

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS RURAIS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA
DOS ALIMENTOS**

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium lactis* e
Lactobacillus acidophilus POR COACERVAÇÃO
COMPLEXA: ESTUDO DA PRODUÇÃO,
CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Thaiane Marques da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2016

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium lactis* e
Lactobacillus acidophilus POR COACERVAÇÃO COMPLEXA:
ESTUDO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E
VIABILIDADE**

Thaiane Marques da Silva

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, Área de Concentração em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS) como requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Orientador: Professor Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes
Co-orientadora: Professora Dr^a. Cristiane de Bona da Silva

Santa Maria, RS, Brasil

2016

Ficha catalográfica elaborada através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Central da UFSM, com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Silva, Thaiane Marques da
Microencapsulação de Bifidobacterium lactis e
Lactobacillus acidophilus por coacervação complexa:
estudo da produção, caracterização e viabilidade / Thaiane
Marques da Silva.-2016.
130 p.; 30cm

Orientador: Cristiano Ragagnin de Menezes
Coorientadora: Cristiane de Bona da Silva
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2016

1. Microencapsulação 2. Coacervação complexa 3.
Probióticos 4. Viabilidade I. Menezes, Cristiano Ragagnin
de II. Silva, Cristiane de Bona da III. Título.

© 2016

Todos os direitos autorais reservados a Thaiane Marques da Silva. A reprodução de partes ou do todo deste trabalho só poderá ser feita mediante a citação da fonte.

E-mail: thaianemsilva@hotmail.com

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências Rurais
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

A Comissão Examinadora, abaixo assinada,
Aprova a Dissertação de Mestrado

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE

elaborada por
Thaiane Marques da Silva

como requisito parcial para a obtenção do grau de
Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

COMISSÃO EXAMINADORA:

Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)
(Presidente/Orientador)

Cristiane de Bona da Silva, Dr^a. (UFSM)
(Co-orientadora)

Cristiane Franco Codevilla, Dr^a. (UFRGS)

Leadir Lucy Martins Fries, Dr^a. (UFSM)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)
(Suplente)

Santa Maria, 26 de fevereiro de 2016.

*Aos meus pais, João Batista e Fatima,
e minha irmã, Ariane, dedico este trabalho.*

AGRADECIMENTOS

A Deus e aos mentores espirituais, pela vida, por todas as oportunidades, por terem me guiado pelo melhor caminho e pelo amparo frente às dificuldades enfrentadas.

Aos meus avós, Pedro e Alda, pelo exemplo de vida e persistência. Aos meus pais, João e Fatima, pelo amor incondicional, educação exemplar, esforços sem medida e por todo o apoio para que eu chegasse até aqui, sem eles nada seria possível. A minha irmã, Ariane, por estar sempre presente, inclusive nas madrugadas de trabalho, por ser minha melhor amiga e pela compreensão, principalmente por minhas ausências. Agradeço também aos tios e, principalmente, meus padrinhos por toda força e motivação durante esse período.

Ao meu orientador, Cristiano Ragagnin de Menezes, por todos os ensinamentos e oportunidades, desde a iniciação científica, que me proporcionaram grande crescimento profissional e por ser essa pessoa amiga e competente, sempre disposta a auxiliar e transmitir seus conhecimentos; exemplo de profissional com quem tenho o privilégio de trabalhar e conviver.

A minha co-orientadora, Cristiane de Bona da Silva, pela colaboração e pela disposição do Laboratório de Desenvolvimento Farmacotécnico; ao professor Érico Flores pela realização da análise de tamanho e distribuição de partículas e ao professor Edson pelo empréstimo do microscópio eletrônico de varredura.

A CAPES pelo apoio financeiro.

Aos queridos amigos, sempre presentes, desde o ensino fundamental, muito obrigada pelos momentos de diversão e descontração que, muitas vezes, foram um refúgio para os momentos difíceis.

Aos colegas do Laboratório 106, em especial, Augusto e Graciele, que auxiliaram incansavelmente na realização deste trabalho e proporcionaram momentos divertidos que facilitaram essa caminhada. Muito obrigada!

Aos colegas de mestrado, Angela, Augusto, Camila, Fernanda, Franciele, Jamila, Karine, Marcelo, Maritiele e Naiéli, que foram mais que essenciais durante esse período, que por muitas vezes não deixaram que eu desanimasse. Amo muito vocês família #tp!

Quero deixar registrado um agradecimento especial às colegas Fernanda, Maritiele e Naiéli, por todos os momentos que compartilhamos nesses dois anos, por todo apoio e auxílio, agradeço imensamente, vocês foram o maior presente desse mestrado!

Enfim, muito obrigada a todos que contribuíram nessa caminhada.

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos
Universidade Federal de Santa Maria

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* POR COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO DA PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE

AUTOR: THAIANE MARQUES DA SILVA

ORIENTADOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

CO-ORIENTADOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA

Local e data de defesa: Santa Maria, 26 de fevereiro de 2016.

Culturas probióticas têm sido utilizadas em alimentos devido aos seus efeitos benéficos na saúde humana. Entretanto, a viabilidade das bactérias probióticas nos alimentos é frequentemente baixa por esses microrganismos não sobreviverem durante o armazenamento do produto devido a vários fatores adversos. Nesse sentido, a microencapsulação surge como uma alternativa. A microencapsulação consiste na proteção de um composto e modulação de sua liberação e, atualmente, várias técnicas estão disponíveis, destacando-se a coacervação complexa. A técnica de coacervação complexa apresenta algumas vantagens frente a outras técnicas como a possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, a ausência de solvente orgânico e condições brandas de temperatura no processamento. O objetivo deste estudo foi aplicar a técnica de coacervação complexa para encapsular *B. lactis* e *L. acidophilus*, utilizando gelatina e goma arábica como materiais de revestimento e realizar a secagem das microcápsulas por liofilização. Ademais, foi analisado o potencial zeta dos materiais de revestimento para a produção das microcápsulas, a morfologia das microcápsulas por microscopia ótica e eletrônica de varredura, bem como o diâmetro médio e a eficiência de encapsulação. As microcápsulas foram avaliadas nas formas úmida e seca, analisando também a resistência dos microrganismos ao processo de secagem por liofilização, à estocagem a temperatura ambiente (25° C), de refrigeração (7° C) e de congelamento (-18° C) durante 120 dias. Foi avaliada a resistência “*in vitro*”, quando inoculados em soluções tampão de diferentes pH e frente à simulação do trato gastrointestinal humano. Verificou-se que para ambos os microrganismos a encapsulação por coacervação complexa foi eficiente em formar microcápsulas probióticas uniformes, com diâmetros médios adequados ao processo e com alta eficiência de encapsulação. Observou-se também que os probióticos foram resistentes ao processo de secagem por liofilização, apresentando viabilidade ($>6\log\text{UFC}\cdot\text{g}^{-1}$). A resistência à estocagem em diferentes temperaturas também foi observada, sendo a temperatura de -18°C, a mais eficiente na proteção dos probióticos. Além disso, as microcápsulas foram eficientes em proteger os probióticos frente às diferentes condições de pH e condições gastrointestinais simuladas. Por fim, o processo de encapsulação por coacervação complexa mostrou-se adequado, oferecendo proteção, liberação controlada e resistência à várias condições adversas, como pH, temperatura e trato gastrointestinal, além de apresentar uma série de vantagens em comparação com outras técnicas.

Palavras-chave: Microencapsulação. Coacervação complexa. Probióticos. Viabilidade.

ABSTRACT

Master Dissertation
Post-Graduate Program in Food Science and Technology
Federal University of Santa Maria

***Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus*
MICROENCAPSULATION BY COMPLEX COACERVATION:
ESTUDY OF PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND VIABILITY**

AUTHOR: THAIANE MARQUES DA SILVA
ADVISOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES
CO-ADVISOR: CRISTIANE DE BONA DA SILVA
Place and Date: Santa Maria, February 26th, 2016.

Probiotic cultures have been used in food because of its beneficial effects on human health. However, the viability of the probiotic bacteria in food is often low because these microorganisms do not survive during storage of the product due to various adverse factors. Accordingly, the microencapsulation is an alternative. Microencapsulation is the protection of a compound and modulation of its release and now, several techniques are available, highlighting the complex coacervation. The complex coacervation technique has some advantages over other techniques such as the possibility of working with biopolymers, the absence of organic solvent and temperature conditions in mild processing. The objective of this study was to apply the complex coacervation technique to encapsulate *B. lactis* and *L. acidophilus* using gelatin and gum arabic as coating materials and perform the drying of the microcapsules by lyophilization. Moreover, it was analyzed zeta potential of the coating material for the production of microcapsules, the microcapsules morphology by light microscopy and scanning electron microscopy, and the average diameter and the encapsulation efficiency. The microcapsules were evaluated in the wet and dry forms, also considering the resistance of microorganisms to the drying process by lyophilization, storage at room temperature (25°C), cooled (7°C) and freezing (-18°C) for 120 days. Resistance was evaluated "in vitro" when inoculated in buffer solutions of different pH and front of the simulated human gastrointestinal tract. It was found that for both micro encapsulation by complex coacervation is effective in forming uniform probiotic microcapsules with mean diameters suitable to the process and with high encapsulation efficiency. It was also observed that probiotics were resistant to drying by lyophilization process, showing viability ($> 6\log\text{UFC.g}^{-1}$). The resistance to storage at different temperatures was also observed with the temperature being -18°C, the most efficient in protection of probiotics. Additionally, the microcapsules were effective to protect the probiotics against the different conditions of pH and simulated gastrointestinal conditions. Finally, the encapsulation by complex coacervation process was adequate, providing protection, controlled release and resistance to various adverse conditions, such as pH, temperature and gastrointestinal tract, and presents a number of advantages compared to other techniques.

Keywords: Microencapsulation. Complex coacervation. Probiotics. Viability.

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

- Figura 1 – Espécies de bactérias comumente utilizadas como probióticos. A) *Lactobacillus acidophilus*; B) *Bifidobacterium lactis*28
- Figura 2 – Representação de microcápsulas: (A) microesfera – o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) microcápsula – o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero)29
- Figura 3 – Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.....33

MANUSCRITO I

- Figura 1 – Representação esquemática do processo de microencapsulação por coacervação complexa44

MANUSCRITO II

- Figura 1 – Medida do potencial zeta (mV) do par polimérico gelatina e goma arábica em diferentes valores de pH78
- Figura 2 – Microscopia óptica de microcápsulas de *B. lactis* Bb-12 obtidas por coacervação complexa (40x)80
- Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas secas de *B. lactis* (Bb-12) obtidas por coacervação complexa.....81

MANUSCRITO III

- Figura 1 – Microscopia óptica de microcápsulas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa (40x)107
- Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa108

ANEXOS

Figura 1 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas úmidas de <i>B. lactis</i> Bb-12	131
Figura 2 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas secas de <i>B. lactis</i> Bb-12	131
Figura 3 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas úmidas de <i>L. acidophilus</i> La-5.....	132
Figura 4 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas secas de <i>L. acidophilus</i> La-5.....	132

LISTA DE TABELAS

REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1 – Características necessárias para um microrganismo ser considerado probiótico ..	25
Tabela 2 – Materiais encapsulantes mais utilizados na encapsulação de probióticos	31
Tabela 3 – Métodos e técnicas de encapsulação.....	32
Tabela 4 – Materiais de revestimento utilizados na técnica de coacervação complexa	34

MANUSCRITO I

Tabela 1 – Técnicas de encapsulação de probióticos e suas respectivas características	40
Tabela 2 – Materiais encapsulantes utilizados na técnica de coacervação complexa	45

MANUSCRITO II

Tabela 1 – Eficiência de encapsulação de microcápsulas de <i>Bifidobacterium lactis</i> Bb-12 ...	79
Tabela 2 – Viabilidade das microcápsulas de <i>B. lactis</i> Bb-12 em diferentes condições de pH	82
Tabela 3 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de <i>B. lactis</i> Bb-12 às condições gastrointestinais simuladas	83
Tabela 4 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de <i>B. lactis</i> Bb-12 durante armazenamento a diferentes temperaturas.....	84

MANUSCRITO III

Tabela 1 – Eficiência de encapsulação de microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> La-5 por coacervação complexa	105
Tabela 2 – Viabilidade das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> La-5 em diferentes condições de pH.....	106
Tabela 3 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de <i>L. acidophilus</i> La-5 às condições gastrointestinais simuladas	109
Tabela 4 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de <i>L. acidophilus</i> La-5 durante armazenamento a diferentes temperaturas.....	110

LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas.....	131
---	-----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	21
1.1 Objetivo geral.....	22
1.2 Objetivos específicos.....	22
2 REVISÃO DE LITERATURA	23
2.1 Probióticos.....	23
2.1.1 <i>Lactobacillus acidophilus</i>	24
2.1.2 <i>Bifidobacterium lactis</i>	25
2.2 Desafios tecnológicos para produtos probióticos na indústria de alimentos.....	26
2.3 Microencapsulação	27
2.3.1 Microencapsulação de probióticos	28
2.3.2 Materiais encapsulantes utilizados na encapsulação de probióticos	29
2.4 Métodos de encapsulação.....	30
2.4.1 Coacervação complexa.....	30
3 MANUSCRITO I.....	33
RESUMO	33
1 INTRODUÇÃO	34
2 ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS	35
2.1 Probióticos.....	35
2.2 Principais técnicas utilizadas para a encapsulação de probióticos	37
3 ENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA	38
3.1 Histórico	38
3.2 Coacervação complexa	40
3.2.1 Materiais de revestimento utilizados na coacervação complexa	42
3.2.2 Aplicações da coacervação complexa para alimentos	44
3.2.3 Aplicações da coacervação complexa para probióticos	47
4 CONCLUSÃO.....	49
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	50
4 MANUSCRITO II	55
RESUMO.....	55
1 Introdução	56
2 Material e métodos	57
3 Resultados e discussão.....	62
4 Conclusão	71
Referências bibliográficas.....	71
5 MANUSCRITO III.....	83
RESUMO.....	83
1 Introdução	84
2 Material e métodos	85
3 Resultados e discussão.....	89
4 Conclusão	97
Referências bibliográficas.....	98
6 DISCUSSÃO GERAL.....	111
6.1 Eficiência de encapsulação.....	111

6.2 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica de varredura	111
6.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas.....	112
6.4 Teste de liberação “ <i>in vitro</i> ”	113
6.5 Sobrevivência dos microrganismos sob condições gastrointestinais simuladas.....	114
6.6 Viabilidade das microcápsulas durante armazenamento a diferentes temperaturas.....	115
7 CONCLUSÃO GERAL	117
8 SUGESTÕES	119
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	121
ANEXOS	129

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a população está cada vez mais consciente da relação entre a dieta e o desenvolvimento de doenças e que os alimentos podem contribuir na prevenção de muitas destas, sendo denominados alimentos funcionais, pois além de contribuírem para a nutrição, fornecem benefícios à saúde. Para serem considerados funcionais, os alimentos devem, além de contribuir para a nutrição básica, possuir componentes fisiologicamente ativos. Entre os alimentos funcionais, considerável atenção tem sido dada às bactérias probióticas, que podem ser definidas como microrganismos vivos que após a ingestão em quantidade suficiente desempenham, no hospedeiro, efeito benéfico para a saúde, por melhorar e manter o equilíbrio da microbiota intestinal (FULLER, 1989; OLIVEIRA, 2006).

Além de trazer benefícios para a microbiota intestinal, as bactérias probióticas previnem infecções urogenitais por patógenos, possuem atividade antimicrobiana, diminuem o risco de desenvolvimento de tumores por estimularem o sistema imunológico, melhoram a intolerância à lactose e diminuem os níveis de colesterol sérico. Assim, há grande interesse em incorporá-las em produtos alimentícios (OLIVEIRA, 2006).

No entanto, as bactérias probióticas na forma livre podem ser sensíveis aos processos empregados na produção de alimentos e, além disso, podem não permanecer viáveis no produto até o momento do consumo ou não serem capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal. Dessa forma, várias técnicas têm sido empregadas com o intuito de fornecer essas bactérias em quantidades suficientes para que exerçam seus efeitos benéficos, mantendo a sobrevivência destas durante a vida útil e a passagem pelo trato gastrointestinal. Entre essas técnicas, está a microencapsulação, que protege as bactérias probióticas de condições adversas do meio externo e do trato gastrointestinal (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008).

A técnica de microencapsulação por coacervação complexa consiste basicamente na combinação de duas soluções hidrocolóides de cargas opostas, causando interação e precipitação dos polímeros complexos, que juntamente com os microrganismos, resulta na formação de microcápsulas. A coacervação complexa não utiliza solvente orgânico nem condições drásticas de temperatura, além de possuir baixo custo e, desse modo, é especificamente vantajosa frente a outras técnicas, como a atomização, que utiliza altas temperaturas e possui um alto custo com o equipamento; como a extrusão, que possui lenta formação das microcápsulas não propiciando seu uso em grande escala; ou como a

emulsificação, que possui a dificuldade das soluções serem insolúveis na fase oleosa. Assim, a coacervação complexa é uma ferramenta potencial para viabilizar as bactérias probióticas, podendo ser aplicada a uma ampla gama de alimentos (PRATA, 2006; MÜLLER, 2011; SHOJI et al., 2013).

Diante do exposto, a aplicação de técnicas que promovam o fornecimento das bactérias probióticas em quantidades adequadas para que exerçam seus efeitos benéficos, desperta o interesse para a pesquisa científica. Assim, este estudo é de grande relevância, primeiramente, por ser uma alternativa de proteção para os probióticos e, além disso, é um estudo pioneiro nessa área, pois não foram encontrados trabalhos na literatura utilizando as mesmas condições de processo.

1.1 Objetivo geral

O objetivo geral deste trabalho foi desenvolver a técnica de coacervação complexa para microencapsular *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-05, associada ou não de liofilização, caracterizar as microcápsulas, estudar o seu rendimento e avaliar a viabilidade dos probióticos, bem como a estabilidade durante a estocagem.

1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver microcápsulas contendo *Bifidobacterium lactis* Bb-12 e *Lactobacillus acidophilus* La-05, separadamente, por coacervação complexa;
- Avaliar os materiais utilizados para a microencapsulação, bem como suas concentrações e eficiência de encapsulação;
- Analisar a forma, diâmetro e distribuição das microcápsulas úmidas e secas;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas úmidas e secas em liberação “*in vitro*”;
- Avaliar a estabilidade das microcápsulas úmidas e secas em diversas condições de pHs, simulando as condições do trato gastrointestinal humano;
- Analisar o método de secagem por liofilização para sobrevivência do microrganismo na microcápsula;
- Acompanhar e avaliar em que condição, seca ou úmida, a microcápsula possui maior estabilidade durante a estocagem a diferentes temperaturas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

Os probióticos eram tradicionalmente definidos como um suplemento alimentar a base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio de sua microbiota intestinal. Entretanto, a definição mais aceita internacionalmente é que são microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FULLER, 1989; FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001).

Além disso, para ser considerado probiótico, o microrganismo deverá apresentar uma série de características, que estão descritas na Tabela 1.

Tabela 1 – Características necessárias para um microrganismo ser considerado probiótico

Características dos probióticos
Ter identificação taxonômica exata
Ser geneticamente estável, de origem humana e atóxico
Não ser patogênico
Aderir e colonizar o cólon
Sobreviver, proliferar e competir no trato gastrointestinal
Estimular as atividades metabólicas no trato gastrointestinal
Resistir ao pH do suco gástrico e a bile
Produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no intestino
Ser antagonista a patógenos
Exercer efeitos benéficos a saúde documentados e validados clinicamente
Sobreviver, mantendo sua atividade e estabilidade durante o armazenamento do produto
Ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos

Fonte: Heller (2001); Suskovic et al. (2001); Saad (2006).

A partir da sua ação, os probióticos podem exercer muitos efeitos benéficos no organismo do hospedeiro, como: preservação da integridade intestinal e atenuação dos efeitos de doenças intestinais, como a diarreia infantil induzida por rotavírus, a diarreia associada ao uso de antibióticos, a doença intestinal inflamatória e a colite; inibição da colonização gástrica

com *Helicobacter pylori* que é associado a gastrite, úlcera péptica e câncer gástrico; estimulação da resposta imunológica, na modulação de reações alérgicas; melhoria da saúde urogenital de mulheres; controle nos níveis sanguíneos de lipídeos; digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose e redução do risco de câncer (RAIZEL et al., 2011).

De acordo com Brasil (2008) os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que fazem parte da microbiota do intestino humano, constituem as principais espécies probióticas. No Brasil são aprovadas para uso como probióticos as espécies *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei* variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008).

Outro ponto importante é a recomendação diária do consumo de probióticos para que os benefícios ocorram, que segundo a Organização Mundial de Gastroenterologia, deve ser no mínimo 10^6 UFC.dose⁻¹ e varia muito em função da cepa e do produto. No Brasil, a legislação recomenda $10^8 - 10^9$ UFC.g⁻¹ na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2008).

2.1.1 *Lactobacillus acidophilus*

O gênero *Lactobacillus* (Figura 1a) é caracterizado como gram-positivo, incapaz de formar esporos, desprovido de flagelo, possuindo forma bacilar ou cocobacilar, podendo ser aerotolerante, ou seja, suportam uma pequena quantidade de oxigênio, ou anaeróbio. Esse gênero compreende a 56 espécies oficialmente conhecidas, sendo as espécies *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* e *L. casei* as mais utilizadas para fins alimentares (STEFE, ALVES & RIBEIRO, 2008).

Atualmente, o *L. acidophilus* está sendo intensivamente estudado por suas características probióticas. Seu crescimento ótimo ocorre em temperaturas entre 37 e 41°C e em pH entre 6 e 7. É homofermentativo, ou seja, realizada a fermentação, produz ácido láctico a partir da lactose. Algumas de suas linhagens podem melhorar o valor nutricional dos produtos, aos quais forem adicionados, por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K. Seus benefícios à saúde incluem, dentre outros, a redução dos sintomas de intolerância a lactose, a inibição de microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas e a redução dos níveis de colesterol. Além disso, esse microrganismo possui a particularidade de ser pouco afetado pela salinidade do meio, tolerar valores baixos de pH e ser microaeróbio, apresentando crescimento em ambientes com pouca oxigenação, o

que resulta numa maior resistência e facilidade de emprego durante a fabricação e armazenamento dos alimentos, quando comparado com outras culturas probióticas (GOMES; MALCATA, 1999; OLIVEIRA, 2006).

2.1.2 *Bifidobacterium lactis*

As espécies do gênero *Bifidobacterium* (Figura 1b), são heterofermentativas, produzindo ácido acético e láctico. A temperatura ótima de crescimento oscila entre 37-41°C. Em relação ao pH ótimo, verificam-se valores entre 6,0 e 7,0 com ausência de crescimento a valores de pH ácidos de 4,5-5,0 ou valores de pH alcalinos de 8,0-8,5 (MACEDO et al., 2008).

Bactérias do gênero *Bifidobacterium*, como *B. lactis*, têm sido classificadas como organismos difíceis de serem pesquisados devido a necessidade da presença de fatores de crescimento encontrados no leite humano e condições anaeróbias de crescimento. Pesquisadores têm relatado que sob condições laboratoriais, as bifidobactérias mostram grande variabilidade na morfologia em resposta à nutrientes, condições de crescimento e quantidade de metabólitos. Embora sejam consideradas anaeróbias, as bifidobactérias variam consideravelmente quanto a tolerância ao oxigênio. Algumas são anaeróbias obrigatórias, enquanto outras toleram oxigênio na presença de CO₂. Os requerimentos anaeróbios das bifidobactérias são relacionados à cepa; cepas menos sensíveis parecem possuir alguma atividade de catalase, que remove traços de H₂O₂.

Os benefícios relatados do *Bifidobacterium* são o controle de infecções intestinais em crianças e idosos, atividade anticarcinogênica e ativação do sistema imune, melhoria das condições gerais de saúde após o consumo de produtos contendo *Bifidobacterium*, melhoria na utilização da lactose, especialmente para indivíduos intolerantes, efeito hipocolesterolêmico, desconjugação de ácidos biliares, inativação de compostos tóxicos e ainda, alívio de sintomas gastrointestinais em mulheres com síndrome pré-menstrual (BARBOSA et al., 2011).

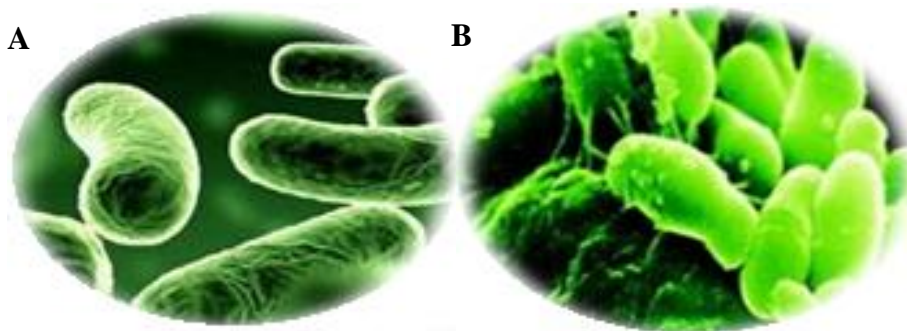


Figura 1 – Espécies de bactérias comumente utilizadas como probióticos. A) *Lactobacillus acidophilus*; B) *Bifidobacterium lactis*

Fonte: Dairiki (2013)

2.2 Desafios tecnológicos para produtos probióticos na indústria de alimentos

O desenvolvimento de novos produtos alimentícios torna-se cada vez mais desafiador, à medida que procura atender à demanda dos consumidores por produtos que, concomitantemente, sejam saudáveis e atrativos. Deste modo, a incorporação da dieta a um estilo de vida saudável, leva à criação de um mercado para esses produtos (DELFINO, 2014).

