEZERRA, 2015). Quanto à lipólise, as bactérias ácido-láticas apresentam, geralmente, fraca capacidade lipolítica quando comparadas a outros grupos de micro-organismos, embora essa capacidade possa variar consideravelmente entre as espécies. Os *Enterococos*, em geral, exibem atividade lipolítica mais elevada do que outras espécies de bactérias ácido-láticas e os gêneros *Lactococcus* e *Lactobacillus* são considerados pouco lipolíticos (COELHO, 2013; COLLINS et al, 2003). A lipólise é processo bioquímico responsável pela hidrólise dos lipídios resultando na liberação de ácidos graxos de cadeia média e curta. A liberação desses ácidos graxos de baixo peso molecular, por ação lipolítica, desempenha um papel crucial no desenvolvimento do aroma e sabor do queijo (SANTOS et al, 2012). A lipólise pode ser influenciada pelo sistema metabólico de bactérias ácido-láticas “starter” e propiônicas, leveduras ou bolores presentes no queijo (MCSWEENEY; SOUSA, 2000).

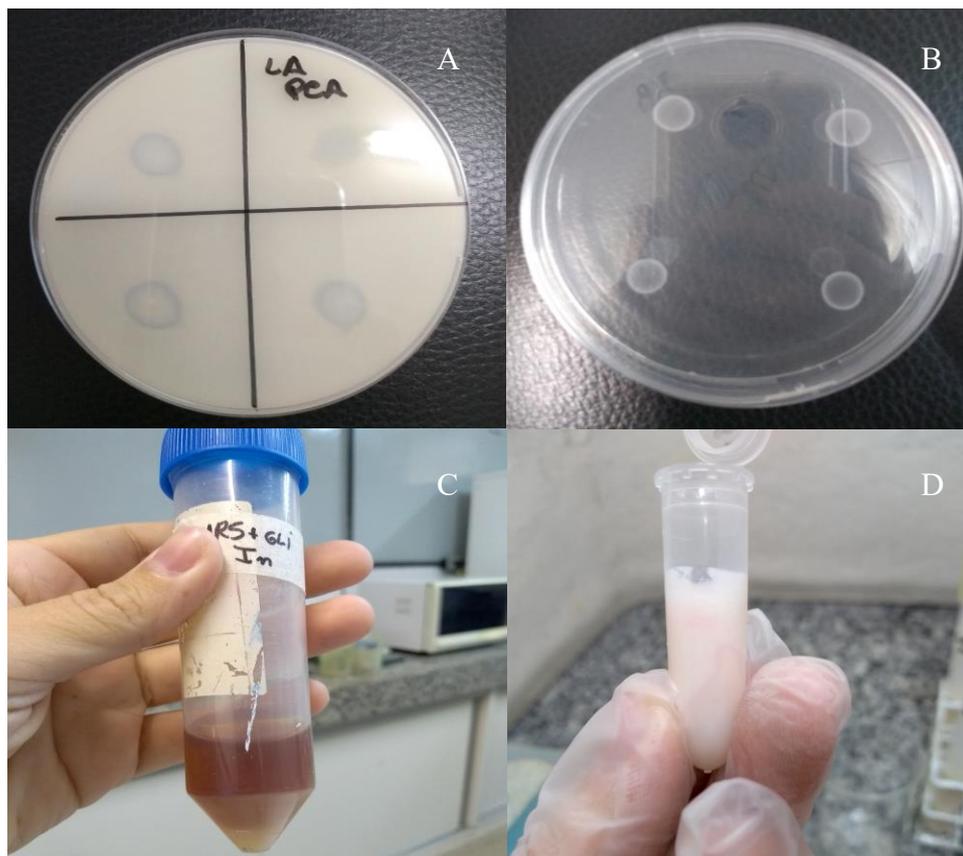


Figura 8. Propriedades tecnológicas da cepa *L. rhamnosus* (A) Teste de proteólise (B) Teste de lipólise (C) Produção de EPS (D) Produção de diacetil

5.3.2 Produção de exopolissacarídeo (EPS) e diacetil por *L. Rhamnosus*

A cepa também foi capaz de produzir EPS (Figura 8C), porém apresentou baixa capacidade de produzir diacetil (+), formando um alo rosado após o tempo de exposição aos reagentes (Figura 8D). Quanto à produção de EPS, autores avaliaram a produção de EPS por todas as nove cepas, encontrando que todas as cepas foram capazes de produzir EPS (ALBUQUERQUE et al, 2017). O interesse por EPS produzidos por bactérias ácido-láticas vem aumentando devido à capacidade que esses biopolímeros possuem de melhorar as propriedades físicas de produtos fermentados, possuindo, assim, importância tecnológica para aplicações industriais. Estudos demonstram que EPS, produzidos por essas bactérias, contribuem para melhorar aspectos sensoriais de alimentos funcionais probióticos, além de auxiliar na estabilidade de produtos fermentados durante a estocagem. Além disso, tem sido relatado que esses polissacarídeos podem possuir propriedades benéficas à saúde, tais como: atividade

antitumoral e imunomodulatória, redução do colesterol ou prevenção ao aparecimento de úlceras (GROSU-TUDOR et al, 2013; JOSHI; KOIJAM, 2014).

O diacetil é um composto volátil derivado do metabolismo de citrato com um papel importante para o desenvolvimento de características distintas em produtos fermentados, principalmente em produtos lácteos (RINCON-DELGADILLO et al, 2012). Um estudo recente verificou forte capacidade de produzir diacetil em queijos com *Bifidobacterium bifidum* BB-12 e *L. acidophilus* LA-5 (OZER et al, 2009). Semelhante a esse estudo, Albuquerque et al (2017) avaliaram a produção de diacetil em nove cepas de *Lactobacillus* selvagens, encontrando capacidade de produzir diacetil, caracterizadas como médio e alto nível.

5.3.3 Tolerância a NaCl (*L. Rhamnosus e microcápsulas*)

Quanto à tolerância a NaCl, pode-se observar que houve um declínio gradual do crescimento bacteriano com aumento das concentrações de NaCl, mas não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as metodologias, o que mostra boa resistência das bactérias, além de tolerância ao estresse causado por altas concentrações de NaCl (TABELA 3). A bactéria *L. rhamnosus* apresentou grande tolerância a altas concentrações de NaCl, tanto em vida livre quanto encapsuladas, o que é um ponto positivo do uso dessa bactéria em alimentos, já que os produtos salgados (pães, massas, salgadinhos) ocupam grande destaque na indústria alimentícia. Essa bactéria não só tolerou as altas concentrações de NaCl (5%), como também apresentou crescimento ótimo (acima de 91%) em todas as metodologias avaliadas.

TABELA 3: Tolerância de *L. rhamnosus*, livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à NaCl.

Metodologia	Tolerância a NaCl			
	Viabilidade (%)			
	0% ^A	1% ^B	3% ^C	5% ^D
Controle^a	100	94,26±1,62	93,45±1,79	91,27±1,63
Extrusão^b	100 ^C	97,26±0,85	94,17±1,65 ^A	91,55±2,43 ^A
Emulsificação^c	100 ^D	99,52±1,75	99,39±2,35	91,45±1,62 ^A

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a - c} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A - D} Para cada concentração de NaCl, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

5.3.4 Tolerância a tratamentos térmicos (*L. Rhamnosus e microcápsulas*)

Quanto à tolerância a tratamentos térmicos, pode-se observar que houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as metodologias de extrusão e emulsificação e o experimento controle (TABELA 4). O experimento controle apresentou um decaimento gradual no crescimento, enquanto as bactérias encapsuladas apresentaram aumento no crescimento entre as temperaturas de 55 °C e 75 °C, e, só a partir de 85 °C houve decaimento na viabilidade das bactérias. Também observa-se alta resistência da bactéria *L. rhamnosus* a altas temperaturas. Em vida livre (controle), essa bactéria apresentou um percentual de sobrevivência de 38,74% a 95 °C, o que denota um alto grau de adaptação a condições de estresse. As bactérias encapsuladas por emulsificação apresentaram um percentual de sobrevivência de 89,67% a 95 °C, enquanto por extrusão, apresentaram 76,89% de sobrevivência, não havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre elas.

Carvalho et al (2017), encapsulando *Bifidobacterium* BB-12 com leite em pó de cabra, submeteu as cápsulas e as células livres a tratamentos térmicos de 55, 65 e 75°C. Os autores encontraram que as bactérias encapsuladas apresentaram sobrevivência

muito maior que o experimento controle, sendo que na temperatura mais alta (75°C por 5 min) houve redução de, em média, 4 logs para as bactérias encapsuladas e 6 logs para as bactérias em vida livre. Os autores observaram que todos os agentes carreadores utilizados na produção das microcápsulas (leite em pó de cabra adicionado ou não de prebióticos) melhoraram a sobrevivência do *Bifidobacterium* BB-12, quando comparados com as células livres.

Em estudo similar, *L. rhamnosus*, encapsuladas por extrusão, sobreviveram significativamente ($P < 0,05$) melhor que as células livres, durante a exposição ao calor a 55, 60 e 65°C. As células livres experimentaram redução de cerca de 5 log ciclos após tratamento térmico a 65°C por 30 min, enquanto que *L. rhamnosus* encapsulado em alginato-quitosana foi reduzido em apenas 2,55 ciclos log (ABBASZADEH et al, 2014).

Um dos principais fatores que determinam o uso de uma bactéria é sua capacidade de tolerar as diferentes temperaturas empregadas no processamento de alimentos, porém mais trabalhos são necessários para avaliar a capacidade de sobrevivência aos tratamentos térmicos de células bacterianas em microcápsulas que possuem diferentes composições matriciais (CARVALHO et al, 2017; TRIPATHI; GIRI, 2014). Alguns autores afirmam que a temperatura favorável para o crescimento da maioria dos probióticos está na faixa de 37-43°C (KORBKANDI et al, 2011; LEE; SALMINEN, 2009). Temperaturas acima de 45 a 50°C durante o processamento, são prejudiciais à sobrevivência do probiótico. O tempo de exposição a temperaturas mais altas deve ser reduzido, a fim de diminuir a morte celular das bactérias (TRIPATHI; GIRI, 2014).

TABELA 4: Tolerância de *L. rhamnosus*, livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à tratamentos térmicos.

Metodologia	Tratamentos térmicos (°C)					
	Viabilidade (%)					
	28 ^A	55 ^B	65 ^C	75 ^D	85 ^E	95 ^F
Controle^a	100	74,97±1,44 ^{CDEFbc}	57,27±1,17 ^{ABFbc}	54,86±1,11 ^{ABEFbc}	44,85±1,40 ^{ABDbc}	38,74±1,17 ^{ABCDbc}
Extrusão^b	100	101,78±1,35 ^{EFa}	100,68±1,2 ^{EFa}	97,11±1,18 ^{EFa}	87,89±1,13 ^{ABCDa}	76,89±1,26 ^{ABCDa}
Emulsificação^c	100	109,23±1,50 ^{EFa}	106,73±1,25 ^{EFa}	103,13±1,20 ^{ABEFa}	95,15±1,17 ^{ABCDa}	89,67±1,49 ^{ABCDa}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a - c} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A - F} Para cada tratamento térmico, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

5.4 PROPRIEDADES DE FUNCIONALIDADES FISIOLÓGICAS

5.4.1 Tolerância a diferentes valores de pH e concentrações de sais biliares

Quanto ao pH, houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre as metodologias extrusão e emulsificação no pH 7,2 em 3 horas de exposição, pH 3 em 1 hora de exposição e no pH 2 com 1 hora de exposição (TABELA 5). Também houve diferença ($P < 0,05$) entre o controle e as metodologias de extrusão e emulsificação no pH 2 com 1 hora de exposição e 2 horas de exposição, e pH 3 com uma hora de exposição, entre as três metodologias. Também nota-se que houve diferença significativa ao longo do período de exposição para a maioria dos pHs. Pode-se perceber que nos pHs 7,2 e 5, houve uma diminuição e posterior aumento da viabilidade das bactérias ao longo do tempo, para todas as metodologias. O pH 3 se mostrou o mais agressivo para as bactérias encapsuladas por extrusão, chegando a 0% de viabilidade nos tempos 2 e 3. Com 3 horas de exposição a condição de pH 2, todas as contagens deram 0%, mostrando que a bactéria não conseguiu se adaptar à condição de estresse prolongado provocado pelo baixo pH. Porém com 1 hora de exposição ao pH 2, tanto as bactérias encapsuladas

por extrusão como por emulsificação apresentaram alta viabilidade, 94,28% e 99,9%, respectivamente, enquanto o controle apresentou contagens de 40,42%. As cápsulas feitas pela metodologia de emulsificação foram mais resistentes que por extrusão a baixas condições de pH, apresentando viabilidade de 70,47% em pH 2 por 2 horas, enquanto que por extrusão a viabilidade foi de 0%, e o experimento controle 28,73%.

Alguns autores observaram que a redução do pH representa um desafio para a sobrevivência dos probióticos em vida livre. Nesse estudo, observou-se que uma redução no pH de 5,6 para 4,9, após a fermentação, afetou a sobrevivência dos probióticos (*L. rhamnosus*) quando aplicados em salsicha fermentada (ERKKILA et al, 2001). Outro estudo, utilizando bifidobactérias micrencapsuladas por spray dry, demonstrou um decréscimo de, aproximadamente, 4 log no número de células livres após 3 horas de incubação a pH 2, quando comparado com as cepas encapsuladas, que tiveram diminuições de cerca de 2 log. As microcápsulas produzidas com leite reconstituído e inulina apresentaram maior contagem ($P < 0,05$) quando incubadas em pH 3,0 e 2,0, após 3 horas de exposição (FRITZEN-FREIRE et al, 2013). Esses resultados não estão de acordo com o presente estudo, onde encontrou-se que o pH 3 foi o que mais afetou as microcápsulas por extrusão em 2 e 3 horas de exposição.

TABELA 5: Tolerância de *L. rhamnosus*, livre e encapsulada por extrusão e emulsificação à ácidos.

Tolerância a ácidos (tempo-horas)	Metodologia		
	Controle ^A	Extrusão ^B	Emulsificação ^C
7,2^a		c	c
0h ^e	100	100	100
1h ^f	86,78±2,05 ^e	86,66±2,27 ^h	83,17±1,72 ^e
2h ^g	71,17±1,47 ^e	85,57±1,01 ^e	91,89±1,08
3h ^h	71,26±1,18 ^e	99,72±2,15 ^{Cf}	77,69±1,11 ^B
5^b		c	

0h ^e	100	100	100
1h ^f	49,23±1,23 ^{gh}	76,59±1,89	75,06±1,03 ^{eh}
2h ^g	71,93±1,28 ^{fh}	90,48±1,92	85,82±0,84 ^{eh}
3h ^h	61,01±1,03 ^{fg}	99,86±1,11	52,23±1,28 ^{efg}
3^c		abd	ad
0h ^e	100	100	100
1h ^f	72,22±1,39 ^B	40,27±1,06 ^{AC_h}	67,72±1,16 ^{B_eg_h}
2h ^g	51,24±1,92 ^{BC}	0 ^{AC_e}	37,66±1,18 ^{AB_efh}
3h ^h	56,41±1,58	0 ^{eg}	0 ^{efg}
2^d		c	bc
0h ^e	100	100	100
1h ^f	28,73±1,56 ^{BC_eh}	0 ^{AC_eh}	70,47±0,03 ^{AB_eg_h}
2h ^g	0 ^{ef_h}	0 ^{ef}	0 ^{ef_h}
3h ^h	40,42±1,31 ^{BC_fg}	94,28±1,23 ^{AC_fg}	99,9±0,24 ^{AB_fg}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a-h} Para cada pH e tempo, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A-C} Para cada metodologia, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

Observa-se que, quanto à tolerância aos sais de bile, as bactérias encapsuladas por emulsificação apresentaram as melhores taxas de sobrevivência (40,03%) na maior concentração de sais de bile, enquanto por extrusão foi de 16,32% e o experimento controle apresentou um crescimento de 9,57%, havendo diferença significativa ($P < 0,05$) entre elas (TABELA 6). Com isso, pode-se perceber que a encapsulação foi eficaz em proteger as bactérias da ação dos sais biliares.

