

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

Thaiane Marques da Silva

**PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS POR  
COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO  
INDUZIDA E APLICAÇÃO EM SUCOS DE FRUTA**

Santa Maria, RS  
2020



**Thaiane Marques da Silva**

**PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS POR COACERVAÇÃO  
COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO INDUZIDA E APLICAÇÃO EM  
SUCOS DE FRUTA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes  
Co-orientadora: Prof. Dra. Cristiane de Bona da Silva

Santa Maria, RS  
2020

This study was financed in part by the Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Finance Code 001

Silva, Thaianne Marques da  
Produção de microcápsulas probióticas por coacervação  
complexa associada à reticulação induzida e aplicação em  
sucos de fruta / Thaianne Marques da Silva.- 2020.  
141 p.; 30 cm

Orientador: Cristiano Ragagnin de Menezes  
Coorientadora: Cristiane de Bona da Silva  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós  
Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2020

1. Microencapsulação 2. L. acidophilus 3.  
Transglutaminase 4. Suco de laranja 5. Suco de maçã I.  
Menezes, Cristiano Ragagnin de II. Silva, Cristiane de  
Bona da III. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UFSM. Dados fornecidos pelo autor(a). Sob supervisão da Direção da Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central. Bibliotecária responsável Paula Schoenfeldt Patta CRB 10/1728.

Declaro, THAIANE MARQUES DA SILVA, para os devidos fins e sob as penas da lei, que a pesquisa constante neste trabalho de conclusão de curso (Tese) foi por mim elaborada e que as informações necessárias objeto de consulta em literatura e outras fontes estão devidamente referenciadas. Declaro, ainda, que este trabalho ou parte dele não foi apresentado anteriormente para obtenção de qualquer outro grau acadêmico, estando ciente de que a inveracidade da presente declaração poderá resultar na anulação da titulação pela Universidade, entre outras consequências legais.

Thaiane Marques da Silva

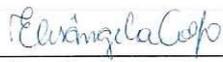
**PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS POR COACERVAÇÃO  
COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO INDUZIDA E APLICAÇÃO EM  
SUCOS DE FRUTA**

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM, RS), como requisito parcial para obtenção do título de **Doutora em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovada em de 27 março de 2020:

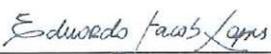
  
\_\_\_\_\_  
**Cristiano Ragagnin de Menezes, Dr. (UFSM)**  
(Presidente/Orientador)

  
\_\_\_\_\_  
**Cristiane de Bona da Silva, Dra. (UFSM)**  
(Coorientadora)

  
\_\_\_\_\_  
**Elisângela Colpo, Dra. (UFN)**

  
\_\_\_\_\_  
**Maria Fernanda Silveira Cáceres de Menezes, Dra. (IFFar)**

  
\_\_\_\_\_  
**Cristiano Augusto Ballus, Dr. (UFSM)**

  
\_\_\_\_\_  
**Eduardo Jacob-Lopes, Dr. (UFSM)**

Santa Maria, RS  
2020



*Aos meus pais e à minha irmã,  
com muito carinho e gratidão,  
dedico este trabalho.*



## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida e por todas as oportunidades colocadas em meu caminho.

À Universidade Federal de Santa Maria e seus mestres, por todo conhecimento adquirido e pelo ensino gratuito e de qualidade durante dez anos.

Ao meu orientador, Prof. Cristiano, pela oportunidade de fazer parte do laboratório 106, jamais me esquecerei das realizações alcançadas por meio dessa oportunidade. Por todas as orientações, pela amizade e pela parceria de oito anos de trabalho. Deixo aqui minha imensa admiração pelo profissional que és e minha gratidão!

À CAPES pelo apoio financeiro.

À Coana e à Ajinomoto pelo fornecimento de insumos para a realização deste trabalho.

À minha família, minha mãe Fatima e meu pai João, por serem minha base, pela excelente educação, por sempre apoiarem meus sonhos e vibrarem com minhas conquistas, fazendo o que fosse necessário pelos meus estudos. E a minha irmã Ariane, minha melhor amiga, que sempre esteve do meu lado (mesmo longe), sendo meu braço direito e minha companheira de todos os momentos. A vocês que tanto amo, minha eterna gratidão!

À Ju (Juliane), minha prima-irmã, por todo apoio e por todos os momentos que estivemos juntas, o teu companheirismo foi imprescindível para esta conquista.

Ao Arthur, que mesmo em pouco tempo presente na minha vida, já me ajudou e me ensinou tanto. Tua ajuda foi muito importante para a concretização deste trabalho! Muito obrigada!

À Gabrielle Fagundes, por me ouvir, me auxiliar e tanto me ensinar, poder contar contigo e teus conselhos foi fundamental pra realização deste trabalho, gratidão!

Aos colegas e amigos do laboratório 106, por todo o auxílio para a realização deste trabalho. Obrigada Cassandra, Débora, Gabi, Greice, Naiara, Simara, Vandrê e Vitor pela convivência, pelos momentos de descontração e diversão, pelo apoio e por tudo que compartilhamos nesse período. Às ex-colegas e amigas, Graci, Mari, MaFer, Maiara e Suelen, que sinto tanta saudade dos mates, vocês também foram muito importantes na realização deste trabalho.

Às minhas amigas e colegas, Maritiele e Bruna, pelos inúmeros momentos que estivemos juntas, pelas viagens, pelos trabalhos e principalmente, pela amizade verdadeira. Amo vocês! Mari, minha gratidão pelos 23 de companheirismo. #CPG

À minha amiga Nicole, pelos 22 anos de amizade e convívio. Muito obrigada pelas risadas garantidas e por tudo que passamos durante esse tempo!

Aos colegas de pós-graduação, Angela, Augusto, Camila, Fernanda, Jamila, Karine, Marcelo, Maritiele e Naiéli, que desde o mestrado estivemos juntos, compartilhando nossas vidas, muito obrigada pela amizade e apoio. #TP

Enfim, a todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho, muito obrigada!



*“Feliz aquele que transfere o que  
sabe e aprende o que ensina”.*

*Cora Coralina*



## RESUMO

### PRODUÇÃO DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA E APLICAÇÃO EM SUCOS DE FRUTA

AUTORA: Thaianne Marques da Silva  
ORIENTADOR: Cristiano Ragagnin de Menezes  
COORIENTADORA: Cristiane de Bona da Silva

O objetivo deste trabalho consistiu em desenvolver microcápsulas contendo *L. acidophilus* LA-02 por coacervação complexa associada à reticulação com transglutaminase para aumentar a viabilidade da cultura probiótica após aplicação em suco de laranja e suco de maçã. As microcápsulas foram produzidas com gelatina e goma arábica (1:1), com posterior reticulação das microcápsulas com 2,5 e 5,0 U de transglutaminase/g de gelatina, tratamentos 1 e 2, respectivamente, sendo produzidas nas formas úmida e seca. As análises a seguir foram realizadas para os probióticos na forma livre e nas microcápsulas, sem e com reticulação. Foram avaliadas a eficiência de encapsulação e a morfologia, no intuito de caracterizar as microcápsulas. Também foi avaliada a viabilidade dos probióticos após a exposição às condições gastrointestinais simuladas, em exposição a tratamentos térmicos e durante armazenamento em diferentes condições de temperatura por 60 dias. Nos sucos de frutas, somente microcápsulas úmidas foram adicionadas e foram avaliadas as concentrações de probióticos adicionados aos sucos (10 e 30%), a viabilidade em armazenamento nos sucos por 63 dias a 4°C e as condições de pH e sólidos solúveis totais dos sucos de fruta. O processo de microencapsulação associado à reticulação com transglutaminase apresentou alta eficiência de encapsulação. A morfologia foi semelhante para microcápsulas com e sem reticulação, apresentando-se esféricas e multinucleadas, sendo que a reticulação influenciou o diâmetro médio das microcápsulas secas. As microcápsulas apresentaram resistência em condições gastrointestinais simuladas e frente ao tratamento térmico, sendo essa resistência ampliada nas microcápsulas reticuladas e secas. Sob armazenamento, as microcápsulas na forma úmida ofereceram melhores condições de sobrevivência aos probióticos, sendo a temperatura de congelamento a mais adequada e o efeito da reticulação com transglutaminase mais evidente na temperatura de refrigeração. Quanto aos sucos de fruta, o suco de laranja foi o mais adequado proporcionando a sobrevivência dos probióticos por 63 dias (8,12 log UFC mL<sup>-1</sup>), nas microcápsulas. No suco de maçã, o processo de reticulação associado à concentração de 30% de microcápsulas foi mais adequado, proporcionando viabilidade aos probióticos por 35 dias (7,68 log UFC mL<sup>-1</sup>). Foi observado que o fator mais relevante para a sobrevivência dos probióticos foi o pH dos sucos e que as variações de pH e sólidos solúveis totais dos sucos de frutas está relacionada a atividade metabólica dos probióticos. Portanto, a coacervação complexa associada à transglutaminase proporcionou a proteção aos probióticos frente a condições adversas como o trato gastrointestinal e o tratamento térmico, bem como proporcionou viabilidade aos probióticos sob armazenamento em sucos de fruta por até 63 dias a 4°C.

**Palavras-chave:** Microencapsulação. *L. acidophilus*. Transglutaminase. Suco de laranja. Suco de maçã.



## ABSTRACT

### PRODUCTION OF PROBIOTIC MICROCAPSULES BY COMPLEX COACERVATION ASSOCIATED WITH ENZYMATIC HARNESS AND APPLICATION IN FRUIT JUICES

AUTHOR: Thaiane Marques da Silva  
ADVISOR: Cristiano Ragagnin de Menezes  
CO-ADVISOR: Cristiane de Bona da Silva

The objective of this work was to develop microcapsules containing *L. acidophilus* LA-02 by complex coacervation associated with crosslinking with transglutaminase to increase the viability of the probiotic culture after application in orange juice and apple juice. The microcapsules were produced with gelatin and gum arabic (1:1), with subsequent crosslinking of the microcapsules with 2.5 and 5.0 U of transglutaminase / g of gelatin, treatments 1 and 2, respectively, being produced in wet and dry forms. The following analyzes were performed for probiotics in free form and in microcapsules, without and with crosslinking. Encapsulation efficiency and morphology were evaluated in order to characterize the microcapsules. The viability of probiotics was also evaluated after exposure to simulated gastrointestinal conditions, exposed to heat treatments and during storage under different temperature conditions for 60 days. In fruit juices, only moist microcapsules were added and the concentrations of probiotics added to the juices (10 and 30%), the viability in storage in the juices for 63 days at 4°C and the pH conditions and total soluble solids of the fruit juices. The microencapsulation process associated with cross-linking with transglutaminase showed high encapsulation efficiency. The morphology was similar for microcapsules with and without crosslinking, being spherical and multinucleated, and the crosslinking influenced the average diameter of the dry microcapsules. The microcapsules showed resistance in simulated gastrointestinal conditions and in the face of heat treatment, and this resistance was increased in dry and reticulated microcapsules. Under storage, the microcapsules in the wet form offered better survival conditions for the probiotics, with the freezing temperature being the most appropriate and the effect of cross-linking with transglutaminase most evident in the refrigeration temperature. As for fruit juices, orange juice was the most adequate, providing probiotics for 63 days (8.12 log CFU mL<sup>-1</sup>) survival, in microcapsules. In apple juice, the cross-linking process associated with a concentration of 30% microcapsules was more appropriate, providing viability to probiotics for 35 days (7.68 log CFU mL<sup>-1</sup>). It was observed that the most relevant factor for the survival of the probiotics was the pH of the juices and that the variations in pH and total soluble solids of the fruit juices are related to the metabolic activity of the probiotics. Therefore, the complex coacervation associated with transglutaminase provided protection to probiotics against adverse conditions such as the gastrointestinal tract and heat treatment, as well as providing viability to probiotics under storage in fruit juices for up to 63 days at 4°C.

**Keywords:** Microencapsulation. *L. acidophilus*. Transglutaminase. Orange juice. Apple juice.



## LISTA DE FIGURAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Figura 1 – Microscopia óptica de cepas de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	33
Figura 2 – A técnica de coacervação complexa aplicada à microencapsulação de probióticos .....	35
Figura 3 – Mecanismo de reação da transglutaminase .....	38

### MANUSCRITO 1

Figura 1 – Processo esquematizado da técnica de coacervação complexa.....	48
Figura 2 – Fatores que afetam a técnica de coacervação complexa .....	50
Figura 3 – Aplicações da coacervação complexa e suas finalidades em diferentes áreas .....	54

### CAPÍTULO DE LIVRO

Figura 1 – Exposição das microcápsulas ao trato gastrointestinal simulado .....	85
---	----

### ARTIGO 1

Figure 1 – Optical and scanning electron microscopy of <i>Lactobacillus acidophilus</i> microcapsules in wet and dry forms, respectively.....	95
Figure 2 – Resistance of <i>L. acidophilus</i> microcapsules to heat treatment.....	96
Figure 3 – Storage temperatures of <i>L. acidophilus</i> microcapsules .....	97

### MANUSCRITO 2

Figura 1 – Dendograma de cluster para viabilidade probiótica no 63º dia de armazenamento a 4°C nos diferentes sucos de fruta .....	113
Figura 2 – Microscopia óptica das microcápsulas no suco de laranja em armazenamento por 63 dias a 4°C .....	114
Figura 3 – Microscopia óptica das microcápsulas no suco de maçã em armazenamento por 63 dias a 4°C .....	115



## LISTA DE TABELAS

### REFERENCIAL TEÓRICO

Tabela 1 – Microrganismos probióticos .....	32
Tabela 2 – Utilização da coacervação complexa na encapsulação de bactérias probióticas ....	36

### MANUSCRITO 1

Tabela 1 – Aplicações dos agentes de reticulação no processo de coacervação complexa.....	57
---	----

### ARTIGO 1

Table 1 – Conditions of enzymatic crosslinking of <i>L. acidophilus</i> microcapsules .....	92
Table 2 – Encapsulation efficiency of <i>L. acidophilus</i> microcapsules in the diferente treatments .....	93
Table 3 – Mean diameter of <i>L. acidophilus</i> microcapsules obtained by complex coacervation.....	93
Table 4 – Behaviour of <i>L. acidophilus</i> after microencapsulation process exposed to simulated gastrointestinal conditions (log UFC g <sup>-1</sup> ).....	96

### MANUSCRITO 2

Tabela 1 – Adição dos probióticos aos sucos de fruta.....	106
Tabela 2 – Viabilidade probiótica (log UFC mL <sup>-1</sup> ) durante 63 dias de armazenamento a 4°C nos diferentes sucos de fruta. ....	109
Tabela 3 – Resultados de pH e SST obtidos dos sucos de fruta no decorrer do armazenamento por 63 dias a 4°C. ....	118



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

COO-	Carboxilato
FDA	Food and drug administration
g	Gramma
GRAS	Geralmente reconhecido como seguro
HCl	Ácido clorídrico
<i>H. pylori</i>	<i>Helicobacter pylori</i>
J	Joule
L	Litro
<i>L. acidophilus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i>
Log	Logaritmo
<i>L. paracasei</i>	<i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>L. rhamnosus</i>	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>
M	Molar
mg	Miligrama
Min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milimetro
MRS	De Man, Rogosa e Sharpe
N	Normal
NaCl	Cloreto de sódio
NaHCO <sub>3</sub>	Bicarbonato de sódio
pH	Potencial hidrogeniônico
OH-	Hidroxila
p/p	Peso por peso
rpm	Rotações por minuto
s	Segundos
SST	Sólidos solúveis totais
U/g	Unidade de enzima por grama de proteína
UFC	Unidades formadoras de colônia
WPI	Isolado protéico de soro de leite
µm	Micrômetro



## SUMÁRIO

	<b>APRESENTAÇÃO.....</b>	<b>23</b>
<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>25</b>
<b>2</b>	<b>OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
2.1	OBJETIVO GERAL .....	29
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	29
<b>3</b>	<b>REFERENCIAL TEÓRICO.....</b>	<b>31</b>
3.1	PROBIÓTICOS COMO ALIMENTOS FUNCIONAIS .....	31
<b>3.1.1</b>	<b>O gênero <i>Lactobacillus</i> .....</b>	<b>33</b>
3.2	A COACERVAÇÃO COMPLEXA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	34
3.3	POR QUE RETICULAR MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA?.....	37
3.4	SUCO DE FRUTA ADICIONADO DE PROBIÓTICOS.....	39
<b>4</b>	<b>MANUSCRITO 1 – RETICULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA DE MELHORAMENTO PARA MICROCÁPSULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>CAPÍTULO DE LIVRO – RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA .....</b>	<b>79</b>
<b>6</b>	<b>ARTIGO 1 – THE EFFECT OF ENZYMATIC CROSSLINKING ON THE VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA (<i>Lactobacillus acidophilus</i>) ENCAPSULATED BY COMPLEX COACERVATION.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>MANUSCRITO 2 – VIABILIDADE DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> MICROENCAPSULADOS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA SOB APLICAÇÃO EM DIFERENTES SUCOS DE FRUTA.....</b>	<b>99</b>
<b>8</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>125</b>
<b>9</b>	<b>CONCLUSÃO .....</b>	<b>131</b>
	<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>133</b>



## APRESENTAÇÃO

Esta tese segue as normas estabelecidas na Estrutura e Apresentação do Manual de Dissertações e Teses da UFSM – MDT (2015). Os dados do presente estudo estão apresentados no formato de artigos científicos e capítulo de livro, sendo a tese composta por um artigo científico (Revista *Food Research International*, Qualis CAPES A1) e um capítulo de livro (e-Book *Avanços e Desafios da Nutrição IV*) publicados; e dois manuscritos, um de revisão bibliográfica, que será submetido a Revista *Ciência Rural* e o outro de caráter científico, com resultados da pesquisa, que será submetido a Revista *Food Research International*. Por fim, encontram-se os itens **DISCUSSÃO**, onde será apresentando uma compilação de interpretações e comentários a respeito dos resultados abordados nos artigos e manuscritos, e **CONCLUSÃO**. As **REFERÊNCIAS** dizem respeito às citações encontradas nos itens **INTRODUÇÃO**, **REFERENCIAL TEÓRICO** e **DISCUSSÃO** dessa tese.