Iogurtes e outros leites fermentados são atualmente os principais alimentos probióticos disponíveis, pois os produtos lácteos contêm proteínas, gorduras, lactose, minerais e vitaminas, sendo considerados nutritivos, e veículos adequados para o desenvolvimento e a sobrevivência dos probióticos. Entretanto, no mercado nacional de alimentos probióticos existe uma grande carência de novos produtos. Ademais, o interesse pela adição de probióticos em alimentos buscando o aumento do valor nutricional e terapêutico é crescente nos últimos anos, e várias cepas probióticas têm sido estudadas e exploradas comercialmente em diversos produtos. Assim, nesses alimentos, para a incorporação de bactérias probióticas, é necessário utilizar tecnologias que protejam o microrganismo do meio externo e aumentem sua viabilidade no produto, sendo que a viabilidade é um parâmetro chave para o desenvolvimento de alimentos probióticos (SOCCOL et al., 2010; OROSCO; KUNIGK, 2012).

Nesse sentido, as bactérias probióticas utilizadas em escala industrial devem ser apropriadas para cada tipo de produto e permanecerem viáveis durante o armazenamento. Esses pré-requisitos representam desafios tecnológicos significantes, uma vez que muitas bactérias probióticas são sensíveis à exposição a oxigênio, calor e ácidos. Assim, o desenvolvimento de um produto probiótico e/ou simbiótico é um desafio para a indústria de

alimentos, devido à dificuldade de crescimento e de sobrevivência de microrganismos probióticos em ambientes considerados adversos (KOMATSU; BURITI & SAAD, 2008).

Dessa forma, para a incorporação de bactérias probióticas nos produtos, é necessário utilizar tecnologias que protejam o microrganismo do meio externo e aumentem sua viabilidade no produto, como a microencapsulação.

2.3 Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica emergente para o acondicionamento de biomoléculas ou células em uma matriz que pode proporcionar uma característica de liberação desejada e uma barreira física contra condições ambientais adversas (CHITPRASERT; SUDSAI; RODKLONGTAN, 2012).

As micropartículas são subdivididas em microesferas e microcápsulas, de acordo com a sua estrutura. São denominadas microesferas as partículas compactas constituídas por uma rede polimérica na qual a substância ativa está distribuída no seu estado sólido ou molecular. Já as microcápsulas são partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero (Figura 2) (SUAVE et al., 2006).

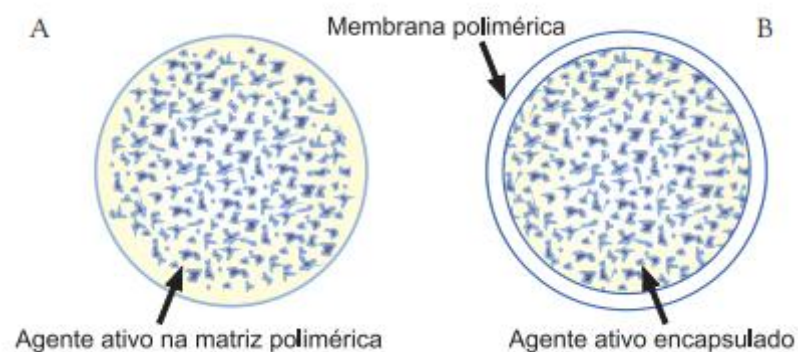


Figura 2 – Representação de micropartículas: (A) microesfera – o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica; (B) microcápsula – o agente ativo está envolvido pelo agente encapsulante (polímero)

Fonte: Suave et al., (2006).

Além disso, o material de revestimento deve ser de grau alimentício, se utilizado na indústria de alimentos, e capaz de formar uma barreira para proteger a substância encapsulada. Materiais à base de polímeros naturais representam matrizes promissoras como

sistemas de liberação controlada, devido à sua biodegradabilidade, natureza e compatibilidade de grau alimentício e ampla disponibilidade. O princípio da liberação controlada consiste em liberar os agentes ativos apenas nos órgãos onde devem agir ou onde serão absorvidos. Em tais produtos, o princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução etc. (SUAVE et al., 2006; ANTUNES et al., 2013).

Segundo Risch; Reineccius (1995) as cápsulas podem ser classificadas de acordo com seu tamanho. Para serem classificadas como macrocápsulas, devem possuir tamanhos maiores que 5000 μm , no entanto, para serem microcápsulas devem possuir tamanhos entre 0,2 e 5000 μm e para serem nanocápsulas, devem possuir tamanhos menores que 0,2 μm .

Atualmente, a técnica de encapsulação está sendo muito utilizada na indústria de alimentos com o intuito de proteger compostos bioativos, como o controle da reação oxidante, mascarando sabores, odores e cores, proporcionando liberação controlada, prolongamento da vida de prateleira, etc. E entre os compostos bioativos mais encapsulados estão probióticos (BURGAIN et al., 2011).

2.3.1 Microencapsulação de probióticos

Um dos maiores desafios em relação à aplicação das culturas probióticas nos alimentos, é a manutenção da viabilidade durante o processamento. Além disso, é necessário que os microrganismos estejam viáveis e biologicamente ativos no local alvo no hospedeiro, assim, é essencial que suportem barreiras naturais do hospedeiro, tais como o trânsito gastrointestinal (FRITZEN-FREIRE et al., 2013).

As tecnologias de microencapsulação são uma perspectiva promissora para a introdução de bactérias probióticas viáveis em alimentos, pois a matriz de encapsulamento pode proporcionar uma barreira física contra condições de estresse. As cápsulas devem também ser capazes de manter sua integridade durante a passagem pelo trato gastrointestinal até chegarem ao seu destino alvo (cólon), onde devem romper-se e liberar as bactérias probióticas. Essas tecnologias são também muitas vezes utilizadas para proteger as células ao tratamento com calor no processamento de alimentos, reduzindo assim potencialmente lesões e morte celular.

Além disso, a microencapsulação pode promover a viabilidade dos probióticos, expandindo a aplicação destes, pois as microcápsulas podem proporcionar um ambiente anaeróbio mais favorável às bactérias probióticas sensíveis, além de representar uma barreira

física às condições adversas. A microencapsulação pode ser utilizada para aumentar a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal, aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura durante a estocagem do produto, proteger os probióticos frente ao calor e aumentar sua sobrevivência, proteger os probióticos frente a ácidos e fenólicos em sucos (CHANDRAMOULI et al., 2004; KAILASAPATHY, 2006; CHITPRASERT; SUDSAI; RODKLONGTAN, 2012; ANTUNES et al., 2013; FRITZEN-FREIRE, 2013; NUALKAEKUL et al., 2013).

2.3.2 Materiais encapsulantes utilizados na encapsulação de probióticos

Vários estudos têm mostrado que a microencapsulação tem sido bem sucedida no revestimento de bactérias utilizando vários materiais (SULTANA et al., 2000). Segundo Suave (2006) o material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as microcápsulas. Além disso, deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado; ter habilidade de selar e manter o material ativo dentro da estrutura da cápsula.

Também deve proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral; e ser econômico (SUAVE, 2006).

Na Tabela 2 estão listados os materiais encapsulantes mais utilizados na encapsulação de probióticos.

Tabela 2 – Materiais encapsulantes mais utilizados na encapsulação de probióticos

Fonte	Exemplo
Carboidratos	Amido, dextrinas, açúcar, celuloses, acetato ftalato de celulose (CAP)
Gomas	Goma arábica, alginato de sódio, carragena
Lipídeos	Monoglicérides e diglicérides, óleos e gorduras
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina
Quitosana	Fonte alternativa extraída da casca de crustáceos

Fonte: Suave, 2006; Menezes et al., (2013).

2.4 Métodos de encapsulação

Várias tecnologias podem ser aplicadas para a encapsulação de probiótico e cada uma delas proporciona microcápsulas com características diferentes em termos de tamanho de partículas e do tipo de cápsula (BURGAIN et al., 2011). Além disso, a escolha do método de encapsulação é um ponto importante, pois depende de uma série de fatores, como: tamanho de partícula requerido, propriedades físicas e químicas do material ativo e do agente encapsulante, aplicação do produto final, mecanismos desejados de liberação e custo (AZEREDO, 2005).

De acordo com Suave (2006) a diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química.

Na Tabela 3 estão descritos os métodos de encapsulação seguidos das respectivas técnicas utilizadas.

Tabela 3 – Métodos e técnicas de encapsulação

Encapsulação	
Métodos	Técnicas
Físicos	<i>Spray drying, spray cooling</i> , pulverização em banho térmico, leito fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, co-cristalização e liofilização.
Químicos	Inclusão molecular e polimerização interfacial.
Físico-químicos	Coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico.

Fonte: Suave (2006).

2.4.1 Coacervação complexa

A técnica de microencapsulação mais antiga e uma das mais utilizadas para a encapsulação de diversos produtos envolve a separação de fases por coacervação. O termo coacervação foi introduzido pela primeira vez, em 1929, na química por Bungenberg de Jong

e Kruyt para descrever o fenômeno de agregação macromolecular formando um sistema coloidal em que existem duas fases líquidas: uma rica (coacervado) e a outra pobre em colóides (sobrenadante). Além disso, é uma técnica promissora devido às possibilidades de liberação controlada baseada no estresse mecânico, temperatura ou liberação modulada (GOUIN, 2004; SUAVE, 2006).

A coacervação complexa é utilizada principalmente para microencapsular substâncias hidrofóbicas e baseia-se na interação entre os diferentes polímeros com cargas opostas. Esta interação forma complexos insolúveis e produzem a separação de fases. A deposição de tais complexos em torno de um núcleo hidrofóbico cria uma barreira, permitindo assim a sua encapsulação. E devido à formação de partículas muito pequenas com recheio uninuclear, o processo de coacervação é considerado como a técnica original e verdadeira de microencapsulação (THIES, 2003; ALVIM; GROSSO, 2010).

De acordo com Suave (2006), de forma geral, o processo de microencapsulação segue as seguintes etapas:

- Dispersão do agente ativo a ser encapsulado em uma solução do polímero;
- Indução da coacervação, formando gotículas de coacervado;
- Deposição das gotículas de coacervado em torno dos núcleos contendo o princípio ativo;
- Coalescência das gotículas de coacervado para formar uma camada polimérica;
- Endurecimento da camada polimérica por meio da difusão do solvente.

A figura 3 representa as etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

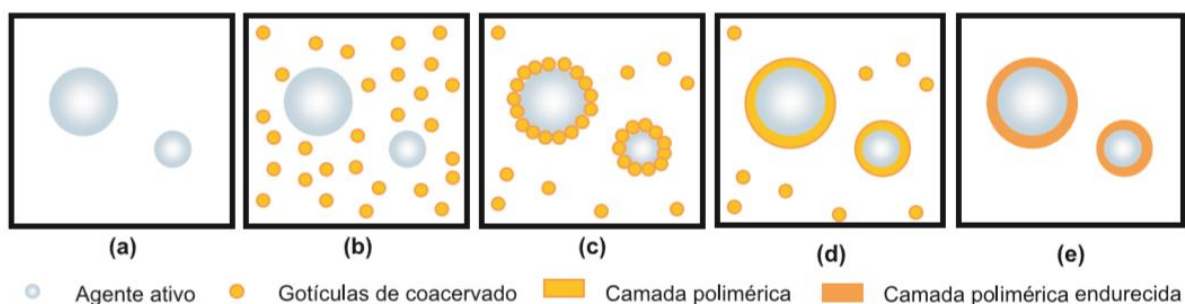


Figura 3 – Representação esquemática das etapas do processo de microencapsulação por coacervação.

Fonte: Suave (2006).

Segundo Fávoro-Trindade; Pinho; Rocha (2008), o diâmetro médio das partículas produzidas por coacervação complexa varia entre 1 e 500 μm , e muitos são os fatores que

interferem no tamanho e distribuição, entre eles estão o método de encapsulação, diferentes materiais de parede, condições de processo, entre outros.

Diversos materiais de revestimento têm sido utilizados na técnica de coacervação complexa, no entanto, o mais estudado e compreendido é o sistema gelatina-goma arábica. Na Tabela 4 estão listados os materiais de revestimentos utilizados em alguns trabalhos encontrados na literatura.

Tabela 4 – Materiais de revestimento utilizados na técnica de coacervação complexa

Materiais	Autores
Pectina e gelatina; alginato e gelatina	SARAVANAN; PANDURANGA RAO, 2010
Goma arábica e gelatina	LV et al., 2012
Pectina e proteína de soja	NORI et al., 2012
Goma arábica e proteína de soja	JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN, 2011
Pectina e caseína	SHOJI et al., 3013
Goma arábica e proteína de ervilha	LIU et al., 2010

Dependendo da utilização requerida, a secagem dos coacervados pode prolongar a sua vida de prateleira e também para sua utilização em produtos desidratados. Assim, podem ser utilizados os seguintes métodos para secagem: atomização, liofilização, secagem em estufa, remoção da água por solventes e secagem em condições ambiente (ALVIM; GROSSO, 2010).

A microencapsulação por coacervação tem sido utilizada por vários segmentos, incluindo o farmacêutico, alimentício, químico e cosmético para a liberação controlada de vários tipos de material ativo, tais como sabores, medicamentos, tintas e com uma ampla gama de aplicações. Qv; Zeng; Jiang (2011) utilizaram a coacervação complexa para encapsular luteína em gelatina e goma arábica, com intuito de melhorar sua instabilidade frente a condições adversas. Yu et al. (2012) encapsularam dodecil acetato em proteína do soro de leite e goma arábica por coacervação complexa, como o objetivo de melhorar a liberação deste composto. Yang et al. (2015) encapsularam óleo de semente de papoula por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais encapsulantes, com o objetivo de melhorar a estabilidade do óleo (ALVIM; GROSSO, 2010).

1 **Manuscrito I**

2 *O Manuscrito será submetido para a publicação na Revista Ciência Rural

3

4

5 **Encapsulação de probióticos por coacervação complexa**

6

7 **RESUMO**

8 Em função dos seus efeitos benéficos, as bactérias probióticas têm sido incorporadas
9 nos mais diversos alimentos, como iogurtes, queijos, sorvetes, leites fermentados e
10 sobremesas congeladas. Entretanto, a viabilidade e a sobrevivência dos probióticos nos
11 alimentos ainda é um problema. Assim, a microencapsulação surge como uma alternativa de
12 proteção e liberação controlada para os probióticos. Entre as técnicas de microencapsulação
13 utilizadas, a coacervação complexa vem apresentando grande potencial para este fim. Essa
14 técnica de encapsulação é considerada uma das mais antigas e consiste basicamente na
15 combinação de duas soluções hidrocolóides de cargas opostas causando interação e
16 precipitação dos polímeros complexos, que resulta na formação de microcápsulas. É uma das
17 técnicas mais estudadas, pois apresenta uma série de vantagens em comparação a outras
18 técnicas, como praticidade, não utilização de solventes orgânicos, processamento brando,
19 devido a não utilização de altas temperaturas, versatilidade e baixo custo. Para a
20 encapsulação de probióticos, a coacervação complexa é considerada uma inovação, pois ainda
21 não existem muitos estudos relacionados. Todavia, de acordo com resultados encontrados no
22 presente trabalho, essa técnica pode ser considerada promissora para esses microrganismos,
23 enfatizando que deve ser mais estudada para aplicação em alimentos. Além disso, fatores
24 como temperatura, concentração dos hidrocolóides e pH, principalmente, são de extrema
25 relevância para a formação das microcápsulas. Nesse sentido, neste artigo de revisão, serão
26 abordados os principais aspectos tecnológicos relacionados à microencapsulação de
27 probióticos pela técnica de coacervação complexa, com ênfase em seu potencial de aplicação,
28 demonstrando suas vantagens.

1 1 INTRODUÇÃO

2

3 Os alimentos enriquecidos com probióticos além de trazerem benefícios à saúde
4 resultam no aumento da diversidade de alimentos. No entanto, a viabilidade dos probióticos e
5 a qualidade geral de produtos que os contém ainda estão em questão, pois para trazerem
6 efeitos benéficos à saúde, as cepas probióticas devem estar viáveis e a um nível elevado
7 durante a vida útil do produto, além de manter elevada viabilidade ao longo do trato
8 gastrointestinal.

9 Nesse sentido, a encapsulação promove a liberação controlada e otimiza o
10 fornecimento dos probióticos no local de ação, potenciando, dessa forma, a eficácia da
11 respectiva cepa probiótica. Esse processo também pode impedir esses microrganismos de se
12 multiplicarem nos alimentos e, conseqüentemente, alterar suas características sensoriais.
13 Além disso, a matriz alimentar de encapsulação deve proteger o material ativo durante o
14 armazenamento, bem como no estômago, até o probiótico ser entregue no trato
15 gastrointestinal e oferecer uma proteção durante o processamento térmico (RANADHEERA;
16 BAINES; ADAMS, 2010; BURGAIN et al., 2011; CHÁVARRI; MARAÑÓN; VILLARÁN,
17 2012; SHOJI et al., 2013).

18 Assim, tecnologias inovadoras têm investigado os problemas de instabilidade desses
19 microrganismos. Entre as tecnologias utilizadas para a encapsulação de microrganismos
20 probióticos está a coacervação complexa (SHOJI et al., 2013).

21 A coacervação complexa é o processo no qual um complexo polieletrólítico é
22 formado. Este processo requer a mistura de dois colóides com ajuste de pH ao qual os dois
23 polímeros de cargas opostas são conduzidos a uma separação de fases e formação de
24 partículas sólidas (CHÁVARRI; MARAÑÓN; VILLARÁN, 2012).

1 A coacervação complexa é considerada a técnica mais antiga, verdadeira e simples de
2 encapsulação. Além disso, é especificamente vantajosa por não utilizar solvente orgânico nem
3 condições drásticas de temperatura. Ademais, apresenta como vantagens a simplicidade, a
4 versatilidade, baixa agitação e o eficiente controle no tamanho da partícula. No contexto atual,
5 a coacervação complexa tem demonstrado elevado interesse entre as literaturas sobre
6 microencapsulação, pois tem sido amplamente utilizada, em produtos químicos na agricultura,
7 produtos farmacêuticos e produtos alimentares, devido à sua alta eficiência de encapsulação
8 de 99% dos ingredientes ativos (SARAVANAN; RAO, 2010; SIOW; ONG, 2013;
9 JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014).

10 Diante do exposto, esse artigo de revisão tem por objetivo informar e esclarecer os
11 aspectos relacionados à técnica de coacervação complexa e suas potencialidades para a
12 microencapsulação de probióticos, pois é uma técnica pouco explorada, com enorme potencial
13 de aplicação, servindo como uma alternativa de proteção e liberação, e sendo extremamente
14 vantajosa frente a outras técnicas por não utilizar altas temperaturas, ser versátil e por não
15 utilizar solventes orgânicos, sendo os materiais encapsulantes compatíveis com os
16 probióticos.

17

18 **2 ENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS**

19

20 **2.1 Probióticos**

21

22 Atualmente, o termo probiótico pode ser definido como “microrganismos vivos que
23 quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro”
24 (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2008).

1 As principais espécies probióticas conhecidas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e
2 *Bifidobacterium*, que fazem parte da microbiota do intestino humano, sendo que no Brasil são
3 aprovadas para uso como probióticos as espécies *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei*
4 variedade *rhamnosus*, *L. casei* variedade *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*,
5 *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e
6 *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2008; MENEZES et al., 2013).

7 Para serem considerados probióticos os microrganismos devem apresentar algumas
8 características. Fuller em 1989 enumerava como características de um probiótico ideal: 1)
9 Serem capazes de exercer um efeito benéfico sobre o hospedeiro. 2) Devem ser não
10 patogênicos e não-tóxicos. 3) Devem estar presentes como células viáveis, de preferência, em
11 grandes números. 4) Devem ser capazes de sobreviver e metabolizar no ambiente intestinal. 5)
12 Devem ser estáveis nas condições de armazenamento. Além disso, atualmente, sabe-se que os
13 microrganismos probióticos devem ser de origem humana, devem demonstrar cientificamente
14 seus efeitos fisiológicos benéficos e devem ser comprovadamente seguros para uso humano
15 (SINGH et al., 2011).

16 De acordo com BUTEL (2014) pode ser observado muitos efeitos benéficos
17 ocasionados pelos probióticos como preservação da integridade intestinal e atenuação dos
18 efeitos de doenças intestinais, como a diarreia infantil induzida por rotavírus, a diarreia
19 associada ao uso de antibióticos, a doença intestinal inflamatória e a doença de crohn; inibição
20 da colonização gástrica com *Helicobacter pylori* que está associado à gastrite e úlcera péptica;
21 estimulação da resposta imunológica, na modulação de reações alérgicas e redução do risco de
22 câncer, inclusive o câncer gástrico.

23 Outro ponto importante é a recomendação diária do consumo de probióticos para que
24 determinados benefícios ocorram. A FAO/OMS determina que um produto deve conter um

1 número de células viáveis de culturas probióticas de, pelo menos, 10^6 a 10^7 ufc.g⁻¹ (FAO/OMS,
2 2001).

3 Assim, para os benefícios ocorrerem, é necessário que os microrganismos probióticos
4 permaneçam no produto em concentração significativa, além de serem capazes de sobreviver
5 à acidez estomacal e aos sais biliares e serem resistentes aos processos tecnológicos. Além
6 disso, a sobrevivência dos probióticos no alimento pode ser afetada por outros fatores, como:
7 composição do alimento (ingredientes e aditivos); oxigênio e potencial redox; atividade de
8 água; temperatura e ambiente de armazenamento; pH e acidez titulável; materiais de
9 embalagem (MARTÍN VILLENA et al., 2009; CHAMPAGNE et al., 2011; TRIPATHI;
10 GIRI, 2014).

11 Nesse sentido, pesquisas têm demonstrado que as culturas probióticas podem ser
12 significativamente protegidas através da técnica de microencapsulação. Essa técnica consiste
13 no acondicionamento de biomoléculas ou células em uma matriz que pode proporcionar uma
14 característica de liberação controlada e uma barreira física contra condições ambientais
15 adversas. Assim, na área de alimentos, está sendo utilizada com o intuito de resolver os
16 problemas de instabilidade e inviabilidade dos probióticos (CHITPRASERT, SUDSAI &
17 RODKLONGTAN, 2012).

18

19 **2.2 Principais técnicas utilizadas para a encapsulação de probióticos**

20

21 A encapsulação é um processo mecânico ou físico-químico que condiciona um
22 material potencialmente sensível e proporciona uma barreira protetora entre esse material e as
23 condições externas, além de proporcionar uma característica de liberação desejada, assim
24 protegendo os microrganismos e prolongando sua sobrevivência (CHITPRASERT; SUDSAI;
25 RODKLONGTAN, 2012; KENT; DOHERTY, 2014).

1 Além disso, a seleção do melhor método de encapsulação para probióticos deve
 2 considerar inúmeros aspectos, como a aplicação que será dada à microcápsula, o tamanho
 3 desejado das partículas, o mecanismo de liberação e propriedades biológicas e fisico-
 4 químicas, tanto da cultura quanto do agente encapsulante, a fim de garantir a sobrevivência
 5 das bactérias durante o processo de encapsulação, em condições de armazenamento e de
 6 consumo, bem como a liberação controlada na área desejada do intestino (CHÁVARRI;
 7 MARAÑÓN; VILLARÁN, 2012; MENEZES et al., 2013).

8 Na Tabela abaixo estão descritas as principais técnicas utilizadas para a encapsulação
 9 de microrganismos probióticos.

10

11 Tabela 1 – Técnicas de encapsulação de probióticos e suas respectivas características

Técnica	Características
<i>Spray-drying</i> ou atomização	Geralmente são utilizados como materiais de revestimento polímeros solúveis em água.
<i>Spray-congealing</i>	Utiliza ceras, ácidos graxos, polímeros solúveis e insolúveis em água, além de outros monômeros como material de revestimento.
<i>Fluidized bed coating/air-suspension</i>	Utiliza polímeros solúveis e insolúveis em água, lipídeos e ceras como material de revestimento.
Extrusão	Utiliza como revestimento da cápsula polímeros solúveis e insolúveis em água.
Coacervação ou técnica de separação de fases	Utiliza como material encapsulante polímeros solúveis em água.
Método eletrostático	Utiliza como material de revestimento polímeros e outros compostos com cargas opostas.

12 Fonte: MENEZES et al. (2013).

13

14 **3 ENCAPSULAÇÃO POR COACERVAÇÃO COMPLEXA**

15 **3.1 Histórico**

16

1 O termo coacervação é derivado do latim *acervus*, significando agregação.
2 Bungenberg de Jong e Kruyt descreveram o termo entre 1929 e 1930, conforme observado
3 por Bungenberg de Jong após extensiva caracterização entre gelatina e goma arábica. Assim,
4 o termo foi utilizado para indicar a formação de líquidos ricos em colóides produzidos por
5 vários processos que causaram a separação de fases em sistemas aquosos de macromoléculas
6 ou colóides em solução. Além disso, destacam que o elemento-chave nestes sistemas
7 coloidais é a permanência das fases em equilíbrio termodinâmico, sendo que esse fenômeno
8 não é determinado apenas por razões de carga superficial da partícula como na instabilidade
9 da partícula coloidal tradicional. Nesse mesmo período, a compreensão teórica da físico-
10 química dos polímeros estava sendo desenvolvida. Assim, Overbeek e Voorn trouxeram a
11 aplicação de um modelo da rede de líquido de soluções de polímeros através das equações de
12 Debye-Huckel para a interação elétrica e as teorias de Flory-Huggins para a entropia
13 (BURGESS, 1990; NAIRN, 1995; VEIS, 2011).

14 A técnica de encapsulação por coacervação complexa foi bastante investigada na
15 década de 50. Em 1954, Green e associados do National Cash Register Company pesquisaram
16 o processo de coacervação usando gelatina e goma-arábica para fins comerciais. Isso levou à
17 publicação de uma série de patentes para a preparação de papel carbono (NAIRN, 1995;
18 VEMMER; PATEL, 2013).

19 Desde então, as microcápsulas produzidas por coacervação complexa são amplamente
20 utilizadas em muitas indústrias tais como de impressão, alimentos, aeroespacial, cosméticos,
21 agricultura e, em particular, produtos farmacêuticos (NAIRN, 1995).

22 Assim, a técnica de coacervação complexa é considerada a mais antiga e desde sua
23 descoberta está sendo amplamente pesquisada. Atualmente, é uma das técnicas mais
24 importantes e utilizadas, principalmente na indústria farmacêutica para a microencapsulação
25 de aromas (CHÁVARRI; MARAÑÓN; VILLARÁN, 2012).