A tolerância às tensões biliares e ácidas é um indicador útil do desempenho tecnológico da cepa em alimentos probióticos (TRIPATHI; GIRI, 2014). A sobrevivência do *Bifidobacterium* BB-12 livre e microencapsulada foi avaliada por até 6 horas após a exposição ao meio de levedura de leite contendo 0,5% e 1% g de sais de bile, mostrando que a partir das contagens iniciais de bifidobactérias livres e microencapsuladas, os números declinaram de forma constante à medida que a

concentração de bile e o tempo de incubação aumentavam. Porém, a taxa de diminuição foi muito maior nas células livres (CARVALHO et al, 2017). Estes resultados estão de acordo com os obtidos por CHANDRAMOULI et al,(2004) e IYER; KAILASAPATHY (2005), que usaram as mesmas concentrações de sais biliares que os empregados no presente estudo e observaram que as bactérias probióticas encapsuladas podem sobreviver em maior número do que as células probióticas livres.

Tabela 6: Tolerância de *L. rhamnosus*, livres e encapsulada por extrusão e emulsificação a sais biliares

Metodologia	Tolerância a sais de bile					
	Viabilidade (%)					
	0% ^A	0,1% ^B	0,15% ^C	0,2% ^D	0,3% ^E	1% ^F
Control^a	100	58,71±1,50 ^{bc}	65,51±1,07 ^{bEF}	57,47±1,44	20,11±2,04 ^{bcB}	9,57±1,54 ^{bcB}
Extrusão^b	100	99,81±2,33	99,59±1,20 ^{ac}	96,05±1,18	64,49±2,06 ^{ac}	16,32±1,74 ^{ac}
Emulsificação^c	100	91,60 ±1,50	86,48±1,20	79,79±2,17 ^{ab}	76,38±1,25 ^b	40,03±1,25 ^{ab}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a - d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A-F} Para cada concentração de sais biliares, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

5.4.2 Ensaio de sobrevivências das células probióticas sob exposição à enzimas digestivas

Para avaliar a resistência das cápsulas ao longo do trato gastrointestinal, realizaram-se dois experimentos, a tolerância a enzimas digestivas (pepsina, sais de bile e pancreatina) e a simulação do trato gastrointestinal. Com relação à tolerância às enzimas (TABELA 7), pode-se notar que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias de vida livre (controle) e as submetidas à encapsulação por extrusão e emulsificação, quando submetidas a diferentes condições pH em solução de pepsina, sais de bile e pancreatina. A solução de pepsina com o pH 2 foi o que causou

maior redução na viabilidade das bactérias, chegando a 0% de crescimento para o controle e extrusão. A metodologia de emulsificação se mostrou mais eficaz na proteção das bactérias, tendo uma sobrevivência maior (51,97%; 85,30% e 68,28% para pH 3, 2,5 e 2, respectivamente) que o experimento controle (85,30%; 47,03% e 0% para pH 3, 2,5 e 2, respectivamente) e extrusão (46,26%; 0%; 0% para pH 3, 2,5 e 2, respectivamente) em todos os pHs da solução de pepsina ($P < 0,05$).

Quanto à tolerância aos sais de bile, utilizou-se uma concentração de 0,6%, simulando a concentração produzida pelos seres humanos na digestão a nível intestinal. Observa-se que as cápsulas feitas por emulsificação (39,37%) mais uma vez conseguiram proteger com mais eficiência as bactérias que a metodologia de extrusão (34,01%) ou as bactérias em vida livre (0%). Houve diferença significativa ($P < 0,05$) entre o controle e as bactérias encapsuladas, mas não houve diferença ($P > 0,05$) entre as metodologias de encapsulação, tendo ambas, protegido as bactérias frente aos sais de bile.

TABELA 7: Viabilidade de *L. rhamnosus*, livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição à enzimas digestivas

Methodology	Enzimas digestivas					
	Viabilidade (%)					
	Pepsina			Sais de bile		Pancreatina
	pH 3 ^A	pH 2,5 ^B	pH 2 ^C	pH 6,8	pH 5 ^A	pH 6,5 ^B
Inóculo inicial^a	100	100	100	100	100	100
Controle^b	51,63(±1,13) ^{acC}	47,03±(1,04) ^b	0,00 ^{acA}	9,58(±1,13) ^{acd}	67,52(±1,32) ^{ac}	46,64(±1,11) ^{acd}
Extrusão^c	46,26(±1,01) ^{abBC}	0 ^{acAC}	0,00 ^{adA}	34,01(±1,71) ^{ab}	93,67(±1,17) ^{abd}	99,70(±1,07) ^{abd}
Emulsificação^d	51,97(±1,05) ^{abcB}	85,30(±1,32) ^{bA}	68,28(±1,12) ^{abc}	39,37(±1,01) ^{ab}	53,80(±1,14) ^{abcB}	90,28(±1,45) ^{abcA}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a - d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A - C} Para cada valor de pH, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

Chen et al (2017) observaram que, com tempo suficiente, o sal biliar pode penetrar as microcápsulas e danificar as células probióticas internas, o que explica a baixa viabilidade das células comparando-se com a viabilidade durante a exposição à pepsina e pancreatina. Pode-se perceber claramente que os sais de bile interferem bem mais na viabilidade das bactérias que a variável do pH. Kurdi et al (2006) observaram que a presença de sais biliares no citoplasma bacteriano, causa distúrbios na integridade da membrana e, conseqüentemente, morte das células. Apesar do pH do suco biliar simulado ser de 6,8, próximo ao pH ótimo da cepa bacteriana, o sal biliar pode atravessar a membrana celular bacteriana, danificar o DNA e as proteínas, causar vazamento de componentes intracelulares e, eventualmente, levar à morte bacteriana (BEGLEY et al, 2005). Ranadheera et al (2014) também mostraram que a presença de sais biliares demonstrou uma influência significativa na redução da viabilidade de probióticos não encapsulados no leite fermentado de cabra, durante a tolerância gastrointestinal in vitro.

Em estudo similar para investigar melhor o efeito protetor de microcápsulas de whey protein revestidas com alginato em *L. bulgaricus*, em suco gástrico simulado, os autores utilizaram três níveis diferentes de pH (2,0, 2,5 e 3,0), para levar em consideração a variável acidez estomacal causada pelo efeito tampão da matriz alimentar (CHEN et al, 2017). Tanto no suco gástrico simulado quanto nos ensaios de tolerância à bile, os autores encontraram que a mortalidade das células probióticas reduziu significativamente quando foram protegidas pela microencapsulação por proteína whey isolada em comparação com as células livres. A redução da contagem de células viáveis foi de 6,40 para células livres e 1,19 log UFC/g para as células microencapsuladas após 2 horas de tratamento em suco gástrico simulado (pH 2,0), e de 7,19 para células livres e 1,73 log UFC/ g para as células microencapsuladas após o ensaio de tolerância biliar por 1 hora. As taxas de sobrevivência de *L. bulgaricus* nos três níveis de pH foram mantidas acima de 80% em 0,5 h de exposição. Ao final da incubação, as taxas de sobrevivência de *L. bulgaricus* foram de 68,0%, 74,6% e 83,1%, respectivamente.

Quanto à solução de pancreatina, o comportamento foi o mesmo, as bactérias encapsuladas mostraram sobrevivência bem maior que em vida livre. Houve diferença entre as metodologias de encapsulação ($P < 0,05$) e entre as metodologias e o experimento controle (67,52%; 46,64% para pH 5 e 6,5 respectivamente) para com as

bactérias encapsuladas por extrusão (93,67%; 99,70% para pH 5 e 6,5 respectivamente) e emulsificação (53,80%; 90,28% para pH 5 e 6,5 respectivamente) (Figura 9). Esse comportamento das bactérias frente às enzimas digestivas, mostra que a encapsulação protegeu *L. rhamnosus* e reduziu os danos causados pelas condições de estresse que a mudança de pH e as próprias enzimas podem causar. Visualmente, nessa etapa, observou-se a desintegração das microcápsulas com liberação do *L. rhamnosus*.

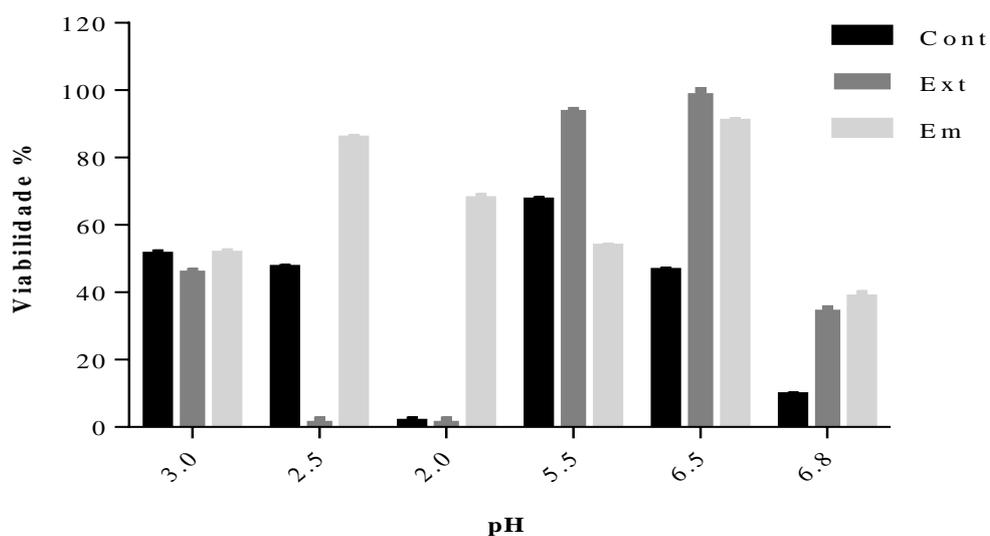


Figura 9. Viabilidade de livre e encapsulado por extrusão e emulsificação de *L. rhamnosus* após exposição a condições gastrointestinais simuladas. Legenda: Cont (células livres); Ext (Extrusão); Em (Emulsificação).

Em estudo semelhante, quando *L. bulgaricus* foi exposto ao suco intestinal simulado, as microcápsulas whey protein revestidas com alginato se desintegravam rapidamente, devido à instabilidade do revestimento de alginato em ambiente alcalino e subsequente hidrólise pela tripsina (enzima utilizada na simulação). De acordo com observações microscópicas, as microcápsulas revestidas com alginato podem se desintegrar completamente dentro de 30 minutos. As microcápsulas não revestidas se desintegraram ainda mais rápido. A prevenção de danos causados pelo suco gástrico hostil e ambientes biliares e a liberação direcionada no intestino são pré-requisitos para que as células probióticas possam ter benefícios à saúde (CHEN et al, 2017).

Em outro estudo simulando as condições de passagem pelo duodeno, os autores encontraram valores de 72,76% para as bactérias em vida livre e até 100,38% para encapsuladas, mostrando que essa etapa é a mais prejudicial às bifidobactérias não encapsuladas. Nessa etapa, Kurdi et al,(2006) observaram a presença de sais biliares no citoplasma bacteriano, causando distúrbios na integridade da membrana e, conseqüentemente, morte celular. Ranadheera et al,(2014) também mostraram que a presença de sais biliares demonstrou uma influência significativa na redução da viabilidade de probióticos não encapsulados no leite fermentado de cabra durante a tolerância gastrointestinal in vitro. Os autores observaram que o aumento do pH para 5 foi favorável para a sobrevivência das células probióticas microencapsuladas. (CARVALHO et al, 2017).

5.4.3 Ensaio de sobrevivências das células probióticas sob condições gastrointestinais simuladas

Com relação à simulação do trato gastrointestinal, pode-se notar que houve diferença estatística significativa ($P < 0,05$) entre as bactérias de vida livre (controle) e as submetidas a encapsulação por extrusão e emulsificação, quando submetidas a diferentes condições pH em solução de pepsina, sais de bile e pancreatina. Não houve diferença significativa ($P > 0,05$) entre as colunas (condições de pH) (TABELA 8). Durante a simulação da passagem das bactérias livres e encapsuladas pelo estômago (pepsina), houve redução gradual do pH até atingir o pH 2, semelhante ao que ocorre durante a digestão. Pode-se perceber que não houve diferença significativa com a diminuição de pH para cada metodologia, havendo diferença apenas das metodologias entre si. Pode-se perceber que quando houve diminuição do pH de 5,5 para 3,8, houve aumento na viabilidade das bactérias em todas as metodologias, mostrando que há atividade metabólica, mesmo após a encapsulação. Esse comportamento de crescimento da bactéria após a encapsulação também foi observado quando houve exposição a tratamentos térmicos.

TABELA 8: Viabilidade de *L. rhamnosus*, livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição a condições gastrointestinais simuladas.

Metodologia	Pepsina			Pancreatina+Sais biliares	
	pH 5,5 ^A	pH 3,8 ^B	pH 2 ^C	pH 5 ^A	pH 6,5 ^B
Inóculo inicial^a	100	100	100	100	100
Controle^b	91,87(±0,88) ^{ac}	95,62(±0,87) ^{cd}	86,87(±0,88) ^{acd}	91,87(±1,02) ^{cd}	90,62(±0,9) ^a
Extrusão^c	96,69(±0,32) ^{ab}	108,46(±1,1) ^b	99,35(±0,49) ^{bd}	114,15(±0,44) ^d	93,38(±0,71) ^a
Emulsificação^d	83,01(±2,5) ^{ab}	99,02(±0,4) ^b	106,04(±0,35) ^{abd}	81,91(±1,5) ^{ac}	92,65(±1,09) ^a

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a - d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A-C} Para cada valor de pH, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

Estudo recente avaliou a sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 em vida livre e encapsulada com leite em pó de cabra (com ou sem gordura adicionados ou não de prebióticos). Os autores observaram que as microcápsulas foram eficientes em proteger as bactérias em condições de pH baixo (simulação da passagem pelo esôfago-estômago), encontrando valores de 85,46% para as bactérias em vida livre e 101,71% nas bactérias encapsuladas (CARVALHO et al, 2017). Esse resultado está de acordo com os encontrados neste estudo, mostrando aumento da viabilidade das bactérias (atividade metabólica) ao longo da passagem pelo estômago.

Prisco et al (2015) avaliaram os resultados de contagens viáveis e porcentagem de sobrevivência de células de *L. reuteri* livres e microencapsuladas com alginato e alginato quitosana, após a exposição a condições simuladas gastrintestinais. Os resultados mostram que as células livres eram muito sensíveis à solução de simulação gástrica, apresentando uma redução significativa de 2,09 ciclos de log após 3 horas, resultando em uma porcentagem de sobrevivência inferior a 1%, resultado muito inferior aos encontrados no presente estudo, mostrando também que *L. rhamnosus* é muito resistente a condições gástricas simuladas. Os autores também observaram que tanto microcápsulas de alginato quanto de quitosana-alginato conferiram resistência às células de *L. reuteri*, em condições gastrointestinais, quando comparadas às células livres.