## 1 INTRODUÇÃO

O mercado global de bebidas está em crescente ascensão. Desde 1996 teve um aumento de 31% em termos de vendas (BARUKČIĆ; JAKOPOVIĆ; BOŽANIĆ, 2019). Nesse sentido, o consumo de sucos de frutas e néctares correspondeu a 36,2 bilhões de litros em 2017 (ASSOCIAÇÃO EUROPEIA DE SUCOS DE FRUTA, 2018). No Brasil, sucos de frutas e néctares são um importante segmento no mercado de bebidas, crescendo aproximadamente 9% ao ano (SANTOS et al., 2018).

Além de grande importância no mercado, as frutas estão entre os alimentos mais importantes, pois além de fornecerem nutrientes, desempenham um papel vital na manutenção da saúde. Assim, sucos de fruta são matrizes promissoras por serem saudáveis, possuindo quantidades adequadas de açúcares, vitaminas e minerais e, nesse sentido, são adequados aos probióticos, pois essas características podem melhorar a viabilidade probiótica durante o armazenamento (LEBAKA et al., 2018).

Além disso, é válido destacar a crescente busca dos consumidores por alimentos funcionais. O conceito de alimentos funcionais está relacionado aos alimentos que além de fornecerem a nutrição básica, oferecem bem-estar físico e mental, contribuindo na prevenção e redução de fatores de risco responsáveis por diversas doenças ou no melhoramento de certas funções fisiológicas (SYNGAI et al., 2015). Por isso, devido aos probióticos proporcionarem benefícios à saúde além da função nutricional tradicional, podem ser considerados alimentos funcionais (LIN, 2003). Assim, a adição dos probióticos em sucos de frutas também contribui para ampliar a gama de alimentos funcionais disponíveis no mercado.

Segundo Lebaka et al. (2018) os sucos de fruta são promissores à adição dos probióticos, pois são, em parte, constituídos por proteínas e fibras alimentares que favorecem a sobrevivência dos probióticos durante o período de armazenamento dos sucos. Outro ponto favorável é que durante a passagem pelo trato gastrointestinal, o tempo de permanência dos sucos de fruta no estômago é relativamente curto e não haveria exposição das bactérias às condições ácidas desfavoráveis do estômago. Contudo, apesar desses pontos favoráveis, há o conhecimento que o pH, quantidade de ácidos orgânicos, fibra alimentar, fenólicos, oxigênio e quantidade insuficiente de aminoácidos e peptídeos livres, são os principais fatores presentes nos sucos de fruta que afetam a sobrevivência dos probióticos. Dessa forma, a adição direta dos probióticos resulta em perdas na viabilidade (KALITA et al., 2018) e

tornando inviável o desenvolvimento de sucos de fruta com o apelo probiótico. Assim sendo, a microencapsulação é uma alternativa promissora nesse sentido.

O processo de microencapsulação consiste em reter uma substância (agente ativo) em um material transportador (material de parede) (DEVI et al., 2016). Além de proteger os probióticos das condições adversas presentes no suco de fruta, a microencapsulação permite que o probiótico permaneça viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal e que chegue no local de ação (cólon) em quantidades adequadas (ERATTE et al., 2018).

A técnica mais antiga de microencapsulação é a coacervação complexa. Esta técnica consiste na separação de fases entre biopolímeros carregados com cargas opostas através da interação eletrostática. Os coacervados geralmente são produzidos a partir de proteínas e polissacarídeos, assim, podem ter uma ampla gama de funcionalidades em vários produtos (EGHBAL; CHOUDHARY, 2018). Nas últimas décadas, tem sido bastante utilizada para a proteção de bactérias probióticas (LAN et al., 2020; SILVA et al., 2019; MARQUES DA SILVA et al., 2018; WITZLER et al., 2017; ERATTE et al., 2016; ERATTE et al., 2015).

Apesar da coacervação complexa ser uma técnica amplamente utilizada, as microcápsulas obtidas por coacervação complexa são também conhecidas por serem frágeis sob certas condições. Sendo assim, alguns compostos têm sido utilizados com o intuito de se obter estruturas mais resistentes. Entre estes compostos, está a transglutaminase (COMUNIAN et al., 2016).

A transglutaminase é uma enzima que catalisa reações de reticulação entre lisina e glutamina, aumentando a estabilidade das microcápsulas por reforçar a estrutura interna das mesmas (MURPHY; FARKAS; JONES, 2017). A transglutaminase promove alterações significativas como melhoramento da textura, estabilidade, gelificação, potencial de emulsificação e capacidade de ligação à água, sem alteração negativa na qualidade sensorial e nutricional (GHARIBZAHEDI et al., 2017). Além disso, em estudos com probióticos, a transglutaminase demonstrou não ter influência negativa no crescimento das células bacterianas (PAVUNC et al., 2011), além de aumentar a resistência de microcápsulas probióticas expostas ao suco gástrico e propiciar maior liberação em suco intestinal (YEW et al., 2011).

Adicionalmente, até o momento, as referências relacionando a técnica de coacervação complexa, probióticos, reticulação enzimática com transglutaminase e aplicação em sucos de fruta inexistem, sendo este estudo inovador e pioneiro, nesse sentido. Além disso, o desenvolvimento desse produto contribui para aumentar o consumo de probióticos na

alimentação, uma vez que o suco de fruta é frequentemente consumido, mas lembrando que não deve ser consumido indiscriminadamente. Diante do exposto, ressalta-se a importância do presente trabalho no sentido de melhorar as microcápsulas obtidas por coacervação complexa, para que se possa com isso, aumentar a viabilidade dos probióticos e, além disso, o desenvolvimento de um produto funcional de alto consumo.



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e avaliar microcápsulas contendo *L. acidophilus* obtidas por coacervação complexa, seguida de reticulação por transglutaminase e analisar sua aplicação em diferentes sucos de fruta.

### 2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Desenvolver microcápsulas contendo *L. acidophilus*, por coacervação complexa;
- Reticular as microcápsulas produzidas com duas concentrações diferentes de transglutaminase e avaliar o efeito da concentração nas microcápsulas;
- Avaliar o tamanho médio e morfologia das microcápsulas não reticuladas e reticuladas;
- Avaliar as microcápsulas reticuladas após serem submetidas ao método de secagem por liofilização para obtenção de microcápsulas secas;
- Avaliar a resistência das microcápsulas reticuladas úmidas e liofilizadas em condições que simulam o ambiente gástrico e intestinal, frente ao tratamento térmico e em diferentes temperaturas de armazenamento;
- Adicionar as microcápsulas produzidas em diferentes concentrações em suco de laranja e suco de maçã;
- Avaliar o efeito das concentrações de microcápsulas nos sucos de fruta;
- Avaliar a viabilidade durante armazenamento das microcápsulas quando aplicadas nos sucos de fruta;
- Avaliar os sucos de fruta adicionados das microcápsulas quanto às características de pH e sólidos solúveis totais.



### 3 REFERENCIAL TEÓRICO

#### 3.1 PROBIÓTICOS COMO ALIMENTOS FUNCIONAIS

Alimentos capazes de auxiliar na manutenção da saúde, na cura ou redução de doenças, bem como contribuir com a nutrição básica, são denominados alimentos funcionais. Esses alimentos têm despertado cada vez mais o interesse dos consumidores que buscam dietas que promovam a saúde e previnam doenças, impulsionando o mercado e conduzindo ao estudo e desenvolvimento dos alimentos funcionais (ANVISA, 1999; PRADO et al., 2008; SYNGAI et al., 2015). De acordo com Prado et al. (2008), o conceito de alimentos funcionais está mais voltado a aditivos alimentares que contribuem positivamente na composição da microbiota intestinal, como os probióticos.

Dessa forma, devido à crescente conscientização por parte dos consumidores sobre a importância da microbiota intestinal para a saúde, o consumo de probióticos aumentou consideravelmente, nas últimas décadas (CHEN et al., 2017). De acordo com analistas de mercado, estima-se que o mercado global dos probióticos exceda três bilhões de dólares em 2024 (LERNER; SHOENFELD; MATTHIAS, 2019). Atualmente, os probióticos são administrados em produtos alimentícios ou suplementos, sendo encontrados, principalmente, em alimentos como leite, queijo, iogurtes e cereais (RAHMANI, 2019).

Apesar desse aumento no consumo nos dias atuais, existem relatos que os probióticos eram utilizados, sem conhecimento algum, há 10.000 anos e que seu consumo foi disseminado através de leites fermentados nos séculos anteriores, principalmente na Europa, onde os probióticos eram relacionados à longevidade e a vida saudável (LERNER; SHOENFELD; MATTHIAS, 2019). Foi nesse período, há mais de um século, quando o cientista russo Elie Metchnikoff supôs também que a longevidade tinha relação com os efeitos benéficos fornecidos pelas bactérias ácido lácticas (LAB), tornando os probióticos conhecidos mundialmente (WGO, 2017).

Os probióticos são definidos oficialmente pela Organização Mundial de Gastroenterologia (WGO) como “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (WGO, 2017). Entretanto, para que estes benefícios sejam conferidos, é recomendável consumir diariamente um produto probiótico que contenha  $10^8 - 10^9$  UFC  $g^{-1}$ , conforme a legislação preconiza, ou o alimento deve conter pelo menos  $10^6 - 10^7$  UFC  $g^{-1}$  por dose, porém valores menores são aceitos desde que sua eficiência seja comprovada (BRASIL, 2008; WGO, 2017). Além disso,

outros aspectos devem ser considerados: os probióticos devem permanecer viáveis na produção em grande escala, permanecer estáveis e viáveis durante o armazenamento e no momento do consumo e sobreviver no trato gastrointestinal (PRADO et al., 2008).

Além da recomendação diária, para que os benefícios ocorram, os probióticos atuam no organismo por diferentes mecanismos, os quais justificam sua importância. A partir de relatos na literatura podemos encontrar, com mais relevância, o auxílio na regulação da composição da microbiota intestinal, a inibição do crescimento de patógenos e a estimulação do sistema imune (WGO, 2017). Como resultado benéfico destes mecanismos, observa-se a redução do colesterol sérico (WANG et al., 2018), o alívio da intolerância a lactose (ARIFIN; BOEDIARSO; TAMBUNAN, 2016), o melhoramento da imunidade (ISOLAURI et al., 1993), bem como resultados positivos no tratamento e prevenção da diarreia aguda (SAAVEDRA et al., 1995), na redução de efeitos colaterais do tratamento para *H. pylori* (KIM et al., 2008) e no tratamento da doença de Crohn (MALIN et al., 1996), entre outras.

Entre os probióticos mais comumente utilizados, encontram-se cepas de bactérias e leveduras, como *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Saccharomyces*, *Bifidobacterium*, *Bacillus* e *Enterococcus*, entre outros (Tabela 1) (RAHMANI, 2019). Segundo a legislação, os gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, participantes da microbiota intestinal humana, são detentores das principais espécies probióticas (BRASIL, 2008). Por ser objetivo do presente estudo, o gênero *Lactobacillus* será detalhado.

Tabela 1 – Microrganismos probióticos

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	Espécies de <i>Bifidobacterium</i>	Outras
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	<i>Bifidobacterium adolescentes</i>	<i>Bacillus cereus</i>
<i>Lactobacillus amylovorus</i>	<i>Bifidobacterium animalis</i>	<i>Clostridium botyricum</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Bifidobacterium breve</i>	<i>Enterococcus faecalis</i>
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	<i>Enterococcus faecium</i>
<i>Lactobacillus casei sp. Rhamnosus</i>	<i>Bifidobacterium infantis</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>Lactobacillus crispatus</i>	<i>Bifidobacterium lactis</i>	<i>Lactococcus lactis sp. cremoriss</i>
<i>Lactobacillus delbrueckii sp. Bulgaricus</i>	<i>Bifidobacterium longum</i>	<i>Lactococcus lactis sp. lactis</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>		<i>Leuconostoc mesenteroides sp. dextranicum</i>
<i>Lactobacillus gasseri</i>		<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>Lactobacillus helveticus</i>		<i>Propionibacterium freudenreichii</i>
<i>Lactobacillus johnsonii</i>		<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>Lactobacillus lactis</i>		<i>Streptococcus salivarius sp. thermophilus</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>		
<i>Lactobacillus plantarum</i>		
<i>Lactobacillus reuteri</i>		

Fonte: Prado et al. (2008)

### 3.1.1 O gênero *Lactobacillus*

O gênero *Lactobacillus* compete a um grande grupo de bactérias gram-positivas, em forma de bastonete, anaeróbias facultativas, não formadoras de esporo, tolerantes a ácidos e catalase-negativas. Esse gênero é formado por mais de 200 espécies, sendo *L. acidophilus*, *L. salivarius*, *L. casei*, *L. brevis*, *L. fermentum* e *L. plantarum* (Figura 1) as principais espécies encontradas no trato gastrointestinal humano. Além disso, é o gênero mais estudado como potencial terapêutico para a saúde humana (NAABER; MIKELSAAR, 2004; MARTÍN et al., 2019; PRADHAN; MALLAPPA; GROVER, 2020).

Figura 1 – Microscopia eletrônica de varredura de cepas de *Lactobacillus plantarum*



Fonte: Arasu et al. (2016)

As cepas de *Lactobacillus* vêm sendo utilizadas na prevenção e tratamento de diversas doenças (PRADO et al. 2008) como a diarreia causada por bactérias patogênicas e vírus (ROSENFELDT et al., 2002), infecções e complicações por *H. pylori* (CHEN et al., 2019), doenças inflamatórias e síndromes intestinais (O'MAHONY et al., 2005), câncer no trato gastrointestinal (RUSSO et al., 2007), sintomas alérgicos (SHIDA et al., 2002), doença cardiovascular (NARUSZEWICZ et al., 2002) e infecções do trato urinário (GRIN et al., 2013).

De acordo com Stürmer et al. (2012) os *Lactobacillus acidophilus* habitam o trato gastrointestinal de humanos e animais, contribuindo para o equilíbrio da microbiota intestinal, pois protegem o trato gastrointestinal frente o acesso e a proliferação de microrganismos

patogênicos. Segundo Saad (2006) e Stümer et al. (2012) entre seus efeitos benéficos destacam-se a capacidade de produzir a enzima lactase e hidrolisar as moléculas de lactose presentes nos lácteos, em carboidratos mais simples, sendo facilmente digeridos e beneficiando os consumidores que apresentam intolerância à lactose; atuam positivamente no controle da diarreia e podem reduzir de forma significativa a sua duração em lactentes e crianças, além de reduzir inflamações do trato gastrointestinal em adultos.

### 3.2 A COACERVAÇÃO COMPLEXA NA MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

De acordo com Bao et al. (2019) a baixa biodisponibilidade *in vivo* dos compostos bioativos é ocasionada pela baixa taxa de absorção dos mesmos, pois antes de serem absorvidos pelo corpo humano, necessitam passar por barreiras gastrointestinais, como o ambiente hostil presente neste local, bem como a camada de muco presente na superfície do trato gastrointestinal, além de sua instabilidade ser afetada por fatores ambientais como ácidos, luz, calor, oxigênio, entre outros. Diante do exposto, a microencapsulação dos compostos bioativos surge como uma alternativa.

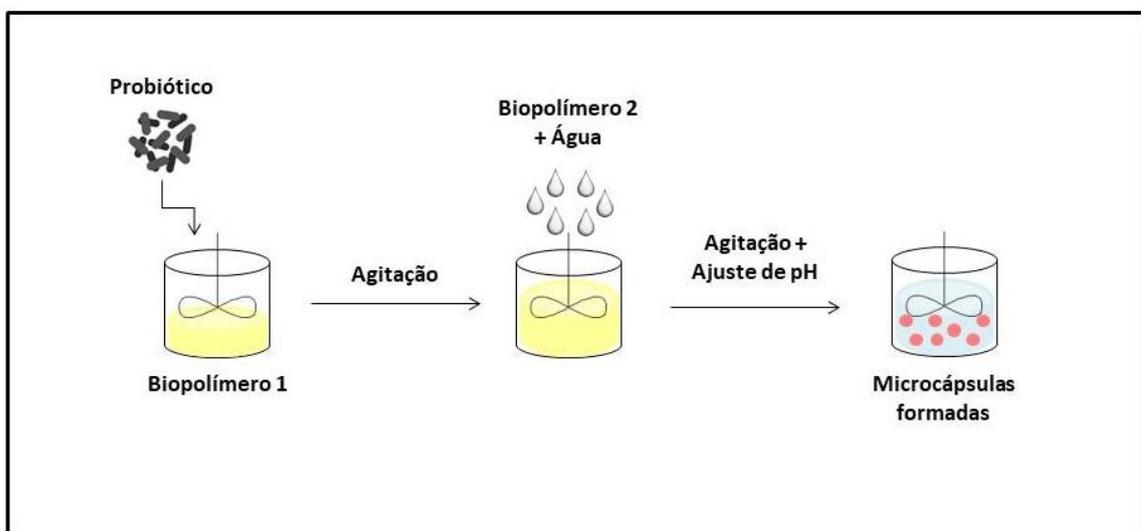
A coacervação complexa é definida como o processo de microencapsulação no qual interações iônicas ocorrem entre dois ou mais polímeros carregados com cargas opostas, sendo normalmente proteínas e polissacarídeos, levando a formação do coacervado e a separação de fases (TIMILSENA et al., 2019).

Nesse sentido, a formação da coacervação complexa é influenciada por parâmetros importantes como a proporção de proteína para polissacarídeo, pH, força iônica (concentração de sal), a concentração total de polímeros e o peso molecular entre a proteína e o polissacarídeo. Alguns outros parâmetros como a densidade das cargas, a agitação, a pressão ou a temperatura também tem demonstrado influenciar na formação dos coacervados (DEVI et al., 2016).

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. Ademais, as proteínas utilizadas frequentemente são gelatina, albumina, proteína de soro de leite, betalactoglobulina, várias proteínas vegetais e proteínas do leite. Os polissacarídeos mais comumente utilizados são goma arábica, quitosana, pectinas, alginatos, goma xantana, carragenas e carboximetilcelulose (DEVI et al., 2016).