1 O potencial eletrocinético da partícula medido na superfície desta entre sua capa iônica
2 e o meio que a envolve é denominado potencial zeta. Essa medida possibilita a determinação
3 da faixa de pH adequada para coacervação, onde o surgimento de turbidez é usualmente
4 atribuído ao aparecimento de gotas coacervadas no meio. Assim, essa relação é determinada
5 através da eletroneutralidade do complexo formado, ou seja, quando a curva traçada por este,
6 corta o eixo do pH (ponto 0 para o potencial zeta) (DUCEL et al., 2004).

7

8 **3.2 A Técnica de Coacervação complexa**

9

10 A coacervação complexa é um fenômeno que ocorre em soluções coloidais e, nesse
11 sentido, gelatina e goma arábica tem sido o complexo mais utilizado na coacervação
12 complexa por apresentar propriedades funcionais e coacervados de melhor qualidade em
13 comparação com macromoléculas mais simples (SARAVANAN; RAO, 2010; HUERTAS,
14 2011; SCHMITT; TURGEON, 2011).

15 Resumidamente, o processo de coacervação complexa pode ser explicado da seguinte
16 forma: Os polieletrólitos são macromoléculas que transportam vários grupos carregados
17 (ácidos ou básicos) e devido à dissociação desses grupos, apresentam cargas livres quando
18 dissolvidas em água. Este acontecimento leva à repulsão entre as moléculas com cargas iguais
19 e a um aumento da hidratação em comparação com as moléculas não carregadas. Assim,
20 quando dois colóides de cargas opostas dissolvidos em água são combinados, eles serão
21 atraídos uns pelos outros para compensar as suas cargas. Isto resulta numa hidratação e
22 redução na formação de pequenas gotas que consistem de um complexo coloidal ligeiramente
23 hidratado (fase de coacervado) (Figura 1) (NESTERENKO; ALRIC; SILVESTRE;
24 DURRIEU, 2013; VEMMER; PATEL, 2013).

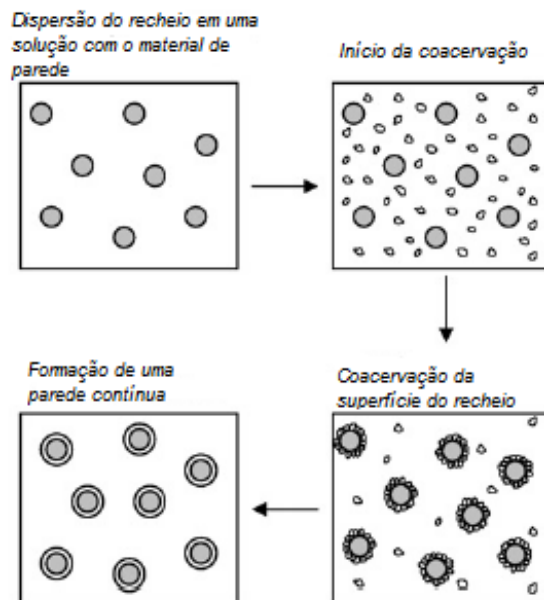
1 Além disso, os estudos de Bungenberg de Jong indicaram que a coacervação complexa
2 é dependente da massa molecular, concentração, da razão entre os dois poliíons e da interação
3 com a força iônica, pH, temperatura e do meio externo. Uma configuração helicoidal aleatória
4 para ambas as macromoléculas também foi considerada importante. (BURGESS, 1990).

5 Um fator relevante que deve ser mantido é o controle crítico das concentrações dos
6 materiais poliméricos, ou seja, a coacervação ocorrerá somente dentro de uma limitada faixa
7 de pH, de concentração de colóide específica e/ou concentração de eletrólito específica. Essa
8 técnica apresenta inúmeras vantagens como baixo custo, versatilidade, eficiente controle no
9 tamanho da partícula, possibilidade de se trabalhar com biopolímeros com ausência de
10 solventes orgânicos e condições brandas de temperatura no processamento (ASSIS,
11 ZAVAREZE, PRENTICE-HERNÁNDEZ; SOUZA-SOARES, 2012; MENEZES et al., 2013;
12 JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014).

13 Quanto à morfologia das partículas, duas formas são obtidas pelo método de
14 coacervação: microcápsulas e microesferas. Nas microcápsulas o agente ativo está envolvido
15 pelo agente encapsulante, já na microesfera o agente ativo está distribuído no agente
16 encapsulante. Além disso, o tamanho das partículas obtidas pelo método de coacervação pode
17 variar entre 1 e 500 μm , e muitos são os fatores que interferem no tamanho e distribuição,
18 entre eles estão os diferentes materiais de parede e as condições de processo. Ademais, esse
19 processo possui valores de eficiência de encapsulação próximos de 100%. Alguns parâmetros
20 podem influenciar a eficiência como as concentrações ativas do núcleo e material de parede, a
21 temperatura e o pH do meio. Além disso, propriedades tais como resistência mecânica,
22 térmica e permeabilidade/porosidade da membrana de microcápsulas coacervadas podem ser
23 alteradas pela reticulação. A reticulação consiste em interligar por meio de ligações cruzadas
24 as cadeias poliméricas, lineares ou ramificadas, formando uma rede polimérica tridimensional

1 (ALVIM; GROSSO, 2008; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; LAMY et al.,
2 2008; NESTERENKO; ALRIC; SILVESTRE; DURRIEU, 2013).

3



4

5 Figura 1 – Representação esquemática do processo de microencapsulação por coacervação complexa.

6

Adaptado de NESTERENKO; ALRIC; SILVESTRE; DURRIEU, 2013.

7

8 3.2.1 Materiais de revestimento utilizados na coacervação complexa

9

10 Para serem utilizados no revestimento das microcápsulas, os materiais devem ser de
11 grau alimentício, biodegradável e capaz de formar uma barreira entre a fase interna e seu
12 exterior. O material da parede afeta particularmente a estabilidade das microcápsulas, a
13 eficiência do processo e o grau de proteção do núcleo ativo. (CHÁVARRI; MARAÑÓN;
14 VILLARÁN, 2012; NESTERENKO; ALRIC; SILVESTRE; DURRIEU, 2013).

15 Segundo MENEZES et al. (2013) os principais polímeros utilizados na encapsulação
16 de probióticos são: carragena, alginato, acetato ftalato de celulose, proteínas, quitosana e
17 amido.

18 Na Tabela 2 estão descritos alguns materiais encapsulantes utilizados na técnica de
19 coacervação complexa descritos na literatura.

1 Tabela 2 – Materiais encapsulantes utilizados na técnica de coacervação complexa

Materiais encapsulantes	Substâncias encapsuladas	Resultados obtidos	Autor
Gelatina/pectina; gelatina/alginato	Cloridrato de metronidazol, Diclofenaco de sódio, Indometacina	Indometacina (62-66% p/p) resultou em maior eficiência de encapsulação que diclofenaco de sódio (49-53% p/p) e que cloridrato de metronidazol (4-7% p/p). Pectina produziu coacervação com gelatina com todos os acidificantes utilizados, porém alginato produziu somente com ácido acético.	SARAVANAN; PANDURANGA RAO (2010)
Proteína de soja/goma arábica	Óleo essencial de laranja	Verificou-se que o pH ótimo para a coacervação foi de 4,0. O rendimento mais elevado foi obtido na proporção de 1:1 e a quantidade de material do núcleo para obter a maior eficiência de microencapsulação e rendimento foi de 10%.	JUN-XIA; HAI-YAN; JIAN (2011)
Gelatina/goma arábica	Ácido ascórbico	Todas as formulações de microcápsulas apresentaram-se esféricas, multinucleadas, ligeiramente solúveis e higroscópicas. A eficiência de encapsulação foi elevada (aproximadamente 98%). O ácido ascórbico foi protegido e mais estável na microcápsula do que em solução.	COMUNIAN et al. (2013)
Pectina/caseína	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	A técnica preservou as contagens de <i>L. acidophilus</i> superior a 10 ⁷ UFC/g em condições de refrigeração, mas não proporcionou proteção para os microrganismos a um pH semelhante ao do estômago humano. Iogurtes preparados com culturas microencapsuladas apresentaram valores mais baixos de pós-acidificação e maior estabilidade em comparação com o produto preparado com a cultura livre.	SHOJI et al. (2013)

1 3.2.2 Aplicações da coacervação complexa para alimentos

2

3 A microencapsulação na indústria alimentícia tem se mostrado uma alternativa viável
4 para solucionar dificuldades na incorporação de alguns ingredientes e aditivos em alimentos e,
5 entre as técnicas de microencapsulação utilizadas, está a coacervação complexa. Entre os
6 ingredientes ativos mais encapsulados para a incorporação em alimentos estão aromas,
7 vitaminas, minerais, microrganismos probióticos e peptídeos bioativos. Yang et al. (2014)
8 utilizaram a coacervação complexa pra encapsular óleo de baunilha em gelatina e goma
9 arábica, com o objetivo de obter novas microcápsulas de sabor e aroma. Shoji et al. (2013)
10 encapsularam *Lactobacillus acidophilus* (LAC-4) em pectina e caseína por coacervação
11 complexa, com o objetivo de proteger e prolongar a viabilidade destes microrganismos em
12 iogurte. Santos et al. (2015) encapsularam xilitol por coacervação complexa utilizando
13 gelatina suína e goma arábica como materiais encapsulantes, com o intuito de prolongar seu
14 poder adoçante e refrescância. (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

15 Alvim; Grosso (2010) utilizaram a coacervação complexa com o objetivo de obter
16 microcápsulas utilizando uma mistura de óleo resina de páprica e óleo de soja como recheio
17 reticulando com glutaraldeído ou transglutaminase, secando as microcápsulas por liofilização
18 e *spray drying* e então avaliaram os efeitos nas características morfológicas, tamanho das
19 microcápsulas e na liberação do recheio hidrofóbico. De acordo com os resultados, a
20 eficiência de encapsulação variou de $96,1 \pm 1,7$ a $98,3 \pm 0,3\%$. Já o diâmetro médio variou entre
21 $38,1 \pm 5,36$ e $106,9 \pm 26,1 \mu\text{m}$. Em relação à morfologia, as microcápsulas úmidas apresentaram
22 formatos arredondados e tamanhos variados, com uma distribuição homogênea do recheio. O
23 processo de liofilização manteve a integridade da matriz em todas as amostras, sem ou com
24 reticulação. As microcápsulas apresentaram-se esféricas, com algumas deformações
25 associadas ao encolhimento da matriz durante a reticulação. Já as microcápsulas submetidas

1 ao processo de *spray drying* apresentaram formato arredondado com uma superfície irregular.
2 Já em relação à liberação, as microcápsulas úmidas sem reticulação liberaram 100% de óleo
3 resina após 30 minutos em álcool anidro. Entretanto, observou-se que a reticulação com a
4 maior concentração de glutaraldeído, foi mais eficiente, pois liberou 65,6% de óleo resina
5 após 120 minutos em álcool anidro. Já a liberação de óleo resina quando a transglutaminase
6 foi utilizada na reticulação, foi próxima a liberação das microcápsulas sem reticulação (93,8%
7 e 100,7%, respectivamente). Comparando-se os processos de secagem, as microcápsulas
8 reticuladas com transglutaminase ou glutaraldeído em menor concentração, após secagem por
9 *spray drying* liberaram maior quantidade de material de recheio do que as liofilizadas. No
10 entanto, quando as microcápsulas foram reticuladas com glutaraldeído em alta concentração,
11 as microcápsulas secas por *spray drying* apresentaram menor liberação que as liofilizadas.
12 Portanto, a coacervação complexa apresenta alta eficiência de encapsulação para óleo resina
13 de páprica, obtendo resultados satisfatórios em relação à secagem e à reticulação.

14 NORI et al. (2011) utilizaram a coacervação complexa com o objetivo de obter
15 própolis em pó com ausência de álcool, com a possibilidade de liberação controlada em
16 alimentos e caracterizar o material obtido. Para esse estudo foram utilizadas as concentrações
17 de 2,5% e 5% de proteína isolada de soja e pectina, utilizadas como encapsulantes. Além
18 disso, a liberação as microcápsulas foi verificada através da avaliação da atividade
19 antioxidante, total de compostos fenólicos e flavonóides e avaliação da concentração mínima
20 inibitória. De acordo com os resultados obtidos, para a obtenção das microcápsulas, o estudo
21 foi realizado utilizando amostras obtidas em ambas as concentrações, em pH 4,0. Em relação
22 à morfologia, a maioria das microcápsulas apresentou formato arredondado e tamanho entre
23 10 e 90 μm . As amostras apresentaram valores de higroscopicidade de $33,46 \pm 0,66$ e
24 $34,10 \pm 1,20$ g de água absorvida/100g de pó e eficiência de encapsulação de $72,01 \pm 0,01$ e
25 $66,12 \pm 0,01$ para as formulações com 2,5 e 5,0 g/100 mL de colóides, respectivamente. Além

1 disso, o processo de coacervação não foi deletério aos compostos responsáveis pela atividade
2 antioxidante. A própolis microencapsulada apresentou atividade inibitória para *S. aureus*,
3 apresentando resultados similares em ambas as amostras, aproximadamente 200-400 µg/mL.
4 Em relação à estabilidade dos compostos fenólicos e flavonoides presentes na própolis, na
5 temperatura de 10°C a porcentagem de compostos fenólicos permaneceu constante por 180
6 dias, entretanto, a 25°C, houve uma pequena redução dessa porcentagem. Já para as amostras
7 formuladas com 2,5 g/mL de colóides, a porcentagem de flavonoides permaneceu constante
8 durante o armazenamento por 180 dias em ambas as temperaturas. No entanto, para as
9 amostras formuladas com 5 g/mL de colóides, a porcentagem de flavonoides reduziu durante
10 o armazenamento. Assim, os resultados apresentados indicaram que foi possível encapsular
11 extrato de própolis com proteína isolada de soja e pectina por coacervação complexa e obter
12 na forma de pó, livre de álcool e com possibilidade de liberação sob condições específicas em
13 alimentos.

14 Já em estudo mais recente, COMUNIAN et al. (2013) utilizaram a coacervação
15 complexa com o objetivo de encapsular ácido ascórbico, caracterizar as cápsulas obtidas e
16 determinar a estabilidade do material encapsulado. Para esse estudo foram realizadas
17 diferentes composições para a produção das microcápsulas, variando as concentrações dos
18 polímeros e do recheio. De acordo com os resultados obtidos, por meio de microscopia óptica,
19 as microcápsulas apresentaram-se arredondadas e multinucleadas. A técnica apresentou
20 eficiência de encapsulação variando entre $97,33 \pm 0,81$ e $99,57 \pm 0,32\%$. Além disso, as
21 microcápsulas apresentaram valores de atividade de água menores que 0,6. Os valores para
22 higroscopicidade variaram entre $3,83 \pm 0,27$ e $4,92 \pm 0,21$ g de água absorvida/100 g de pó, e os
23 valores para solubilidade variaram entre $8,14 \pm 0,51$ e $16,50 \pm 0,95\%$. As microcápsulas
24 apresentaram também diâmetros variando entre $51,67 \pm 2,77$ e $83,82 \pm 4,14$ µm. Em relação à
25 estabilidade, após 30 dias a 20°C, as microcápsulas ainda mantiveram 57 a 80% da

1 concentração inicial de ácido ascórbico. À temperatura mais elevada de 37°C, as
2 microcápsulas mantiveram de 32 a 44% da concentração inicial de ácido ascórbico. Dessa
3 forma, por meio da técnica de coacervação complexa foi possível obter microcápsulas com
4 um recheio hidrofílico. Além disso, apresentaram elevados valores de eficiência de
5 encapsulação do ácido ascórbico.

6

7 3.2.3 Aplicações da coacervação complexa para probióticos

8

9 Segundo CHÁVARRI; MARAÑÓN; VILLARÁN (2012) a coacervação complexa é
10 adequada para a microencapsulação de bactérias probióticas, apresentando vantagens em
11 comparação com outras técnicas, pois consiste num processo de baixo custo, relativamente
12 simples (que não necessariamente utiliza temperaturas elevadas ou solventes orgânicos) e
13 permite a incorporação de uma grande quantidade de microrganismos em relação ao
14 encapsulante.

15 OLIVEIRA et al. (2007) utilizaram a coacervação complexa para encapsular *B. lactis*
16 (Bl 01) e *L. acidophilus* (LAC 4) em caseína/pectina. O objetivo desse estudo foi avaliar a
17 resistência desses microrganismos e das microcápsulas em relação ao processo de secagem
18 por leite de jorro, vida de prateleira e tolerância *in vitro* ao pH ácido, simulando o trato
19 gastrointestinal. O método de leite de jorro mostrou-se adequado para a secagem das
20 microcápsulas, pois a redução na viabilidade dos microrganismos foi somente 0,3 ciclos
21 logarítmicos. Em relação à vida de prateleira, sob armazenamento a 7°C, as microcápsulas
22 contendo Bl 01 permaneceram estáveis por 90 dias, já as microcápsulas com LAC 4
23 permaneceram estáveis por 60 dias. Ambos os microrganismos quando armazenados a 37°C
24 tiveram redução de pelo menos 3 ciclos logarítmicos em 30 dias. Em relação à sobrevivência
25 em diferentes valores de pH, as células de LAC 4 microencapsuladas apresentaram

1 sensibilidade, ocorrendo reduções de 2,7 ciclos logarítmicos em pH 3 e a perda de viabilidade
2 em pH 1. Entretanto, as células de BI 01 microencapsuladas foram menos sensíveis,
3 reduzindo 1 ciclo logarítmico em pH 3 e 2,6 ciclos logarítmicos em pH 1.

4 SHOJI et al. (2013) utilizaram a coacervação complexa para encapsular *L. acidophilus*
5 em pectina/caseína, aplicando as microcápsulas em iogurte de leite de búfala. O objetivo
6 primário desse estudo foi realizar a microencapsulação de *L. acidophilus* por coacervação
7 complexa seguida de secagem por liofilização. O objetivo secundário foi avaliar a viabilidade
8 do *L. acidophilus* microencapsulado durante armazenamento e sua resistência a valores de pH
9 similares ao estômago humano. De acordo com os resultados, *L. acidophilus* demonstrou ser
10 resistente à liofilização, pois redução de apenas 0,7 ciclos logarítmicos foi observada. Em
11 relação ao armazenamento que variou de 30 a 120 dias, os resultados indicaram que a
12 viabilidade do *L. acidophilus* foi maior nas microcápsulas armazenadas sob refrigeração, pois
13 a 7°C a contagem dos microrganismos variou entre 9,04 e 7,23 log UFC.g⁻¹, enquanto que a
14 37°C os microrganismos apresentaram uma perda significativa na viabilidade após 30 dias, de
15 9,70 para 6,47 log UFC.g⁻¹. Já em relação à sobrevivência dos microrganismos em diferentes
16 valores de pH, comparando os microrganismos na forma livre e microencapsulados, pode-se
17 observar que em pH 1 no tempo inicial, os probióticos livres foram totalmente viáveis,
18 entretanto, os microrganismos microencapsulados não apresentaram viabilidade. Após 3h, os
19 microrganismos livres apresentaram redução de 3 ciclos logarítmicos. No entanto, observou-
20 se um comportamento diferente em pH 3, os microrganismos livres apresentaram redução
21 menos intensa e os microrganismos microencapsulados tiveram uma melhor performance,
22 permanecendo viáveis. Por fim, a adição de *L. acidophilus* microencapsulado ao iogurte
23 resultou em menor declínio de pH e valores menores pós-acidificação, comparando às células
24 livres, indicando que o processo de encapsulação resulta em menor atividade metabólica dos
25 microrganismos.

1 Ademais, a técnica de coacervação mostra-se vantajosa frente a outras técnicas. Silva
2 et al. (2015) encapsularam *L. acidophilus* por *spray drying* e observaram que quando
3 armazenados em temperaturas de refrigeração (4°C) e ambiente (25°C), os probióticos
4 apresentaram viabilidade de 7,04 e 6,12 log UFC.g⁻¹, respectivamente, em 120 dias de
5 armazenamento. Em comparação com um estudo realizado por Shoji et al. (2013) em que
6 encapsularam *L. acidophilus* por coacervação complexa, a viabilidade probiótica foi menor.
7 Neste estudo, foi observada uma viabilidade de 7,23 e 6,47 log UFC.g⁻¹, em temperaturas de
8 7°C e 37°C, respectivamente, em armazenamento por 120 dias, portanto, uma viabilidade
9 superior a obtida no estudo anterior. Da mesma forma, Oliveira et al. (2007) encapsularam *B.*
10 *lactis* por coacervação complexa seguida de secagem em leito de jorro, enquanto que, Pedroso
11 et al. (2013) encapsularam *B. lactis* por *spry chilling*. Esses autores observaram que após a
12 encapsulação dos microrganismos, houve uma redução na contagem de células viáveis de 1
13 ciclo logarítmico, entretanto, Oliveira et al. (2007), observaram reduções de somente 0,3
14 ciclos logarítmicos.

15

16 **4 CONCLUSÃO**

17

18 Diante do exposto, observa-se que a técnica de encapsulação por coacervação
19 complexa é utilizada em uma ampla variedade de áreas e produtos. Além disso, inúmeros
20 parâmetros físico-químicos, de elevada importância, estão envolvidos no processo e
21 influenciam-no diretamente. No entanto, demonstra ser uma técnica promissora e possui
22 potencial para a encapsulação de bactérias probióticas com maior eficiência que outras
23 técnicas, ressaltando que, devido aos parâmetros envolvidos no processo, mais estudos devem
24 ser realizados com o intuito de aperfeiçoar a técnica.

25

1 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

2

3 ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation:
4 influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material.
5 *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, out./dez., 2010.

6

7

8 ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry
9 juice by *spray drying*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, p. 17-24, 2013.

10

11

12 ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, E. R.; SOUZA-SOARES, L.
13 A. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos.
14 *Campinas*, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.

15

16

17 BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Resolução – RDC nº 323 de
18 10 de novembro de 2003. Aprova o regulamento técnico de registro, alteração e revalidação
19 de registro dos medicamentos probióticos. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/anvisalegis/resol/2003/rdc/323_03rdc.htm>. Acesso em: 16 janeiro 2015.

20

21

22 BRASIL – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, Lista de alegações de
23 propriedade funcional aprovadas. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 16 janeiro 2015.

24

25

26

27 BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells:
28 From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, v. 104, p. 467-
29 483, 2011.

30

31

32

33 BURGESS, D. J. Practical Analysis of Complex Coacervate Systems. *Journal of Colloid and*
34 *Interface Science*, v. 140, n. 1, November 1990.

35

36

37 BUTEL, M. J. Probiotics, gut microbiota and health. *Médecine et maladies infectieuses*, v. 44,
38 n. 1, p. 1-8, 2014.

39

40

41 CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.;
42 CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as
43 concentrated cultures and in food matrices. *International journal of food microbiology*, v. 149,
44 n. 3, p. 185-193, 2011.

45

46

47 CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; VILLARÁN, M. C. Encapsulation Technology to Protect
48 Probiotic Bacteria. *Intech*, Capítulo 23, p. 501-539, 2012.

1 CHITPRASERT, P.; SUDSAI, P.; RODKLONGTAN, A. Aluminum carboxymethyl
2 cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5.
3 Carbohydrate Polymers, v. 90 n. 1, p. 78-86, set., 2012.

4
5
6 COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.;
7 BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by
8 complex coacervation: Protection and controlled release. Food Research International, v. 52,
9 p. 373-379, 2013.

10
11
12 COZZOLINO, S. Nutracêuticos: o que significa? Associação Brasileira para o Estudo da
13 Obesidade - ABESO, v. 55, p. 5-7, 2012.

14
15
16 DE VOS, P. FAAS, M. M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation
17 of functionality and targeted delivery of bioactive food components. International Dairy
18 Journal, v. 20, n. 4, p. 292-302, 2010.

19
20
21 FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. Revisão: Microencapsulação de
22 ingredientes alimentícios. Brazilian Journal of Food Technology, v. 11, n. 2, p. 103-112,
23 2008.

24
25
26 FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD
27 HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in
28 food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível
29 em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso
30 em: 20ago. 2014. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

31
32
33 FULLER, R. Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriological, Oxford, v. 66,
34 p. 365-378, 1989.

35
36
37 HUERTAS, R. A. P. Revisión: Microencapsulación de Alimentos. Revista Facultad Nacional
38 de Agronomía Medellín, v. 63, n. 2, p. 5669-5684, 2010.

39
40 JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation
41 methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) médium.
42 Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 31, p. 531-542, 2014.

43
44
45 JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex
46 coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. Food Chemistry, v. 125, p. 1267-1272,
47 2011.