Durante a simulação da passagem pelo intestino (pancreatina + sais biliares), nota-se também alta sobrevivência das bactérias, destacando-se a metodologia de extrusão que no pH5 apresentou aumento na taxa de crescimento, chegando a 114,15% (Figura 10). Pode-se perceber que, mesmo havendo diferença significativa entre as metodologias e o experimento controle, todos apresentaram altas taxas de sobrevivência (acima de 80%), mostrando que *L. rhamnosus* tem um alto potencial probiótico por sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal e ainda manter uma viabilidade acima de 90%, tanto para as bactérias microencapsuladas quanto em vida livre. Apesar de não ter havido diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as metodologias no final da simulação do processo digestivo (pancreatina+sais biliares, ph 6,5), pode-se perceber que as bactérias encapsuladas apresentaram maior viabilidade que as bactérias em vida livre, (90,62% controle; 93,38 extrusão; e 92,65% emulsificação).

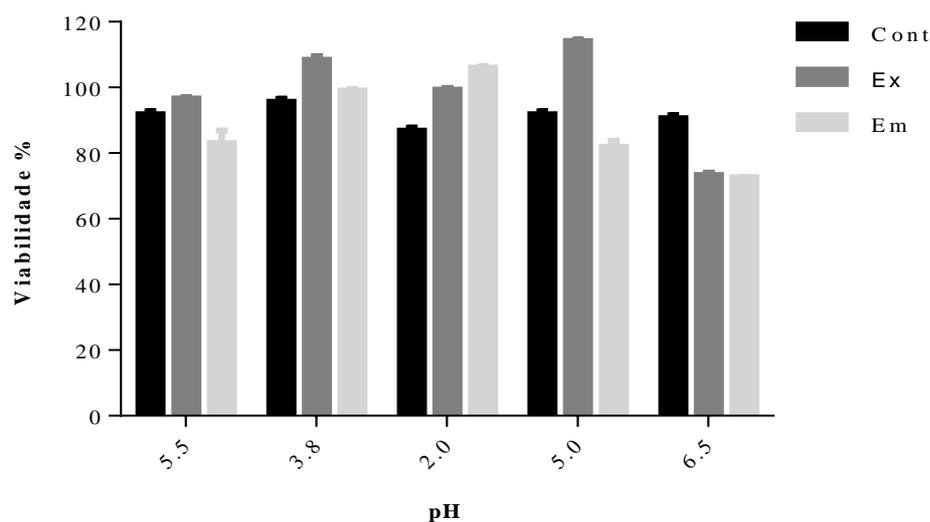


Figura 10. Viabilidade de *L. rhamnosus*, livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, após exposição a condições gastrointestinais simuladas. Legenda: Cont (Controle- células livres); Ext (Extrusão); Em (Emulsificação)

Madureira et al (2011) relatam que alguns micro-organismos, uma vez atingindo a porção final do intestino delgado e grosso, possuem a capacidade de aderir à parede do intestino e desempenhar suas atividades biológicas desejadas. Essa propriedade de aderência às células intestinais tem sido bem descrita para o probiótico

L. rhamnosus (DEEPIKA et al, 2009). Autores demonstraram que *L. rhamnosus* sobrevive à passagem pelo trato gastrointestinal e consegue permanecer por alguns dias na microbiota do intestino, sem que haja uma nova suplementação oral, o que parece ser uma característica importante na prevenção de certas doenças intestinais (KUMPU et al, 2013).

Simulando as condições de passagem pelo duodeno, autores encontraram valores de 72,76% para as bactérias *Bifidobacterium* BB-12 em vida livre e até 100,38% para encapsuladas com leite em pó de cabra (com ou sem gordura adicionados ou não de prebióticos), mostrando que essa etapa é a mais prejudicial às bifidobactérias não encapsuladas. Os autores também observaram que o aumento do pH para 5 foi favorável para a sobrevivência das células probióticas microencapsuladas (CARVALHO et al, 2017).

Prisco et al (2015) avaliaram os resultados de contagens viáveis e porcentagem de sobrevivência de células de *L. reuteri* livres e microencapsuladas com alginato e alginato quitosana. Os autores observaram que em solução de simulação intestinal, o tratamento de células livres durante 4 horas levou a uma redução de 0,82 ciclos log, o que se traduz em cerca de 16% de sobrevivência celular. Tanto microcápsulas de alginato quanto de quitosana-alginato conferiram resistência a células em condições gastrointestinais quando comparadas as células livres. Os resultados encontrados no presente estudo foram melhores que os encontrados pelos autores supracitados, mostrando alta resistência de *L. rhamnosus* tanto em vida livre, quanto microencapsulados.

Alguns autores avaliaram como ocorre a liberação das bactérias encapsuladas com alginato-quitosana ao longo do trato gastrointestinal no processo digestivo. A liberação do probiótico encapsulado após a ingestão do alimento pode ocorrer em duas etapas: primeiramente a quitosana inicia sua dissolução no estômago, devido ao pH ácido, e termina de ser degradada pela microbiota que está disponível no cólon; em seguida, ocorre a solubilização do gel de alginato, pelo sequestro dos íons de cálcio no mesmo local (CHÁVARRI et al, 2010; HEJAZI; AMIJI, 2003). Hejazi; Amiji (2003), considerando as propriedades biomucoadesivas de polímeros naturais, observaram que o sistema de microcápsulas de alginato-quitosana apresenta potencialidade para atingir diretamente o cólon sem perdas significativas de bactérias, o que foi observado no presente estudo quando *L. rhamnosus* foram microencapsulados por extrusão e emulsificação com matriz alginato-quitosana. Outros autores também sugeriram que a

suplementação de alimentos probióticos, após a refeição, pode ser mais benéfica para manter a alta viabilidade dos probióticos (CHEN et al, 2017).

5.5 VIABILIDADE E ESTABILIDADE DAS CÁPSULAS APLICADAS EM LEITE EM PÓ E UHT (VIDA DE PRATELEIRA)

Atualmente, há uma gama de produtos com alegação funcional probiótica, porém a grande maioria se encontra em forma líquida, como sucos ou produtos lácteos. Os produtos lácteos mais utilizados como matriz para aplicação de probióticos são iogurtes, queijos, sorvetes, sobremesas lácteas, fórmulas infantis (KENT; DOHERTY, 2014). Devido a isso, outras matrizes alimentares vêm sendo exploradas para aumentar o consumo de alimentos contendo probióticos, podendo o leite em pó representar uma boa alternativa de aplicação, por ser amplamente consumido no mundo por todas as faixas etárias, além de apresentar fácil acesso, boa aceitação e ótima qualidade nutricional, mostrando-se uma excelente matriz alimentar para a adição de probióticos microencapsulados com matriz de quitosana-alginato, por ser biodegradável e ter baixa toxicidade. A aplicação de microcápsulas de *L. rhamnosus* revestidas com alginato-quitosana em leite em pó e UHT ainda não foi explorada no meio científico e na indústria alimentícia, sendo então uma alternativa promissora para tornar os probióticos mais consumidos no dia a dia.

Durante o processamento e armazenamento de alimentos, as bactérias probióticas, se adicionadas à matriz alimentar, ficam inevitavelmente expostas a várias condições estressantes (estresse oxidativo, temperatura, variações de pH e acidez), que acabam afetando sua sobrevivência (DE PRISCO et al, 2015). Ao considerar os efeitos dos fatores de estresse supracitados, é importante reconhecer a exigência de que qualquer produto alimentar probiótico deve conter pelo menos 10^6 a 10^7 UFC/g das bactérias probióticas viáveis no momento do consumo, a fim de ter efeitos benéficos do probiótico exercido em saúde humana (Comitê de Especialistas FAO / WHO, 2002). Neste estudo, portanto, testamos a sobrevivência de células livres e microencapsuladas por extrusão e emulsificação em leite em pó e UHT.

A vida de prateleira foi avaliada através da viabilidade, expressa em percentual de crescimento de *L. rhamnosus* microencapsulados, adicionados ao leite em pó e UHT, em temperatura refrigerada (4°C), ao longo de 28 dias. Pode-se notar que, em ambas as metodologias de encapsulação e tipos de leite, houve aumento no crescimento da bactéria com relação ao primeiro dia de incubação e, depois, diminuição gradual

(Figura 11). Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as metodologias e tipos de leite. Também não houve diferença estatística ($P > 0,05$) no crescimento da bactéria ao longo do armazenamento em leite UHT, diferentemente do leite em pó, que apresentou redução significativa ($P < 0,05$) na cápsula feita por extrusão (de 100% para 89,35%) e não apresentou diferença significativa por emulsificação, comparando-se o primeiro com o último dia de armazenamento (TABELA 9). As cápsulas feitas por extrusão e aplicadas no leite em pó apresentaram comportamento diferente das outras em questão. Pode-se notar que houve diminuição no crescimento, depois houve um aumento e posterior diminuição. Nas outras amostras, o padrão foi o mesmo, houve aumento do crescimento do sétimo ao décimo quarto dia de armazenamento, só diminuindo a partir do dia 21 ao dia 28.

TABELA 9: Viabilidade de *L. rhamnosus*, livres e encapsulados por extrusão e emulsificação, incorporados ao leite em pó e UHT, armazenados a 4 °C durante 28 dias.

Metodologia	Dias de armazenamento				
	0 ^A	7 ^B	14 ^C	21 ^D	28 ^E
Extrusão					
UHT ^a	100	114,88 (±1,07)	116,18 (±1,06)	113,29 (±1,06)	112,28(±2,18)
Leite em pó ^b	100	91,91 (±1,12)	91,91 (±1,03) ^E	106,06 (±1,40)	89,35 (±0,32) ^C
Emulsification					
UHT ^c	100	105,22 (±1,29)	109,20 (±2,10)	108,52 (±2,08)	105,90(±1,16)
Leite em pó ^d	100 ^{BC}	121,86 (±2,03) ^{ACDE}	114,98 (±2,07) ^{ABDE}	105,81 (±2,16) ^{BD}	101,37 (±1,0) ^{ACD}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a-d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A-E} Para cada dia de armazenamento, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados em Student t.

Para avaliar se estavam adequadas as quantidade de bactérias viáveis segundo a FAO/WHO (2002), podemos converter os valores percentuais em valores de logs. Para extrusão, encontrou-se 112,28% (8 logs UFC/g) e 89,35% (6,86 logs UFC/g) para

leite UHT e em pó, respectivamente. Para emulsificação, os valores encontrados foram 105,90% (7,93 logs UFC/g) e 101,37% (6,70 logs UFC/g) para leite UHT e em pó, respectivamente. Esses valores mostram que, ao longo de 28 dias, ambas as metodologias de encapsulação e tipo de matriz de leite foram eficientes em manter as concentrações adequadas e recomendadas para consumo (Figura 11).

Alvarado-Reveles et al (2018) avaliaram o crescimento de *L. rhamnosus* encapsulado em proteínas de soro de leite com frutanos e sem frutanos, em leite de cabra, após 14 dias de armazenamento a -20°C . Após o período de armazenamento, as cápsulas de proteínas de soro de leite com frutanos em leite de cabra continham $1,08 \times 10^{10}$ UFC/mL de *L. rhamnosus*, enquanto que encapsulado apenas com proteínas do soro do leite, atingiu 3×10^9 UFC/mL. Os autores concluíram que os frutanos estimularam o crescimento do probiótico, além de proteger as células do estresse ácido e oferecer um microambiente favorável e melhor substrato de crescimento.

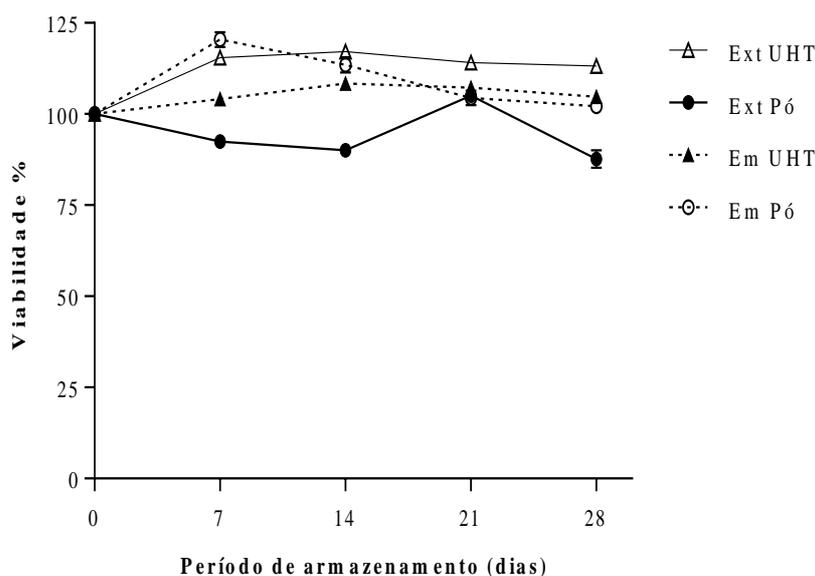


Figura 11. Viabilidade de *L. rhamnosus*, livre e encapsulado por extrusão e emulsificação, incorporado ao leite em pó e UHT, armazenados a 4°C . Legenda: Ext UHT (metodologia de extrusão e aplicação em leite UHT); Ext Pó (metodologia de extrusão e aplicação em leite em pó); Em UHT (metodologia de emulsificação e aplicação em leite UHT); Em Pó (metodologia de emulsificação e aplicação em leite em pó)

Os leites UHT e em pó adicionados de microcápsulas de alginato-quitosana, pelas metodologias de extrusão e emulsificação, também foram avaliados quanto aos aspectos de qualidade físico-química, como acidez titulável, pH, sólidos solúveis e umidade, nos mesmos intervalos utilizados para avaliar a viabilidade das cápsulas (TABELA 10).

Quanto à acidez titulável, pode-se notar um padrão, onde essa medida aumenta ao longo do tempo para o leite UHT e diminui para o leite em pó. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as metodologias e entre os tipos de leite, porém houve diferença significativa ($P < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento. Pode-se observar aumento significativo da acidez para o leite UHT, de 1,9 para 2,6, e de 1,7 para 2,6 para extrusão e emulsificação, respectivamente, e diminuição significativa para o leite em pó, de 2,6 para 1,6, e de 2,5 para 1,5 para extrusão e emulsificação, respectivamente. Em acordo com o presente estudo, autores relatam um aumento na acidez com uma diminuição no pH com o passar do tempo aumentando em amostras de leite UHT (SIDDIQUE et al, 2016). Um aumento na acidez titulável pode ser observado ao longo do armazenamento de leite UHT, devido à lactose, que é degradada em ácidos que são responsáveis por um aumento na acidez titulável do leite (RICHARDS et al, 2016). Quanto ao leite em pó, o comportamento foi diferente, apresentando diminuição da acidez ao longo do armazenamento, porém ainda encontrando-se dentro dos parâmetros de qualidade.

Quanto ao pH, também nota-se um padrão, onde essa medida aumenta no dia 7 de armazenamento, e, a partir do dia 14, apresenta uma diminuição gradual para ambos as metodologias e tipos de leite. Não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) entre as metodologias e entre os tipos de leite nos dias de armazenamento, porém houve diferença significativa ($P < 0,05$) ao longo do tempo de armazenamento, havendo diminuição significativa desse parâmetro do dia zero ao dia 28. Richards et al (2016) encontraram valores de pH de que variaram de 6,7 a 6,5. Os autores relataram que o nível e a extensão da diminuição do pH estavam relacionados à idade de gelificação do leite. Outros autores encontraram valores de pH de 6,79 em amostras de leite UHT com 0 dias de armazenamento a 10°C, enquanto pH significativamente baixo (6,42) foi encontrado em amostras de leite UHT aos 90 dias de armazenamento a 37°C. Os autores observaram que, durante o armazenamento do leite UHT, ocorreu declínio no pH. Os resultados desse estudo estão em acordo com os encontrados por Siddique et al (2016) que observaram que, ao longo do período de armazenamento, há um declínio no pH e

aumento na acidez do leite UHT, aumentando a concentração de ácido láctico devido à degradação da lactose. O contrário pode ser observado no leite em pó, onde houve diminuição da acidez e aumento do pH até o dia 28 de armazenamento.