Segundo Timilsena et al. (2019) a coacervação complexa é altamente promissora e amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e têxtil, sendo a técnica tradicional mais comum para o preparo de microcápsulas (BAO et al., 2019). Assim, essa técnica tem sido bastante utilizada para a encapsulação de probióticas, sendo extensivamente explorada e considerada promissora (DA SILVA et al., 2019). Na Figura 2 está representada a técnica de coacervação complexa para a microencapsulação de probióticos. Já a Tabela 2 resume estudos da coacervação complexa para a encapsulação de bactérias probióticas.

Figura 2 – A técnica de coacervação complexa aplicada à microencapsulação de probióticos



Fonte: Próprio autor

A técnica de coacervação complexa apresenta inúmeras vantagens quando comparada a outras técnicas como versatilidade, eficiente controle no tamanho da partícula com o controle da agitação, possibilidade de se trabalhar com biopolímeros, com ausência de solventes orgânicos e condições brandas de temperatura no processamento (ASSIS et al., 2012; MENEZES et al., 2013; JAMEKHORSHID; SADRAMELI; FARID, 2014), por isso, é apropriada para a microencapsulação de compostos sensíveis, como os probióticos.

Tabela 2 – Utilização da coacervação complexa na encapsulação de bactérias probióticas

Bactéria probiótica	Efeito da encapsulação por coacervação complexa	Autor
<i>Bifidobacterium lactis e Lactobacillus acidophilus</i>	Preservação da viabilidade durante secagem, sob condições gastrointestinais simuladas e aumento da viabilidade durante armazenamento sob refrigeração	Oliveira et al. (2007)
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Preservação da viabilidade durante condições gastrointestinais simuladas	Gerez et al. (2012)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Não conferiu proteção adicional durante condições gastrointestinais simuladas	Gebara et al. (2013)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Preservação da viabilidade durante armazenamento sob refrigeração, mas não protegeu durante condições gastrointestinais simuladas	Shoji et al. (2013)
<i>Lactobacillus plantarum</i>	Aumento da viabilidade durante condições gastrointestinais simuladas	Hernández-Rodríguez, Lobato-Calleros, Pimentel-González, Vernon-Carter (2014)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Preservação da viabilidade no armazenamento sob refrigeração durante 35 dias	Ribeiro et al. (2014)
<i>Lactobacillus casei</i>	Aumento da viabilidade na secagem por liofilização	Eratte et al. (2015)
<i>Enterococcus faecium</i>	Preservação da viabilidade durante armazenamento em temperatura ambiente	Witzler et al. (2017)
<i>Bifidobacterium. lactis</i>	Preservação da viabilidade durante armazenamento em temperatura de congelamento, refrigeração e ambiente	Marques da Silva et al. (2018)
<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Aumento da viabilidade durante armazenamento em temperatura de congelamento, refrigeração e ambiente	Silva et al. (2019)

Fonte: Adaptado de Eratte et al. (2018).

### 3.3 POR QUE RETICULAR MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA?

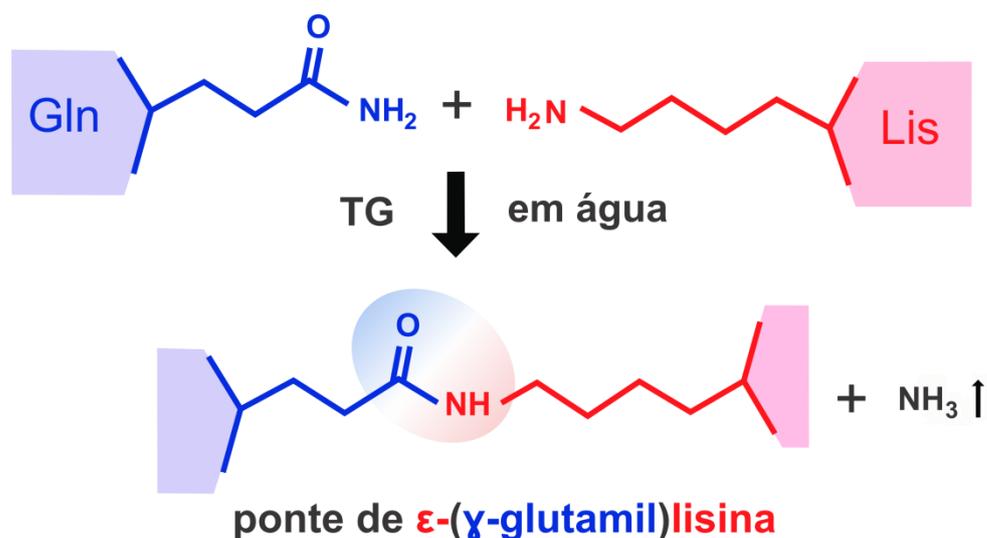
Segundo Bao et al. (2019) os coacervados apresentam certa fragilidade sob determinadas condições e podem se dissociar, como na exposição à concentração de sal de 150 mM, ocorrendo a dissociação desses coacervados pela separação de cargas dos polímeros. Essa instabilidade encontrada nas cargas dos polímeros pode ser melhorada pelo processo de reticulação.

Assim, o processo de reticulação consiste em estabilizar as estruturas formadas pela coacervação complexa, alterando as propriedades de barreira das paredes das microcápsulas e, dessa forma, auxiliando no controle da liberação do ativo encapsulado (PRATA, 2006; WEISS et al., 2019). Além disso, a reticulação pode ser realizada por via química ou enzimática, uma alternativa mais adequada para utilização em alimentos (PRATA, 2006). No presente trabalho, daremos mais atenção à reticulação enzimática por ser o foco do estudo.

A transglutaminase tem sido utilizada como um reticulador enzimático. Desde 1998, esta enzima foi aprovada pelo FDA como “GRAS” (GHARIBZAHEDI; CHRONAKIS, 2018). É uma enzima capaz de promover a reticulação entre proteínas pela catálise das reações de acil-transferência entre grupos carboxiamida (acil doadores) de resíduos de glutamina e os grupos amino de lisinas (acil receptores), resultando na formação de ligações cruzadas de  $\epsilon$ -( $\gamma$ -glutamil)-lisina (Figura 3). As ligações de isopeptídeos resultantes contribuem para a formação de uma rede de proteína estável através de ligações cruzadas intermoleculares e intramoleculares (DJOULLAH et al., 2016).

As reações de reticulação induzidas pela transglutaminase proporcionam alterações significativas nas moléculas de proteína, melhorando a textura, estabilidade, potencial de emulsão e capacidade de ligação com a água, sem qualquer alteração negativa na qualidade sensorial ou nutricional, pelo contrário, pode melhorar o valor nutritivo por aumentar a bioacessibilidade e biodisponibilidade de aminoácidos essenciais (GHARIBZAHEDI et al., 2017).

Figura 3 – Mecanismo de reação da transglutaminase



Fonte: El-Hofi et al. (2014)

Na última década, a reticulação com transglutaminase tem sido amplamente utilizada. Yüksel-Bilsel; Şahin-Yeşilçubuk (2019) utilizaram a transglutaminase para produzir microcápsulas contendo lipídios estruturados por coacervação complexa e posterior adição em kefir. No entanto, foi observado que a reticulação não influenciou de forma significativa em relação às microcápsulas sem reticulação quanto à estabilidade oxidativa. Chang et al. (2016) utilizaram a reticulação com transglutaminase para otimizar a coacervação complexa entre isolado de proteína de canola (CPI) e quitosana (CS). Foi observado que o processo de reticulação melhorou a estabilidade térmica do complexo CPI-CS. Dong et al. (2008) reticularam com transglutaminase microcápsulas de óleo de hortelã-pimenta obtidas por coacervação complexa com o objetivo de verificar se a transglutaminase seria tão eficiente quanto o formaldeído ou glutaraldeído. Foi observado que a transglutaminase apresentou eficácia de reticulação semelhante ao formaldeído.

Em relação à reticulação com transglutaminase associada aos probióticos, Nawong et al. (2016) reticularam microesferas de gelatina e maltodextrina contendo diferentes espécies de *Lactobacillus* com transglutaminase no intuito de proteger as bactérias probióticas durante a exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal. Foi observado que as microesferas reticuladas foram eficientes na proteção das bactérias probióticas, pois melhorou a sua sobrevivência durante a fase gástrica.

Diante do exposto, é notável que a reticulação com transglutaminase é promissora para o melhoramento das microcápsulas obtidas por coacervação complexa e, por isso, é utilizada como foco de estudo, em um primeiro momento, do presente trabalho.

### 3.4 SUCO DE FRUTA ADICIONADO DE PROBIÓTICOS

A elaboração de bebidas à base de frutas, como o suco, está relacionada, principalmente, em função da facilidade de consumo e conservação, além do processamento das frutas permitir o consumo de frutas que não seriam consumidas in natura, por motivos de impossibilidade geográfica ou climática, entressafra, etc (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011). Além disso, há um tempo, o suco de fruta tem ganhado o interesse dos consumidores, pois é consideravelmente saudável e frequentemente consumido pela população mundial, inclusive diariamente (ANTUNES et al., 2013).

De acordo com a legislação, entende-se por suco de fruta a bebida não fermentada, não concentrada e não diluída, obtida da fruta madura e sã, ou parte do vegetal de origem, por processamento tecnológico adequado, submetida a tratamento que assegure sua apresentação e conservação até o momento do consumo (BRASIL, 2009). Além disso, o suco de fruta é rico em nutrientes e não contém culturas *starter* que competem com os probióticos por nutrientes, sendo considerado um alimento probiótico muito promissor (KALITA et al., 2018).

Nos dias atuais, os produtos probióticos disponíveis no mercado são derivados lácteos. Assim, há uma crescente busca por produtos probióticos não lácteos, pois estes surgem como uma alternativa para consumidores que não consomem esse tipo de produto, como aqueles que apresentam hipercolesterolemia, intolerância à lactose, alergia à proteína do leite e aqueles que são estritamente vegetarianos, além de razões econômicas e culturais (SAAD, CRUZ; FARIA, 2011; ANTUNES et al., 2013; LU; PUTRA; LIU, 2018; KALITA et al., 2018).

Existem diversas vantagens para o desenvolvimento de bebidas de origem vegetal probióticas como serem saudáveis e originalmente isentas de colesterol, alternativa de consumo dos probióticos para pessoas que não consomem os tradicionais probióticos lácteos ou possuem alergia ao leite e/ou intolerância à lactose, alta quantidade de açúcares que podem fornecer substrato energético para os probióticos e presença de substâncias antioxidantes, que levam à redução do potencial redox do alimento, sendo positivo para *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, os quais são, majoritariamente, microaerófilos e anaeróbios, respectivamente. Além disso, em relação ao suco de fruta, atualmente, há um consenso sobre o consumo de produtos vegetais para uma alimentação saudável, assim, o desenvolvimento de uma bebida de origem vegetal contendo probióticos viria ao encontro disso (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011).

Nesse sentido, é válido ressaltar que, de acordo com Segun et al. (2019); Fernandes Pereira; Rodrigues (2018); Costa et al. (2017); Gandomi et al. (2016) o suco de laranja e o suco de maçã são substratos adequados para a produção de um suco de fruta probiótico.

Entretanto, na fabricação de um alimento, é necessário considerar o efeito das operações de processamento no produto final. Ademais, a funcionalidade dos compostos bioativos pode ser afetada pela matriz alimentícia. Em relação ao suco de fruta probiótico, pode haver perdas na viabilidade e funcionalidade devido ao ambiente ácido, alta concentração de oxigênio e quantidades insuficientes de aminoácidos e peptídeos livres. Provavelmente, este seja o fator mais limitante para desenvolvimento de bebidas derivadas de frutas com características probióticas. Outros fatores limitantes podem ser a descaracterização demasiada da bebida pela produção de ácidos orgânicos pelos probióticos e a produção de *off-flavour*, sendo essa produção mais pronunciada em produtos não lácteos (SAAD; CRUZ; FARIA, 2011; BETORET et al., 2017; KALITA et al., 2018). Sendo assim, há um grande desafio na adição de culturas probióticas em ambientes não lácteos (PRADO et al., 2008).

Diante do exposto, a microencapsulação dos probióticos para adição em suco de frutas é justificada e altamente promissora. A microencapsulação oferece uma barreira física às condições adversas do suco e as microcápsulas podem fornecer um ambiente anaeróbico mais favorável para os probióticos (ANTUNES et al., 2013). Além disso, pode ter potencial para proteção dos probióticos frente à pasteurização geralmente utilizada no processamento de sucos.

Haffner; Pasc (2018) encapsularam *L. rhamnosus* por atomização por *electrospraying* e adicionaram as microcápsulas ao suco de maçã. Observaram que houve perda de menos de 1 log na contagem de células viáveis após 3 horas de exposição ao suco de maçã. Além disso, a partir deste estudo, estes autores observaram que o suco de fruta amplia o desafio de se adicionar probióticos ao suco de fruta devido a sua acidez. Contudo, afirmam que a microencapsulação tem potencial para aumentar a capacidade de sobrevivência das células durante o armazenamento em matrizes de bebidas.

Ying et al. (2013) estão em acordo com os autores anteriormente citados, afirmando que é um desafio manter os probióticos viáveis em pH baixo. Todavia observaram em seu estudo que *L. rhamnosus* microencapsulado por spray drying foi capaz de sobreviver por 5 semanas a uma taxa de  $10 \log \text{ UFC g}^{-1}$  em suco de maçã armazenado a 25°C. Similarmente, Doherty et al. (2012) afirmam que a microencapsulação proporciona uma matriz capaz de suportar as condições drásticas encontradas durante o armazenamento do suco de fruta. Em seu estudo, estes autores observaram que foi possível manter as células de *L. rhamnosus*

viáveis por 28 dias em suco de cranberry a partir de microcápsulas de WPI formadas por extrusão e revestidas com pectina.

Em relação à técnica de coacervação complexa para a encapsulação de compostos bioativos e posterior aplicação em suco de fruta, encontramos na literatura, até o presente momento, apenas um estudo, nesse sentido. Habibi et al. (2016) encapsularam óleo de peixe em gelatina/goma arábica por coacervação complexa para aplicação em suco de romã. Foi observado nesse estudo que as microcápsulas protegeram o óleo de peixe, houve uma alta eficiência de encapsulação e a aceitabilidade sensorial foi razoável.

Dessa forma, o presente trabalho vem ao encontro da busca por inovações na área de tecnologia em alimentos, visto que investigações em torno de um suco de fruta com características probióticas a partir da adição de microcápsulas formadas pela técnica de coacervação complexa, ainda não foram relatadas na literatura atual, ressaltando sua importância. Ademais, o processo de reticulação com transglutaminase soma-se a isso, tornando o presente trabalho ainda mais relevante e inovador.



**4 MANUSCRITO 1 – RETICULAÇÃO COMO ESTRATÉGIA DE MELHORAMENTO PARA MICROCÁPSULAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA**

Manuscrito formatado de acordo com as normas para submissão da revista Ciência Rural.



## 1 RESUMO

2

3 Esse artigo de revisão tem por objetivo demonstrar a importância do processo de reticulação e  
4 esclarecer o uso da reticulação associada à coacervação complexa nas diferentes áreas de  
5 aplicação, bem como os principais agentes de reticulação utilizados. A coacervação complexa  
6 é a técnica mais antiga de encapsulação e, atualmente, é a técnica mais utilizada para  
7 compostos sensíveis ao calor. É conhecida como um fenômeno de separação de fases entre  
8 polímeros com cargas opostas, que através de interações eletrostáticas se agregam, levando à  
9 separação de fases e a formação dos coacervados. Contudo, esses coacervados apresentam  
10 fragilidade em determinadas condições. Assim, o processo de reticulação surge como uma  
11 estratégia para melhorar a estabilidade dos coacervados e vem sendo amplamente associado à  
12 coacervação complexa. Muitos agentes de reticulação vêm sendo utilizados com essa  
13 finalidade, como os aldeídos, genipina, taninos, transglutaminase, tripolifosfato de sódio,  
14 entre outros. Assim, a reticulação melhora significativamente os coacervados, permitindo sua  
15 aplicação nas mais diversas áreas e produtos.

16

## 17 INTRODUÇÃO

18

19 A aplicação de compostos sensíveis torna-se dificultosa para a indústria devido a sua  
20 baixa solubilidade, baixa estabilidade e biodisponibilidade limitada. A fácil degradação por  
21 condições ambientais (pH, calor, luz, oxigênio, etc) do processamento e do armazenamento,  
22 são as principais causas da baixa bioacessibilidade e biodisponibilidade dos ingredientes  
23 bioativos (BAO et al., 2019; CORRÊA-FILHO, MOLDÃO-MARTINS, ALVES, 2019).

24 Nesse sentido, é de extrema relevância desenvolver uma estratégia no intuito de  
25 superar esses obstáculos. A encapsulação é um processo que consiste no revestimento dos

26 compostos sensíveis por um material, formando partículas ou cápsulas (Shishir et al., 2018).  
27 Assim, são capazes de melhorar a solubilidade, a estabilidade, proteger frente à oxidação,  
28 inibir a degradação, preservar a qualidade e, para compostos bioativos alimentícios, aumentar  
29 a absorção no trato gastrointestinal (BAO et al., 2019).

30 SING (2017) define a coacervação complexa como um fenômeno no qual ao se  
31 misturar dois polímeros com cargas opostas em uma fase aquosa, ocorrerá a separação de  
32 fases e a formação dos coacervados. Assim, é considerada uma técnica simples e uma das  
33 mais aplicadas (SHISHIR et al., 2018).

34 Atualmente, a coacervação complexa é um dos sistemas de fornecimento de  
35 compostos sensíveis mais amplamente utilizados, no intuito de melhorar a solubilidade,  
36 estabilidade e biodisponibilidade desses compostos (BAO et al., 2019). Nesse sentido, vem  
37 sendo aplicada para ingredientes alimentícios, fármacos, agricultura, têxteis e eletrônicos  
38 (TIMILSENA et al., 2019).