48
49

- 1 KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula:
2 Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. *Food*
3 *Research International*, v. 64, p. 567-576, 2014.
4
5
6 KIZILAY, E.; KAYITMAZER, A. B.; DUBIN, P. L. Complexation and coacervation of
7 polyelectrolytes with oppositely charged colloids. *Advances in Colloid and Interface Science*,
8 v. 167, p. 24-37, 2011.
9
10
11 KLASSEN, D. R.; NICKERSON, M. T. Effect of pH on the formation of electrostatic
12 complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum
13 Arabic polysaccharides. *Food Research International*, v. 46, p. 167-176, 2012.
14
15
16 LAMY, R.; NETTO, C. F.; PECEGO, M. G.; PECEGO, J. G. D. C.; PEREIRA, B. D. B.;
17 MORAES JUNIOR, H. V. D.; DANTAS, A. M. Reticulação do colágeno corneano com
18 radiação ultravioleta e riboflavina para tratamento do ceratocone: resultados preliminares de
19 um estudo brasileiro. *Revista Brasileira de Oftalmologia*, v. 67, n. 5, p. 231-5, 2008.
20
21
22 LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for
23 microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between
24 coacervates and the corresponding microcapsule. *Journal of Food Engineering*, v. 111, p. 225-
25 233, 2012.
26
27
28 MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M.
29 E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the
30 probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, v. 27, p. 15-25, 2015.
31
32
33 MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência*
34 *Rural*, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2013.
35
36
37 NACAGAWA, K.; NAGAO, H. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced
38 gelatin-acácia complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*
39 *Engineering Aspects*, v. 411, p. 129-139, 2012.
40
41
42 NAIRN, J. G. Coacervation-phase separation technology. *Advances in Pharmaceutical*
43 *Sciences*, Capítulo 3, p. 93-214, 1995.
44
45
46 NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. Na
47 overview of encapsulation technologies for food applications. *Procedia Food Science*, v. 1,
48 p. 1806-1815, 2011.
49
50

- 1 NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in
2 microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops
3 and Products*, v. 42, p. 469-479, 2013.
4
5
- 6 NORI, M. P.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.;
7 BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex
8 coacervation. *LWT - Food Science and Technology*, v. 44, p. 429-435, 2011.
9
- 10
- 11 OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A.
12 P. 2; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01)
13 and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying.
14 *Drying Technology*, v. 25, p. 1687-1693, 2007.
15
- 16
- 17 PEDROSO, D. L.; DOGENSKI, M.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-
18 TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*
19 and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. *Brazilian
20 Journal of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 777-783, 2013.
21
- 22
- 23 QV, X.; ZENG, Z.; JIANG, J. Preparation of lutein microencapsulation by complex
24 coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*,
25 v. 25, p. 1596-1603, 2011.
26
- 27
- 28 RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. Efeitos do consumo de
29 probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. *Revista Ciência & Saúde*,
30 *Porto Alegre*, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.
31
- 32
- 33 RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in
34 probiotic efficacy. *Food Research International*, v. 43, p. 1-7, 2010.
35
- 36
- 37 RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S.
38 Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, v. 116, p. 369-381, 2013.
39
- 40
- 41 SANTOS, M. G.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S.
42 Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. *Food
43 chemistry*, v. 171, p. 32-39, 2015.
44
- 45
- 46 SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; DE MENEZES, C. R.; DA SILVA, C. D. B.; SORIANI, H.
47 H.; DE OLIVEIRA BASTOS, J.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de
48 probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais
49 simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciência Rural*,
50 v. 45, n. 7, p. 1342-1347, 2015.

- 1 SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation
2 for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being
3 encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, v. 80,
4 p. 808-816, 2010.
5
6
- 7 SCHMITT, C.; TURGEON, S. L. Protein/polysaccharide complexes and coacervates in food
8 systems. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 167, p. 63-70, 2011.
9
10
- 11 SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.;
12 HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L.*
13 *acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and*
14 *Bioproducts Processing*, v. 91, p. 83-88, 2013.
15
16
- 17 SINGH, K.; KALLALI, B.; KUMAR, A.; THAKER, V. Probiotics: A review. *Asian Pacific*
18 *Journal of Tropical Biomedicine*, p. 287-290, 2011.
19
20
- 21 SIOW, L. F.; ONG, C. S. Effect of pH on garlic oil encapsulation by complex coacervation.
22 *Journal of Food Processing and Technology*, v. 4, n. 199, p. 2, 2013.
23
24
- 25 STEFE, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos –
26 Artigo de Revisão. *Saúde e Ambiente em Revista*, v. 3, n.1, p. 16-33, jan./ jun. 2008.
27
28
- 29 TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during
30 processing and storage. *Journal of functional foods*, v. 9, p. 225-241, 2014.
31
32
- 33 VEIS, A. A review of the early development of the thermodynamics of the complex
34 coacervation phase separation. *Advances in Colloid and Interface Science*, v. 167, p. 2-11,
35 2011.
36
37
- 38 VEMMER, M.; PATEL, A. V. Review of encapsulation methods suitable for microbial
39 biological control agentes. *Biological Control*, v. 67, p. 380-389, 2013.
40
41
- 42 WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Probióticos e Prebióticos. Diretrizes
43 Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Guias Mundiais da WGO, outubro,
44 2011.
45
46
- 47 YANG, X; GAO, N.; HU, L.; LI, J.; SUN, Y. Development and evaluation of novel
48 microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. *Journal of Food*
49 *Engineering*, v. 161, p. 87-93, set. 2015.

1 **Manuscrito II**

2 *O Manuscrito será submetido para a publicação na Revista Internacional LWT- Food Science
3 and Technology.

4

5 **Utilização da coacervação complexa para a encapsulação de *Bifidobacterium lactis* Bb-12**
6 **seguida de secagem por liofilização**

7

8 Favor enviar correspondência para

9 *Cristiano Ragagnin de Menezes, Professor

10

11 Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

12

13 Universidade Federal de Santa Maria

14 E-mail: cristiano.ufsm@gmail.com

15

16 **RESUMO**

17 Microcápsulas contendo *B. lactis* foram produzidas por coacervação complexa em
18 gelatina e goma arábica seguida de liofilização e caracterizadas por microscopia óptica e
19 eletrônica de varredura, bem como foi avaliada sua resistência e a resistência dos probióticos
20 frente à liberação “*in vitro*”, ao trato gastrointestinal simulado e ao armazenamento em
21 diferentes temperaturas. O processo de coacervação complexa formou microcápsulas com
22 elevada eficiência de encapsulação (86,04% e 99,52%) e diferentes tamanhos, variando na
23 faixa de 100,12 a 203,32 μm . As microcápsulas foram eficientes em proteger os probióticos
24 na liberação “*in vitro*” mantendo a viabilidade durante 120 dias. Além disso, os probióticos
25 microencapsulados, tanto na forma úmida quanto na forma seca, mantiveram a viabilidade
26 frente às condições gastrointestinais simuladas. Por fim, a técnica de coacervação complexa
27 também foi eficiente em manter a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento em
28 temperaturas de -18°C por 120 dias, 7°C por 120 dias e 25°C por 90 dias. Assim, pode-se

1 afirmar que a técnica de coacervação complexa é apropriada para a encapsulação de
2 probióticos, demonstrando uma elevada eficiência de encapsulação, proteção em diferentes
3 condições adversas, como pH, trato gastrointestinal simulado e diferentes temperaturas.

4 Palavras-chave: microcápsulas; *B. lactis*; coacervação complexa; liofilização.

5 **1 Introdução**

6 Fuller (1989) definiu os probióticos como microrganismos vivos que após a ingestão
7 em quantidade suficiente, desempenham, no hospedeiro, um efeito benéfico para a saúde, por
8 melhorar e manter o equilíbrio da microbiota intestinal. Atualmente, definem-se os
9 probióticos como microrganismos vivos, administrados em quantidades adequadas, que
10 conferem benefícios à saúde do hospedeiro (WORLD GASTROENTEROLOGY
11 ORGANISATION, 2011).

12 Alimentos probióticos têm sido amplamente utilizados por trazerem efeitos benéficos
13 à saúde. As espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais comumente utilizadas
14 como probióticos. Estudos recentes têm demonstrado que a ingestão de alimentos contendo
15 esses probióticos pode prevenir ou reduzir infecções entéricas e infecções do trato respiratório
16 inferior. Especificamente, *Bifidobacterium lactis* Bb-12[®] é relatado por demonstrar efeitos
17 benéficos sobre o metabolismo, como redução de colesterol LDL sérico em pacientes com
18 diabetes tipo 2, aumento do colesterol HDL em mulheres adultas e melhorar a tolerância à
19 glicose durante a gravidez (KABEERDOSS et al. 2011; WORLD GASTROENTEROLOGY
20 ORGANISATION, 2011).

21 Todavia, essas bactérias são sensíveis a uma série de fatores, principalmente a valores
22 ácidos de pH e a presença de oxigênio, assim, podem não permanecer viáveis durante a vida
23 de prateleira do produto e à passagem pelo trato gastrointestinal. Nesse sentido, a
24 microencapsulação surge como uma alternativa de proteção e liberação controlada desses

1 microrganismos, pois através dessa técnica tem-se a separação do material encapsulado do
2 ambiente externo (OLIVEIRA et al., 2007; ALVIM; GROSSO, 2010).

3 A coacervação complexa consiste na combinação de duas soluções de hidrocolóides
4 de cargas opostas, causando a interação e a precipitação dos polímeros complexos. Esta
5 técnica tem se demonstrado promissora na proteção dos probióticos, todavia esse estudo não
6 está totalmente elucidado, surgindo como uma alternativa inovadora nesse sentido. Além
7 disso, é uma técnica promissora por apresentar elevada eficiência de encapsulação (acima de
8 99%) e fácil liberação controlada por stress mecânico, temperatura e mudanças de pH
9 (OLIVEIRA et al., 2007; SHOJI et al., 2013).

10 A técnica de coacervação complexa apresenta inúmeras vantagens quando comparada
11 a outras técnicas como versatilidade, alta eficiência de encapsulação, eficiente controle no
12 tamanho da partícula, possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, com ausência de
13 solventes orgânicos, baixo custo e condições brandas de temperatura no processamento
14 (ASSIS, ZAVAREZE, PRENTICE-HERNÁNDEZ; SOUZA-SOARES, 2012; MENEZES
15 et al., 2013; JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014).

16 Ademais, a secagem das microcápsulas auxilia a preservação da viabilidade dos
17 microrganismos e da atividade metabólica, sendo que a secagem por liofilização é um dos
18 métodos mais utilizados nesse sentido, pois devido à utilização de baixas temperaturas, deve
19 afetar os microrganismos em uma menor extensão que outros processos (OLIVEIRA et al.,
20 2007; SHOJI et al., 2013).

21 Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi microencapsular *Bifidobacterium lactis*
22 Bb-12 por coacervação complexa, seguida de secagem por liofilização, caracterizar e avaliar a
23 estabilidade do material microencapsulado, bem como das microcápsulas.

24 **2 Material e métodos**

25 **2.1 Materiais**

1 Para a formação das microcápsulas foram utilizados: Gelatina tipo A (Gelita,
2 Eberbach, Alemanha); Goma Arábica (CNI, São Paulo, Brasil); Cultura probiótica
3 *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) obtida pela Chr. Hansen do Brasil (Valinhos, São Paulo,
4 Brasil).

5 **2.2 Medida do potencial zeta dos materiais de revestimento**

6 O potencial zeta do par polimérico, gelatina e goma arábica, foi determinado pelo
7 equipamento Zetasizer NanoZS (Malvern Instruments Ltd., Worcestershire, UK). O par
8 polimérico foi analisado em três proporções, 1:3, 1:1 e 3:1 (GE:GA), em pH de 3,0, 4,0, 5,0,
9 6,0 e 7,0, a 25°C e em triplicata.

10 **2.3 Preparo do inóculo**

11 Até o momento da utilização, a cultura probiótica *Bifidobacterium lactis* (Bb-12) foi
12 mantida à -18°C. Para o preparo do inóculo, a cultura probiótica foi ativada em leite
13 reconstituído 12% e incubada durante 12 horas a 37°C. Após, a cultura ativada foi
14 centrifugada a 2470 x g, a 4°C, por 15 minutos e lavada com solução de NaCl (0,85%) por
15 duas vezes. As células foram então suspensas em solução salina para obtenção de uma
16 solução com aproximadamente 10 log UFC.mL⁻¹.

17 **2.4 Microencapsulação pela técnica de coacervação complexa**

18 A produção das microcápsulas foi realizada de acordo com metodologia descrita por
19 Alvim; Grosso (2010), com modificações. Primeiramente, 1g da cultura foi adicionada a 100
20 mL de gelatina 2,5%, mantendo sob agitação com agitador magnético com aquecimento
21 (Centauro, Paraná, Brasil) (48-50°C) por 10 minutos para homogeneização dos
22 microrganismos. Após essa etapa, adicionou-se 100 mL de goma arábica 2,5% e 400 mL de
23 água destilada estéril, mantendo sob agitação e aquecimento (50 ± 2°C) em chapa magnética
24 agitadora (Centauro), ajustando em seguida o pH para 4,0, de acordo com a determinação do
25 potencial zeta, com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Após esta etapa, desligou-se o

1 aquecimento e manteve-se sob agitação, deixando-se esfriar naturalmente a aproximadamente
2 30°C, e após, o abaixamento da temperatura foi realizado até atingir a temperatura de 12 –
3 10°C, com auxílio de banho de gelo. Deixou-se sedimentar e o coacervado foi retirado por
4 filtração em peneira com porosidade de 0,038 mm (400 mesh).

5 Uma parcela das microcápsulas produzidas foi congelada (-18°C por 24 horas) no
6 mesmo dia da produção. A liofilização foi realizada em liofilizador (L101, Liotop, Brasil),
7 onde as microcápsulas foram colocadas congeladas (-18°C) e retiradas do liofilizador 24
8 horas após o início do processo (vácuo: 0,200 – 0,300 µHg e temperatura do condensador de –
9 37°C).

10 **2.5 Eficiência de encapsulação**

11 A eficiência de encapsulação (EE), ou seja, a taxa de sobrevivência dos
12 microrganismos ao processo de microencapsulação (Equação 1) foi calculada conforme
13 Annan et al. (2008), para as microcápsulas úmidas e secas.

14

$$15 \quad EE = (N/N_0) \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

16 Onde N é o número de células viáveis (log UFC.g⁻¹) liberadas a partir das
17 microcápsulas e N₀ é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹) no concentrado de células
18 antes da microencapsulação.

19 **2.6 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica** 20 **de varredura**

21 A microscopia ótica das microcápsulas úmidas foi realizada utilizando microscópio
22 óptico (Scope A.1, Zeiss, Alemanha) equipado com câmera digital Axio Cam MRc (Carl
23 Zeiss). A morfologia das microcápsulas secas foi avaliada em Microscópio Eletrônico de
24 Varredura (Sigma 300 VP, Zeiss, Alemanha). As microcápsulas foram fixadas com uma fita
25 dupla face em stubs de alumínio e recobertas por uma fina camada de carbono.

1 **2.7 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas**

2 O tamanho médio das microcápsulas úmidas e secas foi medido no equipamento
3 Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha).

4 **2.8 Contagem das células viáveis**

5 Diluições apropriadas foram transferidas em triplicada para placas de Petri estéreis,
6 seguidas de adição de ágar MRS (Kasvi, Paraná, Brasil) suplementado com cloreto de lítio
7 (0,1%) e L-cisteína (0,05%). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em jarras de
8 anaerobiose contendo geradores de anaerobiose (Anaerobac, Probac, São Paulo, Brasil). A
9 diluição das microcápsulas consistiu em pesar 1 g de microcápsulas úmidas e 0,1 g de
10 microcápsulas secas, seguido da adição de 9 mL de solução tampão fosfato de sódio (pH 7,5)
11 de acordo com a metodologia descrita por Sheu; Marshall; Heymann (1993). Os resultados
12 foram expressos em log UFC.mL⁻¹.

13 **2.9 Viabilidade das células microencapsuladas frente a diferentes soluções de pH**

14 As microcápsulas úmidas e secas foram adicionadas em diferentes sistemas tampões,
15 tampão acetato pH 4,5, tampão fosfato de sódio pH 6,0 e tampão fosfato de sódio pH 7,5, na
16 proporção de 0,01 g.ml⁻¹. As soluções tampões adicionadas das microcápsulas foram
17 submetidas à agitação de 150 rpm, em incubadora refrigerada tipo shaker (TE-421, Tecnal,
18 Brasil), à 37°C. Foram retiradas alíquotas de 1ml após 60, 120 e 180 minutos de agitação. A
19 partir das alíquotas coletadas, foram efetuadas diluições decimais seriadas para a contagem
20 das células viáveis. Os resultados foram expressos em log UFC. mL⁻¹.

21 **2.10 Sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sob condições gastrointestinais** 22 **simuladas**

23 As condições gastrointestinais simuladas para as microcápsulas úmidas e secas foram
24 realizadas de acordo com Madureira et al. (2011), com modificações. Nesta técnica a
25 viabilidade das microcápsulas probióticas foi avaliada sequencialmente em meios que

1 simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo).
2 Para esta análise, foram utilizadas alíquotas de 2 g de microcápsulas úmidas e 1 g de
3 microcápsulas secas. Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg.mL⁻¹ de pepsina (Sigma),
4 preparada em HCl 0,1 N; esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase
5 gástrica, a uma concentração de 0,05 mL.mL⁻¹ durante 90 min; sendo o pH ajustado até 2,0
6 utilizando HCl 1 M. Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma concentração de 0,25
7 mL.mL⁻¹, uma solução contendo 2 g.L⁻¹ de pancreatina (Sigma) e 12 g.L⁻¹ de sais biliares
8 bovinos (Sigma), preparada em NaHCO₃ 0,1 M. Finalmente, a etapa referente ao íleo foi
9 realizada por um aumento do pH para 6,5 utilizando uma solução de NaHCO₃ 0,1 M. Todas as
10 soluções foram preparados no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro
11 0,20 µm (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). A análise foi conduzida em uma
12 incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a 37°C com o intuito de
13 simular a temperatura do corpo humano e agitação mecânica foi utilizada em paralelo para
14 simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas
15 em seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem
16 das células viáveis, conforme o item 2.8. Os resultados foram expressos em log UFC. mL⁻¹.

17 **2.11 Viabilidade das culturas probióticas microencapsuladas durante o armazenamento** 18 **a diferentes temperaturas**

19 Ambas as microcápsulas úmidas e secas foram armazenadas a temperatura ambiente
20 (25°C), de refrigeração (7°C) e de congelamento (-18°C), por 120 dias. Foi realizada a
21 contagem de células viáveis conforme o item 2.8. Os resultados foram expressos em log UFC.
22 mL⁻¹.

23 **2.12 Análise estatística**

1 Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA), sendo que
2 as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%
3 ($p < 0,05$), utilizando o *software* Statistica 7.

4 **3 Resultados e discussão**

5 **3.1 Medida do potencial zeta dos materiais de revestimento**

6 O potencial zeta do par polimérico está representado na Figura 1. Pode-se observar
7 que o potencial zeta ocorreu na proporção 1:1 próximo ao pH 4,0 (2,27 mV), pois foi o valor
8 mais próximo da eletroneutralidade, ou seja, o mais adequado para a encapsulação. Observa-
9 se também que a proporção 1:1 próximo ao pH 5,0, 1:3 próximo ao pH 3,0, 3:1 próximo ao
10 pH 5,0 e 6,0, também estiveram próximos da faixa apropriada para a encapsulação obtendo
11 potencial zeta de -2,38 mV, 2,29 mV, 2,30 mV e -2,28 mV, respectivamente. Todavia, o
12 resultado obtido está de acordo com Lv et al. (2012), que estudaram o potencial zeta de
13 gelatina e goma arábica e obtiveram a proporção 1:1 como a mais adequada para a
14 microencapsulação e o pH 4,1 como a melhor condição para a formação das microcápsulas,
15 semelhante ao resultado encontrado no presente trabalho.

16 A coacervação complexa entre proteína e polissacarídeo ocorre principalmente devido
17 a atração eletrostática. Além disso, outras interações podem estar secundariamente
18 envolvidas, como interação hidrofóbica, ligação por pontes de hidrogênio e força de van der
19 Waals (LV et al., 2012). Segundo Lv et al. (2012) a tendência a alteração com a variação da
20 relação da mistura não foi totalmente elucidada, mas a maior turvação é coincidente com a
21 atração eletrostática mais forte. Além disso, especificamente, o pH correspondente ao extremo
22 da turbidez é reconhecido como o pH de equivalência elétrica (EEP), onde a intensidade da
23 atração eletrostática entre gelatina e goma arábica é a mais elevada. Assim, a teoria base da
24 microencapsulação é apenas dependente da formação de complexos insolúveis e sua
25 sedimentação no material do núcleo.

1 Os resultados encontrados no presente trabalho estão de acordo com Nacagawa;
2 Nagao (2012), que encapsularam β -caroteno por coacervação complexa utilizando gelatina e
3 goma arábica como encapsulantes com o intuito de estudar a cinética do processo. Em seus
4 estudos, verificaram que a complexação entre gelatina e goma arábica foi obtida em pH 3,0 e
5 4,0. Da mesma forma, Lamprecht; Schäfer; Lehr (2001), Jouzel et al. (2003), Xing et al.
6 (2005) utilizaram em seus experimentos a proporção de gelatina e goma arábica de 1:1 em pH
7 4,0.

8 **3.2 Eficiência de encapsulação**

9 As eficiências de encapsulação obtidas neste trabalho foram de 99,52% e 86,04%, para
10 as microcápsulas úmidas e secas, respectivamente (Tabela 1), havendo diferença significativa
11 entre os valores obtidos ($p < 0,05$). Fazendo-se uma comparação, a eficiência de encapsulação
12 das microcápsulas secas foi relativamente menor em comparação com as microcápsulas
13 úmidas, pois há perdas na contagem de células viáveis devido ao processo de secagem causar
14 a morte de algumas células (SHOJI et al., 2013).

15 CHANG et al. (2006) obtiveram em seu estudos eficiências de encapsulação variando
16 de 80 a 100% para a encapsulação de óleo de cânfora por coacervação complexa utilizando
17 gelatina e goma arábica. PRATA et al. (2008) encontraram uma eficiência de encapsulação de
18 95% para microcápsulas de óleo essencial de vetiver produzidas por coacervação complexa
19 utilizando gelatina e goma arábica. Todavia, em um estudo realizado por Annan et al. (2008)
20 para a encapsulação de *Bifidobacterium adolescentis* por gelificação iônica utilizando
21 gelatina, foram encontradas eficiências de encapsulação variando entre 29,9% e 41,1%.
22 Acredita-se que as diferenças encontradas estejam relacionadas com a técnica de
23 encapsulação, aos agentes encapsulantes, suas concentrações e aos materiais que foram
24 encapsulados. De acordo com Gebara et al. (2013), considerando a ampla variedade de
25 microrganismos estudados, as técnicas de encapsulação e os materiais de revestimento

1 utilizados, a comparação entre as eficiências de encapsulação descritas na literatura torna-se
2 dificultada.

3 As elevadas eficiências de encapsulação encontradas neste estudo podem ter relação
4 com a resistência natural do microrganismo e às condições de encapsulação, como a
5 temperatura (45°C), não utilização de solventes orgânicos e pH 4,0, o que favorece a interação
6 entre a gelatina e a goma arábica (GEBARA et al. 2013). Além disso, a coacervação
7 complexa é considerada uma técnica de encapsulação promissora em função de sua elevada
8 eficiência de encapsulação (acima de 99%), como foi demonstrado neste estudo.

9 **3.3 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica** 10 **de varredura**

11 Observa-se na Figura 2a e 2b, por meio da microscopia óptica (microcápsulas úmidas),
12 que as microcápsulas apresentaram uma distribuição multinuclear e homogênea dos
13 microrganismos, apresentando formatos redondos e tamanhos variados, bem como a presença
14 do microrganismo no interior da microcápsula. Os resultados encontrados são semelhantes
15 aos resultados de Alvim; Grosso (2010). Do mesmo modo, Dong et al. (2011) encapsularam
16 menta por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica, e observaram, através da
17 microscopia, que as microcápsulas apresentaram estrutura multinuclear, com concentração
18 das gotículas de óleo no centro das microcápsulas. Além disso, pode-se afirmar que a
19 microscopia óptica pode ser utilizada como um instrumento de avaliação preliminar e que as
20 microcápsulas foram formadas com êxito pela técnica de coacervação complexa (OLIVEIRA
21 et al. 2007; ALVIM; GROSSO, 2010).

22 No entanto, em relação à microscopia eletrônica de varredura (microcápsulas secas),
23 pode-se observar que se formaram aglomerados de microcápsulas, levando a uma perda da
24 forma esférica, o que é comum pela secagem por liofilização pelo encolhimento da matriz
25 durante o processo de secagem (Figura 3a e 3b). Oliveira et al. (2007) também observaram a

1 formação de aglomerados em microcápsulas de *B. lactis* produzidas por coacervação
2 complexa em pectina e caseína secas em leito de jorro. Wu et al. (2014) produziram
3 microcápsulas de sulforafano em diferentes materiais encapsulantes por spray dryer e
4 observaram a formação de alguns aglomerados. Da mesma forma, Comunian et al. (2013)
5 observaram a formação de aglomerados em microcápsulas de ácido ascórbico produzidas por
6 coacervação complexa e secas por liofilização. Além disso, foi possível observar nas
7 microcápsulas a presença de probióticos, similar aos resultados encontrados por Etchepare
8 et al. (2016) (ALVIM; GROSSO, 2010; COMUNIAN et al. 2013; ETCHEPARE et al. 2016).

9 **3.4 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas**

10 As microcápsulas úmidas apresentaram diâmetros médios de 100,12 μm . Estes
11 resultados são próximos aos obtidos por Saravanan; Rao (2010) em que encontraram
12 diâmetros médios de 110,64 μm ao microencapsular indometacina utilizando pectina e
13 gelatina como agentes encapsulantes por coacervação complexa. Todavia, Alvim; Grosso
14 (2010) obtiveram diâmetros médios de 96,4 μm quando produziram microcápsulas de
15 oleoresina de páprica utilizando gelatina e goma arábica por coacervação complexa. Esses
16 resultados demonstram que a coacervação complexa para a encapsulação de probióticos
17 formou microcápsulas com tamanhos adequados e que estão em conformidade com a
18 literatura.

19 Segundo Hansen et al. (2002) um tamanho de partícula inferior a 100 μm seria
20 vantajoso em relação às propriedades sensoriais e permite a adição direta de probióticos
21 encapsulados em uma grande variedade de alimentos.

22 Em relação às microcápsulas secas, estas apresentaram diâmetros médios de 203, 32
23 μm . Esse valor de diâmetro médio pode estar relacionado à formação de aglomerados.
24 Todavia, Oliveira; Petrovick (2010) os diâmetros médios de microcápsulas produzidas por
25 spray drying podem variar de 15 a 250 μm . Comparando-se aos resultados obtidos, pode-se

1 afirmar que a coacervação complexa foi eficiente e mais vantajosa, pois formou
2 microcápsulas com menor diâmetro médio.