Quanto aos sólidos solúveis, pode-se observar diminuição gradual ao longo do armazenamento. Nota-se uma queda brusca ($P < 0,05$) dos sólidos solúveis para o leite em pó em ambas as metodologias. O leite UHT conservou esse parâmetro de qualidade, não havendo diferença significativa ($P > 0,05$), ao longo do tempo, para a metodologia de extrusão, mas ocorreu redução discreta para a metodologia de emulsificação. Houve diferença estatística significativa ($p < 0,05$) entre os tipos de leite ao longo do período de armazenamento. Siddique et al (2016) encontraram valores de 12,08% de sólidos solúveis no dia 0 de armazenamento, enquanto valor de 12,32% para sólidos totais foi observado em amostras de leite UHT com 90 dias de armazenamento. Os autores relacionam o aumento no teor de sólidos totais à sedimentação e separação de gordura. Os resultados deste estudo não estão em acordo com o presente estudo, que observou diminuição dos valores de sólidos solúveis ao longo do armazenamento em 28 dias. Pode-se observar diminuição significativa dos sólidos solúveis para o leite UHT, de 12,5 para 12,8, e 12,5 para 12,9 para extrusão e emulsificação, respectivamente; e ainda diminuição significativa para o leite em pó, de 14,6 para 7,1 e 14,6 para 7,4 para extrusão e emulsificação. Siddique et al (2016) observaram que, quando o total de sólidos aumentava, a umidade diminuía e isso ocorreria de forma mais significativa no armazenamento prolongado, o que explica o comportamento do leite UHT, que apresentou um aumento dos sólidos solúveis e diminuição da umidade ao longo de 28 dias. Então, o contrário também é verdadeiro, quando os sólidos solúveis diminuem, a umidade aumenta, o que explica o aumento da umidade para o leite em pó com a diminuição significativa dos sólidos solúveis ao longo do armazenamento.

Com relação à umidade, pode-se notar que não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para o leite UHT em ambas as metodologias. No leite em pó, esse comportamento foi diferente, apresentando aumento significativo ($P < 0,05$) da umidade ao longo do armazenamento. Siddique et al,(2016) encontraram valores de umidade variando de 87,92% a 86,70% em amostras de leite UHT com 0 dia e 90 dias de armazenamento, respectivamente. Enquanto que o menor teor de umidade (86,70%) foi observado em amostras de leite UHT processadas a 90 dias de armazenamento. Esses resultados vão de acordo com os encontrados no presente estudo, onde houve diminuição da umidade para o leite UHT. Para o leite em pó integral, os limites de

umidade estabelecidos são de, no máximo, 3,5%. Os resultados encontrados no presente estudo mostram valores superiores, de 5,3 e 4,2 para extrusão e emulsificação, respectivamente, no sétimo dia de armazenamento e de 8,1 e 8,4 para 7,4 para extrusão e emulsificação, respectivamente, no dia 28 de armazenamento.

TABELA 10: Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros físico-químicos em leite UHT e leite em pó, contendo *L. rhamonus* encapsulados por extrusão e emulsificação, armazenados a 4°C por 28 dias.

Metodologia	Dias de armazenamento				
	0 ^A	7 ^B	14 ^C	21 ^D	28 ^E
Acidez titulável (mmol H⁺/100 g)					
Extrusão					
UHT ^a	1,9 (\pm 0,06) ^{DE}	1,9 (\pm 0,03) ^{DEc}	2,2 (\pm 0,13) ^E	2,4 (\pm 0,06) ^{AC}	2,6 (\pm 0,13) ^{ABC}
Leite em pó ^b	2,6 (\pm 0,13) ^{BCDE}	2,0 (\pm 0,03) ^{AC}	1,8 (\pm 0,03) ^{AB}	1,8 (\pm 0,20) ^A	1,6 (\pm 0,01) ^A
Emulsificação					
UHT ^c	1,7 (\pm 0,10) ^{DE}	1,7 (\pm 0,03) ^{BDE}	2,0 (\pm 0,06) ^{CDE}	2,2 (\pm 0,13) ^{ACE}	2,6 (\pm 0,06) ^{ABCD}
Leite em pó ^d	2,5 (\pm 0,13) ^{BCDE}	2,1 (\pm 0,06) ^{AD}	2,0 (\pm 0,13) ^A	1,7 (\pm 0,10) ^A	1,6 (\pm 0,06) ^{AE}
pH					
Extrusão					
UHT ^a	6,7 (\pm 0,02) ^{BCDE}	6,9 (\pm 0,03) ^{ACDE}	6,5 (\pm 0,01) ^{ABDEcd}	6,4 (\pm 0,01) ^{ABCE}	6,3 (\pm 0,01) ^{ABCDbcd}
Leite em pó ^b	6,5 (0,07) ^B	6,9 (0,03) ^{ACDE}	6,6 (0,03) ^{Bcd}	6,6 (0,01) ^B	6,6 (0,01) ^{Bab}
Emulsificação					
UHT ^c	6,7 (\pm 0,03) ^{BCDE}	7,0 (\pm 0,01) ^{ACDE}	6,6 (\pm 0,01) ^{ABEab}	6,5 (\pm 0,01) ^{ABC}	6,4(\pm 0,01) ^{ABCDabd}
Leite em pó ^d	6,5 (\pm 0,07) ^B	6,9 (\pm 0,01) ^{ACDE}	6,7 (\pm 0,04) ^{Bab}	6,6 (\pm 0,01) ^B	6,6 (\pm 0,01) ^{Bab}
Sólidos solúveis (°Brix)					
Extrusão					
UHT ^a	12,5 (\pm 0,21) ^E	12,6 (\pm 0,07)	12,4(\pm 0,21) ^{bd}	12,4 (\pm 0,07) ^{bd}	12,8 (\pm 0,07) ^A
Leite em pó ^b	14,6 (\pm 0,07) ^{BCDE}	10,5 (\pm 0,07) ^{ACDEacd}	8,3(\pm 0,01) ^{ABDEd}	7,5 (\pm 0,07) ^{ABCD}	7,1 \pm 0,14) ^{ABCEac}
Emulsificação					
UHT ^c	12,5 (\pm 0,14) ^{BDE}	12,6 (\pm 0,07) ^A	12,45(\pm 0,07) ^E	12,4 (\pm 0,07) ^{Abd}	12,9 (\pm 0,01) ^{AC}
Leite em pó ^d	14,6 (\pm 0,07) ^{BCDE}	8,5 (\pm 0,28) ^{ACDE}	7,5 (\pm 0,14) ^{ABb}	7,4 (\pm 0,28) ^{ABac}	7,4 (\pm 0,07) ^{AB}

Umidade					
Extrusão					
UHT ^a	88,2 (±0,01) ^E	88,1 (±0,01) ^E	88,2(±0,01) ^E	88,4 (±0,09)	88,6 (±0,19) ^{ABC}
Leite em pó ^b	1,0 (±0,36) ^{BCDE}	5,3 (±0,01) ^{ACE}	5,4 (±0,01) ^{ABDE}	5,6 (±0,01) ^{ACE}	8,1 (±0,01) ^{ABCD}
Emulsificação					
UHT ^c	88,3 (±1,41)	87,7 (±0,01)	88,4(±0,01)	88,5 (±0,01)	88,4 (±0,04)
Leite em pó ^d	0,96 (±0,36) ^{BCDE}	4,2 (±0,01) ^{AE}	4,8 (±0,01) ^{AE}	4,8 (±0,01) ^{AD}	8,4 (±0,41) ^{ABCD}

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a-d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey. ^{A-E} Para cada dia de armazenamento, diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey.

5.6 ANÁLISE SENSORIAL

Várias reações enzimáticas e físico-químicas ocorrem no leite e são responsáveis pelo desenvolvimento de várias características anormais, como mudança no aroma, sedimentação, gelificação e descoloração do leite (RICHARDS et al, 2016). Tendo em vista tal fato, as cápsulas de alginato-quitosana, preparadas por extrusão e emulsificação, foram aplicadas em leite em pó e UHT e submetidas a testes de aceitação, intenção de compra e preferência (TABELA 11). As cápsulas por extrusão e emulsificação receberam escores semelhantes, não apresentando diferença estatística significativa ($P > 0,05$) para aparência, cor, aroma e sabor residual. As cápsulas aplicadas no leite UHT receberam maiores escores ($P \leq 0,05$) em relação aos parâmetros de sabor e avaliação global do produto, onde os escores caíram nas categorias de 'gostei moderadamente' a 'gostei muito'. O leite em pó recebeu escores menores que o leite UHT em relação a todos os parâmetros, sendo que pontuações caíram nas categorias de 'nem gostei, nem desgostei' a 'gostei moderadamente', mostrando que, apesar de menos aceito que o leite UHT, o produto não apresentou rejeição. Quando foi solicitado aos provadores que indicassem a intenção de compra, as pontuações caíram nas categorias de "possivelmente compraria" a "certamente compraria" para leite UHT e entre "talvez compraria" a "possivelmente compraria" para leite em pó, em ambas as metodologias de encapsulação. Porém, não houve diferença estatística significativa ($P > 0,05$), na

intenção de compra, entre os leites e as metodologias utilizadas. Em geral, esses dados indicam que, embora o leite UHT tenha apresentado melhor avaliação global, dos parâmetros sensoriais e melhor intenção de compra, o leite em pó também apresentou resultados satisfatórios. Pode-se também observar que o leite UHT, adicionado de cápsulas por emulsificação, foi o que obteve melhores resultados, mostrando-se o mais preferido pelos provadores, sendo relatado que o sabor estava muito bom e que o tamanho das cápsulas era quase imperceptível e bastante palatável. Mesmo o leite UHT adicionado de cápsulas feitas pelo método de extrusão, onde o tamanho das cápsulas é bem perceptível, não afetou negativamente a intenção de compra, sendo o segundo preferido pelos provadores.

TABELA 11: Valores médios (\pm desvio padrão) dos parâmetros sensoriais em leite UHT e leite em pó, contendo *L. rhamnosus* encapsulados por extrusão e emulsificação

Parâmetros	Metodologias			
	Extrusão		Emulsificação	
	UHT ^a	Leite em pó ^b	UHT ^c	Leite em pó ^d
Aparência	7,9 (\pm 0,86)	7,05 (\pm 1,74)	7,5 (\pm 1,75)	7,4 (\pm 1,43)
Cor	7,9 (\pm 0,94)	7,0 (\pm 1,55)	7,8 (\pm 0,91)	6,9 (\pm 1,88)
Aroma	7,2 (\pm 1,51)	7,0 (\pm 1,61)	7,9 (\pm 1,35)	7,2 (\pm 1,70)
Sabor	6,4 (\pm 2,18)	5,9 (\pm 2,28) ^c	7,28 (\pm 1,87) ^b	6,6 (\pm 2,08)
Sabor residual	6,9 (\pm 1,87)	5,7 (\pm 2,45)	7,5 (\pm 1,47)	6,5 (\pm 1,99)
Avaliação global	6,9 (\pm 1,82) ^c	6,3 (\pm 1,70)	8,1 (\pm 0,99) ^{ad}	6,8 (\pm 1,63) ^c
Intenção de compra	4,09 (\pm 1,22)	3,09 (\pm 1,41)	4,43 (\pm 0,92)	3,43 (\pm 1,28)

Valores com diferentes letras sobrescritas mostram diferença estatística ($p < 0,05$). ^{a-d} Para cada metodologia, diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma linha denotam diferenças ($P \leq 0,05$) entre os valores médios baseados no teste de Tukey.

Conclusão

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que as microcápsulas produzidas por meio da técnica de emulsificação com alginato-quitosana como agente encapsulante foram adequadas para a microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus*, enquanto que as microcápsulas obtidas por extrusão não foram tão satisfatórias observando-se todos os parâmetros avaliados.

A avaliação dos parâmetros tecnológicos das cápsulas foram satisfatórios, mostrando boa viabilidade quando submetidas a tratamentos térmicos em temperaturas medianas e altas, além de boa sobrevivência a diferentes condições de pH e sal (NaCl). Essas qualidades tecnológicas são importantes na incorporação das microcápsulas em matrizes alimentares submetidas a tratamentos térmicos e condições de baixa acidez.

Apesar de ter apresentado baixas taxas de sobrevivência, as bactérias microencapsuladas apresentaram resistência às condições gastrointestinais simuladas. Mais estudos são necessários para avaliar a correlação dos diferentes materiais encapsulantes e suas concentrações utilizadas, na resistência das cápsulas a passagem pelo TGI simulado.

L. rhamnosus encapsulado por metodologias de extrusão e emulsificação, aplicadas em leite e pó UHT, mostrou ótima viabilidade durante o armazenamento a 4°C. Além disso, o leite UHT mostrou-se uma excelente matriz para aplicação de microcápsulas em termos de viabilidade, parâmetros químicos no prazo de validade, além de apresentar uma avaliação sensorial satisfatória. Essas características podem ser favoráveis no uso dessas cápsulas no leite UHT, para que os probióticos se tornem mais consumidos pela população geral. O leite em pó também mostrou ser uma matriz promissora, com boa estabilidade e viabilidade, embora não tenha apresentado bons resultados no prazo de validade. No entanto, merece destaque, pois também apresentou boas notas sobre análise sensorial e intenção de compra.

Na literatura, são escassas as publicações que comparam métodos de encapsulação e as propriedades tecnológicas envolvidas na aplicação dessas cápsulas em matrizes alimentares, o que torna esse trabalho inovador nessa área tecnológica.

Referências

REFERÊNCIAS

ABBASZADEH, S.; GANDOMI, H.; MISAGHI, A.; BOKAEI, S.; NOORI, N. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. **Journal of the Science Food and Agriculture**, v.94, [SN], p.2210–2216, 2014.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**: Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Brasília: ANVISA, 2008.

AGUDELO, J.; A. CANO, C. GONZÁLEZ-MARTÍNEZ, A. CHIRALT, Disaccharide incorporation to improve survival during storage of spray dried *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein-maltodextrin carriers, **J FUNCT FOODS**. 37 (2017) 416–423

AGUIRRE-EZKAURIATZA, E.J.; AGUILAR-YANEZ, J.M.; RAMIREZ-MEDRANO, A.; ALVAREZ, M.M. Production of probiotic biomass (*Lactobacillus casei*) in goat milk whey: comparison of batch, continuous and fed-batch cultures. **Bioresource Technology**, v.101, n.8, p.2837-2844, 2010.

AHMED Z.; WANG, Y.; CHENG, Q.; IMRAN, M. *Lactobacillus acidophilus* bacteriocin, from production to their application: an overview. **African Journal of Biotechnology**, v.9, p.2843- 2850, 2010.

AHN, S. J.; CHOI, H.K.; CHUN, M.K.; RYU, J.M.; JUNG, J.H.; CHO, C.S. Release of triamcinolone acetonide from mucoadhesive polymer composed of chitosan and poly in vitro. **Biomaterials**, v. 23, [sn], p. 1411-1416, 2002.

ALBUQUERQUE, T. M. R.; GARCIA, E. F.; ARAÚJO, A. O.; MAGNANI, M.; SAARELA, M.; SOUZA, E. L. In Vitro Characterization of *Lactobacillus* Strains Isolated from Fruit Processing By-Products as Potential Probiotics, **Probiotics Antimicrob Proteins**. 10 (2017) 704-716.

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; ORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSELL, C.M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food hydrocolloids**, v.29, n.1, p.166-174, 2012.

ALVES, M.; PERES, C. M.; HERNANDEZ-MENDONZA, A. M.; BRONZE, R.; PERES, C.; MALCATA, F. X. Olive paste as vehicle for delivery of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* 33. **Food Research International**, v. 75, p. 61–70, 2015.