39 A coacervação complexa forma microcápsulas pela associação de moléculas através  
40 da auto-organização dessas moléculas. Essas moléculas auto-organizadas podem ser afetadas  
41 pelo pH, temperatura, concentração e força iônica, trazendo fragilidade às microcápsulas  
42 formadas. Dessa forma, a coacervação complexa requer tratamentos adicionais (SHISHIR et  
43 al., 2018). Nesse sentido, a reticulação é utilizada em associação à coacervação complexa para  
44 a estabilização das microcápsulas formadas (WEISS et al., 2019). Assim, no processo de  
45 reticulação, agentes reticuladores são utilizados com o intuito de se obter coacervados estáveis  
46 por meio do melhoramento de suas propriedades termomecânicas e de  
47 permeabilidade/liberação das paredes das microcápsulas (ALVIM & GROSSO, 2010;  
48 TIMILSENA et al., 2019).

49 Muitas revisões já foram publicadas sobre a utilização da coacervação complexa para  
50 a proteção e fornecimento de compostos sensíveis, entretanto, a reticulação associada a essa

51 técnica é um assunto emergente e poucas publicações, principalmente revisões, são  
52 encontradas, o que torna o presente estudo extremamente importante. Nesse sentido, o  
53 objetivo da nossa revisão é abordar informações relevantes em torno do processo de  
54 reticulação, bem como esclarecer o uso do mesmo associado à coacervação complexa nas  
55 diferentes áreas de aplicação. Nessa revisão, aspectos relevantes a técnica, fatores envolvidos  
56 no controle do processo, agentes de reticulação e suas finalidades, bem como a aplicação dos  
57 coacervados e coacervados reticulados foram resumidos e discutidos.

58

## 59 A COACERVAÇÃO COMPLEXA

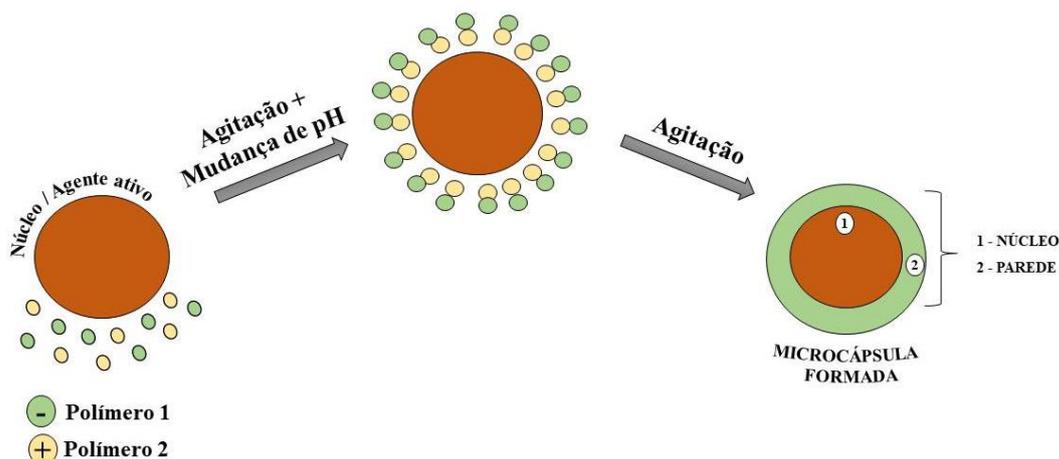
60

61 A técnica de coacervação é a técnica mais antiga de encapsulação. De acordo com  
62 EGHBAL & CHOUDHARY (2018) o processo de coacervação foi discutido pela primeira  
63 vez por Tiebackx em 1911. No entanto, Bungenberg de Jong e Kruyt foram os primeiros a  
64 investigar o processo de coacervação complexa, em 1929, utilizando gelatina e goma arábica.  
65 Porém, somente na década de 1950, ocorreu a primeira aplicação industrial pela National  
66 Cash Register Company que desenvolveu o “papel carbono sem carbono” utilizando a técnica  
67 de coacervação (CORRÊA-FILHO, MOLDÃO-MARTINS, ALVES, 2019). Em 1957,  
68 Overbeek e Voorn, desenvolveram o primeiro modelo teórico bem sucedido de coacervação  
69 complexa. Após 60 anos, essa teoria foi revisada por SING (2017) sendo a mais aceita,  
70 atualmente.

71 O processo de coacervação complexa é definido como um fenômeno de separação de  
72 fases líquido-líquido que ocorre entre dois polímeros de cargas opostas, normalmente uma  
73 proteína carregada positivamente e um polissacarídeo carregado negativamente, sendo este  
74 sistema de biopolímeros os principais e mais utilizados nas últimas décadas (DEVI et al.,  
75 2017; EGHBAL & CHOUDHARY, 2018). Esse fenômeno inicia a partir de interações

76 eletrostáticas que ocorrem entre as macromoléculas com cargas opostas. Os complexos  
 77 formados se agregam ainda mais para diminuir a energia livre do sistema, levando a separação  
 78 de fases e a formação dos coacervados (DEVI et al., 2017) (Figura 1).

79



80

81 Figura 1 – Processo esquematizado da técnica de coacervação complexa

82 Fonte: Adaptado de TIAN et al. (2019)

83

84 Existe também a coacervação simples, que se diferencia da coacervação complexa por  
 85 utilizar apenas um tipo de polímero e é realizada pela alteração de algum parâmetro como  
 86 adição de micro íons, mudança de temperatura ou pH (DEVI et al., 2017; OZKAN et al.,  
 87 2019). Além disso, dependendo do tamanho de cápsulas formadas, elas podem ser  
 88 classificadas em microcápsulas, quando seus tamanhos variam entre 1 a 1000  $\mu\text{m}$ , e  
 89 nanocápsulas, quando seus tamanhos apresentam menos de 0,2  $\mu\text{m}$  (DEVI et al., 2017).

90 Assim, como materiais de revestimento, as proteínas mais comumente utilizadas são  
 91 gelatina, albumina, proteína de soro de leite, beta-lactoglobulina, caseína e várias proteínas  
 92 vegetais. E entre os polissacarídeos mais utilizados estão goma arábica, quitosana, pectinas,  
 93 alginatos, goma xantana, carrageninas e carboximetil celulose (DEVI et al., 2017; BAO et al.,  
 94 2019).

95 Segundo TIMILSENA et al. (2019) a coacervação complexa é altamente promissora e  
96 amplamente utilizada nas indústrias farmacêutica, alimentícia, agrícola e têxtil no intuito de  
97 melhorar a solubilidade, estabilidade e biodisponibilidade das substâncias encapsuladas. BAO  
98 et al. (2019) a partir de estudos (MENDANHA et al., 2009; BOSNEA, MOSCHAKIS &  
99 BILIADERIS, 2017), afirma que a coacervação complexa possui potencial para o  
100 fornecimento de bioativos alimentícios sensíveis, como  $\beta$ -caroteno e probióticos, melhorando  
101 a estabilidade destas substâncias.

102 Atualmente, é a técnica tradicional mais comum para o preparo de microcápsulas e a  
103 mais adequada para a encapsulação de compostos sensíveis ao calor (EGHBAL &  
104 CHOUDHARY, 2018; BAO et al., 2019). Além disso, é caracterizada como uma técnica  
105 vantajosa, pois não requer altas temperaturas, oferece alta capacidade de carga de núcleo,  
106 resulta em alta eficiência de encapsulação e apresenta excelentes propriedades de liberação  
107 controlada (MARQUES DA SILVA et al., 2018; SILVA et al., 2019). No entanto, para se  
108 obter elevada eficiência de encapsulação, é crucial definir condições ideais no processamento  
109 da coacervação complexa (EGHBAL & CHOUDHARY, 2018; SHISHIR et al., 2018).

110

#### 111 FATORES IMPORTANTES RELACIONADOS À COACERVAÇÃO COMPLEXA

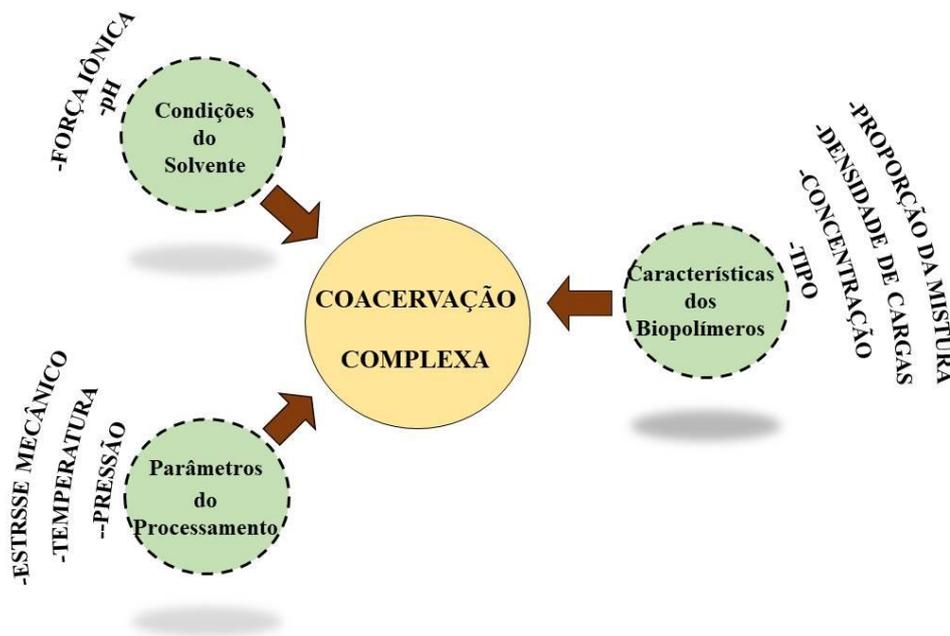
112

113 As interações que envolvem a coacervação complexa ocorrem devido a variações das  
114 propriedades do solvente e dos biopolímeros por meio de mudanças nas condições ambientais  
115 como pH, força iônica, temperatura e cisalhamento, causando interações eletrostáticas que  
116 induzem a formação dos coacervados (WEISS et al., 2019).

117 De acordo com WEISS et al. (2019) fatores como condições do solvente (pH, força  
118 iônica – concentração de sal), características dos biopolímeros (tipo, densidade de carga,  
119 proporção de mistura, concentração) e parâmetros do processamento (temperatura, estresses

120 mecânicos, pressão) influenciam diretamente na obtenção de complexos formados por  
 121 proteínas e polissacarídeos, gerando características morfológicas diferentes. Além desses  
 122 fatores, a flexibilidade e a agitação também exercem influência na formação da coacervação  
 123 complexa (DEVI et al., 2017) (Figura 2).

124



125

126 Figura 2 – Fatores que afetam a técnica de coacervação complexa

127 Fonte: Próprio autor

128

129 Por afetar diretamente a formação dos coacervados, os fatores envolvidos no processo  
 130 devem ser cuidadosamente controlados. Nesse sentido, fatores como pH e proporção de  
 131 biopolímeros têm maior importância, pois podem ser utilizados para o controle do processo de  
 132 coacervação complexa. É possível controlar esses fatores por meio de análises de densidade  
 133 de carga superficial (potencial zeta) e turbidez, para pH e proporção de biopolímeros,  
 134 respectivamente. O potencial zeta está relacionado às propriedades elétricas na superfície dos  
 135 biopolímeros, verificando a complexação e a estabilidade dos coacervados. Já por meio da  
 136 turbidez é possível verificar a interação eletrostática de todas as cargas positivas e negativas

137 dos biopolímeros e, dessa forma, verificar a complexação dos mesmos (EGHBAL &  
138 CHOUDHARY, 2018). Contudo, segundo EGBAL & CHOUDHARY (2018) ainda são  
139 necessárias maiores investigações para melhorar o entendimento dos parâmetros que afetam  
140 as propriedades reológicas dos coacervados.

141 Além disso, como a reticulação é utilizada para o melhoramento das propriedades dos  
142 coacervados, pode ser considerada um fator importante para o controle do processo de  
143 coacervação complexa, garantindo assim, a formação e a estabilidade dos coacervados.

144

#### 145 APLICAÇÕES DA COACERVAÇÃO COMPLEXA

146

147 Com relação à aplicação, os pontos mais atraentes do processo de coacervação  
148 complexa surgem da versatilidade para diferentes agentes ativos e materiais poliméricos e o  
149 ajuste de tamanho das cápsulas (micro ou nano) (DEVI et al., 2017).

150 Assim, estudos referentes à aplicação da coacervação complexa como um sistema de  
151 encapsulação, armazenamento e liberação controlada para diversos compostos têm sido  
152 amplamente relatados (ALVIM & GROSSO, 2010; OCAK, 2012; EGBAL &  
153 CHOUDHARY, 2018; MARQUES DA SILVA et al., 2018; ROY et al., 2018; SUMIGA et  
154 al., 2019).

155 Atualmente, a coacervação complexa vem sendo aplicada principalmente nas áreas de  
156 alimentos, produtos farmacêuticos, cosméticos e na agricultura, entre outras aplicações (DEVI  
157 et al., 2017). De acordo com PRATA et al. (2008) esta técnica vem sendo utilizada para  
158 produtos de consumo como papel de cópia sem carbono, tiras de perfume, amostras de  
159 fragrâncias e ingredientes de sabor, além fármacos lipofílicos. A seguir está detalhada a  
160 funcionalidade da coacervação complexa em cada área a que se aplica. Além disso, a Figura 3  
161 ilustra a aplicação da coacervação complexa nas diferentes áreas.

162 *Alimentos*

163 Na área de alimentos a coacervação complexa tem atraído grande atenção e tem sido  
164 utilizada para encapsulação, formação de filmes para embalagens e produção de emulsões e  
165 géis alimentícios e modificadores de viscosidade, além de estar despertando o interesse em  
166 aplicações para modificação de textura e cor, demonstrando atividades antimicrobianas e  
167 antioxidantes (SING, 2017; EGHBAL & CHOUDHARY, 2018). Além disso, em produtos  
168 alimentícios, podem ser projetados para suportar condições adversas durante o processamento  
169 e o armazenamento, e até mesmo a passagem pelo trato gastrointestinal humano de  
170 substâncias sensíveis (MOSCHAKIS & BILIADERIS, 2017). Assim, JAIN et al. (2006)  
171 utilizaram caseína e goma tragacanto para encapsular  $\beta$ -caroteno por coacervação complexa.  
172 Esses autores observaram que a encapsulação aumentou a estabilidade e demonstrou ser uma  
173 tecnologia eficiente para proteção e liberação controlada do  $\beta$ -caroteno. Em contrapartida,  
174 BOSNEA, MOSCHAKIS & BILIADERIS (2017) encapsularam *L. paracasei* subsp.  
175 *paracasei* em proteína de soro de leite - goma arábica por coacervação complexa e  
176 adicionaram as microcápsulas em iogurte. Foi observado pelos autores que a adição das  
177 microcápsulas não alterou a textura do iogurte as microcápsulas proporcionaram um meio  
178 eficaz para o fornecimento dos probióticos ao intestino.

179

180 *Produtos farmacêuticos*

181 Na área farmacêutica a coacervação complexa vem sendo utilizada para a  
182 encapsulação de medicamentos (BARACAT et al., 2012) e cosméticos (ALOYS et al., 2016).  
183 Esses estudos indicam que a coacervação complexa pode ser um potencial carreador,  
184 melhorando a estabilidade de compostos sensíveis. Dessa forma, MANCER, ALLEMANN &  
185 DAOUD (2018) utilizaram a coacervação complexa para encapsular cloridrato de metformina  
186 em isolado de proteína de soja e pectina. Foi observado pelos autores que a coacervação

187 complexa produziu microcápsulas com tamanho e distribuição adequados, alto rendimento e  
188 foi um método eficiente e inovador na encapsulação de cloridrato de metformina. Já XIAO et  
189 al. (2013) utilizaram a coacervação complexa para encapsular, em gelatina – goma arábica,  
190 óleo essencial de lavanda, amplamente utilizado em bálsamos, pomadas, perfumes,  
191 cosméticos, entre outros. Esses autores encontraram que a coacervação complexa foi  
192 adequada à encapsulação do óleo essencial de lavanda, apresentando rendimento de 65,8%,  
193 eficiência de encapsulação de 66,0% e tamanho médio de 101,2  $\mu\text{m}$ , além de apresentarem  
194 forma esférica, lisa e sem aglomerados.

195

#### 196 *Produtos agrícolas*

197 Na área agrícola a coacervação complexa tem sido utilizada a encapsulação de  
198 pesticidas (KONG et al., 2008). Nesse sentido, DAI et al. (2017) encapsularam o pesticida  
199 clorpirifós em gelatina – carboximetilcelulose de sódio por coacervação complexa. Nesse  
200 estudo, foi possível observar pelos autores que houve alta eficiência de encapsulação do  
201 pesticida, a técnica foi adequada para a liberação controlada e as microcápsulas apresentaram  
202 alta espalhabilidade quando aplicadas em folha de arroz, demonstrando a eficiência da  
203 técnica. Já GIRARDI et al. (2016) encapsularam óleo essencial de boldo, eficiente para o  
204 controle de patógenos fúngicos em sementes, em gelatina e goma arábica por coacervação  
205 complexa. Foi observado pelos autores que a técnica apresentou alta eficiência de  
206 encapsulação, manteve a capacidade antifúngica e aumentou a proteção das sementes durante  
207 armazenamento de 114 dias.

208

209 *Outras aplicações*

210 DEVI et al. (2017) relatam que a coacervação complexa também é aplicada nas  
211 indústrias de impressão e de adesivos. Todavia, não foram encontradas pesquisas científicas  
212 na literatura, nesse sentido.

213



214

215 Figura 3 – Aplicações da coacervação complexa e suas finalidades em diferentes áreas

216 Fonte: Próprio autor

217 MELHORAMENTO DAS MICROCÁPSULAS PRODUZIDAS POR COACERVAÇÃO  
218 COMPLEXA PELA RETICULAÇÃO

219

220 A reticulação das microcápsulas produzidas por coacervação complexa está inserida,  
221 atualmente, entre as estratégias de melhoramento da estabilidade mecânica e térmica dessas  
222 microcápsulas. Além da reticulação, pode ser utilizado para melhoramento das microcápsulas  
223 o tratamento térmico brando e a dessolvatação (TIMILSENA et al., 2016).