3 De acordo com Oliveira et al. (2007) essa variação de tamanho, em microcápsulas
4 secas, se deve à formação de estruturas compactas produzidas por uma matriz coesa, ou seja,
5 devido a aderência dos materiais encapsulantes que levam à formação de aglomerados.
6 Segundo Alvim; Grosso (2010); Comunian et al. (2013), uma grande faixa de valores de
7 diâmetro médio de partículas coacervadas pode ser observado e vários fatores interferem no
8 tamanho das microcápsulas produzidas por coacervação complexa, como as condições do
9 processo, incluindo as condições para a preparação da emulsão, velocidade e tempo de
10 homogeneização, velocidade de arrefecimento, e as características dos materiais de parede e
11 recheio, tais como a tensão superficial e grau de hidrofobicidade.

12 **3.5 Viabilidade das células microencapsuladas frente a diferentes soluções de pH**

13 O ensaio de liberação foi realizado com o intuito de analisar a viabilidade das
14 microcápsulas em relação às variações de pH, os quais são encontrados em diferentes
15 matrizes alimentícias e na passagem pelo trato gastrointestinal.

16 Pode-se observar, por meio da Tabela 2, que o número de células de *B. lactis* Bb-12
17 permaneceu viável no decorrer de 3 horas, tanto para as microcápsulas úmidas quanto para as
18 microcápsulas secas, mantendo a viabilidade acima de 6 log UFC. g⁻¹ em todos os tratamentos
19 e apresentando diferença significativa entre os valores obtidos ($p < 0,05$). Quando expostas
20 em soluções de pH 4,5, 6,0 e 7,5, as microcápsulas úmidas apresentaram viabilidade ao final
21 de 3 horas de observação de 9,39, 8,84 e 8,60 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Da mesma
22 forma, as microcápsulas secas apresentaram viabilidade de 8,87, 8,70 e 10,24 log UFC.g⁻¹
23 para as soluções de pH 4,5, 6,0 e 7,5, respectivamente ao final de 3 horas.

24 Além disso, pode-se observar que em meio ácido a liberação dos microrganismos
25 ocorreu em um menor espaço de tempo. Isso pode ter ocorrido devido ao fato que as proteínas

1 em meio ácido são desnaturadas, assim ocorrendo a liberação dos microrganismos das
2 microcápsulas. Contudo, em um estudo realizado por OLIVEIRA et al. (2007), em que as
3 microcápsulas de pectina e caseína contendo *B. lactis* e produzidas por coacervação complexa
4 foram expostas à ambientes ácidos, observou-se que houve reduções na contagem de células
5 viáveis de 1 ciclo logarítmico após 3 horas de observação. Por outro lado, Josué et al. (2000)
6 estudaram a liberação de microcápsulas de quitosana e ácido acrílico obtidas por extrusão e
7 impregnadas com eosina e observaram sua exposição em meio ácido. Em um intervalo de 2
8 horas, não ocorreu a liberação de eosina, entretando, em meio básico, ocorreu, praticamente, a
9 liberação total de eosina.

10 No final de 3 horas, as maiores contagens de células viáveis foram observadas nas
11 microcápsulas secas, pois a secagem fornece maior proteção ao microrganismo,
12 principalmente pelo fato de não haver grande disponibilidade de água na microcápsula e, com
13 isso, as reações e as atividades metabólicas dos microrganismos não ocorrem com facilidade
14 (OLIVEIRA et al., 2007).

15 De acordo com a legislação, para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos, é
16 necessário que o número de células viáveis esteja no mínimo em $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Assim, os
17 resultados obtidos demonstram que a técnica de coacervação complexa é eficiente para
18 proteger o probiótico, em ambas as formas de microcápsulas (úmidas e secas), pois os
19 microrganismos apresentaram-se viáveis em todas as condições de pH estudadas (FAO/WHO,
20 2001).

21 **3.6 Sobrevivência de *Bifidobacterium lactis* Bb-12 sob condições gastrointestinais** 22 **simuladas “*in vitro*”**

23 Comparando-se as microcápsulas úmidas e secas, após a passagem do estômago para o
24 duodeno e do duodeno para o íleo, observa-se que as contagens de células viáveis foram de
25 $7,78$ e $7,77 \log \text{UFC.g}^{-1}$, para as microcápsulas úmidas e $8,76$ e $8,75 \log \text{UFC.g}^{-1}$, para as

1 microcápsulas secas, ou seja, superiores a 6 log UFC.g⁻¹ em ambos os tratamentos, estando de
2 acordo com os requisitos para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos, o que não é
3 observado para os microrganismos na forma livre (Tabela 3) (FAO/WHO, 2001).

4 Na etapa referente ao óleo, reduções de 4,68 e 1,92 log UFC.g⁻¹ foram observadas para
5 as microcápsulas úmidas e secas, respectivamente, quando comparadas às contagens de
6 células viáveis iniciais, apresentando diferenças significativas em ambas as microcápsulas.
7 Estes resultados estão de acordo com Oliveira et al. (2007), em que as condições empregadas
8 no processo de secagem garantiram a integridade celular microbiana, justificando a baixa
9 redução na contagem de células viáveis das microcápsulas secas.

10 Os resultados encontrados no presente trabalho estão melhores que resultados
11 encontrados na literatura. Oliveira et al. (2007) encapsularam *B. lactis* por coacervação
12 complexa em pectina e caseína, seguida de secagem em leito de jorro e observaram que
13 quando as microcápsulas foram expostas às condições gastrointestinais simuladas, o processo
14 de microencapsulação não foi suficiente para proteger os microrganismos, pois as reduções
15 encontradas para os microrganismos encapsulados foram as mesmas que os microrganismos
16 na forma livre. Da mesma forma, Pedroso et al. (2013) encapsularam *B. lactis* por spray
17 chilling em manteiga de cacau e lecitina e quando expuseram as microcápsulas às condições
18 gastrointestinais simuladas, observaram que tanto as microcápsulas na forma livre quanto as
19 microcápsulas encapsuladas, apresentaram reduções de 1,3 log UFC.g⁻¹, apresentando
20 viabilidade próxima de 8 e 6 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Ademais, Silva et al. (2015)
21 encapsularam *B. animalis* por spray drying e compararam os probióticos na forma livre e
22 microencapsulados frente às condições gastrointestinais simuladas. Observaram que *B.*
23 *animalis* na forma livre não resistiram às condições gastrointestinais simuladas, não havendo
24 contagem após 120 minutos de incubação. Já os *B. animalis* microencapsulados, após 360

1 minutos de incubação, possuíam $9,86 \log \text{UFC.g}^{-1}$, demonstrando que a microencapsulação
2 protege os microrganismos das condições gastrointestinais simuladas.

3 **3.7 Viabilidade das culturas probióticas microencapsuladas durante o armazenamento a** 4 **diferentes temperaturas**

5 A Tabela 4 mostra o efeito da temperatura ambiente (25°C), de congelamento (-18°C)
6 e de refrigeração (7°C) na viabilidade de *B. lactis* Bb-12 nas microcápsulas úmidas e secas.

7 Em relação ao armazenamento em temperatura ambiente, tanto as microcápsulas
8 úmidas quanto as microcápsulas secas, permaneceram viáveis até 90 dias de armazenamento,
9 com contagens de células viáveis em torno de $6,60$ e $9,45 \log \text{UFC.g}^{-1}$, respectivamente. De
10 acordo com a legislação, para que os probióticos exerçam seus efeitos benéficos, é necessário
11 que o número de células viáveis esteja no mínimo em $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Além disso, os
12 resultados encontrados estão de acordo com Oliveira et al. (2007), que descrevem que o
13 armazenamento de culturas bacterianas por vários meses em temperatura acima de 10°C , sem
14 uma perda significativa de atividade parece ser impossível.

15 Quanto ao armazenamento em temperatura de refrigeração, as microcápsulas úmidas e
16 secas apresentaram viabilidade similar até os 120 dias de armazenamento, apresentando
17 contagens de células maiores que $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Contudo, desde o início, as microcápsulas
18 úmidas apresentaram maior viabilidade que as microcápsulas secas, com contagens de células
19 viáveis em torno de 8 e $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, respectivamente. De acordo com Shoji et al. (2013) o
20 congelamento lento requerido por este processo pode causar alguma injúria nas células e,
21 consequentemente, a eliminação de alguns microrganismos. Além disso, é esperado que a
22 secagem por liofilização, em baixas temperaturas, prejudique os microrganismos numa menor
23 extensão do que outros processos, como *o spray drying*.

24 Com relação ao armazenamento em temperatura de congelamento, esse tratamento
25 apresentou a maior viabilidade entre os tratamentos analisados, com contagens de células

1 viáveis acima de 6 log UFC.g⁻¹, tanto para as microcápsulas úmidas quanto as microcápsulas
2 secas, ao final dos 120 dias de armazenamento. De acordo com Oliveira et al. (2007) a
3 estabilidade bacteriana durante o armazenamento aumenta com uma diminuição da
4 temperatura, assim estando em concordância com os resultados obtidos.

5 Pode-se afirmar que a técnica de coacervação complexa foi muito eficiente em
6 proteger os probióticos de condições adversas durante o armazenamento, como a temperatura,
7 demonstrando a relevância dessa técnica. Semelhantemente, Silva et al. (2015) encapsularam
8 *B. lactis* por *spray drying* e analisaram as microcápsulas por 120 dias armazenadas em
9 temperaturas de 4 e 25°C. Esses autores observaram que os microrganismos permaneceram
10 viáveis em ambas as temperaturas, com contagens de células viáveis de 7,20 e 6,30 log
11 UFC.g⁻¹, respectivamente. Entretanto, Oliveira et al. (2007) encapsularam *B. lactis* por
12 coacervação complexa seguida de secagem em leito de jorro. Essas microcápsulas foram
13 armazenadas em 7 e 37°C por 120 dias. Foi observado na temperatura de 7°C que os
14 microrganismos mantiveram a viabilidade por 60 dias, apresentando contagem de células
15 viáveis de 6,32 log UFC.g⁻¹. Já as microcápsulas armazenadas a 37°C perderam a viabilidade
16 em 30 dias, apresentando contagem de células viáveis de 5,08 log UFC.g⁻¹ no final desse
17 período. Esses resultados demonstram que o processo de liofilização realizado neste trabalho
18 manteve a viabilidade dos probióticos, obtendo contagens similares entre as microcápsulas
19 úmidas e secas, mais uma vez, demonstrando a substancial vantagem da técnica de
20 coacervação complexa.

21 Por fim, todos os tratamentos apresentaram viabilidade satisfatória por pelo menos 90
22 dias de armazenamento, estando de acordo com a legislação que considera contagens de
23 células viáveis de no mínimo 6 log UFC.g⁻¹ para que os probióticos exerçam seus benefícios
24 (FAO/WHO, 2001).

1 **4 Conclusão**

2 A técnica de coacervação complexa se mostrou extremamente relevante para a
3 microencapsulação de *B. lactis* Bb-12, pois tanto para as microcápsulas úmidas quanto para as
4 microcápsulas secas demonstraram elevadas eficiências de encapsulação e proteção dos
5 probióticos. Ademais, apresenta inúmeras vantagens em comparação com outras técnicas,
6 como a facilidade do processo, a versatilidade, o uso de biopolímeros, o uso de temperaturas
7 relativamente baixas e o baixo custo do processo. Além disso, a microcápsula foi capaz de
8 proteger o probiótico frente às condições gastrointestinais e proporcionou viabilidade por pelo
9 menos 90 dias em armazenamento sob distintas condições de temperaturas.

10 **Referências bibliográficas**

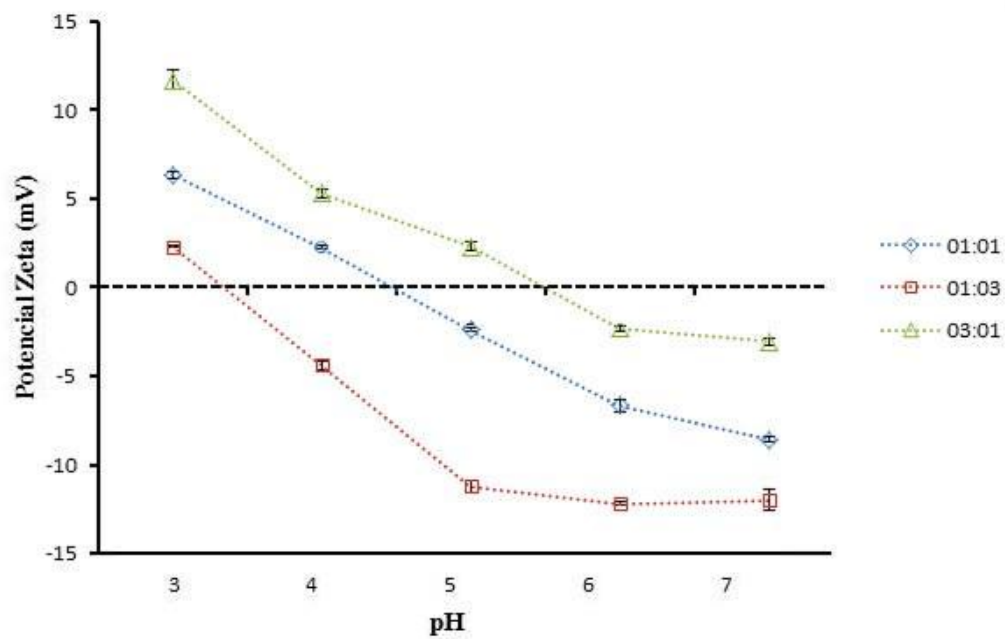
- 11 ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation:
12 influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material.
13 Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, out./dez., 2010.
- 14 ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin
15 microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis*15703T during
16 exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Research International, v. 41, p. 184-
17 193, 2008.
- 18 ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, E. R.; SOUZA-SOARES, L. A.
19 Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. Campinas, v. 15, n. 2,
20 p. 99-109, 2012.
- 21 CHANG, C. P.; LEUNG, T. K.; LIN, S. M.; HSU, C. C. Release properties on gelatin-gum
22 arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. Colloids and Surfaces
23 B: Biointerfaces, v. 50, p. 136-140, 2006.
- 24 COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.;
- 25 BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by

- 1 complex coacervation: Protection and controlled release. Food Research International, v. 52,
2 p. 373-379, 2013.
- 3 DONG, Z.; MA, Y.; HAYAT, K.; JIA, C.; XIA, S.; ZHANG, X. Morphology and release
4 profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. Journal of
5 Food Engineering, v. 104, n. 3, p. 455-460, 2011.
- 6 DUCCEL, V.; RICHARD, J.; SAULNIER, P.; POPINEAU, Y.; BOURY, F. Evidence and
7 characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to
8 the microencapsulation of oil droplets. Colloids and Surfaces A-Physicochemical and
9 Engineering Aspects, v. 232, n. 2-3, p. 239-247, 2004.
- 10 ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-
11 LOPES, E.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and
12 chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate.
13 LWT - Food Science and Technology, v. 65, p. 511-517, 2016.
- 14 Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization.
15 (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live
16 lactic acid bacteria.
- 17 FULLER, R. Probiotics in man and animals. Journal Applied Bacteriological, Oxford, v. 66,
18 p. 365-378, 1989.
- 19 GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.;
20 GIGANTE, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein
21 microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Research
22 International, v. 51, p. 872-878, 2013.
- 23 HANSEN, L. T.; ALLAN-WOJTAS, P. M.; JIN, Y. L.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-
24 alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal
25 conditions. Food Microbiology, v. 62, p. 47-55, 2002.

- 1 JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation
2 methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) médium.
3 Renewable and Sustainable Energy Reviews, v. 31, p. 531-542, 2014.
- 4 JOSUÉ, A.; LARANJEIRA, M. C.; FÁVERE, V. T.; KIMURA, I. Y.; PEDROSA, R. C.
5 Liberação controlada da eosina impregnada em microesferas de copolímero de quitosana e
6 poli (ácido acrílico). Polímeros: Ciência e tecnologia, v. 10, n. 3, p. 116-121, 2000.
- 7 JOUZEL, B.; PENNARUN, A. L.; PROST, C.; RENARD, D.; PONCELET, D.;
8 DEMAIMAY, D. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the
9 development of the *Crassostrea gigas* oyster flavours. Journal of Microencapsulation, v. 20,
10 n. 1, p. 35-46, 2003.
- 11 KABEERDOSS, J.; DEVI, R. S.; MARY, R. R.; PRABHAVATHI, D.; VIDYA, R.;
12 MECHENRO, J.; MAHENDRI, N. V.; PUGAZHENDH, S.; RAMAKRISHNA, B. S. Effect
13 of yoghurt containing *Bifidobacterium lactis* Bb12® on faecal excretion of secretory
14 immunoglobulin A and human beta-defensin 2 in healthy adult volunteers. Nutrition Journal,
15 v. 10:138, 2011.
- 16 LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U. F.; LEHR, C. M. Influences of process parameters on
17 preparation of microparticle used as a carrier system for $\dot{U} - 3$ unsaturated fatty acid ethyl
18 esters used in supplementary nutrition. Journal of Microencapsulation, v. 18, n. 3, p. 347-357,
19 2001.
- 20 LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization
21 formicrocapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between
22 coacervates and the corresponding microcapsule. Journal of Food Engineering, v. 111, p. 225-
23 233, 2012.

- 1 MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X.
2 Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to
3 simulatedgastrointestinal conditions. *Food Research International*, v. 44, p. 465-470, 2011.
- 4 MENEZES, C. R. et al. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência*
5 *Rural*, v. 43, n. 7, p. 1309-1316, 2013.
- 6 NACAGAWA, K. NAGAO, H. Microencapsulation of oil droplets using freezing-induced
7 gelatin–acácia complex coacervation. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and*
8 *Engineering Aspects*, v. 411, p. 129-139, 2012.
- 9 OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A.
10 P.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (Bl 01) and
11 *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. *Drying*
12 *Technology*, v. 25, p. 1687-1693, 2007.
- 13 OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. *Spray drying* of plant extracts: basic remarks and
14 application. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, v. 20, n. 4, p. 641-650, 2010.
- 15 PEDROSO, D. L.; DOGENSKI, M.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-
16 TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and
17 *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. *Brazilian Journal*
18 *of Microbiology*, v. 44, n. 3, p. 777-783, 2013.
- 19 PRATA, A. S.; ZANIN, M. H.; RÉ, M. I., GROSSO, C. R. F. Release properties of chemical
20 and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe
21 plus vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 67, p. 171-178, 2008.
- 22 SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation
23 for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being
24 encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, v. 80,
25 p. 808-816, 2010.

- 1 SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in
2 frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 7, p. 1902-1907,
3 1993.
- 4 SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.;
5 HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L.*
6 *acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and*
7 *Bioproducts Processing*, v. 91, p. 83-88, 2013.
- 8 SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; DE MENEZES, C. R.; DA SILVA, C. D. B.; SORIANI, H.
9 H.; DE OLIVEIRA BASTOS, J.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de
10 probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais
11 simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciência Rural*,
12 v. 45, n. 7, p. 1342-1347, 2015.
- 13 WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Probióticos e Prebióticos. Diretrizes
14 Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Guias Mundiais da WGO, outubro,
15 2011.
- 16 WU, Y.; ZOU, L.; MAO, J.; HUANG, J.; LIU, S. Stability and encapsulation efficiency of
17 sulforaphane microencapsulated by *spray drying*. *Carbohydrate polymers*, v. 102, p. 497-503.
18 2014.
- 19 XING, F. B.; CHENG, G. X.; YI, K. J.; MA, L. R. Nanoencapsulation of capsaicin by
20 complex coacervation of gelatin, acacia, and tannins *Journal of Applied Polymer Science*,
21 v. 96, n. 6, p. 2225-2229, 2005.
- 22 YOKSAN, R.; JIRAWUTTHIWONGCHAI, J.; ARPO, K. Encapsulation of ascorbyl
23 palmitate in chitosan nanoparticles by oil-in-water emulsion and ionic gelation
24 processes. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, v. 76, n. 1, p. 292-297, 2010.
- 25



1

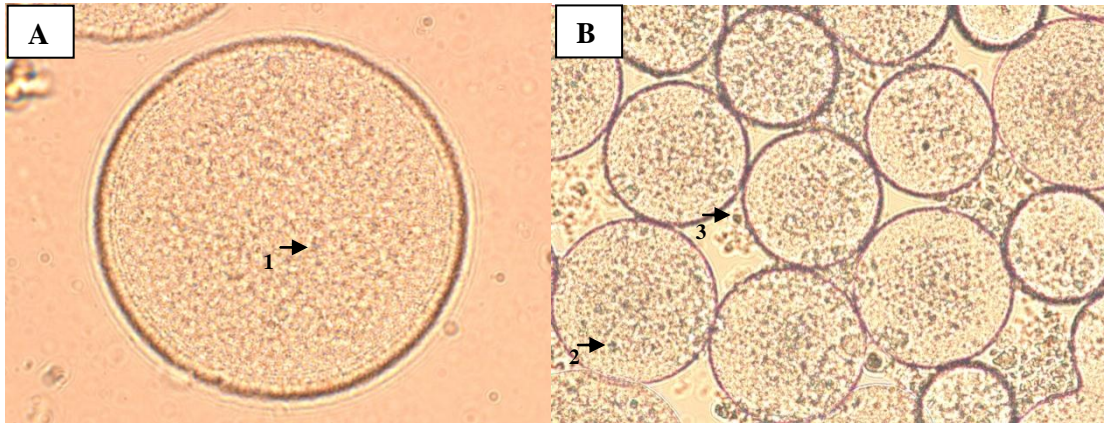
2 Figura 1 – Medida do potencial zeta (mV) do par polimérico gelatina e goma arábica em
3 diferentes valores de pH. 01:01 – uma parte de gelatina e uma parte de goma arábica; 01:03 –
4 uma parte de gelatina e três partes de goma arábica; 03:01 – três partes de gelatina e uma
5 parte de goma arábica. Médias obtidas em triplicata.

6

- 1 Tabela 1 – Eficiência da microencapsulação por coacervação complexa para microcápsulas
2 úmidas e secas de *Bifidobacterium lactis* Bb-12

Tratamento	EE%
Úmida	99,52 ± 2,34 ^A
Seca	86,04 ± 0,68 ^B

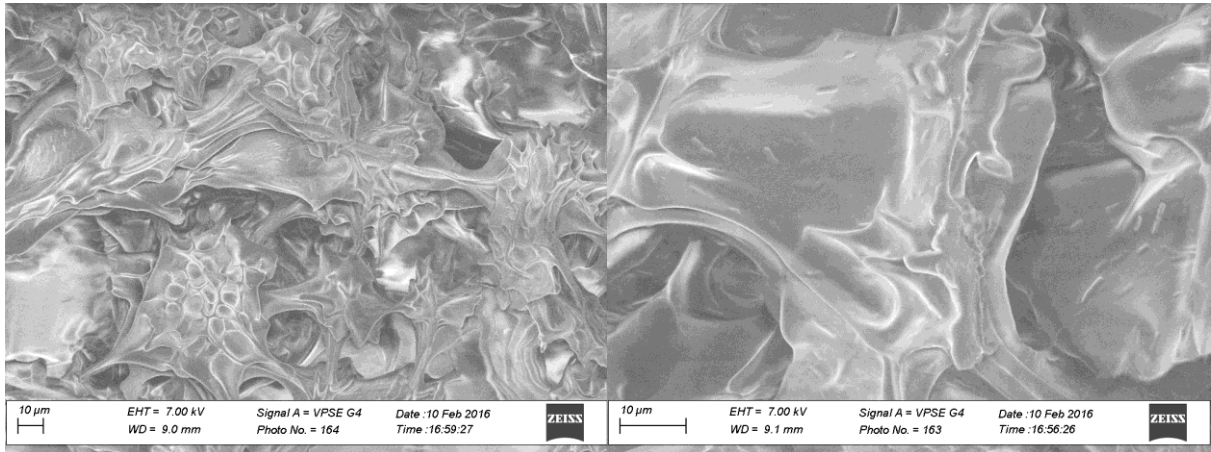
- 3 Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a
4 5% de significância.
5



1

2 Figura 2 – Microscopia óptica de microcápsulas úmidas de *B. lactis* Bb-12 obtidas por
3 coacervação complexa (40x), na qual as setas 1, 2 e 3 indicam a presença dos probióticos.