- AMERICAN PUBLIC HEALTH ASSOCIATION (APHA). **Compendium of Methods for the Microbiological Examination of Foods**. 4 ed. Washington, DC, 2001.
- AMINE, K. M.; CHAMPAGNE, C. P.; SALMIERI, S.; BRITTEN, M.; ST-GELAIS, D.; FUSTIER, P.; LACROIX, M. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of *Bifidobacterium longum* during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.56, n.1, p.111–117, 2014.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.
- ANTUNES, A. E. C.; LISERRE, A. M.; COELHO, A. L. A.; MENEZES, C. R.; MORENO, I.; YOTSUYANAGI, K. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT e Food Science and Technology**, v.54, [SN], p.125-131, 2013.
- ASAHARA, T.; SHIMIZU, T.; NOMOTO, K.; HAMABATA, T.; OZAWA, A.; TAKEDA, Y. Probiotic bifidobacteria protect mice from lethal infection with Shiga toxin-producing *Escherichia coli* O157:H7. **Infection and Immunology**, v. 72, n.4, p. 2240-2247, 2004.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official Methods of Analysis**. Washington DC, 2005.
- AUGUSTIN, M.A.; HEMAR, Y. Nano- and microstructured assemblies for encapsulation of food ingredients. **Chemical Society Review**, v. 38, [SN], p. 902–912, 2009.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. Alimentos e Nutrição, **Araraquara**, v. 16, n. 1, p. 89-97, 2005.
- AZEVEDO, V. V. C.; CHAVES, S. A.; BEZERRA, D. C.; LIA FOOK, M. V.; COSTA, A. C. F. M. Quitina e QUI: aplicações como biomateriais. **Revista Eletrônica de Materiais e Processos**, v.2, n.3, p.27-34, 2007.
- BAE, E.A.; MYUNG, J.H.; SONG, M.J.; KIM, D.H. Purification of rotavirus infection inhibitory protein from *Bifidobacterium breve* K-110. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 12, n.4, p. 553-556, 2002.
- BALDRICK, P. The safety of chitosan as a pharmaceutical excipient. **Regul Tropical Pharmacol**, v.56, [SN], p.290-299, 2010.
- BARBOSA, Y.; MARQUEZ, E.; PARRA, K.; PIÑEIRO, M.P.; MEDINA LM. Development of a potential functional food prepared with pigeon pea (*Cajanus cajan*), oats and *Lactobacillus reuteri* ATCC 55730. **International Journal Food Science Nutrition**, v.63, n.7, p.813–820, 2012.
- BEAUGERIE, L.; PETIT, J.C. Microbial-gut interactions in health and disease. Antibiotic-associated diarrhoea. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**, v. 18, n.2, p. 337- 352, 2004.
- BEGLEY, M.; GAHAN, C. G. M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625–651, 2005.

BEKHIT, M.; L. SANCHEZ-GONZALEZ, G.B. MESSAOUD, S. DESOBRY, Encapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *Lactis* on alginate/pectin composite microbeads: Effect of matrix composition on bacterial survival and nisin release, **J. Food Eng.** 180 (2016) 1-9.

BEZERRA, T. K. A. Estudo da proteólise, lipólise e compostos voláteis em queijo de coalho caprino adicionado de bactérias ácido-láticas probióticas. Dissertação (Mestrado), Universidade Federal do Paraíba, João Pessoa, 111f, 2015.

BORDERÍAS, A. J.; ALONZO, I.; MATEOS, M. New applications of fibres in foods: Addition to fishery products. **Trends in Food Science and Technology**, v. 16, p.458, 2005.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v.103, [SN], p.123-128, 2011.

BRON, P. A.; BAARLEN, P. V.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews Microbiology**, v.10, n.1, p.66–78, 2012.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, [SN], p. 467-483, 2011.

BURITI, F.C.; SAAD, S.M. Bacteria of *Lactobacillus casei* group: characterization, viability as probiotic in food products and their importance for human health. **Archivos Latinoamericanos de Nutricion**, v.57, n.4, p.373-380, 2007.

CANELLA, K.M.N.C.; GARCIA, R.B. Caracterização de QUI por Cromatografia de Permeação em Gel – Influência do método de preparação e do solvente. **Química Nova**, v.24, n.1, p.13, 2001.

CARLISE, B.; FRITZEN-FREIRE, E. S.; PRUDÊNCIO, S. S.; PINTO, I. B.; MUÑOZ, R. D.; AMBONI, M. C.. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 39-44, 2013.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C.B.; SANT'ANNA, E.S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, [SN], p. 186-193, 2012.

CECCHI, H. M. Fundamentos Teóricos e Práticos em Análise de Alimentos. Editora da UNICAMP, Campinas, São Paulo, 2001, p.212.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotics cultures of foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.45, n.1, p.61-84, 2005.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of**

Food Microbiology, v.149, n.3, p.185-193, 2011.

CHAN, E. S.; WONG, S. L.; LEE, P. P.; LEE, J. S. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium- alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225–232, 2011.

CHANDRAMOULI, V. KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n.1, p. 27-35, 2004.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35, n.1, p. 1-27, 1997.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, [sn], p.185–189, 2010.

CHEN, H.Y.; X.Y. LI, B.J. LIU, X.H. MENG, Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions, **J Funct Foods**. 29 (2017) 248–255.

CHEN, M.; A. MUSTAPHA, Survival of freeze-dried microcapsules of a-galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix, **Food Microbiol.** 30 (2012) 68-73

CHERMESH, I.; ELIAKIM, R. Probiotics and the gastrointestinal tract: Where are we in 2005? **World Journal of Gastroenterology**, v.12, n.6, p. 853-857, 2006.

COELHO, M.C. Isolamento e caracterização de bactérias do ácido láctico produtoras de bacteriocina e nas e sua aplicação no fabrico de queijo fresco. Dissertação (Mestrado em Tecnologia e Segurança Alimentar)- Departamento de Ciências Agrárias.129f. Universidade de Açores. Angra do Heroísmo. 2013.

COLLINS, Y. F.; McSWEENEY P. L. H.; WILKINSON, M. G. Lipolysis and free fat acid catabolism in cheese: a review of current knowledge. *International dairy journal*, v.13, n. 4, p. 841-866, 2003.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, [sn], p.56–67, 2012.

COPPINI, L.Z. **Fibras alimentares e ácidos graxos de cadeia curta**. In: WAITZBERG, D.L. editor. *Nutrição oral, enteral e parenteral na prática clínica*. 3ª ed. São Paulo: Atheneu; 2001. p.79-94.

CÓRDOBA, L. D. M. M. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**, v. 95, p. 315–323, 2013.

- COSTA, H. S. R.; SANTOS, K. S. C. R.; FERREIRA, E. I. QUI: derivados hidrossolúveis, aplicações farmacêuticas e avanços. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p.776-785, 2006.
- COSTA, J. M. G.; SILVA, E. K.; HIJO, A. A. C. T.; AZEVEDO, V. M.; MALTA, M. R.; ALVES, J. G. L. F.; BORGES, S. V. Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. **Powder Technology**, v.274, [SN], p.296-304, 2015.
- DE PRISCO, D.G.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool, **Trends Food Sci Technol**. 48 (2015) 27-39. ^[L]_[SEP]
- DE VOS, P.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v.20, [sn], p.292-302, 2010.
- DEEPIKA, G.; GREEN, R. G.; FRAZIER, R. A.; CHARALAMPOPOULOS, D. Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Applied Microbiology**, v.107, n.4, p.1230-1240, 2009.
- DEEPIKA, G.; R.G.GREEN, R.A. FRAZIER, D. CHARALAMPOPOULOS, Effect of growth time on the surface and adhesion properties of *Lactobacillus rhamnosus* GG, **J. Appl. Microbiol.** 107 (2009) 1230-1240.
- DENKBAS E. B.; KILICAY, E.; BIRLIKSEVEN, C.; ÖZTÜRK, E. Magnetic chitosan microspheres: preparation and characterizations, **Reactive & Functional Polymers**, v.50, p. 225, 2002.
- DERAZ, S.; KARLSSON, N.E.; KHALIL, A.A.; MATTIASSON, B. Mode of action of acidocin D20079, a bacteriocin produced by the potential probiotic strain, *Lactobacillus acidophilus* DSM 20079. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.34, p.373-379, 2007.
- DHEWA, T. **Screening, production purification and potential use of bacteriocins from lactic acid bacteria of meat and dairy food origin**. In: INTERNATIONAL CONFERENCE ON NUTRITION AND FOOD SCIENCES, 2012, Singapore. Proceedings... Singapore: IACSIT Press, 2012. v. 39, p. 35-41.
- DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; PETROVIĆ, T.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S.; LEVIĆ, S.; NEDOVIĆ, V.; KOURKOUTAS, Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT – Food Sci. Technology**, v. 71, p. 169–174, 2016.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V.V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in Cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 77, n.10, p. 2854-2864, 1994.
- DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection, **International dairy journal**, v. 15, n. 10, p. 973- 988, 2005.
- EL-DIEB, S. M.; ABD RABO, F. H. R.; BARDAN, S. M.; EL-FATTAH, A. M.; ELSHAGHABEE, F. M. F. The growth behaviour and enhancement of probiotic

viability in bioyoghurt. **International of Dairy Journal**, v.22, [SN], p.44-47, 2012.

ERKKILÄ, S.; M.L. SUIHKO, S. EEROLA, E. PETÄJÄ, T. MATTILA-SANDHOLM, Dry sausage fermented by *Lactobacillus rhamnosus* strains, **Int J Food Microbiol.** 28 (2001) 205-10.

ETCHEPARE, M.D.A.; J.S. BARIN, A.J. CICHOSKI, E. JACOB-LOPES, R. WAGNER, L.L.M. FRIES, C.R. MENEZES, Microencapsulation of probiotics using sodium alginate, **Cienc Rural.** 45 (2015) 1319–1326

FAHIMDANESH, M.; MOHAMMADI, N.; AHARI, H.; KHOSRAVI, M. A.; ZANJANI F. Z. H.; BEHROUZNASAB, K. Effect of microencapsulation plus resistant starch on survival of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium bifidum* in mayonnaise sauce. **African Journal Microbiology Research**, v.6, n.40, p.6853–685, 2012.

FAVIER, C.F.; VAUGHAN, E.E.; DE VOS, W.M.; AKKERMANS, A.D. Molecular monitoring of succession of bacterial communities in human neonates. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 68, 219-226, 2002.

FDA. Food, Drug Administration. Probiotics. New York, 2004. Disponível em: http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099. cfm. Acesso em: 20 de out. de 2014.

FERNANDES, C. E.; BENTO, R. A.; STAMFORD, T. L. M. Probióticos: aspectos fisiológicos, terapêuticos e tecnológicos. **Revista Higiene Alimentar**, v. 22, p. 16-21, 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS - FAO; WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba: FAO, 2001. 34 p. Disponível em: ftp://ftp.fao.org/esn/food/probio_report_en.pdf. Acesso em: 21 out. 2014.

FOOKS, L.J.; GIBSON, G.R. Mixed culture fermentation studies on the effects of synbiotics on the human intestinal pathogens *Campylobacter jejuni* and *Escherichia coli*. **Anaerobe**, v. 9, p. 231-242, 2003.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; E. PRUDENCIO, R.D.M.C. AMBONI, S.S. PINTO, A.N. NEGRAO-MURAKAMI, F.S. MURAKAMI, Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, **Food Res Int.** 45 (2012) 306–312.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v.69, [SN], p.365-371, 2016.

GANDOMI, H.; MISAGHI, A.; BOKAEI, S.; NOORI, N. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. **Journal of Science and Food Agriculture**. v. p. 2210–2216, 2014.

- GAON, D.; GARCIA, H.; WINTER, L.; RODRIGUEZ, N.; QUINTAS, R.; GONZALEZ, S.N.; OLIVER, G. Effect of *Lactobacillus* strains and *Saccharomyces boulardii* on persistent diarrhea in children. **Medicina (B Aires)**, v.63, n.4, p.293-299, 2003.
- GAWKOWSKI, D.; CHIKINDAS, M. L. Nondairy probiotic beverages: the next step into human health. **Beneficial Microbes**, v.4, n.2, p.127-42, 2013.
- GEORGE, M.; ABRAHAM, E. T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. **Journal of controlled release**, v. 114, [sn] p.1-14, 2006.
- GEREZ, C. L. ; G. F. VALDEZ, M.L. GIGANTE, C.R.F. GROSSO, Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Lett Appl Microbiol**, 54 (2012) 552-556
- GILLOR, O.; ETZION, A.; RILEY, M.A. The dual role of bacteriocins as anti- and probiotics. **Applied microbiology and biotechnology**, v..81, n..4, p.591-606, 2008.
- GOMES, A.M.; MALCATA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v.81, n.6, p.1492-507, 1998.
- GOMES, C. R.; VISSOTO, F.Z.; FADINI, A.L.; FARIA, E.V.; LUIZ, A.M. Influência de diferentes agentes de corpo nas características reológicas e sensoriais de chocolates diet em sacarose e light em calorias. **Ciência e Tecnologia de Alimentos Campinas**, v. 27, n. 3, p. 614-623, 2007.
- GREGORET, V.; PEREZLINDO, M. J.; VINDEROLA, G.; REINHEIMER, J.; BINETTI A. A comprehensive approach to determine the probiotic potential of human-derived *Lactobacillus* for industrial use. **Food Microbiology**, v. 34, p. 19-28, 2013.
- GROSU-TUDOR, S. S.; ZAMFIR, M.; MEULEN, R. V.; VUYST, L. Isolation of novel homopolysaccharide-producing lactic acid bacteria from Romanian raw milk and fermented dairy products. **European Food Research and Technology**, v. 237, n. 4, p. 609-615, 2013.
- HANSEN L. T.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.
- HASLER, C. M. Functional foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v. 57, [sn], p. 57-62, 2001.
- HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n.7, p. 1670-1677, 2009.
- HEJAZI, R., AMIJI, M. Chitosan-based gastrointestinal delivery systems. **Journal of Controlled Release**, v. 89, n.2, p. 151-165, 2003.

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G.R.; MERENSTEIN, D.J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R.R.; FLINT, H.J.; SALMINEN, S.; CALDER, P.C.; SANDERS, M.E. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v.11, n.8, p. 506-514, 2014.

HOESLI, C. A.; RAGHURAM, K.; KIANG, R. L. J.; MOCINECOVÁ, D.; HU, X.; JOHNSON, J. D. Pancreatic cell immobilization in alginate beads produced by emulsion and internal gelation. **Biotechnology and Bioengineering**, v.108, n.2, p.424-434, 2011.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M.R.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. **Food chemistry**, v. 111, n. 1, p. 50-55, 2008.

HOPKINS, M.J.; SHARP, R.; MACFARLANE, G.T. Age and disease related changes in intestinal bacterial populations assessed by cell culture , 16S Rna abundance, and community cellular fatty acid profiles. **Gut**, v. 48, n.2, p. 198-205, 2001

HUANG, H.Y.; TANG, Y.J.; KING, V.A.; CHOU, J.W.; TSEN, J.H. Properties of *Lactobacillus reuteri* chitosan- calcium-alginate encapsulation under simulated gastrointestinal conditions. **International Microbiology**, v.18, [SN], p.61-69, 2015.

HUTKINS, R.W. (2006) In: **Microbiology and Technology of Fermented Foods**, 1.ed. (p.475). IFT Press, Blackwell Publishing, Oxford. 2006.

IFEDUBA, E.A. C.C. AKOH, Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in maillard reaction-modified complex coacervates, **Food Chem.** 199 (2015) 524-532. [SEP]

INSTITUTO ADOLFO LUTZ – IAL. **Métodos físico-químicos para análise de alimentos**. 4. ed. São Paulo: Instituto Adolfo Lutz, 2008;

ISOLAURI, E. Probiotics in human disease. **Clinical Nutrition**, v. 73, n.6, p. 1142S-1146S, 2001.