224 Os coacervados apresentam certa fragilidade sob determinadas condições e podem se  
225 dissociar, como em resposta ao pH ou apresentando instabilidade sob alta concentração  
226 fisiológica de sal (CHAI et al., 2018). O que ocorre nesta situação é a dissociação dos  
227 polímeros com cargas opostas. Essa instabilidade, entre outras, pode ser melhorada pelo  
228 processo de reticulação entre os polímeros de cargas opostas.

229 Segundo COMUNIAN et al. (2016) a reticulação pode ser entendida como um  
230 processo em que um composto (aniônico ou catiônico) é adicionado às microcápsulas  
231 coacervadas com o objetivo de estabilizar essas estruturas. Também pode ser entendida como  
232 a ligação de uma cadeia de polímero do material encapsulante à outra cadeia de polímero por  
233 meio de uma ligação química, com a modificação das propriedades físico-químicas dos  
234 coacervados (ALVA et al., 2017; MOSCHAKIS & BILIADERIS, 2017).

235 A reticulação pode ocorrer de forma química ou enzimática, podendo ser realizada por  
236 ligações cruzadas químicas, ligações covalentes como interações eletrostáticas, pontes de  
237 hidrogênio ou interações hidrofóbicas, ou ligações cruzadas físicas, ligações não covalentes  
238 como pontes dissulfeto, onde as microcápsulas são endurecidas para que o material de parede  
239 se dissolva facilmente com forças mecânicas (ERATTE et al., 2018; LIU et al., 2018).

240 Entretanto, alguns fatores relacionados à reticulação devem ser conhecidos como a  
241 grande absorção de água polímeros, desfavorável durante o processamento de alimentos

242 (CHAI et al., 2018); e a competição por locais de ligação entre proteínas e polissacarídeos  
243 envolvidos no processo e se esses biopolímeros tendem a formar ligações proteína-proteína,  
244 polissacarídeo-polissacarídeo ou proteína-polissacarídeo (WEISS et al., 2019).

245 Contudo, a reticulação é uma forma importante utilizada para a estabilização de  
246 estruturas e com o passar dos anos, as microcápsulas melhoradas pelo processo de reticulação  
247 estão se tornando populares (EGHBAL & CHOUDHARY, 2018; BAO et al., 2019). Além de  
248 melhorar a estabilidade, a reticulação melhora as características de liberação controlada do  
249 agente ativo e previne a auto-oxidação (YE, GEORGES & SELOMULYA, 2018). Além  
250 disso, a reticulação influencia de forma significativa o tamanho, a morfologia, o  
251 comportamento da liberação controlada do agente ativo, entre outras propriedades das  
252 microcápsulas (DEVI et al., 2017). Por isso, de acordo com ROJAS-MORENO et al. (2018),  
253 os agentes de reticulação desempenham um papel fundamental no processo de coacervação  
254 complexa. A Tabela 1 expõe os agentes de reticulação utilizados na coacervação complexa e  
255 suas finalidades.

256

257

258 Tabela 1 – Aplicações dos agentes de reticulação no processo de coacervação complexa

Agente de reticulação	Objetivo	Autores
Formaldeído e Glutaraldeído	Produzir microcápsulas de antioxidantes butil hidroxianisol e butil hidroxitolueno para uso como conservante em amendoim	GIRARDI et al. (2015)
Formaldeído	Produzir microcápsulas com óleo essencial de boldo para prolongar a vida de prateleira	GIRARDI et al. (2016)
Formaldeído	Avaliar parâmetros de formulação e processo nas microcápsulas	LAMOUDI, CHAUMEIL & DAOUD (2015)
Glutaraldeído	Liberação controlada de óleo de citronela para utilização como aditivo funcional em sistemas de embalagem secundária de papel e papelão para alimentos e produtos farmacêuticos	SUMIGA et al. (2019)
Glutaraldeído	Produzir microcápsulas para proteção e liberação controlada de compostos hidrofóbicos em condições gastrointestinais simuladas	HUANG et al. (2017)
Glutaraldeído	Produzir e caracterizar microcápsulas com óleo de lavanda	OCAK (2012)
Genipina	Investigar os efeitos da acidez da coacervação na liberação controlada de albumina de soro bovino no intestino	XIAO et al. (2018)
	Melhorar a liberação controlada e a termo estabilidade do óleo de baunilha	YANG et al. (2014)
	Caracterização das microcápsulas: propriedades mecânicas, resistência, permeabilidade e durabilidade	CHEN et al. (2009)
Taninos	Avaliação da liberação controlada do extrato de <i>Perinereis aibuhitensis</i>	LI et al. (2019)
	Melhorar a estabilidade da fucoxantina frente ao trato gastrointestinal	LI et al. (2019)
	Caracterização e melhoramento de microcápsulas de óleo de hortelã-pimenta	MUHOZA, XIA & ZHANG (2019)
Transglutaminase	Melhoramento de microcápsulas obtidas por coacervação complexa para a proteção de probióticos	DA SILVA et al. (2019)
	Proteção de bactérias probióticas em exposição a condições simuladas do trato gastrointestinal	NAWONG et al. (2016)
	Avaliar a estabilidade térmica e oxidativa das microcápsulas	IFEDUBA & AKOH (2015)
Tripolifosfato de sódio	Investigar o processo de reticulação dos coacervados sob influência do pH e/ou irradiação por micro-ondas	ZAKARIA et al. (2019)
	Avaliar a estabilidade frente à secagem e rendimento	PRATA & GROSSO (2015)
	Desenvolver e caracterizar as microcápsulas	BUTSTRAEN & SALAÛN (2014)

259

260

## 261 AGENTES DE RETICULAÇÃO

262

263 *Aldeídos*

264 Para o processo de reticulação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa  
265 é muito comum a utilização de aldeídos, sendo o glutaraldeído e o formaldeído os mais  
266 conhecidos e os agentes mais tradicionalmente utilizados nesse processo (COMUNIAN et al.,  
267 2016; VEIGA et al., 2016). Segundo FUGUET, PLATERINK & JANSSEN (2007) a  
268 reticulação com esses aldeídos forma microcápsulas mais resistentes ao calor e à umidade.

269 O glutaraldeído é um agente químico e amplamente utilizado como reticulador, pois  
270 possui dois sítios reativos que podem promover ligação covalente com grupos amino livre de  
271 proteínas, denominada reação básica de Schiff, criando assim, ligações intra e  
272 intermoleculares (FUGUET, PLATERINK & JANSSEN, 2007; DONG et al., 2008). Este tipo  
273 de reticulação é resistente a condições extremas de pH e temperatura, além de ser irreversível.  
274 Entretanto, sua utilização na reticulação para a aplicação em alimentos não é adequada devido  
275 à sua natureza tóxica (ALVIM & GROSSO, 2010; EGHBAL & CHOUDHARY, 2018).  
276 Contudo, ainda é o agente de reticulação mais utilizado, apesar de sua provável toxicidade  
277 (ROJAS-MORENO et al., 2018).

278 Assim como o glutaraldeído, o formaldeído é tóxico a humanos, não sendo utilizado  
279 para alimentos, e é relatado como agente reticulante para microcápsulas obtidas por  
280 coacervação complexa. Dessa forma, são frequentemente utilizados em indústrias de  
281 fertilizantes e farmacêuticas. Todavia, de acordo com PRATA et al. (2008) a toxicidade  
282 desses aldeídos está limitando enormemente a exploração de uso para reticulação de produtos  
283 para aplicações alimentícias e farmacêuticas.

284 Além disso, ALAVI et al. (2009) reportam algumas vantagens na morfologia das  
285 microcápsulas reticuladas com glutaraldeído como maior uniformidade, morfologia mais

286 arredondada, e tamanhos menores em relação ao formaldeído. KONG et al. (2008) ainda  
287 relatam maior eficiência de reticulação do glutaraldeído comparado ao formaldeído.

288 Contudo, HAWLADER, UDDIN & KHIN (2003) utilizaram o formaldeído para  
289 reticular microcápsulas de gelatina e goma arábica contendo parafina, formadas por  
290 coacervação complexa. Neste estudo, observaram que um carboxilato, presente na gelatina,  
291 reage com a molécula de formaldeído, ativando o ataque carboxílico ao nucleofílico. Assim,  
292 as reações desses grupos, em outra molécula de gelatina, com o carboxilato ativado fazem a  
293 reticulação da gelatina, sendo essa reação catalisada por OH<sup>-</sup> (condição alcalina). Esse  
294 processo de reticulação proporcionou a formação de microcápsulas com alta eficiência de  
295 encapsulação (80,42-94,89%), com formatos arredondados, uniformes e lisas, com alta  
296 capacidade de armazenamento e liberação de energia térmica (145–240 J/g). No entanto, a  
297 quantidade de formaldeído utilizada para a reticulação é um fator limitante. Esses autores  
298 encontraram que quando foi utilizada uma quantidade maior que 8 mL de formaldeído, a  
299 eficiência de encapsulação foi reduzida.

300 Já ZHAO et al. (2016) utilizaram o glutaraldeído para reticular microcápsulas de  
301 gelatina – polifosfato de sódio contendo metoxicinamato de octila produzidas por coacervação  
302 complexa, composto utilizado em cosméticos para proteção solar. O objetivo deste estudo foi  
303 produzir microcápsulas de metoxicinamato de octila para melhorar sua aplicação. Assim, a  
304 partir dos resultados obtidos, os autores concluíram que com o aumento na quantidade de  
305 glutaraldeído a eficiência de encapsulação de 80% também aumentou para 94,9%, que o  
306 processo de microencapsulação pode reduzir a absorção percutânea de metoxicinamato de  
307 octila e seu produto de fotodegradação, melhorando a fotoproteção e que as microcápsulas  
308 têm potencial para a administração de medicamentos para a pele. Além disso, não foram  
309 relatadas fragilidades em relação à microencapsulação do composto e posterior reticulação  
310 das microcápsulas com glutaraldeído.

312 *Genipina*

313 A genipina é um composto químico e agente reticulador natural solúvel em água,  
314 produto da hidrólise da  $\beta$ -glicosidase do geniposídeo, um componente isolado dos frutos da  
315 gardênia (MUZZARELLI, 2009; PENG et al., 2014). É um agente de reticulação rico em  
316 grupos funcionais ativos, como  $-OH$  e  $COO^-$  e, por isso, pode reticular espontaneamente o  
317 amino ativo da proteína (YANG et al., 2014). Pode ser utilizada para substituir agentes de  
318 reticulação tóxicos como os aldeídos e também à transglutaminase e ao ácido tânico, devido  
319 ao alto custo e sabor desagradável, respectivamente, limitantes da sua aplicabilidade (PENG  
320 et al., 2014). Além disso, frente ao glutaraldeído exibe vantagens como estabilidade e  
321 biocompatibilidade dos produtos reticulados, características que facilitam a avaliação e a  
322 manipulação da qualidade (MUZZARELLI, 2009).

323 Diante do exposto, HUANG et al. (2016) utilizaram a genipina para reticular  
324 microcápsulas de O-carboximetilquitosana - goma arábica obtidas por coacervação complexa  
325 com o intuito de avaliar os efeitos da acidez do processo de encapsulação na ação da  
326 reticulação e liberação controlada no intestino. Esses autores verificaram que a reticulação  
327 com genipina foi capaz de melhorar a estabilidade dos coacervados frente às condições  
328 gastrointestinais simuladas quando maior quantidade de genipina foi utilizada (0,3 mg/mL),  
329 possibilitando o fornecimento de compostos hidrofóbicos ao intestino e que quanto menor a  
330 acidez da coacervação complexa, menor a velocidade e o grau de reticulação, porém maior a  
331 elasticidade e a estabilidade térmica. Como fragilidades atreladas ao processo, foram  
332 reportados a liberação do agente ativo no fluido gástrico com 0,1 ou 0,2 mg/mL de genipina e  
333 a liberação controlada afetada pelo pH da coacervação complexa. Quanto menor o valor de  
334 pH, maior a liberação. Assim, a coacervação complexa realizada em pH 3,0 não se mostrou  
335 adequada em relação ao controle da liberação.

336

### 337 *Taninos*

338 Os polifenóis podem ser utilizados como agentes de reticulação pela sua capacidade de  
339 ligação a proteínas, como a gelatina, por meio de ligações de hidrogênio e interações  
340 hidrofóbicas (PAKZAD, ALEMZADEH & KAZEMI, 2013). Entre os polifenóis, os taninos  
341 (polifenóis vegetais) são relatados como agentes reticuladores, sendo o ácido tânico o mais  
342 frequente.

343 Nesse sentido, um ponto importante a ser consideração em relação à reticulação com  
344 ácido tânico é o tipo de proteína a ser reticulada. Em proteínas conformacionalmente abertas,  
345 como a gelatina, o ácido tânico interage através da formação de ligações de hidrogênio, já  
346 com proteínas globulares do soro de leite, não forma a mesma interação, o que causa uma  
347 reticulação inadequada; o mesmo ocorre com a reticulação utilizando ácido tânico oxidado  
348 (ZHANG et al., 2011; ROJAS-MORENO et al., 2018). Segundo ROJAS-MORENO et al.  
349 (2018) o tipo de polissacarídeo também vai influenciar a interação com o ácido tânico. Além  
350 disso, uma limitação encontrada para sua aplicação na indústria de alimentos é o sabor  
351 estranho (EGHBAL & CHOUDHARY, 2018).

352 Todavia, ALEXANDRE et al. (2019) reticularam microcápsulas de gelatina – goma de  
353 caju contendo óleo de pequi com ácido tânico, com o objetivo de produzir e caracterizar as  
354 micropartículas. Assim, os autores observaram que o aumento no percentual de ácido tânico  
355 (6,9%) na reticulação resultou em maior rendimento (7,77 a 39,77%) e eficiência de  
356 encapsulação (2,60 a 70,98%). Além disso, a reticulação proporcionou um aumento na  
357 temperatura de degradação do material; e conseqüentemente, melhorou a estabilidade térmica  
358 das micropartículas (312 a 316°C). Assim, o processo de reticulação foi considerado  
359 vantajoso na produção dessas micropartículas. Contudo, foi observada a baixa solubilidade  
360 das partículas em água (1,08 a 4,82%) e que a reticulação interferiu na morfologia das  
361 partículas, tornando-as menos homogêneas.

362 *Transglutaminase*

363 A transglutaminase é uma transferase que catalisa a formação de uma ligação  
364 covalente entre grupos gama-carboxilamida de resíduos de peptídeo ou glutamina ligada a  
365 proteínas e grupos amino primários e, com isso, realiza reticulações intra e intermoleculares  
366 (VEIGA et al., 2016).

367 Avanços recentes utilizando a transglutaminase como um reticulador eficaz de  
368 proteínas fornecem que esta enzima é capaz de prover soluções viáveis para encapsular  
369 compostos bioativos sem comprometer suas características biológicas e físico-químicas, bem  
370 como sua liberação controlada. Além disso, vem sendo muito utilizada como substituinte a  
371 agentes de reticulação tóxicos, como o glutaraldeído e o formaldeído (GHARIBZAHEDI et  
372 al., 2018).

373 A taxa de liberação controlada de microcápsulas reticuladas pela transglutaminase  
374 pode ser influenciada pela alteração da concentração da enzima e por fatores que afetam o  
375 processo de reticulação, como pH, tempo e grau de reticulação (EGHBAL & CHOUDHARY,  
376 2018). Com relação ao grau de reticulação, existem opiniões divididas entre os pesquisadores,  
377 alguns afirmam que a reticulação é eficiente, pois reduz a taxa de liberação do material ativo,  
378 contudo, outros relatam que a taxa de liberação é semelhante à microcápsulas sem reticulação  
379 (DONG et al., 2008; PRATA et al., 2008; ALVIM & GROSSO, 2010; DONG et al., 2011;  
380 ZHANG et al., 2012; ROJAS-MORENO et al., 2018).

381 Entretanto, uma limitação para a sua utilização pela indústria de alimentos, é seu alto  
382 custo (EGHBAL & CHOUDHARY, 2018). Além disso, após a coacervação complexa, a  
383 reticulação enzimática pode ser dificultada, pois o acesso da enzima aos locais ativos no  
384 substrato polimérico pode ser inibida, por exemplo, pela enzima não conseguir alcançar o  
385 substrato polimérico em sistemas multicamadas ou por não haver sítios de reticulação  
386 disponíveis devido à interações com outros polímeros (WEISS et al., 2019). Apesar dessas

387 limitações, tem se mostrado adequada à coacervação complexa, resultando em maior  
388 resistência mecânica das microcápsulas (GHARIBZAHEDI et al., 2018).

389 Em um estudo recente, DA SILVA et al. (2019) utilizaram a transglutaminase para  
390 reticular microcápsulas de gelatina – goma arábica contendo *L. acidophilus* obtidas por  
391 coacervação complexa. Foi observado pelos autores nesse estudo que a transglutaminase se  
392 mostrou adequada à coacervação complexa, protegendo os probióticos frente a condições  
393 adversas como no tratamento térmico a 63°C por 30 minutos e a 72°C por 15 segundos; no  
394 trato gastrointestinal simulado, liberando os probióticos das microcápsulas somente na porção  
395 intestinal com a viabilidade de 9,07 log UFC g<sup>-1</sup>; e durante armazenamento em condições de  
396 congelamento e refrigeração por 60 dias. No entanto, como um fator limitante, foi observado  
397 que a reticulação com transglutaminase não foi adequada ao armazenamento das  
398 microcápsulas em condições de temperatura ambiente, mantendo os probióticos viáveis por  
399 30 dias.

400

#### 401 *Tripolifosfato de sódio*

402 O tripolifosfato de sódio é um ânion polivalente não-tóxico, é capaz de formar  
403 ligações iônicas intermoleculares ou redes reticuladas pela sua interação com grupos amino  
404 carregados positivamente (-NH<sup>3+</sup>) por forças eletrostáticas (BUSTATRAEN & SALAÛN,  
405 2014). É frequentemente relatada na literatura a utilização de tripolifosfato de sódio como  
406 reticulador em coacervados formados com quitosana como polissacarídeo (ROJAS-  
407 MORENO et al., 2018).