4



1

2 Figura 3 – Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas secas de *B. lactis* (Bb-12)

3 obtidas por coacervação complexa. (A) 1000 x (B) 3000 x

- 1 Tabela 2 – Viabilidade das microcápsulas úmidas e secas de *B. lactis* Bb-12
 2 microencapsuladas por coacervação complexa, em diferentes condições de pH

Tratamento/tempo (hora)	ÚMIDA	SECA
pH 4,5		
1	8,31 ± 0,01 ^C	8,92 ± 0,03 ^A
2	9,12 ± 0,04 ^B	8,95 ± 0,02 ^A
3	9,39 ± 0,07 ^A	8,87 ± 0,06 ^A
pH 6,0		
1	7,76 ± 0,08 ^C	8,51 ± 0,07 ^B
2	8,12 ± 0,04 ^B	8,63 ± 0,04 ^{AB}
3	8,84 ± 0,06 ^A	8,70 ± 0,04 ^A
pH 7,5		
1	7,92 ± 0,04 ^C	5,26 ± 0,02 ^C
2	8,34 ± 0,07 ^B	7,57 ± 0,06 ^B
3	8,60 ± 0,02 ^A	10,24 ± 0,03 ^A

- 3 Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a
 4 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

1 Tabela 3 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de *B. lactis* Bb-12 obtidas por
 2 coacervação complexa, durante o teste de resistência gastrointestinal “*in vitro*”

Tratamento	BB12 livre (log UFC.g ⁻¹)	BB12 úmida (log UFC.g ⁻¹)	BB12 seca (log UFC.g ⁻¹)
Inicial	8,81 ± 0,05 ^A	12,45 ± 0,05 ^A	10,67 ± 0,56 ^A
Estômago	4,65 ± 0,26 ^B	5,89 ± 0,06 ^C	8,94 ± 0,06 ^B
Duodeno	4,92 ± 0,06 ^B	7,78 ± 0,14 ^B	8,76 ± 0,01 ^C
Íleo	4,98 ± 0,06 ^B	7,77 ± 0,21 ^B	8,75 ± 0,05 ^C

3 Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a
 4 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

5

- 1 Tabela 4 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de *B. lactis* Bb-12 obtidas por
 2 coacervação complexa durante 120 dias de armazenamento a diferentes temperaturas

Tratamento		Úmidas		
Tempo (dias)	-18°C	7°C	25°C	
0	14,47 ± 0,34 ^{Aa}	14,47 ± 0,34 ^{Aa}	14,47 ± 0,34 ^{Aa}	
15	14,24 ± 0,02 ^{Aa}	13,79 ± 0,08 ^{Bb}	8,64 ± 0,04 ^{Bc}	
30	13,76 ± 0,13 ^{Ba}	13,88 ± 0,03 ^{Ba}	8,84 ± 0,06 ^{Bb}	
45	12,62 ± 0,14 ^{Cb}	13,77 ± 0,05 ^{Ba}	8,60 ± 0,07 ^{Bc}	
60	12,25 ± 0,02 ^{CDb}	13,99 ± 0,01 ^{Ba}	6,91 ± 0,70 ^{Cc}	
75	12,14 ± 0,05 ^{DEa}	11,41 ± 0,06 ^{Cb}	7,12 ± 0,07 ^{Cc}	
90	11,73 ± 0,15 ^{Ea}	9,61 ± 0,14 ^{Db}	6,60 ± 0,14 ^{Cc}	
105	9,93 ± 0,04 ^{Fa}	8,60 ± 0,03 ^{Eb}	5,76 ± 0,05 ^{Dc}	
120	6,35 ± 0,01 ^{Gb}	8,83 ± 0,10 ^{Ea}	5,08 ± 0,05 ^{Dc}	
		Secas		
Tempo (dias)	-18°C	7°C	25°C	
0	12,51 ± 0,10 ^{Ba}	12,51 ± 0,10 ^{Aa}	12,51 ± 0,10 ^{Ba}	
15	12,45 ± 0,06 ^{Bb}	10,63 ± 0,06 ^{Cc}	12,93 ± 0,06 ^{Aa}	
30	12,46 ± 0,15 ^{Ba}	10,84 ± 0,04 ^{Bc}	12,08 ± 0,05 ^{CDb}	
45	12,82 ± 0,06 ^{Aa}	10,54 ± 0,08 ^{Cc}	12,14 ± 0,04 ^{Cb}	
60	11,14 ± 0,07 ^{Da}	10,80 ± 0,08 ^{Bb}	11,22 ± 0,14 ^{Ea}	
75	11,89 ± 0,03 ^{Ca}	10,08 ± 0,04 ^{Db}	11,91 ± 0,04 ^{Da}	
90	9,70 ± 0,10 ^{Ea}	9,37 ± 0,11 ^{Eb}	9,45 ± 0,04 ^{Fb}	
105	6,68 ± 0,16 ^{Fa}	6,22 ± 0,03 ^{Fb}	4,09 ± 0,04 ^{Gc}	
120	6,60 ± 0,13 ^{Fa}	6,42 ± 0,03 ^{Fa}	3,67 ± 0,05 ^{Hb}	

- 3 Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre
 4 si pelo teste Tukey a 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

1 **Manuscrito III**

2 *O Manuscrito será submetido para a publicação na Revista Internacional LWT- Food Science
3 and Technology.

4

5 **Obtenção de microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 por coacervação**
6 **complexa e liofilização**

7

8 Favor enviar correspondência para

9 *Cristiano Ragagnin de Menezes, Professor

10

11 Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

12

13 Universidade Federal de Santa Maria

14 E-mail: cristiano.ufsm@gmail.com

15

16 **Resumo**

17

18 Microcápsulas contendo *L. acidophilus* foram produzidas por coacervação complexa
19 em gelatina e goma arábica seguida de liofilização. O objetivo do presente estudo foi produzir
20 e caracterizar as microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica de varredura e avaliar a
21 resistência dos probióticos frente à liberação “*in vitro*”, ao trato gastrointestinal simulado e ao
22 armazenamento em diferentes temperaturas. O processo de coacervação complexa formou
23 microcápsulas com elevada eficiência de encapsulação (77,60% e 87,53%). As microcápsulas
24 protegeram os probióticos frente às condições gastrointestinais simuladas, entretanto, as
25 contagens de células viáveis apresentaram-se abaixo de $6 \log \text{ UFC.g}^{-1}$. A encapsulação
26 também foi eficiente em manter a viabilidade desses microrganismos quando expostos a
27 diferentes condições de pH, variando de 6 a $8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$, e ao armazenamento em diferentes
28 temperaturas por com maior viabilidade nas microcápsulas secas.

29 Palavras-chave: microcápsulas; *L. acidophilus*; coacervação complexa; liofilização.

1 1 Introdução

2 Cada vez mais as culturas probióticas têm sido utilizadas como adjuvante em
3 alimentos devido aos efeitos benéficos na saúde humana. Nesse sentido, o *L. acidophilus* está
4 sendo intensivamente estudado por suas características probióticas. Seus benefícios à saúde
5 incluem, dentre outros, a redução dos sintomas de intolerância a lactose, a inibição de
6 microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas e a redução dos níveis de
7 colesterol (GOMES; MALCATA, 1999; OLIVEIRA, 2006).

8 No entanto, a viabilidade das bactérias e a qualidade geral de muitos produtos que
9 contêm probióticos necessitam de melhoramento. Estudos demonstram que a sobrevivência e
10 a viabilidade das bactérias probióticas é frequentemente baixa nos alimentos, resultando em
11 contagens inferiores a $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, ingestão diária recomendada para conferir benefícios à
12 saúde (FAO/WHO, 2001; SHOJI et al., 2013).

13 Dessa forma, a microencapsulação tem sido empregada com o intuito de proteger as
14 bactérias probióticas de condições adversas do meio externo e do trato gastrointestinal e,
15 conseqüentemente, fornecer essas bactérias em quantidades suficientes para que exerçam seus
16 efeitos benéficos, mantendo a sobrevivência destas durante a vida útil. Assim, a encapsulação
17 pode promover a liberação controlada e otimizar o fornecimento dos probióticos no local de
18 ação, potenciando, dessa forma, a eficácia da respectiva cepa probiótica. Esse processo
19 também pode impedir esses microrganismos de se multiplicarem nos alimentos e,
20 conseqüentemente, alterar suas características sensoriais (KOMATSU, BURITI; SAAD,
21 2008; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; BURGAIN et al., 2011; CHÁVARRI;
22 MARAÑÓN; VILLARÁN, 2012; SHOJI et al., 2013).

23 A microencapsulação por coacervação tem sido utilizada por alguns segmentos
24 industriais com uma vasta gama de aplicações, tais como produtos farmacêuticos, produtos
25 alimentares, químicos, cosméticos e para a liberação controlada de vários tipos de

1 substâncias (ALVIM; GROSSO, 2010). A técnica de coacervação complexa apresenta várias
2 vantagens em comparação com outras técnicas de encapsulação, como versatilidade,
3 facilidade de operação, utilização de biopolímeros, baixo custo, utilização de temperaturas
4 brandas e ausência de solventes orgânicos. Além disso, é um método promissor e com grande
5 potencial para ser utilizado para a encapsulação de probióticos, porém, a coacervação
6 complexa não está totalmente elucidada, difundida e os estudos são escassos (KOMATSU,
7 BURITI & SAAD, 2008; RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; BURGAIN et al.,
8 2011; CHÁVARRI; MARAÑÓN; VILLARÁN, 2012; SHOJI et al., 2013).

9 Diante do exposto, o objetivo deste estudo foi microencapsular *Lactobacillus*
10 *acidophilus* La-05 por coacervação complexa, seguida de secagem por liofilização,
11 caracterizar e avaliar a viabilidade do material microencapsulado, bem como das
12 microcápsulas durante o armazenamento.

13 **2 Material e métodos**

14 **2.1 Materiais**

15 Para a formação das microcápsulas foram utilizados: Gelatina tipo A (Gelita,
16 Eberbach, Alemanha); Goma Arábica (CNI, São Paulo, Brasil); Cultura probiótica
17 *Lactobacillus acidophilus* (La-5) obtida pela Chr. Hansen do Brasil (Valinhos, São Paulo,
18 Brasil).

19 **2.2 Preparo do inóculo**

20 Até o momento da utilização, a cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-5) foi
21 mantida à -18°C. Para o preparo do inóculo, a cultura probiótica foi ativada em caldo MRS
22 (Himedia) e incubada durante 12 horas a 37°C. Após, a cultura ativada foi centrifugada a
23 2470 x g, a 4°C, por 15 minutos e lavada em solução de NaCl (0,85%) por duas vezes. As
24 células foram então suspensas em solução salina para obtenção de uma solução com
25 aproximadamente 10 log UFC/mL.

1 **2.3 Produção das microcápsulas pela técnica de coacervação complexa**

2 A produção das microcápsulas foi realizada de acordo com metodologia descrita por
3 Alvim; Grosso (2010), com modificações. Primeiramente, 1g da cultura foi adicionada a 100
4 mL de gelatina 2,5%, mantendo sob agitação em agitador magnético com aquecimento
5 (Centauro, Paraná, Brasil) (48 - 50°C) por 10 min para adaptação dos microrganismos. Após
6 essa etapa, adicionou-se 100 mL de goma arábica 2,5% e 400 mL de água destilada estéril,
7 mantendo sob agitação e aquecimento, ajustando em seguida o pH para 4,0 com solução de
8 ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Desligou-se o aquecimento e manteve-se sob agitação,
9 deixando-se esfriar naturalmente a aproximadamente 30°C, e após, o abaixamento da
10 temperatura foi realizado com gelo até 12 – 10°C. Deixou-se sedimentar e o coacervado foi
11 retirado por filtração em peneira com porosidade de 0,038 mm (400 mesh).

12 Uma parcela das microcápsulas produzidas foi congelada (-18°C por 24 horas) no
13 mesmo dia da produção. A liofilização foi realizada em liofilizador (L101, Liotop, Brasil),
14 onde as microcápsulas foram colocadas congeladas (-18°C) e retiradas do liofilizador 24
15 horas após o início do processo (vácuo: 0,200 – 0,300 µHg e temperatura do condensador de –
16 37°C).

17 **2.4 Eficiência de encapsulação**

18 A eficiência de encapsulação (EE), ou seja, a taxa de sobrevivência dos
19 microrganismos ao processo de microencapsulação (Equação 1) foi calculada conforme
20 Annan et al. (2008), para as microcápsulas úmidas e secas.

21

$$22 \quad EE = (N / N_0) \times 100 \quad \text{(Equação 1)}$$

23 Onde N é o número de células viáveis (log UFC.g⁻¹) liberadas a partir das
24 microcápsulas e N₀ é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹) no concentrado de células
25 antes da microencapsulação.

1 **2.5 Caracterização das microcápsulas**

2 2.5.1 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica de 3 varredura

4 A microscopia óptica das microcápsulas úmidas foi realizada utilizando um
5 microscópio óptico (Scope A.1, Zeiss, Alemanha) equipado com câmera digital Axio Cam
6 MRc (Carl Zeiss). A morfologia das microcápsulas secas foi avaliada em um Microscópio
7 Eletrônico de Varredura (Sigma 300 VP, Zeiss, Alemanha). As microcápsulas foram fixadas
8 com uma fita dupla face em stubs de alumínio e recobertas por uma fina camada de carbono.

9 2.5.2 Análises físico-químicas

10 As microcápsulas úmidas foram analisadas quanto ao teor de umidade (% m/m),
11 lipídios (% m/m), proteínas (% m/m) e cinzas (% m/m) segundo a metodologia descrita pela
12 AOAC (2005). O teor de carboidratos foi estimado por diferença, diminuindo de 100 o
13 somatório de proteínas, lipídios, cinzas e umidade. As análises foram realizadas em triplicata
14 e os resultados expressos em porcentagem.

15 2.5.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

16 O tamanho médio das microcápsulas úmidas e secas foi medido no equipamento
17 Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha).

18 **2.6 Contagem das células viáveis**

19 Diluições apropriadas foram transferidas em triplicata para placas de Petri estéreis,
20 seguidas de adição de ágar MRS (Merck, Merck Brasil, São Paulo, Brasil). As placas foram
21 incubadas a 37°C por 72 horas em jarras de anaerobiose contendo geradores de anaerobiose
22 (Anaerobac, Probac, São Paulo, Brasil). A diluição das microcápsulas consistiu em pesar 1 g
23 de microcápsulas úmidas e 0,1 g de microcápsulas secas, seguido da adição de 9 mL de
24 solução tampão fosfato de sódio (pH 7,5) de acordo com a metodologia descrita por Sheu;
25 Marshall; Heymann (1993). Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$.

1 **2.7 Viabilidade das células microencapsuladas frente a diferentes soluções de pH**

2 As microcápsulas úmidas e secas foram adicionadas nos diferentes tampões, tampão
3 acetato pH 4,5, tampão fosfato de sódio pH 6,0 e tampão fosfato de sódio pH 7,5, na
4 proporção de 0,01 g/ml. As soluções tampões adicionadas das microcápsulas foram
5 submetidas à agitação de 150 rpm, em incubadora refrigerada tipo shaker (TE-421, Tecnal,
6 Brasil), à 37°C. Foram retiradas alíquotas de 1 mL após 60, 120 e 180 minutos de agitação. A
7 partir das alíquotas coletadas, foram efetuadas diluições decimais seriadas para a contagem
8 das células viáveis. Os resultados foram expressos em log UFC.mL⁻¹.

9 **2.8 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 sob condições gastrointestinais** 10 **simuladas**

11 As condições gastrointestinais simuladas para as microcápsulas úmidas e secas foram
12 realizadas de acordo com Madureira et al. (2011), com modificações. Nesta técnica a
13 viabilidade das microcápsulas probióticas é avaliada sequencialmente em meios que simulam
14 as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Para esta
15 análise, foram utilizadas alíquotas de 2 g de microcápsulas úmidas e 1 g de microcápsulas
16 secas. Na etapa esôfago-estômago utilizou-se 25 mg.mL⁻¹ de pepsina (Sigma), preparada em
17 HCl 0,1 N; esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a
18 uma taxa de 0,05 mL a cada mL de solução durante 90 min; sendo o pH ajustado até 2,0
19 utilizando HCl 1 M. Na etapa referente ao duodeno utilizou-se, a uma taxa de 0,25 ml.ml⁻¹,
20 uma solução contendo 2 g.L⁻¹ de pancreatina (Sigma) e 12 g.L⁻¹ de sais biliares bovinos
21 (Sigma), preparada em NaHCO₃ 0,1 M. Finalmente, a etapa referente ao íleo foi realizada por
22 um aumento do pH para 6,5 utilizando uma solução de NaHCO₃ 0,1 M. Todas as soluções
23 foram preparadas no momento da utilização e esterilizadas por membrana de poro 0,20 µm
24 (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). A análise foi conduzida em uma incubadora
25 refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a 37°C com o intuito de simular a

1 temperatura do corpo humano e agitação mecânica foi utilizada em paralelo para simular os
2 movimentos peristálticos, com intensidades semelhantes às alcançadas em cada seção do trato
3 digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células
4 viáveis. Os resultados foram expressos em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$.

5 **2.9 Viabilidade das células microencapsuladas durante o armazenamento a diferentes** 6 **temperaturas**

7 As amostras de microcápsulas úmidas e secas foram armazenadas a temperatura
8 ambiente (25°C), de refrigeração (7°C) e de congelamento (-18°C), por 120 dias. Foram
9 realizadas contagens de células viáveis conforme o item 2.6. Os resultados foram expressos
10 em $\log \text{UFC.mL}^{-1}$.

11 **2.10 Análise estatística**

12 Os resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA), sendo que
13 as médias foram comparadas pelo teste de Tukey, considerando o nível de significância de 5%
14 ($p < 0,05$), utilizando o *software* Statistica 7.

15 **3 Resultados e discussão**

16 **3.1 Eficiência de encapsulação**

17 As eficiências de encapsulação obtidas para as microcápsulas de *Lactobacillus*
18 *acidophilus* La-5 foram de 87,53% e 77,60%, em suas formas úmida e seca, respectivamente
19 (Tabela 1), havendo diferença significativa entre os valores obtidos ($p < 0,05$). Assim, os altos
20 valores de eficiência de encapsulação obtidos indicam que a coacervação complexa foi
21 adequada para os probióticos.

22 Os resultados obtidos são melhores que estudos conduzidos por Nori et al. (2011) ao
23 utilizarem a coacervação complexa para a encapsulação de extrato de própolis obtendo uma
24 eficiência de encapsulação de 72,01%. Outro estudo, conduzido por Qv; Zeng; Jiang (2011)
25 obteve eficiência de encapsulação de 85,32% na encapsulação de luteína por coacervação

1 complexa utilizando gelatina e goma arábica, nas mesmas condições utilizadas no presente
2 trabalho. *Lactobacillus acidophilus* encapsulado por gelificação iônica utilizando pectina com
3 recobrimento de proteína de soro de leite apresentou eficiência de encapsulação de 84,35%
4 (GEBARA et al. 2013). Além disso, os resultados obtidos também estão em conformidade
5 com Chang et al. (2006) que encapsularam óleo de cânfora por coacervação complexa
6 utilizando gelatina e goma arábica como encapsulantes e obtiveram eficiências de encapsulação
7 superiores a 80%.

8 Todavia, em um estudo realizado por Zou et al. (2011) em que produziram
9 microesferas de alginato contendo *Bifidobacterium bifidum* F-35 preparadas por
10 emulsificação/gelificação interna foram reforçadas por uma mistura com amido ou pectina ou de
11 revestimento com quitosana ou poli-L-lisina para proporcionar uma proteção adicional para os
12 microrganismos e obtiveram uma eficiência de encapsulação de 43-50%. Em contrapartida,
13 em um estudo realizado por Chitprasert; Sudsai; Rodklongtan (2012) onde *L. reuteri* KUB-
14 AC5 foi encapsulado por emulsão em carboximetil celulose de alumínio e farelo de arroz,
15 observou-se uma eficiência de encapsulação de 90,57%.

16 **3.2 Caracterização das microcápsulas**

17 3.2.1 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica de 18 varredura

19 Observa-se na Figura 1a e 1b, através da microscopia óptica (microcápsulas úmidas),
20 que a técnica de coacervação complexa foi eficiente na microencapsulação de *L. acidophilus*
21 La-5, pois nota-se a presença do microrganismo no interior da microcápsula. Além disso, as
22 microcápsulas apresentaram formatos arredondados e tamanhos variados, com distribuição
23 homogênea e multinuclear do núcleo.

24 Etchepare et al. (2016) ao encapsularem *L. acidophilus* La-14 por extrusão em alginato
25 observaram a presença dos microrganismos no interior das microcápsulas, distribuídos de

1 forma multinuclear e homogênea. Da mesma forma, Nori et al. (2011) ao encapsularem
2 extrato de própolis por coacervação complexa utilizando pectina e proteína de soja isolada
3 obtiveram microcápsulas com tamanhos variados e formatos arredondados. Da mesma forma,
4 Comunian et al. (2013) encapsularam ácido ascórbico por coacervação complexa utilizando
5 gelatina e goma arábica como materiais encapsulantes e observaram resultados semelhantes,
6 microcápsulas com formatos arredondados e multinucleadas, os quais conferem maior
7 proteção do núcleo. Alvim e Grosso (2010), ao encapsularem oleoresina de páprica por
8 coacervação complexa com gelatina e goma arábica também observaram resultados de
9 caracterização morfológica das microcápsulas úmidas semelhantes aos encontrados no
10 presente trabalho.

11 Com relação às microcápsulas secas, ao observar a microscopia eletrônica de
12 varredura (Figura 2a e 2b), nota-se a formação de aglomerados pelas microcápsulas, o que
13 segundo Comunian et al. (2013) é um comportamento típico de microcápsulas obtidas por
14 coacervação e posteriormente liofilizadas. Esses resultados também foram observados por
15 Oliveira et al. (2007).

16 3.2.2 Análises físico-químicas

17 De acordo com as análises físico-químicas (Tabela 2), as microcápsulas úmidas
18 apresentaram umidade de 86,18%. Estes resultados são similares aos de Oliveira et al. (2007)
19 que encapsularam *L. acidophilus* por coacervação complexa utilizando gelatina e goma
20 arábica como encapsulantes obtiveram 91,90% de umidade. Segundo Scott (1958) o conteúdo
21 ideal de umidade varia de acordo com a composição dos materiais encapsulantes, a atmosfera
22 em que as microcápsulas estão armazenadas e as espécies de microrganismos.

23 Para o perfil lipídico, as microcápsulas apresentaram valores em torno de 0,95%. Já os
24 valores de conteúdo mineral das microcápsulas foram próximos de 0,03%. Para proteína, as
25 microcápsulas apresentaram valores em torno de 7,0% e para carboidratos, as microcápsulas

1 apresentaram valores próximos de 5,84%, que estão relacionados aos materiais encapsulantes,
2 gelatina e goma arábica, respectivamente. Esses resultados são interessantes, pois proteínas e
3 carboidratos são muito utilizados na produção de alimentos. No processamento de alimentos
4 as proteínas apresentam propriedades importantes como a capacidade de gelificar (gelatina),
5 capacidade de emulsificação (proteína da gema do ovo) e capacidade de retenção de água
6 (proteína da soja). Já os carboidratos são utilizados como espessantes na produção de sorvete
7 (carragena), adoçantes na indústria de doces (sacarose) e também como tratamento para a
8 água (quitosana). Diante dessas propriedades, a utilização desses compostos em alimentos se
9 faz necessária. Além disso, proteínas e carboidratos estão sendo extensivamente utilizados
10 para revestir cápsulas com o intuito de promover a liberação controlada do seu conteúdo
11 (FOOD INGREDIENTS BRASIL (2012), FOOD TECH (2013)).

12 3.2.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

13 Os diâmetros médios obtidos foram de 127,14 μm e 227,05 μm , para as microcápsulas
14 úmidas e secas, respectivamente.

15 Alvim; Grosso (2010) ao encapsularem oleoresina de páprica por coacervação
16 complexa com gelatina e goma arábica como encapsulantes obtiveram diâmetros médios em
17 torno de 96,4 μm . Todavia, Etchepare et al. (2016) encapsularam *L.acidophilus* por extrusão
18 utilizando alginato como material encapsulante e obtiveram diâmetros médios de 70,37 μm .
19 Em um estudo realizado por Chitprasert; Sudsai; Rodklongtan (2012) onde *L. reuteri* KUB-
20 AC5 foi encapsulado por emulsão em carboximetil celulose de alumínio e farelo de arroz,
21 observou-se diâmetros médios variando entre 159,52 e 661,19 μm . Similarmente, Kim et al.
22 (2008) encapsularam *L. acidophilus* ATCC 43121 por extrusão seguida de secagem em *spray*
23 *drying* e observaram que o diâmetro médio das microcápsulas foi de 75 μm , sendo que esse
24 tamanho se deve ao processo de secagem por *spray drying*.

1 Contudo, as microcápsulas secas apresentaram diâmetros médios superiores às
2 microcápsulas úmidas. Segundo Oliveira et al. (2007) esses elevados diâmetros médios, bem
3 como a variação de tamanho, são decorrentes da aderência dos materiais encapsulantes,
4 formando aglomerados e contribuindo para o aumento do tamanho das microcápsulas.

5 Assim, esses resultados demonstram que o diâmetro médio das microcápsulas depende
6 da técnica de microencapsulação utilizada, dos materiais encapsulantes e das condições de
7 processamento. Além disso, é importante salientar que, em relação às propriedades sensoriais
8 e a adição dos probióticos encapsulados em alimentos, as microcápsulas devem apresentar
9 tamanhos entre 100 e 200 μm (LAWLESS; HEYMANN, 2010).

10 **3.3 Viabilidade das células microencapsuladas frente a diferentes soluções de pH**

11 Os resultados obtidos na liberação das microcápsulas frente a diferentes condições de
12 pH estão expressos na Tabela 3. Observa-se que as microcápsulas úmidas e secas
13 apresentaram comportamentos semelhantes em todos os tratamentos analisados, ocorrendo
14 liberação gradual dos microrganismos no decorrer das 3 horas e apresentando os maiores
15 valores de contagens de células viáveis de 7,10 log UFC.g⁻¹ em pH 4,5, 7,81 log UFC.g⁻¹ em
16 pH 6,0 e 7,46 log UFC.g⁻¹ em pH 7,5, para as microcápsulas úmidas, e de 6, 82 log UFC.g⁻¹
17 em pH 4,5, 6,31 log UFC.g⁻¹ em pH 6,0 e 8,11 log UFC.g⁻¹, para as microcápsulas secas, no
18 final do tempo de observação.

19 A partir da contagem de células viáveis, pode-se observar que as microcápsulas foram
20 liberando os microrganismos com o aumento do pH e do tempo analisado, assim o pH 4,5
21 apresentou as menores contagens de células viáveis, sendo as maiores contagens obtidas no
22 pH 7,5, tanto para as microcápsulas úmidas quanto para as microcápsulas secas. Esse
23 resultado é esperado, pois as microcápsulas devem liberar os microrganismos em pH 7,5 por
24 ser próximo ao pH encontrado no intestino humano. No entanto, o conteúdo das
25 microcápsulas é liberado mais rapidamente em pH 4,5.

1 Contudo, no pH 4,5 esperava-se que a contagem de células viáveis de $7,10 \log \text{UFC.g}^{-1}$
2 ¹ e $6,82 \log \text{UFC.g}^{-1}$, para as microcápsulas úmidas e secas, respectivamente, fosse menor,
3 pois a liberação não deve ocorrer neste valor de pH por ser uma condição adversa a
4 sobrevivência dos microrganismos. Todavia, sabe-se que a gelatina é desnaturada em pH
5 ácido, rompendo suas ligações e, conseqüentemente, ocorrendo a liberação dos
6 microrganismos. Em um estudo realizado por Oliveira et al. (2007), *L. acidophilus* foi
7 encapsulado por coacervação complexa utilizando gelatina e goma arábica como materiais
8 encapsulantes. Foi observado que quando as microcápsulas foram expostas em pH 3,0 ocorreu
9 uma redução na contagem de células viáveis de 3 ciclos logarítmicos no decorrer de 3 horas,
10 no entanto em pH 7,0 não houve reduções significativas. Além disso, em pH ácido, vários
11 fatores como tamanho de microcápsula, concentração de polímero utilizado e a composição
12 das microcápsulas estão relacionados à proteção necessária para a sobrevivência dos
13 microrganismos microencapsulados. Da mesma forma, Shoji et al. (2013) encapsularam *L.*
14 *acidophilus* por coacervação complexa em pectina e caseína e observaram reduções na
15 contagem de células viáveis quando as microcápsulas foram expostas a meio ácido,
16 apresentando contagens em torno de $8 \log \text{UFC.g}^{-1}$ no final de 3 horas de observação.