IYER, A.; K. KAILASAPATHY, Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **J Food Sci.** 70 (2005) 18–23.

JIANG, T.; SINGH, B.; MAHARJAN, S.; LI, H.S.; KANG, S.K.; BOK, J.D.; CHO, C.S.; CHOI, Y.J. Oral delivery of probiotic expressing M cell homing peptide conjugated BmpB vaccine encapsulated into alginate/chitosan/alginate. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 88, n.3, p.766-777, 2014.

JOSHI, S. R.; KOIJAM, K. Exopolysaccharide production by a lactic acid bacteria, *Leuconostoc lactis* isolated from ethnically fermented beverage. **National Academy Science Letters**, v. 37, n. 1, p. 59-64, 2014.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v. 39, [sn], p.177-183, 2006.

- KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39-48, 2002.
- KANMANI, P.; SATISH KUMAR, R.; YUVARAJ, N.; PAARI, K.A.; PATTUKUMAR, V.; VENKATESAN ARUL. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58– 59, [sn] p.140– 147, 2011.
- KEAN, T.; THANOU, M. Biodegradation, biodistribution and toxicity of chitosan. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 62, [SN], p. 3-11, 2010.
- KHANI, S.; HOSSEINI, H. M.; TAHERI, M.; NOURANI, M. R.; IMANI FOOLADI, A. A. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. **Inflammation and Allergy Drugs Targets**, v.11, n.2, p.79-89, 2012.
- KLEESSEN, B.; SYKURA, B.; ZUNFT, H.-J.; BLAUT, M. Effects of inulin and lactose on fecal microflora, microbial activity and bowel habit in elderly constipated persons. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 65, n.5, p. 1397-1402, 1997.
- KOUPANTISIS, T.; E. PAVLIDOU, A. PARASKEVOPOULOU, Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins e cmc complex coavervates for flavour encapsulation, **Food Hydrocoll.** 57(2016) 62-71.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT**, v.39, [sn], p.177–183, 2006.
- KUMPU, M.; SWASNLJUNG, E.; TYNKKYNEN, S.; HATAKKA, K.; KEKKONEN, R.A.; JARVENPAA, S.; KORPELA, R.; PITKARANTA, A. Recovery of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* GG in tossil tissue after oral administration: randomised, placebo-controlled, double-blind clinical trial. **British Journal of Nutrition**, v.109, n.12, p.2240-2246, 2013.
- KURDI, P.; K. KAWANISHI, K. MIZUTANI, A. YOKOTA, Mechanism of growth inhibition by free bile acids in *Lactobacilli* and *Bifidobacteria*, **J. Bacteriol.** 188 (2006) 1979–1986.
- LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v.61, n.3, p.219-25, 2010.
- LAROIA, S.; MARTIN, H. Bifidobacterium as possible dietary adjuncts in cultured dairy products- a review. **Cult Dairy Prod Journal**, v. 25, p. 18-22, 1990.
- LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; SINDEREN, D.V. Getting better with bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p. 1303-1315, 2005
- LEE, J.W.; SHIN, G.J.; KIM, E.H.; KANG, H.E.; YIM, I.B.; KIM, J.Y.; JOO, H.G.; WOO, H.J. Immunomodulatory and antitumor effects in vivo by the cytoplasmic

fraction of *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum*. **Journal of Veterinary Science**, v. 5, n.1, p. 41-48, 2004.

LIDBECK, A.; NORD, C.E.; GUSTAFSSON, J.A.; RAFTER, J. Lactobacilli, anticarcinogenic activities and human intestinal microflora. **European Journal of Cancer Prevention**, v.1, n.5, 341-353, 1992.

LIEW, S.L.; ARIFF, A.B.; RAHA, A.R.; HO, Y.W. Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.137–142, 2005.

LOPES, S. P. **Desenvolvimento e caracterização de cápsulas probióticas contendo lactobacillus rhamnosus**. (Dissertação de Mestrado). Programa de pós-graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Pernambuco, 2016.

LUO, J.; ZHAO, L.; YANG, Y. Y.; SONG, G. L.; LIU, Y.; CHEN, L. J.; TANG, G. Y. Emulsifying ability and cross-linking of silk fibroin microcapsules containing phase change materials. **Solar Energy Materials & Solar Cells**. v. 147, p. 144–149, 2016.

MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465-470, 2011;

MALGANHA, L.C. **Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado**. 62 f. Dissertação (Mestrado e Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MAO, L.; MIAO, M. Structuring food emulsions to improve nutrient delivery during digestion, **Food eng rev.**, v.7, p.439-451, 2015.

MARRONE, R.; BALESTRIERI, A.; PEPE, T.; VOLLANO, L.; MURRU, N.; D'OCCHIO, M. J.; ANASTASIO, A. Physicochemical composition, fatty acid profile and cholesterol content of “Pecorino Carmasciano” cheese, a traditional Italian dairy product. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 36, n. 1-2, p. 85-89, 2014.

MARTEAU, P.R. Protection from gastrointestinal diseases with the use of probiotics. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n.2, p. S430-S436, 2001.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate- encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. **LWT-Food Science and Technology**, v.53, [SN], p.480–486, 2013.

MARTIN, M.J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M.A.; MORALES, M.E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v.27, [SN], p.15-25, 2015.

MATHAI K. Nutrição na idade adulta. In: MAHAN, L.K. editor. ESCOTT-STUMP, S. Krause – alimentos, nutrição e dietoterapia. 10ª ed. São Paulo:Roca;2002. p.261-75.

MCSWEENEY, P. L. H.; SOUSA, M. J. Biochemical pathways for the production of flavor compounds in cheeses during ripening.a review. **Lait**, v.80, n.3, p.293-324, 2000.

MENEZES, C. R.; BARIN, J.S.; CHICOSKI, A.J.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L.L.M.; TERRA, N.N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, n.7, p.1309-1316, 2013.

MERCENIER, A.; PAVAN, S.; AND POT, B. Probiotics as biotherapeutic agents: present knowledge and future prospects. **Current Pharmaceutical Design**, v.8, n.2, p.99-110, 2003.

MOKARRAN, R.R.; MORTAZAVI, S.A.; NAJAFI, M.B.H.; SHAHIDI, F.The influence of potencial probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice.**Food Research International**, v.42, n.8, p.1040-1045, 2009.

MORENO, I.; MARASCA, E.T.G.; SÁ, P.B.Z.R; MOITINHO, J.S.; MARQUEZINI, M.G.; ALVES, M.C.R.; BROMBERG, R. Evaluation of Probiotic Potential of Bacteriocinogenic Lactic Acid Bacteria Strains Isolated from Meat Products, **Probiotics Antimicrob Proteins**, v.10, [SN], p.762-774, 2018.

MORTAZAVIAN, A. M.; RAZAVI, S. H., EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, n.1, p.1-18, 2007.

MU, R.J.; Y. YUAN, L. WANG, Y. NI, M. LI, H. CHEN, J. PANG, Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with konjac glucomannan hydrogel, **Food Hydrocoll.** 76 (2018) 42-48

MUZZARELLI, R. A. A. Chitins and chitosans as immunoadjuvants and non-allergenic drug carries. **Marine Drugs**, v. 8, [SN], p.392-312, 2010.

NAG, A.; HAN, K. S.; SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 247–253, 2011.

NAZZARO, F.; P. ORLANDO, F. FRATIANNI, R. COPPOLA, Microencapsulation in food science and biotechnology, **Curr. Opin. Biotechnol.** 23 (2012) 182–186.

NIELSEN GLOBAL SERVICES. **Os produtos mais quentes do mundo. Informações sobre o crescimento de alimentos e bebidas:** relatório executivo de notícias. 2002. Disponível em: <http://www.br.nielsen.com/reports>. Acesso em: 17 out. 2014.

O'SHEA, E. F.; COTTER, P. D.; STANTON, C.; ROSS, R. P.; HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic 39 mechanisms: bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, n. 3, p. 189-205, 2012.

OESLSCHLAEGER, T.A. Mechanisms of probiotic actions - A review. **International Journal of Medical Microbiology**, v.300, n.1, p.57-62, 2010

OHLAND, C.L.; MACNAUGHTON, W.K. Probiotic bacteria and intestinal epithelial barrier function. **American Journal of Physiology-Gastrointestinal and Liver Physiology**, v.298, n.6, p. G807-G819, 2010.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, A. J. H.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 38, 2002.

OLIVEIRA, R.P.S. **O efeito da composição de cultura e da suplementação do leite no crescimento, na taxa de acidificação, na sobrevivência e no metabolismo de bactérias probióticas em leite fermentado**. 170 f. Tese (Doutorado e Tecnologia Bioquímico- Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2010.

ORRHAGE, K.; BRISMAR, B.; NORD, C.E. Effect of supplements with *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* on the intestinal microbiota during administration of clindamycin. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 7, n.1, p. 17-25, 1994.

ÖZER, B., UZUN, Y.S., KIRMACI, H.A. Effect of microencapsulation on viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-12 during kasar cheese ripening. **International Journal of Dairy Technology**, v.61, n.3, p.237–244, 2008.

OZER, B.; KIRMACI, H. A.; SENEL, E.; ATAMER, M.; HAYALOGLU, A. Improving the viability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12 and *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in white-brined cheese by micro- encapsulation. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 22–29, 2009.

PAROLO, C.C.F. **Estudo dos lactobacilos no biofilme dental**. 163 f. Tese (Doutorado em Odontologia) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2009.

PAVUNC, A.L.; BEGANOVI, C.J.; KOS, B.; BUNETA, A.; BELUHAN, S.; SUSKOVI, C.J. Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v.64, [SN], p.254-261, 2011. ^[L]_[SEP]

PINGITORE, E. V.; TODOROV, S. D.; SESMA, F.; FRANCO, B. D. G. M. Application of bacteriocinogenic *Enterococcus mundtii* CRL35 and *Enterococcus faecium* ST88Ch in the control of *Listeria monocytogenes* in fresh Minas cheese. **Food Microbiology**, v. 32, [sn], p. 38-47, 2012;

PINTO, L. A. M. ; G.A.P. MATEUS, F.O. TAVARES, A. T. A. BAPTISTA, A. K. HIRATA, M. O. SILVA, R. G. GOMES, R. C. BERGAMASCO, Evaluation of the effect of drying in feasibility microorganisms probiotics microencapsulated in alginate, **Uningá Rev.** 23 (2015) 11-14.

PONCELET, D.; BABAK, V.; DULIEU, C.; PICOT, A.A physico-chemical approach to production of alginate beads by emulsification-internal ionotropic gelation. **Colloids**

and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, v. 155, n.2–3, p.171-176, 1999.

PRANDINI, A.; SIGOLO, S.; PIVA, G. A comparative study of fatty acid composition and CLA concentration in commercial cheeses. **Journal of Food Composition and Analysis**, v. 24, n. 1, p. 55-61, 2011.

QIN, C.; LI, H.; XIAO, Q. Water-soluble of chitosan and its antimicrobial activity. **Carbohydrate Polymers**, v.63, [SN], p.367-374, 2006.

RAGAVAN, N.M.L. Process optimization for microencapsulation of probiotic yeasts, **Front. Biol.** 13(2018) 197–207

RAJAM, R.; KUMAR, S. B.; PRABHASANKAR, P.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* MTCC 5422 in fructooligosaccharide and whey protein wall systems and its impact on noodle quality. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4029–4041, 2015.

RESTA-LENERT, S.; BARRETT, K.E. Live probiotics protect intestinal epithelial cells from the effects of infection with enteroinvasive *Escherichia coli* (EIEC). **Gut**, v.52, n.7, p.988-997, 2003.

RIAZ, M.S. R. ; H.M. MEHWISH, M. SIDDIQ, Z. HAOBIN, J. ZHU, L. YAN, J. SHI, Identification, characterization, and probiotic potential of *Lactobacillus rhamnosus* isolated from human milk, **LWT-FOOD SCI TECHNOL.** 84 (2017) 271-280.

RIBEIRO, M. C.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v.66, [SN], p.424-431, 2014.

RINCON-DELGADILLO, M. I.; LOPEZ-HERNANDEZ, A.; WIJAYA, I.; RANKIN, S. A. Diacetyl levels and volatile profiles of commercial starter distillates and selected dairy foods. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 1128–1139, 2012.

RIVAS, F.P.; CASTRO, M. P.; VALLEJO, M.; MARGUET, E.; CAMPOS, C. A. Antibacterial potential of *E. faecium* strains from ewes' milk and cheese. **Food Science Technology**, v. 46, p. 428–436, 2012.

ROBERFROID, M. B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digest and Liver Disease**, v. 34, n. 2, p. 105-110, 2002.

ROOS, Y.H. (1995). Phase transitions in foods. San Diego, CA: Academic Press. M.E. Segers, S. Lebeer, Towards a better understanding of *Lactobacillus rhamnosus* GG – host interactions. **Microbial Cell Fact.** 13 (2014) 7

RUTZ, J.K.; C.D. BORGES, R.C. ZAMBIAZI, R.C. DA, S.M. DA, Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food, **Food Chem.** 202 (2016) 324-333.

- SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v.42, p.1-16, 2006. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1590/S1516-93322006000100002>>. Acesso em: 21 out. 2014.
- SANCHEZ, B.; RUIZ, L.; GUIDEMOND, M.; RUAS-MADIEDO, P.; MARGOLLES, A. To- ward improving technological and functional properties of probiotics in foods. **Trends in Food Science and Technology**, v.26, [SN], p.56-63, 2012.
- SANCHEZ, M. T.; RUIZ, M. A.; LASSERROT, A.; HORMIGO, M.; MORALES, M. E. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 67-75, 2017.
- SANDERS, M. E. Probiotics: considerations for human health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.
- SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; ALVAREZ-RAMÍREZ, L.; VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginatepectin beads and survival of entrapped *L. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v.43, [SN], p.111-117, 2010.
- SANTOS, K. M. O.; BOMFIM, M. A. D.; VIEIRA, A. D. S.; BENEVIDES, S. D.; SAAD, S. M. I.; BURITI, F. C. A.; EGITO, A. S. Probiotic caprine Coalho cheese naturally enriched in conjugated linoleic acid as a vehicle for *Lactobacillus acidophilus* and beneficial fatty acids. **International Dairy Journal**, v. 24, n. 2, p. 107-112, 2012.
- SAVADOGO, A.; OUATTARA, C. A. T.; BASSOLE, I. H. N.; TRAORE, S. A. Bacteriocins and lactic acid bacteria: a minireview. **African Journal of Biotechnology**, v. 5, n.9, p. 678-683, 2006.
- SCHIRRU, S.; TODOROV, S. D.; FAVARO, L.; MANGIA, N. P.; BASAGLIA, M.; CASELLA, S.; COMUNIAN, R.; FRANCO, B. D. G. M.; DEIANA, P. Sardinian goat's Milk as source of bacteriocinogenic potential protective cultures. **Food Control**, v. 25, [sn], p. 309-320, 2012;
- SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A.,C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, 9v.1, [SN], p.83-88, 2013.
- SHORTT C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends in Food Science and Technology**, v.10, n.12, p.411-417, 1999.
- SILVA, A.M.; BAMBIRRA, E.A.; OLIVEIRA, A.L.; SOUZA, P.P.; GOMES, D.A.; VIEIRA, E.C.; NICOLI, J.R. Protective effect of bifidus milk on the experimental infection with *Salmonella enteritidis* subsp. *Typhimurium* in conventional and gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 86, n.2, p. 331-336, 1999.
- SIMAKACHORN, N.; PICHAIPAT, V.; RITHIPORNPAISARN, P.; KONGKAEW, C.; TONGPRADIT, P.; VARAVITHYA, W. Clinical evaluation of the addition of lyophilized, heat-killed *Lactobacillus acidophilus* LB to oral rehydration therapy in

- the treatment of acute diarrhea in children. **Journal of Pediatric and Gastroenterology Nutrition**, v.30, n.1, p.68-72, 2000.
- SOHAIL, T. M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**. v. 145, p. 162–168, 2011.
- SONG, H.; YU, W.; LIU, X.; MA, X. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate–chitosan microencapsulated low density cells. **Carbohydrate Polymers**, v.108, [SN], p.10-16, 2014.
- SOTO, L.P.; L.S. FRIZZO, E. AVATANEO, M.V. ZBRUN, E. BERTOZZI, G. SEQUEIRA, G., Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves. **J Anim Sci Technol**. 165 (2011) 176-183.
- SUVARNA, S.; J. DSOUZA, M.L. RAGAVAN, Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition, **Food Sci. Biotechnol**. 27(2018) 745–753
- SZAJEWSKA, H.; WANKE, M.; PATRO, B. Meta-analysis: the effects of *Lactobacillus rhamnosus* GG supplementation for the prevention of healthcare-associated diarrhea in children. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.34, n.9, p.1079-1087, 2011.
- TAKEI, T.; YOSHIDA, M.; HATATE, Y.; SHIOMORI, K.; KIYOYAMA, S. Lactic acid bacteria-enclosing poly(epsilon-caprolactone) microcapsules as soil bioamendment. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 106, n.3, p. 268-72, 2008.
- TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Comparison of selective and differential media for the accurate enumeration of strains of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus casei* complex from commercial yoghurts. **International Dairy Journal**, v.14, n.2, p.143-149, 2004.
- TOURÉ, R.; KHEADR, E.; LACROIX, C.; MORONI, O.; FLISS, I. Production of antibacterial substances by bifidobacterial isolates from infant stool active against *Listeria monocytogenes*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 95, n.5, p. 1058-1069, 2003.
- TRABELSI, I.; BEJAR, W.; AYADI, D.; CHOUAYEKH, H.; KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; SALAH, E.B. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, [SN], p. 36-42, 2013.
- TRIPATHY, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v.9, [SN], p.225-241, 2014.
- TRUJILLO-DE SANTIAGO, G.; SAENZ-COLLINS, C. P.; ROJAS-DE GANTE, C. Elaboration of a probiotic oblea from whey fermented using *Lactobacillus acidophilus* or *Bifidobacterium*. **Journal Dairy Science**, v.95, [SN], p.6897–904, 2012.

- VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v.18, n.7, p.714–728, 2008.
- VERRUCK, S.; CARVALHO, M. W.; LIZ, G. R.; AMANTE, E. R.; VIEIRA, C. R. W.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDENCIO, E. S. 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.
- VITAGLIONE, P.; LUMAGA, R. B.; FERRACANE, R.; RADETSKY, I.; MENNELLA, I.; SCHETTINO, R. Curcumin bioavailability from enriched bread: the effect of microencapsulated ingredients. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.60, [SN], p.3357-3366, 2012.
- VITALI, B.; MINERVINI, G.; RIZZELLO, C. G.; SPISNI, E.; MACCAFERRI, S.; BRIGIDI, P.; GOBBETTI, M.; CAGNO, R. D. Novel probiotic candidates for humans isolated from raw fruits and vegetables. **Food Microbiology**, v. 31, [sn], p. 116-125, 2012;
- VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, prebiotics, and synbiotics. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, v.111, [SN], p.1–66, 2008.
- XU, M.; F. GAGNÉ-BOURQUE, M. DUMONT, S. JABAJI, Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **J. Food Eng.** 168 (2016) 52–59.
- YANG, S. C.; LIN, C. H.; SUNG, C. T.; FANG, J. Y. Antibacterial activities of bacteriocins: application in foods and pharmaceuticals. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, [SN], p. 1-10, 2014.
- YOON, K. Y.; WOODAMS, E. E.; HANG, Y. D. Production of probiotic cabbage juice by lactic acid bacteria. **Bioresource Technology**, v.97, [SN], p.1427-1430, 2006.
- ZAMORA-VEGA, R.; MONTAÑEZ-SOTO, J.L.; MARTÍNEZ-FLORES, H.E.; FLORESMAGALLÓN, R.; MUÑOZ-RUIZ, C.V.; VENEGAS-GONZÁLEZ, J.; ORTEGA, T.D.J. A. Effect of incorporating prebiotics in coating materials for the microencapsulation of *Sacharomyces boulardii*. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v.63 , n.8, p. 930–935, 2012.
- ZANJANI, M. A. K.; TARZ, B. G.; SHARIFAN, A.; MOHAMMADI, N.; BAKHODA, H.; MADANIPOUR, M. M. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* with calcium alginate-resistant starch and evaluation of survival and sensory properties in cream-filled cake. **African Journal Microbiology Research**, v.6, n.26, p.5511–5517, 2012.
- ZANJANI, M.A.K.; A. SHARIFAN, M. R. EHSANI, B. G. TARZI, A. SHARIFA, Promoting *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium adolescentis* survival by microencapsulation with different starches and chitosan and poly L-lysine coatings in ice cream, **J Food Process Preserv.** 42 (2018) e13318.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, V. G.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Revista Brasileira de Farmacologia**, v.20, n.3, p459-471, 2010.

ZOU, Q.; ZHAO, J.; LIU, X.; TIAN, F.; ZHANG, H.; ZHANG, H.; CHEN, W. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science & Technology**, v.46, n.8, p.1672–1678, 2011.

APÊNDICE A

Apêndice A: Capítulo de livro aceito pelo congresso Biomicroworld 2018

Efficiency of encapsulation and viability of *Lactobacillus acidophilus* during storage: Comparison of two probiotic encapsulation techniques

A.J.A.A. Athayde¹; L.R.R.Berger¹; E.L.de Souza²; C.E.V. de Oliveira²; H.M.A. do Nascimento²; K.F.D. Fernandes²; S.C.A.de Andrade¹; L.A.A.Lopes¹; R.C.C.Maia³; T.C.M.Stamford¹

¹Universidade Federal de Pernambuco- UFPE, 50670-901, Recife, Pernambuco, Brazil

²Universidade Federal da Paraíba- UFPB, 58051-085, João Pessoa, Paraíba, Brazil

³Universidade Federal Rural de Pernambuco-UFRPE, 52171-900, Recife, Pernambuco, Brazil

Probiotics are defined as safe strains of live microorganisms which when present in appropriate amount in the intestinal tract confer health benefits on the host. Regular and adequate ingestion of the probiotic food contained in the range of 10^8 to 10^9 CFU/g is recommended to ensure that a therapeutic minimum of 10^6 to 10^7 UFC/g reaches the colon of the intestine. Microencapsulation is a process in which probiotic cells are incorporated into an encapsulation matrix. Microcapsule protects probiotics from degradation by harmful factors in the environment and enables the controlled release of these microorganisms under particular conditions. Therefore, the objective of this study was to compare two probiotic encapsulation techniques regarding the efficacy of encapsulation and maintenance of probiotic viability (survival) in an in vitro model. Calcium Alginate-chitosan microcapsules containing probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) were prepared by extrusion and emulsification/internal gelation techniques. Evaluation of the encapsulation efficiency and viability of the probiotic was determined by suspending 1g of microcapsules containing probiotic in 10mL of distilled water containing 0,1g/100g of sodium citrate submitted to a homogenizer until complete dissolution of the capsules, to release the probiotic from the matrix. The probiotic count was made by serial dilution in 0.1% (w/w) sterile peptone water, subsequently, the cells was plated by pour-plate on MRS agar (37 ° C / 48 h under anaerobiosis) for viable cell counts. Encapsulation efficiency and probiotic viability were evaluated over 28 days. The encapsulation efficiency was approximately 99% for emulsification and 96% for extrusion on the first day. After 28 days the cell viability was approximately 61% (emulsification) and 56% (extrusion). The bacterial cell count decrease on average 4 logs over the storage period in both techniques. However, it was preserved the minimal therapeutic dose throughout the storage. The results demonstrate that the emulsification/internal gelation technique was more effective in the encapsulation and maintenance of probiotic viability and may be a promising technique in the food

industry.

Keywords: extrusion technique; emulsification/internal gelation technique; calcium-alginate-chitosan

Acknowledgements: The authors thank the Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia de Pernambuco (FACEPE-Brazil)

and Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) for financial support.

1. Introduction

In the recent years, the population has shown more interest in acquiring a good quality of life which requires a balanced diet including functional foods with probiotics [1, 2]. Therefore, the daily consumption of probiotic food products has increased significantly in developed countries, being responsible for 60-70% of the functional food marketed [3,4].

Probiotics are described by the World Health Organization (WHO) as “live organism, which when administered in adequate amounts confer health benefits to the host” [5]. They can provide many health benefits, such as: efficiency in the treatment of several intestinal disorders [6]; immune system stimulation [6, 7]; regulation of the gut microbiota composition [8]; inhibition of the pathogen growth [9]; serum cholesterol reduction, relief lactose intolerance, and completely protects against bone loss induced by estrogen deficiency [10].

Many factors may affect the viability and survival of probiotic bacteria in foods including the probiotic strains used, pH, the presence of hydrogen peroxide and dissolved oxygen, oxidative stress, the concentration of metabolites such as lactic and acetic acids, the medium buffering capacity, storage temperature, the nature of the added ingredients and food matrices [11, 12, 13].

From an exploration of the global market it raised that the currently employed probiotic strains exhibit little or no survival in final goods, showing cell loads lower than they are labelled, so the quality of the foods that carry them are still scarce [14]. Moreover, most of the consumed probiotics should remain intact while passing through the gastrointestinal tract, until reaching the targeted locations where they exert beneficial effect [15, 16]. However, gastric acid and bile are the two primary lethal factors for probiotics during the above process [16]. In this context, different approaches that increase the resistance of these sensitive microorganisms against adverse conditions have been proposed, including microencapsulation [17, 19].

Microencapsulation can be defined as the process in which cells are retained within an encapsulating membrane to reduce cell injury or cell lost, in a way that result in appropriate microorganism release in the gut [20]. Some benefits of microencapsulation of cells include: protection from bacteriophages and detrimental factors increasing survival during freeze drying, freezing and storage and converting them into a powder form easier to use, since it enhances their homogeneous distribution throughout the product [21].

However, this technique requires some specific processing steps which complicate the manufacture of the food product and increase its cost. Many challenges exist when considering microencapsulation of probiotic living cells like, probiotic strain selection for its health benefits and quantity require to have positives effects, but also stability of the cells during the processing steps and storage and finally, effects on sensory properties of the food [22]. Two encapsulation techniques stand out, emulsification and extrusion. Emulsion technique is a classic microencapsulation method. It is often chosen for the convenience to scale up [15, 23]. Extrusion technique is the most popular method because of its, simplicity, low cost and gentle formulation conditions that ensure high cell viability [24].

Therefore, the aims of this research was to compare two probiotic encapsulation techniques (extrusion and emulsification) with respect to the efficacy of encapsulation and

maintenance of *Lactobacillus acidophilus* viability (survival) in an in vitro model.

2. Materials and Methods

2.1 Materials

Lactobacillus acidophilus (LA5) was obtained from Chr. Hansen A/S (Denmark) and were inoculated into 9mL of de Man, Rogosa and Sharpe (MRS) broth (Oxoid, Melbourne, Australia) and incubated at 37 °C for 24 hours under aerobic conditions. The initial inoculum was standardized at a cell concentration of 10^9 CFU/mL. After, the inoculum was collected by centrifugation at 5000 rpm for 15min at 4°C and washed twice with sterilized distilled water. Finally, the cells were suspended in 4 mL of sterile distilled water for subsequent application to the microcapsules (adapted from [25]).

Low-molecular-weight chitosan (0.5g) (Sigma-Aldrich®) was dissolved in 100 mL of lactic acid solution (1% v/v), distilled water acidified with lactic acid (1 with pH adjusted to 5.7 - 6.0 by adding 1 mol L⁻¹ NaOH. The chitosan solution was autoclaved at 121°C for 15 min [25].

2.2 Microencapsulation of probiotics

2.2.1 Extrusion

The suspended cells were mixed with 40 mL of sodium alginate solution (2% w/v) (D 3247 AJAX Chemicals Ltd., Sydney, Australia) sterilized at 121 °C for 15 min. The cell suspension was placed in a sterile syringe and injected through a 0.11 mm needle into sterile 0.05 mol l⁻¹ CaCl₂ containing 0.1 g/100 g Span 80®. After 30 min gelification in 0.05 mol l⁻¹ CaCl₂, the beads were washed and filtered and then placed in the chitosan solution for 40 minutes in magnetic stirrer. Afterwards, they were again washed and filtered and stored under refrigeration in sterile solution of CaCl₂ 0.05 mol l⁻¹ [25] with modification.

2.2.2 Emulsification /internal gelation

The suspended cells and a solution of CaCO₃ 500mM (2mL) were mixed with 40 mL of sodium alginate solution (2% w/v) (D 3247 AJAX Chemicals Ltd., Sydney, Australia) sterilized at 121 °C for 15 min. After homogenization, the mixture was dispersed into soybean oil (200mL) by stirring in magnetic stirrer. After 15 min emulsification, 40 mL of soybean oil containing glacial acetic acid (7mL) was added to the w/o emulsion using a sterile syringe and injected through a 0.11 mm needle into the mixture, and stirring continued to permit calcium carbonate solubilisation. After this, 300mL of 0.05 mol l⁻¹ CaCl₂ added by the walls of the container and stirring in magnetic stirrer for 10 min. Then, microcapsules were settled down, the top layer oily phase was removed by aspiration and the microcapsules were harvested with two subsequent washing to remove remnant oil, filtered (Whatman No. 4) and placed in the chitosan solution for 40 minutes in magnetic stirrer. Afterwards, they were again washed and filtered and stored under refrigeration in sterile solution of CaCl₂ 0.05 mol l⁻¹ [27] with modification.

2.2.3 Enumeration of bacteria entrapped within microcapsules

Encapsulation efficiency was evaluated over 28 days (times 0, 7, 14, 21 and 28d) at 4 °C ([17] with modifications). This assay were released by homogenizing 1 g of each sample of microcapsules in 10 mL of sodium citrate solution (3% w/v). The suspension was shaken in a vortex until complete dissolution of the capsules; thereafter 0.1 mL aliquots of the dilutions were plated onto MRS agar. All of the plates were incubated in anaerobiosis at 37 °C for 48h before enumeration of encapsulated bacteria as CFU/g. All samples were analyzed in triplicate ([18] with modification). The encapsulation efficiency .

Bacteria incorporation to microparticapsules was expressed in terms of. Encapsulation efficiency (EE) and it was calculated applying:

$$EE = (N/N_0) \times 100$$

where N is the number of viable entrapped cells released from the microcapsules N_0 is the cell load before the microencapsulation. The assay was carried out in triplicate.

3. Results and discussion

The results obtained are described in Figure 1. EE and probiotic viability were evaluated over 28 days. The encapsulation efficiency was approximately 99% for emulsification and 96% for extrusion on the first day. After 28 days the cell viability was approximately 61% (emulsification) and 56% (extrusion). The bacterial cell count decrease on average 4 log over the storage period in both techniques. However, it preserved the minimal therapeutic dose throughout the storage. Similar result was obtained when lyophilized *Lactobacillus acidophilus* microcapsules on matrix of k- carrageenan and inulin produced by extrusion/emulsion technique showed high cell survival [27].

In study using galactooligosaccharides and inulin in microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei* in alginate beads coated with chitosan observed that the initial cell count before encapsulation was in the range of 8.3-10.8 log CFU/mL. There were significant differences ($p < 0.05$) in yield of microencapsulation for each culture. Right after encapsulation process (time zero), the number of cells was reduce by 0.1-2.6 logs [28]. Similarly, other authors using chitosan-coated alginate microspheres to encapsulate *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium bifidum* as probiotics showed that after 28 days, the survival of *L. gasseri* and *B. bifidum* idecreased from $4,07 \times 10^9$ to $3,09 \times 10^7$ CFU / mL and from $2,40 \times 10^9$ to $1,38 \times 10^7$ CFU / mL respectively [29].