408 Todavia, ROJAS-MORENO et al. (2018) utilizaram o tripolifosfato de sódio para  
409 reticular coacervados de óleo essencial de laranja formados com isolado de proteína do soro  
410 de leite/carboximetilcelulose, isolado de proteína do soro de leite/alginato de sódio e isolado  
411 de proteína do soro de leite/quitosana, e observaram que a utilização do tripolifosfato de sódio

412 não foi tão vantajosa quando associada a secagem por liofilização, pois reduziu as eficiências  
413 de encapsulação (30%) devido ao fenômeno de mascaramento de cargas elétricas pela  
414 presença dos íons sódio, causando a interrupção da interação entre proteínas e polissacarídeos.  
415 A partir da redução da eficiência de encapsulação constataram que a interação eletrostática  
416 entre esse agente de reticulação e a proteína do soro de leite não é suficientemente forte para  
417 preservar o óleo essencial encapsulado. Outro ponto importante a se observar na reticulação  
418 com tripolifosfato de sódio é a concentração deste agente de reticulação, pois no mesmo  
419 estudo de ROJAS-MORENO et al. (2018) não houve a separação de fases dos coacervados  
420 devido a perda da interação entre os polímeros. Contudo, como vantagens da reticulação com  
421 tripolifosfato de sódio, quando as microcápsulas foram secas por spray drying foi observado  
422 que a eficiência de encapsulação aumentou até 38% com a reticulação e que houve a redução  
423 no tamanho das microcápsulas, apresentando entre 10 e 17 $\mu$ m.

424

#### 425 *Outros agentes de reticulação*

426 Como mais uma alternativa de reticulação, porém raramente utilizada, para  
427 microcápsulas obtidas por coacervação complexa, consta na literatura a reticulação por  
428 cloreto férrico. SZE HUEI et al. (2016) utilizaram uma solução hidro alcoólica de cloreto  
429 férrico para reticular microcápsulas de ibuprofeno produzidas por coacervação complexa. No  
430 entanto, o cloreto férrico não resultou em resultados significativos, levando os autores a  
431 concluir que mais estudos são necessários para confirmar a estabilidade do ibuprofeno na  
432 presença de ferro que pode iniciar o processo de oxidação.

433 Outro agente de reticulação pouco relatado, mas utilizado para o processo de  
434 coacervação complexa é ácido sinápico, conhecido como um antioxidante capaz de realizar  
435 uma reticulação eficaz e melhorar a estabilidade de microcápsulas produzidas por  
436 coacervação complexa (COMUNIAN et al., 2017; COMUNIAN et al., 2018). Além disso, de

437 acordo com COMUNIAN et al. (2018) o ácido sinápico pode ser considerado uma alternativa  
438 adequada a agentes de reticulação tradicionais como a transglutaminase, que apresenta alto  
439 custo e o glutaraldeído, que é tóxico. Nesse sentido, COMUNIAN et al. (2016) utilizaram o  
440 ácido sinápico para reticular microcápsulas de gelatina – goma de caju contendo óleo de  
441 echium obtidas por coacervação complexa e comparar as microcápsulas obtidas à  
442 microcápsulas de gelatina – goma arábica reticuladas com transglutaminase. As  
443 microcápsulas obtidas foram submetidas a diferentes condições de estresse como  
444 temperaturas (2 a 80°C), valores de pH (2 a 8), soluções de NaCl ( 1 a 5%) (p/p) e soluções de  
445 sacarose (1 a 20%) (p/p). Foi observado que o processo demonstrou ser vantajoso em valores  
446 de pH de 3 a 7, sob exposição a soluções de sacarose e alta temperatura (80°C) com as  
447 microcápsulas permanecendo intactas. Entretanto, houve rompimento das microcápsulas em  
448 soluções com concentração de sal de 3 e 5%, demonstrando a limitação do processo.  
449 Ademais, foi ressaltado pelos autores que os tratamentos com goma de caju e ácido sinápico  
450 obtiveram resultados semelhantes aos tratamentos com goma arábica e transglutaminase nas  
451 condições analisadas, podendo ser utilizados como uma alternativa para fornecimento e  
452 aplicação de compostos em produtos alimentícios.

453

#### 454 CONCLUSÃO E PERSPECTIVAS FUTURAS

455

456 A coacervação complexa exhibe inúmeras vantagens frente a outras técnicas de  
457 microencapsulação. Além disso, apesar de ser amplamente utilizada, o melhoramento das  
458 microcápsulas obtidas pela coacervação complexa se faz necessário. Nesse sentido, a  
459 reticulação é um processo relevante, por melhorar significativamente a estabilidade das  
460 microcápsulas e facilitar sua aplicação. Assim, a reticulação é vantajosa em associação à  
461 coacervação complexa e vem sendo realizada por uma ampla gama de agentes reticuladores,

462 com destaque para os agentes atóxicos, possibilitando que as microcápsulas reticuladas sejam  
463 aplicadas nas mais diversas áreas e produtos.

464 No entanto, mais estudos em torno do processo de reticulação, dos agentes utilizados  
465 no processo e da aplicação das microcápsulas reticuladas são necessários para que as  
466 informações nesse sentido sejam mais difundidas e ampliadas, para que possam ser utilizadas  
467 por cientistas, tecnólogos e engenheiros de alimentos para o melhoramento desse processo.

468

#### 469 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

470

471 ALEXANDRE, J. B. et al. Cross-linked coacervates of cashew gum and gelatin in the  
472 encapsulation of pequi oil. **Ciência Rural**, Santa Maria, v.49:12, 2019. Disponível em:  
473 [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782019001200753&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782019001200753&script=sci_arttext). doi:  
474 10.1590/0103-8478cr20190079

475 ALOYS, H. et al. Microencapsulation by Complex Coacervation: Methods, Techniques,  
476 Benefits, and Applications - A Review. **American Journal of Food Science and Nutrition**  
477 **Research**. vol. 3, n°. 6, p. 188-192, 2016. Disponível em:  
478 [https://www.researchgate.net/publication/326186301\\_Microencapsulation\\_by\\_Complex\\_Coacervation\\_Methods\\_Techniques\\_Benefits\\_and\\_Applications\\_-\\_A\\_Review](https://www.researchgate.net/publication/326186301_Microencapsulation_by_Complex_Coacervation_Methods_Techniques_Benefits_and_Applications_-_A_Review).

480 ALVA, G. et al. Synthesis, characterization and applications of microencapsulated phase  
481 change materials in thermal energy storage: A review. **Energy and Buildings**, 144, 276–294,  
482 2017. Disponível em:  
483 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0378778816309689>.

484 doi:10.1016/j.enbuild.2017.03.063

485 ALVIM, I.; GROSSO, R. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the  
486 type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Ciência e**

487 **Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 1069-1076, 2010. Disponível em:  
488 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0101-20612010000400036](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612010000400036). doi:  
489 10.1590/S0101-20612010000400036

490 BARACAT, M. M. et al. (2012). Preparation and characterization of microcapsules based on  
491 biodegradable polymers: pectin/casein complex for controlled drug release systems. **AAPS**  
492 **Pharm Sci Tech**, v. 13(2), p. 364–372. Disponível em:  
493 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3364389/>. doi:10.1208/s12249-012-9752-0

494 BAO, C. et al., The delivery of sensitive food bioactive ingredients: Absorption mechanisms,  
495 influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models, **Food Research**  
496 **International**, v. 120, p. 130-140, 2019. Disponível em:  
497 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919301115>. doi.org/10.1016/  
498 j.foodres.2019.02.024

499 BOSNEA, L. A. et al. Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in  
500 biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. **Food & Function**, v.  
501 8(2), p. 554-562, 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27935607>. doi:  
502 10.1039/c6fo01019a

503 BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of  
504 gum Arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014. Disponível em:  
505 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713008965>. doi:  
506 10.1016/j.carbpol.2013.09.006

507 CHAI, J. et al. The intelligent delivery systems for bioactive compounds in foods:  
508 Physicochemical and physiological conditions, absorption mechanisms, obstacles and  
509 responsive strategies. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 144–154, 2018.  
510 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224417306465>.  
511 doi:10.1016/j.tifs.2018.06.003

- 512 CHEN, H. et al. Genipin cross-linked polymeric alginate-chitosan microcapsules for oral  
513 delivery: in-vitro analysis. **International Journal of Polymer Science**, p. 1–16, 2009.  
514 Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/ijps/2009/617184/>. doi:  
515 10.1155/2009/617184
- 516 COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil  
517 microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319-329, 2016. Disponível em:  
518 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27312643>. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.05.044
- 519 COMUNIAN, T. A. et al. Development of functional yogurt containing free and encapsulated  
520 echium oil, phytosterol and sinapic acid. **Food Chemistry**, v. 237, p. 948–956, 2017.  
521 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28764091>. doi:  
522 10.1016/j.foodchem.2017.06.071
- 523 COMUNIAN, T. A. et al. Enhancing stability of echium seed oil and beta-sitosterol by their  
524 coencapsulation by complex coacervation using different combinations of wall materials and  
525 crosslinkers. **Food Chemistry**, v. 252, p. 277–284, 2018. Disponível em:  
526 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29478542>. doi: 10.1016/j.foodchem.2018.01.121
- 527 CORRÊA-FILHO, L. C. et al. Advances in the application of microcapsules as carriers of  
528 functional compounds for food products. **Applied Science**, v. 9, p. 1-18, 2019. Disponível  
529 em: <https://www.mdpi.com/2076-3417/9/3/571>. doi:10.3390/app9030571.
- 530 DA SILVA, T. M. et al. The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic  
531 bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation. **Food Research**  
532 **International**, v. 125, 108577, 2019. Disponível em:  
533 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996919304557>. doi:  
534 10.1016/j.foodres.2019.108577
- 535 DAI, R. Y. et al. High blades spreadability of chlorpyrifos microcapsules prepared with  
536 polysiloxane sodium carboxylate/sodium carboxymethylcellulose/gelatin via complex

537 coacervation. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 530,  
538 p. 13–19, 2017. Disponível em:  
539 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775717306192> doi:  
540 10.1016/j.colsurfa.2017.06.057

541 DEVI, N. et al. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex  
542 coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.  
543 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300446>  
544 doi:10.1016/j.cis.2016.05.009

545 DONG, Z. et al. Optimization of cross-linking parameters during production of  
546 transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation.  
547 **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 63, p. 41–47, 2008. Disponível em:  
548 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18155888> doi: 10.1016/j.colsurfb.2007.11.007

549 DONG, Z. et al. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint  
550 oil by complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 455–460, 2011.  
551 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0260877411000239>  
552 doi: 10.1016/j.jfoodeng.2011.01.011

553 EGHBAL, N., CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled  
554 release of active agents in food systems, **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p.  
555 254–264, 2018. Disponível em:  
556 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817309301> doi:  
557 10.1016/j.lwt.2017.12.036

558 ERATTE, D. et al. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic  
559 bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science & Technology**,  
560 v. 71, p. 121–131, 2018. Disponível em:

- 561 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224416304356> doi:  
562 10.1016/j.tifs.2017.10.014
- 563 FUGUET, E. et al. Analytical characterisation of glutardialdehyde cross-linking products in  
564 gelatine–gum arabic complex coacervates. **Analytica Chimica Acta**, v. 604 (1), p. 45–53,  
565 2007. Disponível em:  
566 [https://www.researchgate.net/publication/5862484\\_Analytical\\_characterisation\\_of\\_glutardial](https://www.researchgate.net/publication/5862484_Analytical_characterisation_of_glutardialdehyde_cross-linking_products_in_gelatine-gum_arabic_complex_coacervates)  
567 [dehyde\\_cross-linking\\_products\\_in\\_gelatine-gum\\_arabic\\_complex\\_coacervates](https://www.researchgate.net/publication/5862484_Analytical_characterisation_of_glutardialdehyde_cross-linking_products_in_gelatine-gum_arabic_complex_coacervates) doi:  
568 10.1016/j.aca.2007.07.002 .
- 569 GHARIBZAHEDI, S. M. T. et al. New trends in the microencapsulation of functional fatty  
570 acid-rich oils using transglutaminase catalyzed crosslinking. **Comprehensive Reviews in**  
571 **Food Science and Food Safety**, v. 17(2), p. 274–289, 2018. Disponível em:  
572 <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/1541-4337.12324> doi:10.1111/1541-  
573 4337.12324
- 574 GIRARDI, N. S. et al. Stability of food grade antioxidants formulation to use as preservatives  
575 on stored peanut. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62 (2), p. 1019–1026, 2015.  
576 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815000687> doi:  
577 10.1016/j.lwt.2015.01.052
- 578 GIRARDI, N. S. et al. Microencapsulation of *Peumus boldus* oil by complex coacervation to  
579 provide peanut seeds protection against fungal pathogens. **Industrial Crops and Products**, v.  
580 92, p. 93–101, 2016. Disponível em:  
581 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0926669016304940> doi:  
582 10.1016/j.indcrop.2016.07.045
- 583 HAWLADER, M. N. A. et al. Microencapsulated PCM thermal-energy storage system.  
584 **Applied Energy**, v. 74 (1-2), p. 195–202, 2003. Disponível em:

585 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0306261902001460>  
586 doi:10.1016/s0306-2619(02)00146-0

587 HUANG, G.-Q. et al. Effects of coacervation acidity on the genipin crosslinking action and  
588 intestine-targeted delivery potency of the O-carboxymethyl chitosan–gum arabic coacervates.  
589 **International Journal of Polymeric Materials and Polymeric Biomaterials**, v. 66 (2), p.  
590 89–96, 2016. Disponível em:  
591 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/00914037.2016.1190924> doi:  
592 10.1080/00914037.2016.1190924

593 HUANG, G.-Q. et al. Glutaraldehyde-crosslinked O-carboxymethyl chitosan–gum arabic  
594 coacervates: Characteristics versus complexation acidity. **Journal of Dispersion Science and**  
595 **Technology**, v. 38 (11), p. 1607–1612, 2017. Disponível em:  
596 <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/01932691.2016.1265454> doi:  
597 10.1080/01932691.2016.1265454

598 IFEDUBA, E. A., AKOH, C. C. Microencapsulation of stearidonic acid soybean oil in  
599 complex coacervates modified for enhanced stability. **Food Hydrocolloids**, v. 51, p. 136–  
600 145. (2015). Disponível em:  
601 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X1500209X> doi:  
602 10.1016/j.foodhyd.2015.05.008

603 JAIN, A. et al. Characterization of microcapsulated  $\beta$ -carotene formed by complex  
604 coacervation using casein and gum tragacanth. **International Journal of Biological**  
605 **Macromolecules**, v. 87, p. 101–113, 2016. Disponível em:  
606 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26851204> doi:10.1016/j.ijbiomac.2016.01.117

607 KONG, X. Z. et al. Spreadable dispersion of insect sex pheromone capsules, preparation via  
608 complex coacervation and release control of the encapsulated pheromone component

609 molecule. **Biomedical Microdevices**, v. 11 (1), p. 275–285, 2008. Disponível em:  
610 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18821015> doi: 10.1007/s10544-008-9234-z

611 LAMOUDI, L. et al. Effet des paramètres du procédé de microencapsulation du piroxicam par  
612 coacervation complexe. **Annales Pharmaceutiques Françaises**, v. 73 (1), p. 37–42, 2015.  
613 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0003450914000613> doi:  
614 10.1016/j.pharma.2014.05.006

615 LI, Y. et al. Improvement of fucoxanthin oral efficacy via vehicles based on gum Arabic,  
616 gelatin and alginate hydrogel. **Journal of Functional Foods**, v. 63, p. 103573, 2019.  
617 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S1756464619304979>  
618 [doi.org/10.1016/j.jff.2019.103573](https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103573)

619 LIU, F. et al. Recent development of lactoferrin-based vehicles for the delivery of bioactive  
620 compounds: Complexes, emulsions, and nanoparticles, **Trends in Food Science &**  
621 **Technology**, v. 79, p. 67-77, 2018. Disponível em:  
622 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0924224418301377> doi:  
623 10.1016/j.tifs.2018.06.013

624 MANCER, D. et al. Metformin hydrochloride microencapsulation by complex coacervation:  
625 Study of size distribution and encapsulation yield using response surface methodology.  
626 **Journal of Drug Delivery Science and Technology**, v. 45, p. 184–195, 2018. Disponível  
627 em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S177322471730919X> doi:  
628 10.1016/j.jddst.2018.03.015

629 MARQUES DA SILVA, T. et al. Development and characterization of microcapsules  
630 containing Bifidobacterium Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze  
631 drying. **LWT - Food Science and Technology**, 90, 412–417, 2018. Disponível em:  
632 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817309519>  
633 doi:10.1016/j.lwt.2017.12.057

- 634 MENDANHA, D. V. et al. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex  
635 coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42(8), p. 1099-1104, 2009.  
636 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996909001628>  
637 doi: 10.1016/j.foodres.2009.05.007
- 638 MOSCHAKIS, T., BILIADERIS, C. G. (2017). Biopolymer-based coacervates: Structures,  
639 functionality and applications in food products. **Current Opinion in Colloid & Interface**  
640 **Science**, v. 28, p. 96–109. Disponível em:  
641 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359029417300444> doi:  
642 10.1016/j.cocis.2017.03.006
- 643 MUHOZA, B. et al. Gelatin and high methyl pectin coacervates crosslinked with tannic acid:  
644 The characterization, rheological properties, and application for peppermint oil  
645 microencapsulation. **Food Hydrocolloids**, 105174, 2019. Disponível em:  
646 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X19305508> doi:  
647 10.1016/j.foodhyd.2019.105174
- 648 MUZZARELLI, R. A. A. Genipin-crosslinked chitosan hydrogels as biomedical and  
649 pharmaceutical aids. **Carbohydrate Polymers**, v. 77 (1), p. 1–9, 2009. Disponível em:  
650 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861709000526>  
651 doi:10.1016/j.carbpol.2009.01.016
- 652 NAWONG, S. et al. Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin–  
653 maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. during exposure to simulated gastro-  
654 intestinal juices. **Food Research International**, v. 85, p. 191–199, 2016. Disponível em:  
655 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996916301843> doi:  
656 10.1016/j.foodres.2016.04.041
- 657 OCAK, B. Complex coacervation of collagen hydrolysate extracted from leather solid wastes  
658 and chitosan for controlled release of lavender oil. **Journal of Environmental Management**,