17 **3.4 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-5 sob condições gastrointestinais** 18 **simuladas**

19 Os resultados obtidos referentes à sobrevivência dos microrganismos frente à
20 condições gastrointestinais simuladas estão representados na Tabela 4.

21 Observa-se que os microrganismos na forma livre apresentaram reduções de 4,77
22 ciclos logarítmicos entre a contagem de células viáveis antes da exposição às condições
23 gastrointestinais simuladas e o estômago e 2,56 ciclos logarítmicos entre o estômago e o íleo
24 (etapa final), totalizando 7,33 ciclos logarítmicos. Para os microrganismos microencapsulados
25 na forma úmida as reduções observadas foram de 3,21 e 1,88 ciclos logarítmicos entre a

1 contagem de células viáveis antes da exposição às condições gastrointestinais simuladas e o
2 estômago; e entre o estômago e o íleo, respectivamente. Já para os microrganismos
3 microencapsulados na forma seca as reduções observadas foram de 1,71 e 0,52,
4 respectivamente. Nota-se que a microencapsulação promoveu a proteção substancial dos
5 probióticos frente às condições gastrointestinais simuladas.

6 Diante desses resultados, comparando-se a contagem de células viáveis dos
7 microrganismos na forma livre com os microrganismos encapsulados, é possível afirmar que a
8 microencapsulação protegeu os microrganismos das condições adversas encontradas no trato
9 gastrointestinal, apesar da contagem de células viáveis estar abaixo da recomendação diária
10 segundo a legislação, sendo que as microcápsulas secas apresentaram maior viabilidade por
11 propiciarem maior proteção aos microrganismos pela baixa atividade de água. Assim, pode-se
12 afirmar que a viabilidade dos *L. acidophilus* sob condições gastrointestinais simuladas irá
13 depender da técnica de microencapsulação utilizada, bem como das condições de
14 processamento e da forma das microcápsulas (úmidas ou secas) (FAO/WHO, 2001).

15 No entanto, Etchepare et al. (2016) encapsularam *L. acidophilus* por extrusão
16 utilizando alginato como material encapsulante e observaram que as microcápsulas na forma
17 úmida apresentaram contagem de células viáveis de 4,14 ciclos logarítmicos na simulação do
18 estômago e 6,11 ciclos logarítmicos na simulação do íleo (etapa final). Já as microcápsulas na
19 forma seca apresentaram contagem de células viáveis de 3,92 ciclos logarítmicos na
20 simulação do estômago e 5,41 ciclos logarítmicos na simulação do íleo. Silva et al. (2015)
21 encapsularam *L. acidophilus* por *spray drying* e expuseram as microcápsulas às condições
22 gastrointestinais simuladas. Observaram que as células livres não apresentaram viabilidade no
23 final do processo, entretanto, os probióticos encapsulados apresentaram viabilidade de 9,03
24 log UFC.g⁻¹. Estudos realizados por Gebara et al. (2013), relatam o aumento da resistência de

1 probióticos microencapsulados quando expostos às condições gastrointestinais simuladas,
2 comparando com a sobrevivência das células livres.

3 **3.5 Viabilidade das células microencapsuladas durante o armazenamento a diferentes** 4 **temperaturas**

5 Os resultados obtidos do efeito da temperatura ambiente (25°C), de congelamento (-
6 18°C), de refrigeração (7°C) e do tempo de armazenamento na viabilidade dos *L. acidophilus*
7 estão na Tabela 5.

8 Em temperatura ambiente (25°C) as microcápsulas na forma úmida apresentaram
9 viabilidade ($>6 \log \text{UFC.g}^{-1}$) por 15 dias, apresentando $6,27 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Já as microcápsulas
10 na forma seca apresentaram viabilidade por 45 dias, apresentando $6,13 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Para a
11 temperatura de refrigeração (7°C), as microcápsulas úmidas apresentaram viabilidade por 30
12 dias ($6,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$). Entretanto, as microcápsulas secas apresentaram viabilidade por 105
13 dias ($6,59 \text{UFC.g}^{-1}$). Os resultados obtidos corroboram, em parte, com o estudo realizado por
14 Pedroso et al. (2012) em que foi realizada a encapsulação de *L. acidophilus* em matrizes
15 lipídicas por spray chilling, observando que a viabilidade das microcápsulas foi superior a 6
16 $\log \text{UFC.g}^{-1}$ até 30 dias de armazenamento a 7°C. Da mesma forma, Oliveira et al. (2007)
17 encapsularam *L. acidophilus* por coacervação complexa seguida de secagem por leito de jorro
18 utilizando pectina e caseína como encapsulantes e observaram que a viabilidade das
19 microcápsulas armazenadas a 7°C permaneceu por 90 dias, apresentando contagens de células
20 viáveis de $8,18 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Semelhantemente, Silva et al. (2015) encapsularam *L.*
21 *acidophilus* por *spray drying* e armazenaram as microcápsulas a 4 e 25°C. Esses autores
22 observaram que em ambas as temperaturas as microcápsulas permaneceram viáveis por 120
23 dias, apresentando contagem de células viáveis de $7,04 \log \text{UFC.g}^{-1}$ em 4°C e $6,12 \log \text{UFC.g}^{-1}$
24 em 25°C. Dessa forma, ressalta-se que os resultados obtidos no presente trabalho, muitas

1 vezes, foram melhores que os resultados encontrados na literatura por outras técnicas,
2 enfatizando a importância da técnica utilizada para a proteção dos probióticos.

3 Com relação à temperatura de congelamento (-18°C) tanto as microcápsulas na forma
4 úmida quanto as microcápsulas na forma seca apresentaram viabilidade por 120 dias,
5 apresentando 6,29 log UFC.g⁻¹ e 6,15 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Segundo Oliveira et al.
6 (2007) com a diminuição da temperatura a estabilidade bacteriana durante o armazenamento
7 aumenta, o que foi observado no presente estudo por meio dos resultados obtidos. Além disso,
8 os resultados obtidos estão de acordo com Etchepare et al. (2016), onde foram produzidas
9 microcápsulas de *L. acidophilus* em alginato por extrusão observando a viabilidade das
10 microcápsulas nas formas úmida e seca por 135 dias e 60 dias, respectivamente. Esses autores
11 observaram que a viabilidade foi mantida no decorrer do tempo analisado, apresentando
12 contagem de células viáveis de 6,35 log UFC.g⁻¹ para as microcápsulas na forma úmida e 6,08
13 log UFC.g⁻¹ para as microcápsulas na forma seca.

14 Diante desses resultados, pode-se afirmar que a técnica de coacervação complexa
15 manteve a viabilidade dos *L. acidophilus* e foi eficiente em protegê-los frente à temperatura e
16 um longo tempo de armazenamento, sendo a temperatura de congelamento (-18°C) mais
17 apropriada, pois forneceu maior contagem de células viáveis em um maior período de tempo.

18 **4 Conclusão**

19 A técnica de coacervação complexa para a encapsulação de *L. acidophilus* mostrou-se
20 adequada por proporcionar alta eficiência de encapsulação, proteção em diferentes valores de
21 pH e frente ao armazenamento em diferentes temperaturas por um longo período de tempo.
22 Contudo, mais estudos são necessários com o intuito de aumentar a resistência das
23 microcápsulas frente ao trato gastrointestinal. Além disso, é uma técnica promissora para a
24 pesquisa, pois ainda pouco se sabe sobre a influência dos parâmetros envolvidos nessa
25 técnica. No entanto, em comparação com outras técnicas, apresenta uma série de vantagens,

1 como altas eficiências de encapsulação, baixo custo, versatilidade e facilidade de operação.
2 As microcápsulas obtidas neste trabalho apresentaram eficiências de encapsulação superiores
3 aos trabalhos encontrados, demonstrando o quão eficiente e promissora é a técnica de
4 coacervação complexa para a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus*.

5 **Referências bibliográficas**

- 6 ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation:
7 influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material.
8 Ciência e Tecnologia de Alimentos, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, out./dez., 2010.
- 9 ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin
10 microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during
11 exposure to simulated gastro-intestinal conditions. Food Research International, v. 41, p. 184-
12 193, 2008.
- 13 Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the
14 association analytical chemists. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.
- 15 BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells:
16 From laboratory scale to industrial applications. Journal of Food Engineering, v. 104, p. 467-
17 483, 2011.
- 18 CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Evidence of membrane damage in
19 *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. Journal of Applied Microbiology, v. 82,
20 p. 87-94, 1997.
- 21 CHANG, C. P.; LEUNG, T. K.; LIN, S. M.; HSU, C. C. Release properties on gelatin-gum
22 arabic microcapsules containing camphor oil with added polystyrene. Colloids and Surfaces
23 B: Biointerfaces, v. 50, p. 136-140, 2006.
- 24 CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; VILLARÁN, M. C. Encapsulation Technology to Protect
25 Probiotic Bacteria. Intech, Capítulo 23, p. 501-539, 2012.

- 1 CHITPRASERT, P.; SUDSAI, P.; RODKLONGTAN, A. Aluminum carboxymethyl
2 cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5.
3 Carbohydrate Polymers, v. 90, n. 1, p. 78-86, setembro, 2012.
- 4 COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; MATOS JUNIOR, F. E.;
5 BALIEIRO, J. C. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by
6 complex coacervation: Protection and controlled release. Food Research International, v. 52,
7 p. 373-379, 2013.
- 8 ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-
9 LOPES, E.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and
10 chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate.
11 LWT - Food Science and Technology, v. 65, p. 511-517, 2016.
- 12 Food and Agriculture Organization of the United Nations; World Health Organization.
13 (2001). Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live
14 lactic acid bacteria.
- 15 FOOD INGREDIENTS BRASIL. Carboidratos. Dossiê Carboidratos, n. 20, 2012. Disponível
16 em <http://www.revista-fi.com/materias/210.pdf>. Acesso em: 20/01/2016.
- 17 FOOD TECH. Proteínas em alimentos: o que são proteínas? Ciências dos Alimentos &
18 Tecnologia, 2013. Disponível em [https://cienciasdosalimentos.wordpress.com/2013/08/28/
19 proteinas-em-alimentos/](https://cienciasdosalimentos.wordpress.com/2013/08/28/proteinas-em-alimentos/). Acesso em: 20/01/2016.
- 20 GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.;
21 GIGANTE, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein
22 microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. Food Research
23 International, v. 51, p. 872-878, 2013.

- 1 GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*:
2 biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as
3 probiotics. Trends in Food Science & Technology, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.
- 4 KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J.
5 Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus*
6 *acidophilus* ATCC 43121. LWT-Food Science and Technology, v. 41, n. 3, p. 493-500, 2008.
- 7 KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade
8 superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. Revista Brasileira de
9 Ciências Farmacêuticas, v. 44, n. 3, jul./set., 2008.
- 10 LAWLESS, H. T.; HEYMANN, H. Sensory evaluation of food: Principles and practices
11 (2^a ed.) Springer, Berlin, 2010.
- 12 MADUREIRA, A. R.; AMORIM, M.; GOMES, A. M.; PINTADO, M. E.; MALCATA, F. X.
13 Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to
14 simulated gastrointestinal conditions. Food Research International, v. 44, p. 465-470, 2011.
- 15 NORI, M. P.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.;
16 BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex
17 coacervation. LWT - Food Science and Technology, v. 44, p. 429-435, 2011.
- 18 OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A.
19 P.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and
20 *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. Drying
21 Technology, v. 25, p. 1687-1693, 2007.
- 22 OLIVEIRA, A. C. J. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*
23 microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray-drying* e leite de jorro.
24 Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas

- 1 de Ribeirão Preto, São Paulo, 2006. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/>
2 [disponiveis/60/60137/tde-10052007-103644/pt-br.php](http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-10052007-103644/pt-br.php)>. Acesso em: 20/08/2014.
- 3 PEDROSO, D. D. L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-TRINDADE,
4 C. S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by
5 microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, v. 26, n. 2, p. 127-132,
6 2012.
- 7 QV, X.; ZENG, Z.; JIANG, J. Preparation of lutein microencapsulation by complex
8 coacervation method and its physicochemical properties and stability. *Food Hydrocolloids*,
9 v. 25, p. 1596-1603, 2011.
- 10 RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in
11 probiotic efficacy. *Food Research International*, v. 43, p. 1-7, 2010.
- 12 SCOTT, W. J. The effect of residual water on the survival of dried bacteria during storage.
13 *Journal of General Microbiology*, v. 19, p. 624-633, 1958.
- 14 SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in
15 frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, v. 76, n. 7, p. 1902-1907,
16 1993.
- 17 SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.;
18 HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of
19 *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and*
20 *Bioproducts Processing*, v. 91, p. 83-88, 2013.
- 21 SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; DE MENEZES, C. R.; DA SILVA, C. D. B.; SORIANI, H.
22 H.; DE OLIVEIRA BASTOS, J.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de
23 probióticos por *spray drying*: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais
24 simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciência Rural*,
25 v. 45, n. 7, p. 1342-1347, 2015.

- 1 ZOU, Q.; ZHAO, J.; LIU, X.; TIAN, F.; ZHANG, H. P.; ZHANG, H.; CHEN, W.
- 2 Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres
- 3 prepared by emulsification/internal gelation. *International Journal of Food Science &*
- 4 *Technology*, v. 46, n. 8, p. 1672-1678, 2011.
- 5

- 1 Tabela 1 – Eficiência da microencapsulação por coacervação complexa para microcápsulas
2 úmidas e secas de *L. acidophilus* La-5

Tratamento	EE%
Úmida	87,53 ± 0,40 ^A
Seca	77,60 ± 0,75 ^B

- 3 Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a
4 5% de significância.
5

Tabela 2 – Características físico-químicas obtidas para as microcápsulas produzidas por coacervação complexa com gelatina e goma arábica 1,5%

Características físico-químicas das microcápsulas obtidas por coacervação complexa (%)	
Umidade	86,18 ± 0,21
Lipídios	0,95 ± 0,27
Cinzas	0,03 ± 0,01
Proteína	7,0 ± 0,32
Carboidratos	5,84 ± 0,80

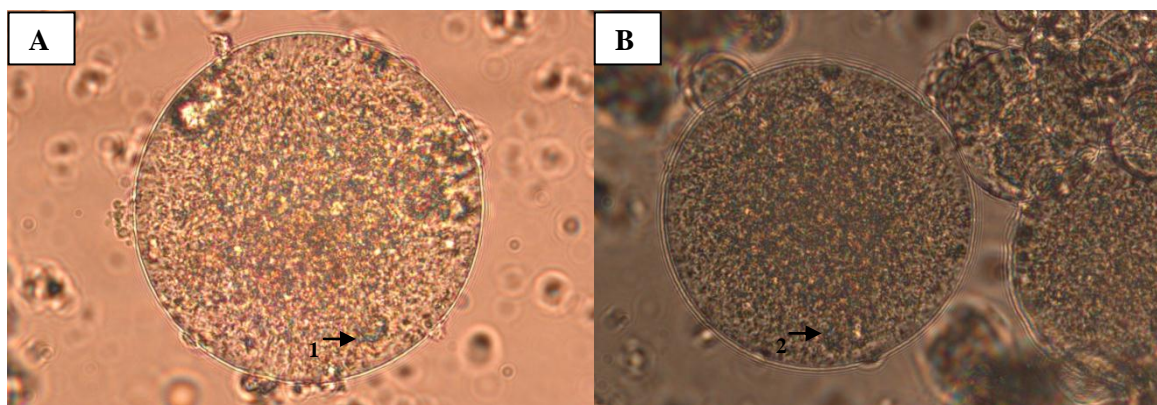


Figura 1 – Microscopia óptica de microcápsulas úmidas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa (40x), na qual as setas 1 e 2 indicam a presença dos probióticos.

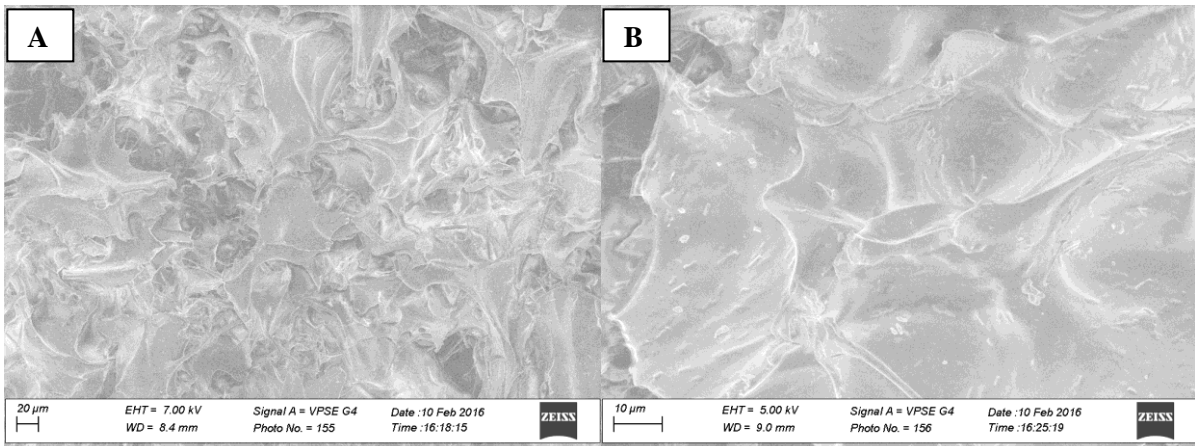


Figura 2 – Microscopia eletrônica de varredura de microcápsulas secas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa. (A) 500 x (B) 2250 x

Tabela 3 – Viabilidade das microcápsulas úmidas e secas de *L. acidophilus* La-5 microencapsuladas por coacervação complexa, em diferentes condições de pH

Tratamento/Tempo (hora)	ÚMIDA	SECA
pH 4,5		
1	5,42 ± 0,10 ^C	7,36 ± 0,58 ^A
2	7,28 ± 0,04 ^A	6,61 ± 0,03 ^A
3	7,10 ± 0,03 ^B	6,82 ± 0,12 ^A
pH 6,0		
1	3,92 ± 0,01 ^C	5,05 ± 0,01 ^C
2	5,21 ± 0,03 ^B	5,23 ± 0,03 ^B
3	7,81 ± 0,04 ^A	6,31 ± 0,01 ^A
pH 7,5		
1	4,09 ± 0,03 ^C	5,15 ± 0,01 ^C
2	5,29 ± 0,03 ^B	7,84 ± 0,07 ^B
3	7,46 ± 0,06 ^A	8,11 ± 0,03 ^A

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

Tabela 4 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa, durante o teste de resistência às condições gastrointestinais simuladas “*in vitro*”

Tratamento	La-5 livre (log UFC.g ⁻¹)	La-5 úmida (log UFC.g ⁻¹)	La-5 seca (log UFC.g ⁻¹)
Inicial	9,89 ± 0,10 ^A	8,42 ± 0,02 ^A	6,17 ± 0,11 ^A
Estômago	5,12 ± 0,19 ^B	5,21 ± 0,18 ^B	4,46 ± 0,02 ^B
Duodeno	3,94 ± 0,04 ^C	4,70 ± 0,02 ^C	4,30 ± 0,01 ^C
Íleo	2,56 ± 0,07 ^D	3,33 ± 0,14 ^D	3,94 ± 0,15 ^D

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

Tabela 5 – Viabilidade de microcápsulas úmidas e secas de *L. acidophilus* La-5 obtidas por coacervação complexa, durante 120 dias de armazenamento a diferentes temperaturas

Tratamento	Úmida		
	25°C	-18°C	7°C
0	9,92 ± 0,05 ^{Aa}	9,92 ± 0,05 ^{Aa}	9,92 ± 0,05 ^{Aa}
15	6,27 ± 0,15 ^{Bc}	7,50 ± 0,29 ^{Bb}	7,73 ± 0,05 ^{Ba}
30	5,02 ± 0,06 ^{Cc}	7,75 ± 0,07 ^{Ba}	6,08 ± 0,04 ^{Db}
45	5,89 ± 0,36 ^{Cb}	6,85 ± 0,06 ^{Ca}	5,27 ± 0,01 ^{Ec}
60	5,74 ± 0,15 ^{BCb}	6,57 ± 0,16 ^{CDa}	3,46 ± 0,17 ^{Gc}
75	5,99 ± 0,23 ^{Bb}	7,58 ± 0,17 ^{Ba}	5,02 ± 0,04 ^{Fc}
90	5,20 ± 0,18 ^{Cb}	6,92 ± 0,08 ^{Ca}	5,08 ± 0,06 ^{EFb}
105	5,04 ± 0,25 ^{Cb}	7,48 ± 0,17 ^{Ba}	5,18 ± 0,06 ^{EFb}
120	4,02 ± 0,06 ^{Db}	6,29 ± 0,02 ^{Da}	6,41 ± 0,14 ^{Ca}
	Seca		
0	8,80 ± 0,08 ^{Aa}	8,80 ± 0,08 ^{Aa}	8,80 ± 0,08 ^{Aa}
15	8,06 ± 0,18 ^{ABb}	8,89 ± 0,14 ^{Aa}	8,19 ± 0,12 ^{Bb}
30	7,88 ± 0,11 ^{Bb}	8,76 ± 0,20 ^{Aa}	7,71 ± 0,16 ^{Bb}
45	6,13 ± 0,22 ^{Cc}	7,90 ± 0,15 ^{Ba}	6,91 ± 0,23 ^{Cb}
60	5,84 ± 0,12 ^{Cb}	6,97 ± 0,17 ^{Ca}	6,90 ± 0,15 ^{Ca}
75	5,82 ± 0,12 ^{Cb}	6,91 ± 0,01 ^{Ca}	6,84 ± 0,27 ^{Ca}
90	5,75 ± 0,18 ^{Cb}	6,76 ± 0,23 ^{Ca}	6,71 ± 0,28 ^{Ca}
105	5,46 ± 0,45 ^{Cb}	6,62 ± 0,24 ^{CDa}	6,59 ± 0,11 ^{Ca}
120	3,86 ± 0,50 ^{Dc}	6,15 ± 0,20 ^{Da}	5,16 ± 0,16 ^{Db}

Médias seguidas pela mesma letra, maiúscula na coluna e minúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste Tukey a 5% de significância. Médias obtidas em triplicata.

6 DISCUSSÃO GERAL

6.1 Eficiência de encapsulação

As maiores eficiências de encapsulação foram encontradas nas microcápsulas úmidas e a técnica de coacervação complexa foi mais eficiente em encapsular *B. lactis* Bb-12. Isso deve ter ocorrido pelo fato que a cepa de *B. lactis* Bb-12 é mais resistente que *L. acidophilus* La-05. Além disso, a eficiência foi maior para as microcápsulas úmidas, pois durante o processo de secagem, muitos microrganismos não resistem e acabam sendo eliminados. Esses resultados estão de acordo com Oliveira et al. (2007) que encapsularam *B. lactis* BI 01 e *L. acidophilus* LAC 4 por coacervação complexa utilizando pectina e caseína como encapsulantes seguida de secagem em leito de jorro e observaram que *B. lactis* foi mais resistente, principalmente ao processo de secagem, que *L. acidophilus*.

Girardi et al. (2015) encapsularam hidroxianisol butilado (BHA) e hidroxitolueno butilado (BHT) por coacervação complexa utilizando como encapsulantes gelatina e goma arábica e obtiveram eficiências de encapsulação variando entre 74-84% para BHA e 78-90% para BHT. Similarmente, Fritzen-Freire et al. (2013) encapsularam *B. lactis* Bb-12 por spray-dryer em diferentes polissacarídeos e observaram eficiências de encapsulação variando entre 70,58 e 75,68%. Todavia, Chávarri et al. (2010) encontraram eficiências de encapsulação variando entre 19,5 e 40,2% na encapsulação de *Lactobacillus gasseri* e *Bifidobacterium bifidum* utilizando gelificação iônica com revestimento de quitosana. Do mesmo modo, Picot; Lacroix (2004) quando utilizaram *spray drying* para a encapsulação de *Bifidobacterium breve* e *Bifidobacterium longum*, obtiveram eficiências de encapsulação variando entre 0,03 e 25,67%. Diante do exposto, observa-se que a técnica de coacervação complexa apresenta eficiências de encapsulação superiores quando comparada a outras técnicas, demonstrando a vantagem dessa técnica.

6.2 Caracterização morfológica das microcápsulas por microscopia óptica e eletrônica de varredura

A técnica de coacervação complexa produziu microcápsulas similares em relação à morfologia, tanto para as microcápsulas úmidas quanto para as microcápsulas secas para ambos os microrganismos.

Com relação às microcápsulas úmidas, nota-se que apresentaram formatos arredondados, distribuição uniforme e multinuclear. Esses resultados também foram observados por Etchepare et al. (2016) na encapsulação de *L. acidophilus* (La-14) por extrusão. Souza et al. (2012) também observaram os mesmos resultados quando produziram microcápsulas de pectina e proteína do soro de leite por geleificação iônica seguida de secagem por *spray drying*. De Castro-Cislagh et al. (2012) encapsularam *B. lactis* Bb-12 por *spray drying* em soro de leite e observaram que as microcápsulas apresentaram formatos esféricos com a presença de concavidades. Esses resultados estão em conformidade com Fávaro-Trindade; Grosso (2002) que encapsularam *L. acidophilus* e *B. lactis* em acetato ftalato de celulose por *spray drying*.