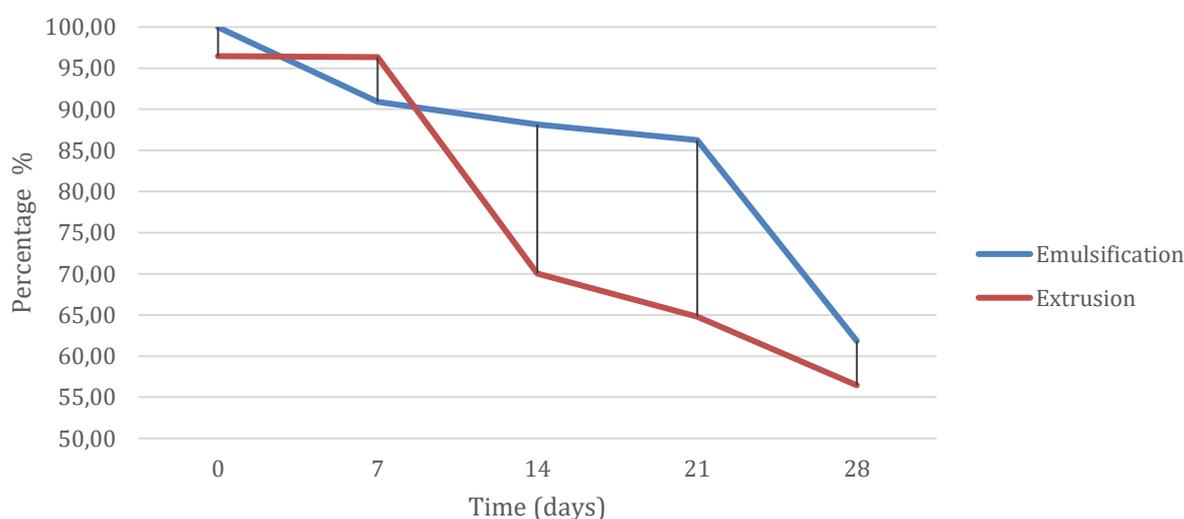


Fig. 1 Encapsulation efficiency and probiotic viability evaluated along 28 days comparing the extrusion and emulsification methodologies.

Microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with alginate and chitosan-alginate matrix by vibrating technology and were freeze dried in skimmed milk presented interesting results. Microencapsulation procedure proved to not affect cell viability as indicated by a high encapsulation yield (97%) as well as further chitosan coating that minimally affected cell population with decrease of bacterian population. The viability of microencapsulated probiotic was evaluated under several stress conditions such as 28 days storage in different solutions

(Ringer, NaCl and CaCl₂) at 4 and 20 °C. Results of survival assays showed that in most of tested conditions microencapsulation significantly ($P < 0.05$) improved *L. reuteri* resistance. The storage at 20°C led to a dramatic decrease in viability for both free and microencapsulated probiotic cells. Total reduction in the cell load was observed on the 14th day of storage for free cells in CaCl₂. Different results were obtained for samples stored in Ringer and in NaCl at 4 °C. Best microcapsule preservation was achieved for Alginate microcapsules stored in Ringer and in NaCl for which only 1 Log reduction in viable cell counts ($p < 0.05$) was observed after 28 days in both cases. On the contrary, viable count of free cells in the same solutions decreased by about 3 Log cycles at the end of storage. Furthermore, a reduction of 3 Log cycles in viable cell count was registered for Alginate microcapsules in CaCl₂ while about 4.5 Log reduction was observed in the case of free cells instead [17].

In other study evaluated the viability of *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying with partial replacement of reconstituted skim milk, as encapsulating agent, with the prebiotics inulin, oligofructose, and oligofructose-enriched inulin. The viable cell counts of the microcapsules were determined during storage for 180 days at 4 °C and at -18 °C and howed a high survival rate of bifidobacteria during storage at the temperatures evaluated [30].

Despite other probiotic protection systems were described by other authors as more effective, whose results could be related to the efficiency of a simple layer system, as just alginate instead alginate-chitosan, in preserving the viability of different probiotic strains during a long-term storage, in this study, we shows that great stability could be obtained by coating alginate microcapsules with chitosan. However, it should be highlighted that different results could be due to different resistance of the microencapsulated strains. In this context, this study demonstrated that both techniques was preserved the minimal therapeutic dose throughout the storage in refrigerated temperature. The results demonstrate that the emulsification/internal gelation technique was more effective in the encapsulation and maintenance of probiotic viability and may be a promising technique in the food industry.

References

- [1] Kailasapathy K, Champagne C. Trends in the microencapsulation of probiotics for application in dairy products. *Agro Food Industry Hi Tech*. 2011; 22: 25.
- [2] Ozen AE, Pons A, Tur JA. Worldwide consumption of functional foods: A systematic review. *Nutrition Reviews*. 2012; 70: 472-481.
- [3] Khani S, Hosseini HM, Taheri M, Nourani MR, Imani Fooladi AA. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review. *Inflammation allergy drug targets*, 2012; 11: 79-89.
- [4] Tripathy MK, Giri SK. Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*. 2014; 9: 225-241.
- [5] FAO/WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario: Canada; 2002.
- [6] Kumar KS, Sastry N, Polaki H, Mishra V. Colon Cancer Prevention through Probiotics: An Overview. *Journal of Cancer Science and Therapy*. 2015; 7: 81-92.

- [7] Chen, H Y, Li, XY, BJ, Meng, XH. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*. 2017; 29: 248–255.
- [8] Harata G, Kumar H, He F, Miyazawa K, Yoda K, Kawase M, Kubota A, Hiramatsu M, Rautava S, Salminen S. Probiotics modulate gut microbiota and health status in Japanese cedar pollinosis patients during the pollen season. *European Journal of Nutrition*. 2017; 56: 2245–2253.
- [9] Pacheco-Ordaz R, Wall-Medrano A, Goñi MG, Ramos-Clamont-Montfort G, Ayala-Zavala JF, González-Aguilar GA. Effect of phenolic compounds on the growth of selected probiotic and pathogenic bacteria. *Letters in Applied Microbiology*. 2018; 66: 25–31.
- [10] Li JY et al, Sex steroid deficiency-associated bone loss is microbiota dependent and prevented by probiotics. *Journal of Clinical Investigation*. 2016; 126: 2049–2063.
- [11] Costa MGM, Fonteles TV, Jesus ALT, Rodrigues S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. *Food Chemistry*. 2013; 139: 261–266.
- [12] Pereira ALF, Maciel TC, Rodrigues S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. *Food Research International*. 2011; 44: 1276–1283.
- [13] Tian W, Song J, Wang Y, Yue L, Wang J, Dan T, ... Zhang H. Effect of different calcium salts and methods for triggering gelation on the characteristics of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1. *RSC Advances*. 2015; 5: 73352–73362.
- [14] Corona-Hernandez RI, Alvarez-Parrilla E, Lizardi-Mendoza J, Islas-Rubio AR, De La Rosa A, Wall-Medrano A. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: a review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 2013; 12: 614–628.
- [15] Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012; 162: 56–67.
- [16] Doherty SB, Auty MA, Stanton C, Ross RP, Fitzgerald GF, Brodtkorb A. Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. *International Dairy Journal*. 2012; 22: 31–43.
- [17] Prisco A, Maresca D, Ongeng D, Mauriello G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment *LWT. Food Science and Technology*. 2015; 61: 452–462.
- [18] Sanchez MT, Ruiz MA, Lasserrot A, Hormigo M, Encarnacio MM. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus* spp. bacteria: Protection, survival and stability study. *Food Hydrocolloids*. 2017; 69:67–75.
- [19] Sarkar S. Approaches for enhancing the viability of probiotics: a review. *British Food Journal*. 2010; 112: 329–349.
- [20] Sultana K, Godward G, Reynolds N, Arumugaswamy R, Peiris P, Kailasapathy K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*. 2000; 5: 47–55.
- [21] Mortazavian A, Razavi SH, Ehsani MR, Sohrabvandi S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. *Iranian journal of biotechnology*. 2007; 5: 1–18.
- [22] Champagne CP, Fustier P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*. 2007; 18: 184–90.
- [23] Burgain J, Gaiani C, Francius G, Revol-Junelles AM, Cailliez-Grimal C, Lebeer S, ... Scher J. In vitro interactions between probiotic bacteria and milk proteins probed by atomic force microscopy. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*. 2013; 104: 153–162.
- [24] Cook MT, Tzortzis G, Charalampopoulos D, Khutoryanskiy VV. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*. 2012; 162: 56–67.
- [24] Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*. 2003; 13: 3–13.
- [25] Krasaekoopt W, Bhandari B, Deeth HC. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *Deeth^[1]_{SEP}* *LWT*.

2006; 39: 177–183.

[26] Zou Q, Zhao J, Liu X, Tian F, Zhang H, Zhang H, Chen W. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science & Technology*. 2011; 46: 1672-1678.

[27] Chen M, Mustapha A. Survival of freeze-dried microcapsules of α -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. *Food Microbiology*. 2012; 30: 68-73

[28] Krasaekoopt W, Watcharapoka S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*. 2014; 57 : 761-766

[29] Chávarri M, Marañón I, Ares R, Ibáñez FC, Marzo F, Villarán MC. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 2010, 142: 185–189

[30] Fritzen-Freire CB, Prudencio E, Amboni RDMC, Pinto SS, Negrao-Murakami AN, Murakami FS. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*. 2012; 45: 306–312.

APÊNDICE B

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Prezado (a) Senhor (a)

Esta pesquisa é sobre a aplicação de uma bactéria (*L. rhamnosus*) reconhecidamente probiótica pela ANVISA, microencapsulados por dois métodos distintos (extrusão e emulsificação) com alginato de cálcio e quitosana, em leite em pó comercial e está sendo desenvolvida por Ana Júlia Alves Aguiar Athayde, aluna do Curso de Pós-Graduação em Nutrição da Universidade Federal de Pernambuco, sob a orientação da Profa. Thayza C. M. Stamford.

Os objetivos do estudo são aumentar o consumo de probióticos pela população em geral, tendo em vista os benefícios a saúde trazidos quando consumidas essas bactérias. Apesar do mercado atual estar apresentando ampla variedade de produtos com alegação funcional probiótica, os produtos lácteos ainda são os mais comumente utilizados como veículos dessas bactéria. No entanto, vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados no leite líquido. Devido a isso, outras matrizes alimentares vêm sendo utilizadas para aumentar o consumo de alimentos contendo probióticos, sendo o leite em pó uma boa alternativa de aplicação, por ser amplamente consumido. Em 2015, o Brasil foi o segundo maior consumidor de leite em pó no mundo, perdendo apenas para a China, além disso, esse produto é consumido por todas as faixas etárias, apresenta fácil acesso, boa aceitação e ótima qualidade nutricional, mostrando-se uma excelente matriz alimentar para a adição de probióticos microencapsulados com alginato-quitosana.

Solicitamos a sua colaboração para a realização de análise sensorial, como também sua autorização para apresentar os resultados deste estudo em eventos da área de saúde e publicar em revista científica. Por ocasião da publicação dos resultados, seu nome será mantido em sigilo. Informamos que essa pesquisa não oferece riscos, previsíveis, para a sua saúde.

Esclarecemos que sua participação no estudo é voluntária e, portanto, o(a) senhor(a) não é obrigado(a) a fornecer as informações e/ou colaborar com as atividades solicitadas pelo Pesquisador(a). Caso decida não participar do estudo, ou resolver a qualquer momento desistir do mesmo, não sofrerá nenhum dano, nem haverá modificação na assistência que vem recebendo na Instituição.

Os pesquisadores estarão a sua disposição para qualquer esclarecimento que considere necessário em qualquer etapa da pesquisa.

Diante do exposto, declaro que fui devidamente esclarecido(a) e dou o meu consentimento para participar da pesquisa e para publicação dos resultados. Estou ciente que receberei uma cópia desse documento.

Assinatura do Participante da Pesquisa^[1] ou Responsável Legal

APÊNDICE C

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NUTRIÇÃO

TESTE DE ACEITAÇÃO E INTENÇÃO DE COMPRA

Nome: _____

Idade: _____

Escolaridade: _____

ESCALA

9- Gostei muitíssimo

8- Gostei muito

7- Gostei moderadamente

6- Gostei ligeiramente

5- nem gostei/nem desgostei

4- desgostei ligeiramente

3- desgostei moderadamente

2- desgostei muito

1- desgostei muitíssimo

1- Você está recebendo 05 amostras codificadas (amostras de leite UHT e leite em pó contendo bactérias probióticas microencapsuladas com alginato-quitosana). As seguintes amostras devem ser provadas e avaliadas de acordo para os demais atributos apresentados no quadro, seguindo o valor da escala que você considera correspondente a cada amostra (código).

ATRIBUTOS	AMOSTRAS			
	144-1	144-2	355-1	355-2
Aparência				
Cor				
Aroma				
Sabor				
Sabor residual				
Avaliação global				

2- Agora indique sua atitude ao encontrar esses leites no mercado.

ATRIBUTOS	AMOSTRAS (Código)				
	144-1	144-2	355-1	355-2	
Aparência					

COMENTÁRIOS:

3- De acordo com a avaliação global, qual produto você consideraria melhor (144 -1; 144-2 ; 355-1 ou 355-2)?

	MAIS PREFERIDA	MENOS PREFERIDA
POSTO	1 ^o Lugar	2 ^o Lugar
CÓDIGO		

5- Compraria

4- Possivelmente compraria

3- Talvez

2- Possivelmente não compraria

1- Jamais compraria

4- Qual característica sensorial você mais apreciou na amostra escolhida?

5- Qual característica sensorial você não apreciou na amostra escolhida?

APÊNDICE D

Comprovantes de submissão dos artigos

Subject: Track your recent Authored submission to LWT

*** Automated email sent by the system ***

Dear Dr. MONTENEGRO STAMFORD,

Thank you for sending your manuscript for consideration to LWT - Food Science and Technology . Please accept this message as confirmation of your submission.

Title: "Stability, shelf life and acceptability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* added to powdered and UHT milk"

Co-Authors: Ana Júlia Alves Aguiar Athayde ; Laênia Angélica Andrade Lopes ; Maria Lúcia da Conceição ; Heloisa Maria Almeida do Nascimento ; Karina Félix Dias Fernander ; Rebecca Alves Aguiar Athayde ; Evandro Leite de Souza and Thatiana Montenegro Stamford-Arnaud

When should I expect to receive the Editor's decision?

We publicly share the average editorial times for LWT - Food Science and Technology to give you an indication of when you can expect to receive the Editor's decision.

Dear Thayza Stamford,

Thank you for sending your manuscript for consideration to International Journal of Biological Macromolecules. Please accept this message as confirmation of your submission.

Title: "Technological and physiological properties of *L. rhamnosus* free and encapsulated with alginate-chitosan by extrusion and emulsification"

Co-Authors: Ana Júlia Alves Aguiar Athayde; Laênia Angélica Andrade Lopes; Karina Félix Dias Fernandes; Sônia Paula Alexandrino de Oliveira; Thatyane Mariano Rodrigues de Albuquerque; Maria Lúcia da Conceição; Evandro Leite de Souza; Lúcia Raquel Ramos Berger

You may check the status of your manuscript by logging onto the Elsevier Editorial System as an Author at <http://ees.elsevier.com/ijbiomac/>.

Your username is: thayzastamford29@gmail.com

If you need to retrieve password details, please go to: http://ees.elsevier.com/IJBIOMAC/automail_query.asp