- 659 v. 100, p. 22–28, 2012. Disponível em:  
660 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0301479712000345> doi:  
661 10.1016/j.jenvman.2012.01.026
- 662 OZKAN, G. et al. A review of microencapsulation methods for food antioxidants: Principles,  
663 advantages, drawbacks and applications. **Food Chemistry**, v. 272, p. 494-506, 2018.  
664 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814618313669>  
665 doi:10.1016/j.foodchem.2018.07.205
- 666 PAKZAD, H. et al. Encapsulation of Peppermint Oil with Arabic Gum-gelatin by Complex  
667 Coacervation Method. **IJE Transactions B: Application**, v. 26, n°. 8, p. 807-814, 2013.  
668 Disponível em:  
669 [https://www.researchgate.net/publication/286130861\\_Encapsulation\\_of\\_peppermint\\_oil\\_with](https://www.researchgate.net/publication/286130861_Encapsulation_of_peppermint_oil_with_arabic_gum-gelatin_by_complex_coacervation_method)  
670 [\\_arabic\\_gum-gelatin\\_by\\_complex\\_coacervation\\_method](https://www.researchgate.net/publication/286130861_Encapsulation_of_peppermint_oil_with_arabic_gum-gelatin_by_complex_coacervation_method)
- 671 PENG, C. et al. Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of  
672 Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 165,  
673 p. 560–568, 2014. Disponível em:  
674 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614008425> doi:  
675 10.1016/j.foodchem.2014.05.126
- 676 PRATA, A. S. et al. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatina-gum  
677 arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. **Colloids and**  
678 **Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, p. 171-178, 2008. Disponível em:  
679 [https://www.researchgate.net/publication/23299665\\_Release\\_properties\\_of\\_chemical\\_and\\_en](https://www.researchgate.net/publication/23299665_Release_properties_of_chemical_and_enzymatic_crosslinked_gelatin-gum_Arabic_microparticles_containing_a_fluorescent_probe_plus_vetiver_essential_oil)  
680 [zymatic\\_crosslinked\\_gelatin-](https://www.researchgate.net/publication/23299665_Release_properties_of_chemical_and_enzymatic_crosslinked_gelatin-gum_Arabic_microparticles_containing_a_fluorescent_probe_plus_vetiver_essential_oil)  
681 [gum\\_Arabic\\_microparticles\\_containing\\_a\\_fluorescent\\_probe\\_plus\\_vetiver\\_essential\\_oil](https://www.researchgate.net/publication/23299665_Release_properties_of_chemical_and_enzymatic_crosslinked_gelatin-gum_Arabic_microparticles_containing_a_fluorescent_probe_plus_vetiver_essential_oil) doi:  
682 10.1016/j.colsurfb.2008.08.014

683 PRATA, A. S., GROSSO, C. R. F. Production of microparticles with gelatin and chitosan.  
684 **Carbohydrate Polymers**, v. 116, p. 292–299, 2015. Disponível em:  
685 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861714002975> doi:  
686 10.1016/j.carbpol.2014.03.056

687 ROJAS-MORENO, S. et al. Effect of the cross-linking agent and drying method on  
688 encapsulation efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein  
689 isolate with different polysaccharides. **Journal of Microencapsulation**, v. 35 (2), p. 165-180,  
690 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29513057> doi:  
691 10.1080/02652048.2018.1449910

692 ROY, J. C. et al. Influence of process parameters on microcapsule formation from chitosan—  
693 Type B gelatin complex coacervates. **Carbohydrate Polymers**, v. 198, p. 281–293, 2018.  
694 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861718307422> doi:  
695 10.1016/j.carbpol.2018.06.087

696 SHISHIR, M.R.I. et al. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds  
697 using biopolymer and lipid-based transporters, **Trends in Food Science & Technology**,  
698 2018. Disponível em:  
699 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422441730777X> doi:  
700 10.1016/j.tifs.2018.05.018.

701 SILVA, T. M. da. Development, characterization and viability study of probiotic  
702 microcapsules produced by complex coacervation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**,  
703 v. 49(7), 2019. Disponível em:  
704 [http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S0103-84782019000700752](http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782019000700752)  
705 doi:10.1590/0103-8478cr20180775

706 SING, C. E. Development of the modern theory of polymeric complex coacervation.  
707 **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239(4), p. 2-16, 2017. Disponível em:

- 708 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0001868616300495> doi:  
709 10.1016/j.cis.2016.04.004
- 710 ŠUMIGA, B. et al. Antimicrobial paper coatings containing microencapsulated cymbopogon  
711 citratus oil. **Coatings**, v. 9 (8), p. 470, 2019. Disponível em: [https://www.mdpi.com/2079-](https://www.mdpi.com/2079-6412/9/8/470)  
712 6412/9/8/470 doi: 10.3390/coatings9080470
- 713 SZE HUEI, G. O. et al. Iron cross-linked carboxymethyl cellulose–gelatin complex  
714 coacervate beads for sustained drug delivery. **Chemical Papers**, v. 70 (2), p. 243-252, 2016.  
715 Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1515/chempap-2015-0197>
- 716 TIAN, Y. et al. Preparation and characterization of gelatin-sodium alginate/paraffin phase  
717 change microcapsules. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*,  
718 124216, 2019. Disponível em:  
719 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0927775719312117?via%3Dihub>  
720 doi:10.1016/j.colsurfa.2019.124216
- 721 TIMILSENA, Y. P. et al. Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia  
722 seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554-563, 2016. Disponível  
723 em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X15300436> doi:  
724 10.1016/j.foodhyd.2015.07.033
- 725 TIMILSENA, Y. P. et al. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in  
726 microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276-  
727 1286, 2019. Disponível em:  
728 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018348967>  
729 doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144.
- 730 VEIGA, C. C. et al. Microencapsulation of roasted coffee oil by complex coacervation with  
731 gelatin/gum arabic enzymatically crosslinked. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo  
732 Mourão, v. 7, n. 2, p. 156-172, mai./ago, 2016. Disponível em:

733 [https://www.researchgate.net/publication/308126307\\_Microencapsulation\\_of\\_Roasted\\_Coffee](https://www.researchgate.net/publication/308126307_Microencapsulation_of_Roasted_Coffee_Oil_by_Complex_Coacervation_with_GelatinGum_Arabic_Enzymatically_Crosslinked)  
734 [e\\_Oil\\_by\\_Complex\\_Coacervation\\_with\\_GelatinGum\\_Arabic\\_Enzymatically\\_Crosslinked](https://www.researchgate.net/publication/308126307_Microencapsulation_of_Roasted_Coffee_Oil_by_Complex_Coacervation_with_GelatinGum_Arabic_Enzymatically_Crosslinked)  
735 doi: 10.3895/rebrapa.v7n2.3704

736 WANG, B. et al. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin–sodium  
737 hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 158, p. 358–365, 2014.  
738 Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24731355> doi:  
739 10.1016/j.foodchem.2014.02.135

740 WEISS, J. et al. Use of molecular interactions and mesoscopic scale transitions to modulate  
741 protein-polysaccharide structures. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 271,  
742 101987, 2019. Disponível em:  
743 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S000186861930137X>  
744 doi:10.1016/j.cis.2019.07.008

745 XIAO, Z. et al. Production and characterization of multinuclear microcapsules encapsulating  
746 lavender oil by complex coacervation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29 (3), p. 166–  
747 172, 2013. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/ffj.3192> doi:  
748 10.1002/ffj.3192

749 XIAO, J.-X. et al. pH-Dependent intestine-targeted delivery potency of the O -carboxymethyl  
750 chitosan – gum arabic coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.  
751 117, p. 315–322, 2018. Disponível em:  
752 <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813018308663?via%3Dihub> doi:  
753 10.1016/j.ijbiomac.2018.05.183

754 YANG, Z. et al. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing  
755 vanilla oil using complex coacervation approach. **Food Chemistry**, v. 145, p. 272–277, 2014.  
756 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814613011588> doi:  
757 10.1016/j.foodchem.2013.08.074

- 758 YE, Q. et al. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research  
759 stage to commercial food products. **Trends in Food Science & Technology**, v. 78, p. 167–  
760 179, 2018. Disponível em:  
761 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S092422441830013X> doi:  
762 10.1016/j.tifs.2018.05.025
- 763 ZAKARIA, L. et al. Enhancing sustained drug release property of chitosan in spheroids  
764 through crosslinking reaction and coacervation. **Powder Technology**, v. 354, p. 815–821,  
765 2019. Disponível em:  
766 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S003259101930498X> doi:  
767 10.1016/j.powtec.2019.07.006
- 768 ZHANG, Z.-Q. et al. Tannic acid cross-linked gelatin–gum arabic coacervate microspheres  
769 for sustained release of allyl isothiocyanate: Characterization and *in vitro* release study. **Food**  
770 **Research International**, v. 44 (4), p. 1000–1007, 2011. Disponível em:  
771 <https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0963996911001463>  
772 doi:10.1016/j.foodres.2011.02.044
- 773 ZHANG, K. et al. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules  
774 prepared by complex coacervation. **Colloids Surface B Biointerfaces**, v. 89, p. 61-66, 2012.  
775 Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0927776511005017>  
776 doi:10.1016/j.colsurfb.2011.08.023
- 777 ZHAO, X-L. et al. Preparation and Characterization of Microcapsules Encapsulating Octyl  
778 Methoxycinnamate by Complex Coacervation. **Indian J Pharm Sci**; v. 78 (2), p. 193-202,  
779 2016. Disponível em: [http://www.ijpsonline.com/articles/preparation-and-characterization-of-](http://www.ijpsonline.com/articles/preparation-and-characterization-of-microcapsules-encapsulating-octyl-methoxycinnamate-by-complex-coacervation.html)  
780 [microcapsules-encapsulating-octyl-methoxycinnamate-by-complex-coacervation.html](http://www.ijpsonline.com/articles/preparation-and-characterization-of-microcapsules-encapsulating-octyl-methoxycinnamate-by-complex-coacervation.html) doi:  
781 10.4172/pharmaceutical-sciences.1000103
- 782

**5 CAPÍTULO DE LIVRO – RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL DE MICROCÁPSULAS PROBIÓTICAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA**

Capítulo de livro publicado no e-Book **Avanços e Desafios da Nutrição IV**, Capítulo 30, p. 279-286, 2019.



## CAPÍTULO 30

### RESISTÊNCIA AO TRATO GASTROINTESTINAL DE MICROCAPSULAS PROBIÓTICAS OBTIDAS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA

#### Thaiane Marques da Silva

Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos

Santa Maria – Rio Grande do Sul

#### Vandré Sonza Pinto

Universidade Federal de Santa Maria, Curso de Graduação de Tecnologia em Alimentos

Santa Maria – Rio Grande do Sul

#### Carlos Raimundo Ferreira Grosso

Universidade de Campinas, Faculdade de Engenharia de Alimentos

Campinas – São Paulo

#### Cristiane de Bona da Silva

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Farmácia

Santa Maria – Rio Grande do Sul

#### Cristiano Ragagnin de Menezes

Universidade Federal de Santa Maria, Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos

Santa Maria – Rio Grande do Sul

**RESUMO:** O processo de microencapsulação consiste em reter uma substância em um material transportador. Assim, a coacervação complexa tem sido estudada para a proteção de probióticos. Entretanto, suas microcápsulas apresentam-se frágeis sob certas condições. Assim, compostos têm sido utilizados para

se obter estruturas mais resistentes, como a transglutaminase. Além de proteger os probióticos das condições adversas do alimento, o processo de microencapsulação permite que o probiótico permaneça viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Assim, o objetivo desse trabalho foi avaliar a resistência de microcápsulas contendo *Lactobacillus rhamnosus* obtidas por coacervação complexa e reticuladas com transglutaminase frente às condições gastrointestinais simuladas. Dessa forma, as microcápsulas foram produzidas pela técnica de coacervação complexa seguindo metodologia de Marques da Silva et al. (2018). O processo de reticulação com transglutaminase foi realizado seguindo metodologia de Prata et al. (2008). A resistência ao trato gastrointestinal simulado foi realizada segundo Madureira et al. (2011). Observou-se que as microcápsulas sem reticulação liberaram seu conteúdo na etapa referente ao estômago e o probiótico permaneceu viável ( $6,13 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) até o final do processo (íleo). Em relação às microcápsulas reticuladas com transglutaminase, a liberação dos probióticos ocorreu somente na etapa referente ao duodeno ( $8,10 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) para o tratamento 1, permanecendo viável até o íleo ( $8,08 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ), e na etapa referente ao íleo ( $7,85 \log \text{ UFC g}^{-1}$ ) para o tratamento 2. Assim, o processo de reticulação foi extremamente vantajoso, aumentando substancialmente a

resistência das microcápsulas frente ao trato gastrointestinal simulado, aumentando assim, a viabilidade probiótica.

**PALAVRAS-CHAVE:** *Lactobacillus rhamnosus*; microencapsulação; transglutaminase.

**ABSTRACT:** Microencapsulation process consists of retaining a substance in a carrier material. Thus, complex coacervation has been studied for the protection of probiotics. However, its microcapsules are fragile under certain conditions. Thus, compounds have been used to obtain more resistant structures, such as transglutaminase. In addition to protecting probiotics from adverse food conditions, the microencapsulation process allows the probiotic to remain viable during passage through the gastrointestinal tract. Thus, the objective of this work was to evaluate the resistance of microcapsules containing *Lactobacillus rhamnosus* obtained by complex coacervation and crosslinked with transglutaminase against the simulated gastrointestinal conditions. Thus, the microcapsules were produced by the complex coacervation technique following the methodology of Marques da Silva et al. (2018). The transglutaminase crosslinking process was performed following the methodology of Prata et al. (2008). Resistance to the simulated gastrointestinal tract was performed according to Madureira et al. (2011). Non-crosslinked microcapsules were observed to release their contents in the stomach step and the probiotic remained viable ( $6.13 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) until the end of the process (ileum). The transglutaminase crosslinked microcapsules released into the duodenum ( $8.10 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) for treatment 1, remained viable until the ileum ( $8.08 \log \text{CFU g}^{-1}$ ), and in the ileum step ( $7.85 \log \text{CFU g}^{-1}$ ) for treatment 2. Thus, the crosslinking process was extremely advantageous, substantially increasing the resistance of the microcapsules to the simulated gastrointestinal tract, thereby increasing probiotic viability.

**KEYWORDS:** *Lactobacillus rhamnosus*; microencapsulation; transglutaminase.

## 1 | INTRODUÇÃO

O mercado de alimentos funcionais tem crescido consideravelmente nos últimos anos, de 33,0 bilhões em 2000 para 176,7 bilhões de dólares em 2013, sendo responsável por um aumento de 5% no mercado global de alimentos. Esse aumento é associado à busca dos consumidores não só por alimentos que forneçam nutrientes, mas por alimentos que promovam a saúde e o bem-estar (RIBEIRO et al., 2014). Nesse sentido, os probióticos surgem como uma alternativa, pois quando vivos e em quantidades adequadas, conferem efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (LU; PUTRA & LIU, 2018).

Probióticos podem ser definidos como microrganismos vivos que quando administrados em doses adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/OMS, 2001). Atuam no organismo humano interagindo com bactérias comensais e podem ter impacto direto sobre o hospedeiro, com isso, modulam os efeitos das bactérias potencialmente nocivas, causam impacto no trato gastrointestinal, na digestão, no metabolismo e no sistema imunológico do hospedeiro (BINNS, 2013).

O processo de microencapsulação consiste em reter uma substância (agente ativo) em um material transportador (material de parede) (DEVI et al., 2016). Além de proteger os probióticos das condições adversas presentes no suco de fruta, a microencapsulação permite que o probiótico permaneça viável durante a passagem pelo trato gastrointestinal e que chegue no local de ação (cólon) em quantidades adequadas (ERATTE et al., 2018).

A técnica mais antiga de microencapsulação é a coacervação complexa. Esta técnica consiste na separação de fases entre biopolímeros carregados com cargas opostas através da interação eletrostática. Os coacervados geralmente são produzidos a partir de proteínas e polissacarídeos, assim, podem ter uma ampla gama de funcionalidades em vários produtos (EGHBAL & CHOUDHARY, 2018).

Apesar da coacervação complexa ser uma técnica amplamente utilizada, as microcápsulas obtidas por coacervação complexa são também conhecidas por serem frágeis sob certas condições. Sendo assim, alguns compostos têm sido utilizados com o intuito de se obter estruturas mais resistentes. Entre estes compostos, está a transglutaminase (COMUNIAN et al., 2016).

A transglutaminase é uma enzima que catalisa reações de reticulação entre lisina e glutamina, aumentando a estabilidade das microcápsulas por reforçar a estrutura interna das mesmas (MURPHY; FARKAS; JONES, 2017). A transglutaminase promove alterações significativas como melhoramento da textura, estabilidade, gelificação, potencial de emulsificação e capacidade de ligação à água, sem alteração negativa na qualidade sensorial e nutricional (GHARIBZAHEDI et al., 2017). Além disso, em estudos com probióticos, a transglutaminase demonstrou não ter influência negativa no crescimento das células bacterianas (PAVUNC et al., 2011), além de aumentar a resistência de microcápsulas probióticas expostas ao suco gástrico e propiciar maior liberação em suco intestinal (YEW et al., 2011).

Diante do exposto, ressalta-se a importância do presente trabalho no sentido de melhorar as microcápsulas obtidas por coacervação complexa, para que se possa com isso, aumentar a viabilidade dos probióticos. Sendo assim, o objetivo deste trabalho é desenvolver microcápsulas probióticas por coacervação complexa induzida pela reticulação enzimática, analisando estas microcápsulas frente às condições adversas do trato gastrointestinal simulado.