Já as microcápsulas secas apresentaram formação de aglomerados. Este resultado está corroborando com Oliveira et al. (2007) que observaram a formação de estruturas compactas pela matriz coesiva de pectina e caseína utilizadas pela coacervação complexa para a encapsulação de *B. Lactis* (B1-01) e *L. acidophilus* (LAC-4). Semelhantemente, Souza et al. (2012) produziram microcápsulas de pectina e soro de leite por geleificação iônica seguida de secagem por *spray drying* com o objetivo de caracterizar as microcápsulas. Foi observado que as microcápsulas perderam a forma esférica apresentando irregularidades e ondulações, devido às gotículas de gordura e à camada de proteínas adsorvida presentes nas microcápsulas, resultados similares aos encontrados no presente trabalho. Em contrapartida, Kim et al. (2008) encapsularam *L. acidophilus* ATCC 43121 por extrusão seguida de secagem em *spray drying* e observaram que as microcápsulas apresentaram superfícies esféricas com a presença de rugosidades. Em outro estudo realizado por Rajam et al. (2012) em que encapsularam *L. plantarum* em isolado de proteína do soro de leite por *spray drying* e liofilização, observaram que as microcápsulas secas por *spray drying* apresentaram formatos irregulares. Já as microcápsulas formadas por liofilização, apresentaram estrutura extremamente porosa e esponjosa.

6.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

O diâmetro médio e a distribuição de tamanho das microcápsulas foram similares para *B. lactis* e *L. acidophilus*. Para *B. lactis* os diâmetros médios obtidos foram de 100,12 μm para as microcápsulas úmidas e 203,32 μm para as microcápsulas secas. Para *L. acidophilus* os diâmetros médios obtidos foram de 127,14 μm e 227,05 μm , para as microcápsulas úmidas e secas, respectivamente. Com relação às microcápsulas secas, os diâmetros médios mais altos

são decorrentes da aderência dos materiais encapsulantes, formando aglomerados e contribuindo para o aumento do tamanho das microcápsulas. Contudo, os diâmetros médios encontrados estão de acordo com a literatura. Segundo Fávaro-Trindade; Pinho; Rocha (2008) as microcápsulas formadas por coacervação complexa apresentam diâmetros médios variando entre 1 e 500 μm (OLIVEIRA et al., 2007).

Saravanan; Rao (2010) obtiveram diâmetro médio de 120,94 μm e 110,64 μm para a encapsulação de indometacina por coacervação complexa utilizando pectina-gelatina e alginato-gelatina, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com os resultados encontrados no presente trabalho. Por outro lado, Chandramouli et al. (2004) encapsularam *L. acidophilus* CSCC 2400 e *L. acidophilus* CSCC 2404 por extrusão e obtiveram diâmetros médios variando de 200 a 1000 μm . Semelhantemente, Aguilar (2003) produziu microcápsulas de pectina e alginato por gelificação iônica recobertas com concentrado protéico de soro de leite e observou diâmetros médios variando entre 190,24 e 197,47 μm .

6.4 Viabilidade dos probióticos em diferentes condições de pH

Observa-se que *B. lactis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-05 apresentaram liberação similar nos diferentes pH e tempos analisados, onde houve rápida liberação em pH 4,5 já em 1 hora de liberação, sendo que as maiores contagens de células viáveis foram observadas no pH 7,5 em 3 horas. É esperado que as microcápsulas liberem seu conteúdo em pH próximo de 7,5, pois é um valor próximo ao pH do intestino humano, como foi observado no presente trabalho, por meio da microscopia óptica, em que as microcápsulas liberaram totalmente seu conteúdo em pH 7,5. Contudo, houve rápida liberação em pH 4,5. Esse resultado também era previsto, visto que, a gelatina é um dos materiais que compõem as microcápsulas e esse composto em meio ácido rompe suas ligações devido à desnaturação, liberando seu conteúdo. Além disso, de acordo com Gharsallaoui et al. (2007), a goma arábica produz emulsões estáveis frente a uma ampla faixa de pH quando adicionada de óleo. Assim, isso pode ser uma justificativa para a liberação dos probióticos das microcápsulas, pois as microcápsulas obtidas no presente trabalho apresentaram baixa quantidade de lipídeos, e pode ser uma alternativa no melhoramento das microcápsulas em estudos posteriores.

Oliveira et al. (2007) encapsularam *B. lactis* (B1-01) e *L. acidophilus* (LAC-4) por coacervação complexa utilizando como materiais encapsulantes pectina e caseína e observaram que quando expuseram os microrganismos a condições ácidas, houve reduções de 1 e 2,7 ciclos logarítmicos para *B. lactis* e *L. acidophilus*, respectivamente. Quando as

microcápsulas foram expostas a condições básicas, os microrganismos não apresentaram diferenças significativas na contagem de células viáveis no decorrer das 3 horas de observação. Da mesma forma, Fávaro-Trindade; Grosso (2002) e Shoji et al. (2013) observaram que *B. lactis* encapsulado em acetato de celulose por *spray drying* e *L. acidophilus* encapsulado em pectina e caseína por coacervação complexa foram resistentes a soluções ácidas. Em contrapartida, em um estudo realizado por Grosso; Fávaro-Trindade (2004), células de *L. acidophilus* imobilizadas em alginato foram resistentes por 28 dias e 14 dias quando expostas a soluções de pH básico e ácido, respectivamente. Já *B. lactis* foi resistente por 28 dias frente às duas soluções. Isso é justificado pelo fato do alginato ser insolúvel em meio ácido (GBASSI; VANDAMME, 2012). Apesar disso, a técnica de coacervação complexa foi eficiente para a encapsulação de *B. lactis* Bb-12 e *L. acidophilus* La-05, pois a coacervação complexa foi capaz de proteger os microrganismos em condições ácidas e liberar grande quantidade destes em pH apropriado.

6.5 Sobrevivência dos microrganismos sob condições gastrointestinais simuladas

Pode-se observar que *L. acidophilus* La-05 perdeu a viabilidade em todos os tratamentos, no entanto, os microrganismos encapsulados na forma úmida e seca apresentaram maior viabilidade que os microrganismos na forma livre. Já *B. lactis* Bb-12 perdeu a viabilidade na forma livre, assim, a microencapsulação foi capaz de proteger o microrganismo, mantendo sua viabilidade. Essa viabilidade obtida nas formas úmida e seca está de acordo com a legislação para que os benefícios probióticos ocorram ($>6 \log \text{UFC.g}^{-1}$).

Pedroso et al. (2013) encapsularam *B. lactis* por *spray chilling* em manteiga de cacau e lecitina e quando expuseram as microcápsulas às condições gastrointestinais simuladas, observaram que tanto as microcápsulas na forma livre quanto as microcápsulas encapsuladas, apresentaram reduções de $1,3 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

Etchepare et al. (2016) encapsularam *L. acidophilus* (La-14) por extrusão em alginato seguida de secagem por liofilização e observaram que quando expuseram as microcápsulas em condições gastrointestinais simuladas, as microcápsulas úmidas e secas apresentaram reduções de 3,67 e 1,24 ciclos logarítmicos respectivamente.

Diante dos resultados obtidos, observa-se que a coacervação complexa foi eficiente em proteger *B. lactis* Bb-12 das condições adversas do trato gastrointestinal, entretanto, apesar de oferecer proteção para *L. acidophilus* La-05 a contagem de células viáveis está abaixo de $6 \log \text{UFC.g}^{-1}$, valor estipulado pela legislação para que os benefícios fornecidos pelos

probióticos ocorram. Assim, mais estudos devem ser realizados com o intuito de melhorar a estabilidade destas microcápsulas.

6.6 Viabilidade das células microencapsuladas durante o armazenamento a diferentes temperaturas

Observa-se que a microencapsulação foi capaz de proteger ambos os microrganismos. Para *B. lactis* Bb-12 as microcápsulas úmidas armazenadas a -18°C apresentaram viabilidade por 120 dias (6,35 log UFC.g⁻¹), a 7°C por 120 dias (8,83 log UFC.g⁻¹) e a 25°C por 90 dias (6,60 log UFC.g⁻¹). Já as microcápsulas secas armazenadas a -18°C apresentaram viabilidade por 120 dias (6,60 log UFC.g⁻¹), a 7°C por 120 dias (6,42 log UFC.g⁻¹) e a 25°C por 90 dias (9,45 log UFC.g⁻¹). Em relação ao *L. acidophilus* La-05 as microcápsulas úmidas armazenadas a -18°C, 7°C e 25°C apresentaram viabilidade por 120 dias (6,29 log UFC.g⁻¹), 30 dias (6,41 log UFC.g⁻¹) e 15 dias (6,2 log UFC.g⁻¹), respectivamente. Para as micropartículas secas armazenadas a -18°C, 7°C e 25°C as viabilidades apresentadas foram de 120 dias (6,15 log UFC.g⁻¹), 105 dias (6,59 log UFC.g⁻¹) e 45 dias (6,13 log UFC.g⁻¹).

SHOJI et al. (2013) encapsularam *L. acidophilus* por coacervação complexa em pectina e caseína seguida de secagem por liofilização e observaram que quando as microcápsulas foram expostas ao armazenamento em temperaturas de 7°C e 37°C, somente a temperatura de 7°C foi capaz de manter a viabilidade dos microrganismos no final da vida de prateleira de 120 dias (7,23 log UFC.g⁻¹). Da mesma forma, Oliveira et al. (2007) encapsularam *B. lactis* em pectina e caseína por coacervação complexa e observaram sua viabilidade em temperaturas de 7°C e 37°C e obtiveram que somente a temperatura de 7°C foi capaz de manter a viabilidade por 60 dias. Em outro estudo, Paéz et al. (2012) encapsularam *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus plantarum* por *spray drying* em leite desnatado e observaram a viabilidades destes probióticos armazenados em 5, 25 e 37°C. Foi observado que todos os probióticos permaneceram viáveis quando armazenados a 5 e 25°C por 75 dias, entretanto, somente *L. acidophilus* permaneceu viável por este período a 37°C. Semelhantemente, Nualkaekul et al. (2013) encapsularam *L. plantarum* e *B. longum*, separadamente, em alginato e pectina por extrusão, adicionaram as microcápsulas em suco de romã e observaram sua viabilidade a 4°C. Observou-se que ambos os microrganismos permaneceram viáveis por 45 dias com contagens de células viáveis em torno de 7 log UFC.g⁻¹. Em outro estudo, realizado por Kailasapathy (2006) onde *L. acidophilus* e *B. lactis* foram encapsulados em alginato de cálcio por emulsão,

observou-se que ambos os probióticos mantiveram a viabilidade por 6 semanas em iogurte armazenado a 4,4°C.

Os resultados demonstram que a microencapsulação foi eficiente em proteger os microrganismos mantendo a sua viabilidade por longo período de tempo na maioria das temperaturas analisadas. Conclui-se também que *B. lactis* Bb-12 é mais resistente que *L. acidophilus* e que a temperatura de 25°C não é eficiente para manter a viabilidade para ambos os microrganismos por longo período de tempo.

7 CONCLUSÃO GERAL

A coacervação complexa para a encapsulação de *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* mostra-se como uma alternativa viável para a proteção destes microrganismos, pois:

- Apresentou elevada eficiência de encapsulação;
- Satisfatórios diâmetros médios;
- Proteção frente a diferentes condições de pH;
- Proteção frente às condições gastrointestinais simuladas;
- Manteve a viabilidade dos microrganismos durante a vida de prateleira, por um longo período de tempo.

Por fim, a técnica de encapsulação por coacervação complexa para probióticos mostra-se promissora, pois ainda não existem estudos aprofundados e de acordo com os resultados obtidos no presente trabalho, essa técnica possui grande potencial para a encapsulação na área de alimentos.

8 SUGESTÕES

Ressalta-se a importância de estudos mais aprofundados com relação à viabilidade das microcápsulas, com o intuito de produzir microcápsulas mais resistentes frente às condições adversas. Outro ponto importante ocorre em relação às microcápsulas contendo *L. acidophilus* quando expostas a condições gastrointestinais simuladas, sugere-se que mais estudos sejam realizados com o objetivo de aumentar a resistência das microcápsulas frente a essas condições para manter a viabilidade dos microrganismos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUILAR, K. C. **Adsorción de proteína em hidrogéis de alginato pectina**. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas). Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, Morelia, Michoacán - Mexico, 66 p., 2013.

ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. **Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material**. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, Campinas, v. 30, n. 4, p. 1069-1076, out./dez., 2010.

ANTUNES, A. E. C.; LISERRE, A. M.; COELHO, A. L. A.; MENEZES, C. R.; MORENO, L.; YOTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N. C. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013.

AZEREDO, H. M. C. **Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos**. *Alimentos e Nutrição*, Araraquara, v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.

BARBOSA, F. H. F.; DA SILVA, A. M.; BARBOSA, L. P. J. D. L.; NICOLI, J. R. O gênero *Bifidobacterium*: Dominância à favor da vida. **Ciência Equatorial**, v. 1, n. 2, 2012.

BRASIL. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 20 ago. 2014.

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, p. 467-483, 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, p. 27-35, 2004.

CHITPRASERT, P.; SUDSAI, P.; RODKLONGTAN, A. Aluminum carboxymethyl cellulose–rice bran microcapsules: Enhancing survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 1, p. 78-86, set., 2012.

DAIRIKI, J. K. **Probióticos na aquicultura**. V Encontro de negócios da aquicultura na Amazônia – Enaq - AM, Manaus, AM, 2013.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; SANT'ANNA, E. S. Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium Bb-12* por *spray drying*: comparação com goma arábica. **Ciência Rural**, v. 42, n. 9, p. 1694-1700, 2012.

DELFINO, N. C. **Desenvolvimento de queijo Petit Suisse com adição de probiótico *Lactobacillus casei***. (Dissertação). Universidade Federal do Recôncavo da Bahia, Salvador – Brasil, 107 p., 2014.

ETCHEPARE, M. A.; RADDATZ, G. C.; FLORES, E. M. M.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; BARIN, J. S.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) e *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.; ROCHA, G. A. **Revisão**: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Córdoba, 2001. 34p. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf>. Acesso em: 20ago. 2014. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].

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

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriological**, Oxford, v. 66, p. 365-378, 1989.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T. Probiotic encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 149-163, 2012.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GIRARDI, N. S.; GARCIA, D.; NESCI, A.; PASSONE, M. A. Stability of food grade antioxidants formulation to use as preservatives on stored peanut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 1019-1026, 2015.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Food Science and Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GROSSO, C. R. F.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Stability of free and immobilized Lactobacillus acidophilus and Bifidobacterium lactis in acidified milk and of immobilized B. lactis in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 35, n. 1-2, p. 151-156, 2004.

HELLER, K. J. Probiotic bacteria in fermented foods: product characteristics and starter organisms. **The American Journal of Clinical Nutrition**, USA, v. 73, p. 374S-379S, 2001.

JUN-XIA, X.; HAI-YAN, Y.; JIAN, Y. Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. **Food Chemistry**, v. 125, p. 1267-1272, 2011.

KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.

KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in Lactobacillus acidophilus ATCC 43121. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 493-500, 2008.

KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, jul./set., 2008.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of Bifidobacterium animalis subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007.

LIU, S.; CAO, Y. L.; GHOSH, S.; ROUSSEAU, D.; LOW, N. H.; NICKERSON, M. T. Intermolecular Interactions during Complex Coacervation of Pea Protein Isolate and Gum Arabic. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 58, p. 552-556, 2010.

LV, Y.; ZHANG, X.; ABBAS, S.; KARANGWA, E. Simplified optimization for microcapsule preparation by complex coacervation based on the correlation between coacervates and the corresponding microcapsule. **Journal of Food Engineering**, v. 111, p. 225-233, 2012.

MACEDO, L. N.; LUCHESE, R. H.; GUERRA, A. F.; BARBOSA, C. G. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 28, n. 4, p. 935-942, out.-dez., 2008.

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

MÜLLER, P. S. **Microencapsulação do óleo essencial de laranja**. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal do Paraná, Paraná, 2011. Disponível em <<http://www.posalim.ufpr.br/Pesquisa/pdf/DissertacaoPriscilaMuller.pdf>>. Acesso em: 06/10/2014.

NORI, M. P.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; ALENCAR, S. M.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; CASTILLO, C. J. C. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 429-435, 2011.

NUALKAEKUL, S.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULUS, D. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium longum* in fruit juices. **Food Research International**, v. 53, p. 304-311, 2013.

OLIVEIRA, A. C. J. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por *spray-drying* e leito de jorro**. Dissertação de Mestrado, Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, São Paulo, 2006. Disponível em <<http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/60/60137/tde-10052007-103644/pt-br.php>>. Acesso em: 20/08/2014.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A. P.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (B1 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. **Drying Technology**, v. 25, p. 1687-1693, 2007.

OROSCO, I. M.; KUNIGK, C. J. **Influência do preparo do inóculo na sobrevivência de bactérias probióticas encapsuladas liofilizadas**. Instituto Mauá de Tecnologia, 2012.

PAÉZ, R.; LAVARI, L.; VINDEROLA, G.; AUDERO, G.; CUATRIN, A.; ZARITZKY, N.; REINHEIMER, J. Effect of heat treatment and *spray drying* on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 748-754, 2012.

PEDROSO, D. L.; DOGENSKI, M.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, 3, p. 777-783, 2013.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, june, 2004.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. Tese de Doutorado, Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, São Paulo, 2006.

QV, X.; ZENG, Z.; JIANG, J. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1596-1603, 2011.

RAIZEL, R.; SANTINI, E.; KOPPER, A. M.; REIS FILHO, A. D. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 4, n. 2, p. 66-74, jul./dez. 2011.

RAJAM, R.; KARTHIK, P.; PARTHASARATHI, S.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Effect of whey protein–alginate wall systems on survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 4, n. 4, p. 891-898, 2012.

RISCH, S. J.; REINECCIUS, G. A. **Encapsulation and controlled released of food ingredients**. Washington, DC: American Chemical Society, 214 p., 1995.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.

SARAVANAN, M.; PANDURANGA RAO, K. Pectin-gelatin and alginate-gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, p. 808-816, 2010.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.

SHOJI, A. S.; OLIVEIRA, A. C.; BALIEIRO, J. C. C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; OKURO, P. K.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, p. 83-88, 2013.

SOCCOL, C. R.; VANDENBERGHE, L. P. S.; SPIER, M. R.; MEDEIROS, A. B. P.; YAMAGUISHI, C. T.; LINDNER, J. D. D.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. **Food Technology Biotechnology**, v. 48, n.4, p. 413-434, 2010.

SOUZA, F. N.; GEBARA, C.; RIBEIRO, M. C.; CHAVES, K. S.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food research international**, v. 49, n. 1, p. 560-566, 2012.

SOUZA, F. S.; COCCO, R. R.; SARNI, R. O. S.; MALLOZI, M. C., SOLÉ, D. Prebióticos, probióticos e simbióticos na prevenção e tratamento das doenças alérgicas. **Revista Paulista de Pediatria**, v. 28, n. 1, p. 86-97, 2010.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos – Artigo de Revisão. **Saúde e Ambiente em Revista**, v. 3, n. 1, p. 16-33, jan./jun. 2008.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, v. 7, n. 2, p. 12-20, 2006.

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**, v. 62, p. 47-55, 2000.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; GORETA, J.; MATO, S. Role of Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in Synbiotic Effect. **Food technology and biotechnology**, v. 39, n. 3, p. 227-235, 2001.

THIES, C. Microcapsules. In: **Encyclopedia of Food Sciences and Nutrition**, 2. ed. p. 3892-3903, 2003.

YANG, X; GAO, N.; HU, L.; LI, J.; SUN, Y. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 161, p. 87-93, set., 2015.

YU, Y.T.; LIU, L. N.; ZHU, X. L.; KONG, X. Z. Microencapsulation of dodecyl acetate by complex coacervation of whey protein with acacia gum and its release behavior. **Chinese Chemical Letters**, v. 23, n. 7, p. 847-850, jul., 2012.

ANEXOS

Anexo A – Diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

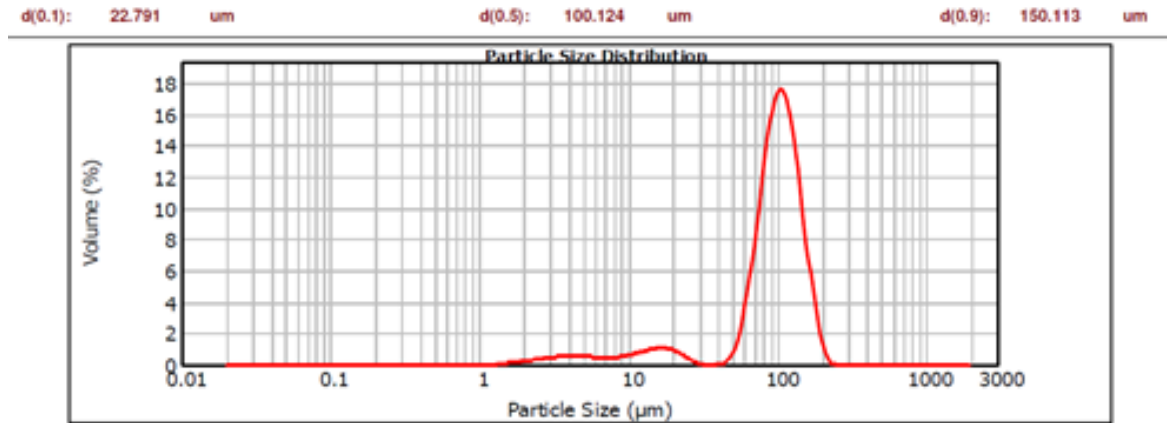


Figura 1 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas úmidas de *B. lactis* Bb-12

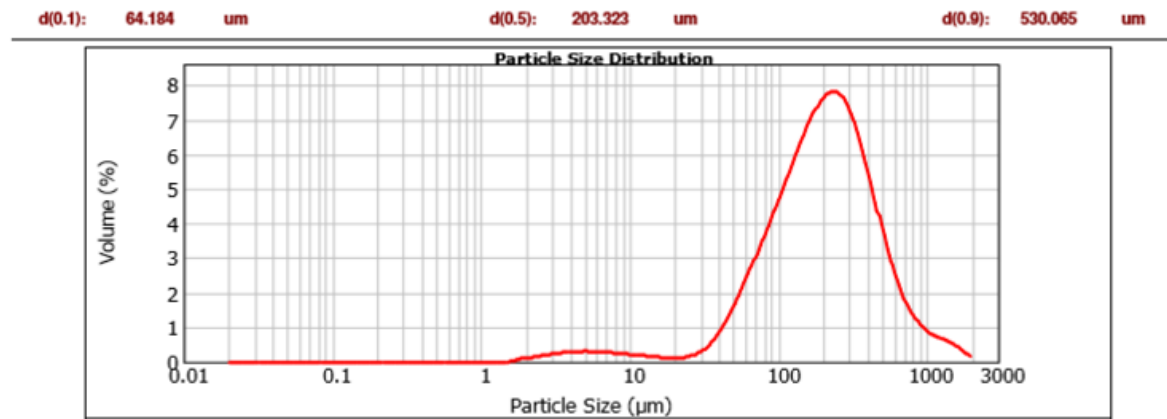


Figura 2 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas secas de *B. lactis* Bb-12

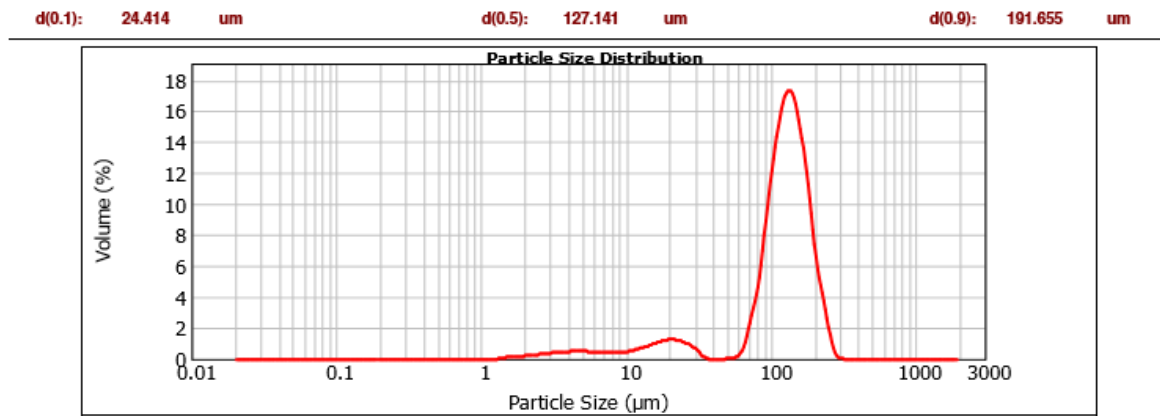


Figura 3 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas úmidas de *L. acidophilus* La-5

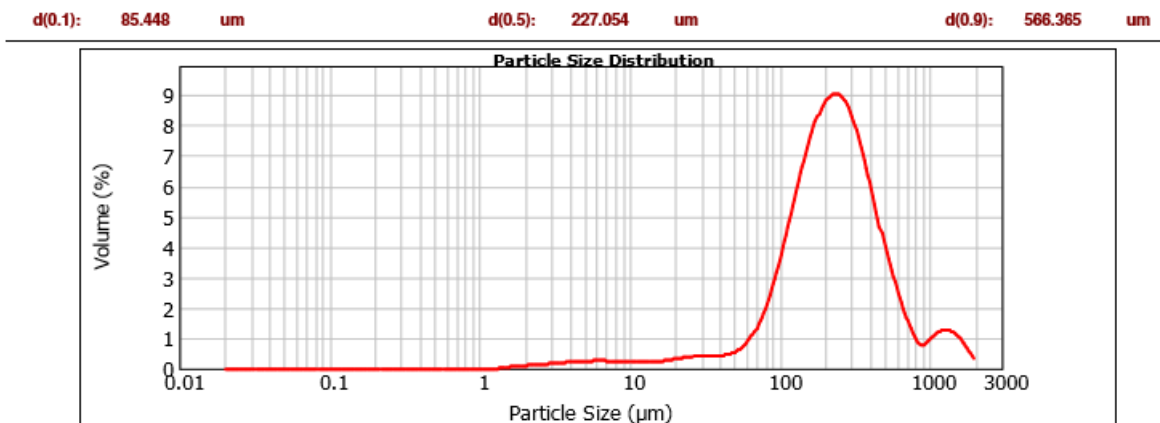


Figura 4 – Diâmetro médio e a distribuição de tamanho de microcápsulas secas de *L. acidophilus* La-5