## 2 | METODOLOGIA

Até o momento da utilização, os *Lactobacillus rhamnosus* foram armazenados sob congelamento (-18°C) em freezer. Para ativá-los, pesou-se 1 g dos mesmos e adicionou-se em 100 mL de caldo MRS, incubando por 16 horas, a 37°C. Após, a cultura ativada foi centrifugada a 2470 x g, a 4°C, por 15 minutos e lavada com solução de NaCl (0,85%) por duas vezes. As células foram então suspensas em solução salina

para obtenção de aproximadamente  $10 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ .

Para produção das microcápsulas, foi utilizada a metodologia descrita por Marques da Silva et al. (2018). Primeiramente, a cultura ativada foi adicionada a 100 mL de gelatina 2,5%, mantendo sob agitação com agitador magnético com aquecimento (Centauro, Paraná, Brasil) ( $48\text{-}50^\circ\text{C}$ ) por 10 minutos para homogeneização dos microorganismos. Após essa etapa, foram adicionados 100 mL de goma arábica 2,5% e 400 mL de água destilada estéril, mantendo sob agitação e aquecimento ( $50 \pm 2^\circ\text{C}$ ); ajustando em seguida o pH para 4,0, com solução de ácido clorídrico (HCl) 0,1M. Após esta etapa, o aquecimento foi desligado, mantendo-se sob agitação, deixando-se esfriar naturalmente a aproximadamente  $30^\circ\text{C}$ , e após, o abaixamento da temperatura foi realizado até atingir a temperatura de  $12 - 10^\circ\text{C}$ , com auxílio de banho de gelo. Foi realizada a sedimentação e o coacervado foi retirado por filtração em peneira com porosidade de 0,038 mm (400 mesh).

A reticulação enzimática foi realizada de acordo com Prata et al. (2008), com modificação. A enzima transglutaminase (Ajinomoto, 100 U/g de atividade) foi adicionada às microcápsulas prontas na concentração de 2,5 e 5,0 U/g de proteína, que corresponderam aos tratamentos 1 e 2, respectivamente. A reação foi realizada a  $25^\circ\text{C}$  durante 15 horas sob agitação constante.

Após, a sobrevivência das culturas probióticas microencapsuladas submetidas às condições gástricas e entéricas simuladas foram avaliadas de acordo com a metodologia descrita por Madureira et al. (2011), com modificações. Nesta técnica, a viabilidade das microcápsulas probióticas será avaliada sequencialmente em meios que simulam as diferentes seções do trato gastrointestinal (esôfago/estômago, duodeno e íleo). Para esta análise, foram utilizadas alíquotas de 1 g de microcápsulas. Na etapa esôfago-estômago foram utilizados  $25 \text{ mg.mL}^{-1}$  de pepsina (Sigma), preparada em HCl 0,1 N; esta solução foi adicionada, em alíquotas iguais, durante toda a fase gástrica, a uma concentração de  $0,05 \text{ mL.mL}^{-1}$  durante 90 min, a 130 rpm; sendo o pH ajustado até 2,0 utilizando HCl 1 M. Na etapa referente ao duodeno foi utilizada, a uma concentração de  $0,25 \text{ mL.mL}^{-1}$ , uma solução contendo  $2 \text{ g.L}^{-1}$  de pancreatina (Sigma) e  $12 \text{ g.L}^{-1}$  de sais biliares bovinos (Sigma), preparadas em  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, por 20 minutos, a 45 rpm. Finalmente, a etapa referente ao íleo foi realizada por um aumento do pH para 6,5 utilizando uma solução de  $\text{NaHCO}_3$  0,1 M, por 90 minutos, a 45 rpm. Todas as soluções foram preparadas no momento da utilização e esterilizadas com membrana de poro  $0,20 \mu\text{m}$  (Minisart, Sartorius Stedim Biotech, Alemanha). A análise foi conduzida em uma incubadora refrigerada tipo Shaker (TE-421, Tecnal, Brasil) mantida a  $37^\circ\text{C}$  com o intuito de simular a temperatura do corpo humano e agitação mecânica foi utilizada em paralelo para simular os movimentos peristálticos intestinais, com intensidades semelhantes às alcançadas em cada seção do trato digestivo. Ao final de cada etapa, foram retiradas alíquotas para a contagem das células viáveis. Os resultados foram expressos em  $\log \text{ UFC.mL}^{-1}$ .

### 3 | RESULTADOS

Os resultados obtidos para a exposição das microcápsulas ao trato gastrointestinal simulado estão expressos no Gráfico 1.

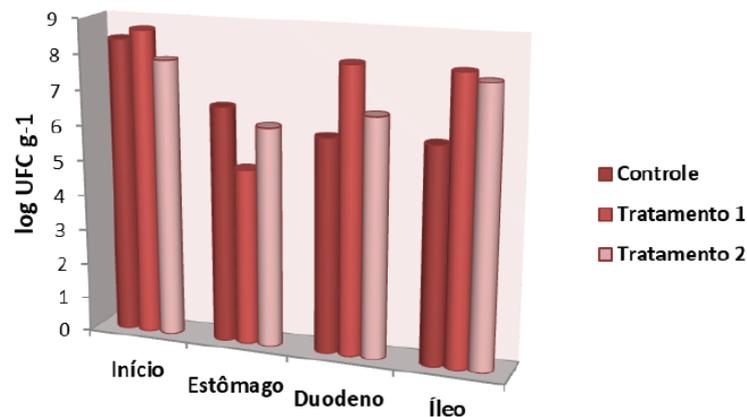


Gráfico 1 – Exposição das microcápsulas ao trato gastrointestinal simulado. Controle – microcápsulas sem reticulação; tratamento 1 – microcápsulas reticuladas com 2,5 U de enzima/g de proteína; tratamento 2 - microcápsulas reticuladas com 5 U de enzima/g de proteína

Observa-se por meio do Gráfico 1 que as microcápsulas sem reticulação (tratamento controle) não ofereceram uma maior proteção aos probióticos frente ao trato gastrointestinal simulado, pois liberaram todo seu conteúdo na etapa referente ao estômago, apresentando contagens de células viáveis de 8,14 log UFC g<sup>-1</sup> no início do processo e 6,13 log UFC g<sup>-1</sup> na etapa referente ao íleo, resultando em uma redução de aproximadamente 2 log UFC g<sup>-1</sup>.

Em relação às microcápsulas reticuladas com transglutaminase, para o tratamento 1 observa-se que os probióticos foram liberados das microcápsulas na etapa referente ao duodeno (8,10 log UFC g<sup>-1</sup>), apresentando contagens de células viáveis de 8,70 log UFC g<sup>-1</sup> no início do processo e permanecendo viável até o íleo (8,08 log UFC g<sup>-1</sup>). Já para o tratamento 2, os probióticos foram liberados das microcápsulas somente na etapa referente ao íleo, apresentando contagens de células viáveis de 7,89 log UFC g<sup>-1</sup> no início do processo e 7,85 log UFC g<sup>-1</sup> no final do processo.

### 4 | DISCUSSÃO

A microencapsulação dos probióticos é um método emergente para reduzir a perda da viabilidade celular durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como uma alternativa de liberação controlada no trato intestinal (COOK; CHARALAMPOULOS; TZORTZIS & KHUTORYANSKIY, 2012).

Comparando-se os tratamentos 1 e 2 ao tratamento controle, nota-se uma proteção substancialmente maior nos tratamentos 1 e 2, pois os probióticos foram liberados das microcápsulas somente nas etapas referentes ao duodeno e íleo, respectivamente, em contrapartida ao controle que liberou os probióticos na etapa referente ao estômago, o que não é desejável devido aos probióticos apresentarem sensibilidade ao suco gástrico, o que pode levar a perda da sua viabilidade devido ao pH extremamente ácido (COOK; CHARALAMPOULOS; TZORTZIS & KHUTORYANSKIY, 2012; ZANJANI; TARZI; SHARIFAN & MOHAMMADI, 2014), como é demonstrado no tratamento controle.

Em relação aos tratamentos 1 e 2, o resultado era esperado, pois a transglutaminase faz ligações cruzadas entre as proteínas, resultando em uma maior resistência à parede das microcápsulas devido ao aumento da sua estabilidade e permitindo que elas só sejam rompidas no trato intestinal (COOK; CHARALAMPOULOS; TZORTZIS & KHUTORYANSKIY, 2012; MURPHY; FARKAS & JONES, 2017). Além disso, este comportamento é adequado aos probióticos, pois é interessante que eles sejam liberados somente na etapa intestinal para que os probióticos cheguem ao intestino grosso em quantidades adequadas para garantir a sua colonização e proliferação (SHORI, 2017).

Os resultados estão de acordo com Marques da Silva et al. (2018) onde foram observadas reduções nas contagens de células viáveis de *Bifidobacterium lactis* encapsulado por coacervação complexa e expostos a condições gastrointestinais simuladas. Etchepare et al. (2016) também observaram o mesmo comportamento ao encapsular *L. acidophilus* por gelificação iônica e expor as microcápsulas à condições gastrointestinais simuladas.

Em relação ao processo de reticulação com transglutaminase, resultado similar ao presente trabalho foi encontrado por Chen, Li, Liu & Meng (2017) ao utilizar a transglutaminase para induzir a gelificação iônica na microencapsulação de *L. bulgaricus*. Neste estudo, foi observado que quando as microcápsulas foram expostas ao trato gastrointestinal simulado, as microcápsulas começaram a liberar seu conteúdo no suco gástrico ( $7,5 \log \text{UFC g}^{-1}$ ) e tendo sua liberação total no suco intestinal ( $9,3 \log \text{UFC g}^{-1}$ ). Este resultado afirma que o processo de reticulação com transglutaminase é eficiente em oferecer maior resistência às microcápsulas e, conseqüentemente, maior proteção aos probióticos.

## 5 | CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante do exposto, o processo de coacervação complexa associada à reticulação com transglutaminase mostrou-se adequado, aumentando consideravelmente a resistência das microcápsulas frente ao trato gastrointestinal simulado e assim, protegendo de forma eficaz os probióticos.

## REFERÊNCIAS

- BINNS, N. (2013). **Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal**. Europe Concise Monograph Series, ILSI – International Life Sciences Institute, p. 1-44.
- CHEN, H.-Y.; LI, X.-Y.; LIU, B.-J. & MENG, X.-H. (2017). **Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions**. Journal of Functional Foods, v. 29, p. 248-255.
- COMUNIAN, T. A.; GOMEZ-ESTACA, J.; FERRO-FURTADO, R.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAES, I. C. F.; CASTRO, I. A. & FAVARO-TRINDADE, C. S. (2016). **Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules**. Carbohydrate Polymers, v. 150, p. 319-329.
- COOK, M. T.; CHARALAMPOPOULOS, D.; TZORTZIS, G. & KHUTORYANSKIY, V. V. (2012). **Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery**. Journal of Controlled Release, v. 162, p. 56-67.
- DEVI, N.; SARMAH, M.; KATHUN, B. & MAJI, T. K. (2016). **Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates**. Advances in Colloid and Interface Science.
- EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. (2018). **Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems**. LWT - Food Science and Technology, v. 90, p. 254-264.
- ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C. J. & ADHIKARI, B. (2018). **Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review**. Trends in Food Science & Technology, v. 71, p. 121-131.
- 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. (2016). **Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate**. Food Science and Technology, v. 65, p. 511-517.
- 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](http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf)>. Acesso em: 10 jan. 2019. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation].
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; GEORGE, S. & ROOHINEJAD, S. (2017). **Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review**. International Journal of Biological Macromolecules, v. 107, p. 2364-2374.
- LU, Y.; PUTRA, S. D. & LIU, S.-Q. (2018). **A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast**. International Journal of Food Microbiology, v. 265, p. 1-8.
- MADUREIRA, A. R., AMORIM, M., GOMES, A. M., PINTADO, M. E. & MALCATA, F. X. (2011). **Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions**. Food Research International, 44, 465-470.
- MARQUES DA SILVA, T.; LOPES, E. J.; CODEVILLA, C. F.; CICHOSKI, A. J.; FLORES, E. M. M.; MOTTA, M. H.; SILVA, C. B.; GROSSO, C. R. F. & MENEZES, C. R. (2018). **Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying**. LWT - Food Science and Technology, v. 90, p. 412-417.
- MURPHY, R. W.; FARKAS, B. E. & JONES, O. G. (2017). **Effect of crosslinking on the physical and chemical properties of  $\beta$ -lactoglobulin (Blg) microgels**. Journal of Colloid and Interface Science, v. 505, p. 736-744.

PAVUNC, A. L.; BEGANOVIC, J.; KOS, B.; BUNETA, A.; BELUHAN, S. & SUSKOVIC, J. (2011). **Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt.** International Journal of Dairy Technology, v. 64, p. 254-261.

PRATA, A. S.; ZANIN, M. H. A.; RÉ, M. I. & GROSSO, C. R. F. (2008). **Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatina-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil.** Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, v. 67, p. 171-178.

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

SHORI, A. B. (2017). **Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit.** Hayati Journal of Biosciences, v. 24, p. 1-5.

YEW, S.; LIM, T.; LEW, L.; BHAT, R.; MAT-EASA, A. & MIN-TZE, L. (2011). **Development of a probiotic delivery system from agrowastes, soy protein isolate, and microbial transglutaminase.** Journal of Food Science, v. 76, p. 108-115.

ZANJANI, M. A. K.; TARZI, B. G.; SHARIFAN, A. & MOHAMMADI, N. (2014). **Microencapsulation of probiotics by calcium alginate-gelatinized starch with chitosan coating and evaluation of survival in simulated human gastro-intestinal condition.** Iranian Journal of Pharmaceutical Research, v. 13, p. 843-852.

**6 ARTIGO 1 – THE EFFECT OF ENZYMATIC CROSSLINKING ON THE VIABILITY OF PROBIOTIC BACTERIA (*Lactobacillus acidophilus*) ENCAPSULATED BY COMPLEX COACERVATION**

Artigo publicado na Revista **Foos Research International**, v. 125, 108577, 2019.





Contents lists available at ScienceDirect

Food Research International

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/foodres](http://www.elsevier.com/locate/foodres)



## The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation



Thaiane Marques da Silva<sup>a</sup>, Cassandra de Deus<sup>a</sup>, Bruna de Souza Fonseca<sup>a</sup>, Eduardo Jacob Lopes<sup>a</sup>, Alexandre José Cichoski<sup>a</sup>, Erick Almeida Esmerino<sup>c</sup>, Cristiane de Bona da Silva<sup>b</sup>, Edson Irineu Muller<sup>d</sup>, Erico Marlon Moraes Flores<sup>d</sup>, Cristiano Ragagnin de Menezes<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Food Science and Technology, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>b</sup> Department of Industrial Pharmacy, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

<sup>c</sup> Department of Food, Federal University Rural Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil

<sup>d</sup> Department of Chemistry, Federal University of Santa Maria, Santa Maria, Brazil

### ARTICLE INFO

#### Keywords:

Microencapsulation  
Probiotics  
Transglutaminase

### ABSTRACT

*Lactobacillus acidophilus* were encapsulated by complex coacervation followed by transglutaminase crosslinking, aiming to improve the resistance of the microcapsules and improve the protection for probiotics. Subsequently, microcapsules were dried by freeze drying. The encapsulation efficiency, morphology, thermal resistance, gastrointestinal simulation and storage stability were analysed for wet and dry forms. The treatments offered high encapsulation efficiency (68.20–97.72%). Transglutaminase maintained the structure rounded, multinucleate and homogeneous distribution of probiotics in the microcapsules. In relation to the thermal resistance, in general, microencapsulation was effective in protecting and crosslinked microcapsules demonstrated greater protection for probiotics, obtaining viable cell counts of up to  $10 \log \text{CFU g}^{-1}$ , approximately. On exposure to the simulated gastrointestinal tract, microencapsulation coupled to crosslinking demonstrated good results and the dry form was more efficient in the protection and the treatment with greater amount of transglutaminase was highlighted ( $9.07 \log \text{CFU g}^{-1}$ ). As for storage, probiotic viability was maintained for up to 60 days in freezing temperature, with counts of up to  $9.59 \log \text{CFU g}^{-1}$ . The results obtained in the present work are innovative and present a promising alternative for the protection of probiotics and their addition in food products.

### 1. Introduction

Nowadays, the market for functional foods, including probiotics, has been growing considerably (Champagne, Cruz, & Daga, 2018). Hill et al. (2014) define probiotics as, “live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit on the host”. However, the incorporation of probiotics into food is particularly challenging, especially in terms of its stability during processing and storage. Moreover, it is extremely important to avoid undesirable interactions with the food matrix (Ranadheera, Naumovski, & Ajlouni, 2018), as well as ensuring stability without losing functionality until reaching the gastrointestinal tract and releasing them at the site of action (Eratte, Dowling, Barrow, & Adhikari, 2018). Therefore, microencapsulation emerges as an alternative to these barriers.

Microencapsulation is widely known to improve the physical protection and stability of probiotics in food. In addition, microencapsulation has been sought by the food industry as a way to add

value to its products and differentiate itself in the market. In this sense, the food industry should analyze and consider all economic aspects involved, such as technology and coating material appropriate for controlled release, method complexity, feasibility of production to meet consumer specifications and costs for product manufacture, as well, determining whether this technology will have functionality. If economically viable, this technology can enhance the addition of novel food ingredients, provide greater protection for processed food products, enter new market segments, and achieve important goals in this dynamic and ever-changing market (Veršič, 2014). Thus, complex coacervation is being extensively explored and considered promising for the encapsulation of probiotics (Bosnea, Moschakis, & Biliaderis, 2014; Marques da Silva et al., 2018).

However, parameters such as composition and concentration of biopolymers, and environmental conditions may affect the production of the microcapsules and their structure (Bosnea, Moschakis, Nigam, & Biliaderis, 2017). In addition, microcapsules formed by complex

\* Corresponding author.

E-mail address: [cristiano.ufsm@gmail.com](mailto:cristiano.ufsm@gmail.com) (C.R. de Menezes).

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108577>

Received 3 April 2019; Received in revised form 15 July 2019; Accepted 21 July 2019

Available online 23 July 2019

0963-9969/© 2019 Elsevier Ltd. All rights reserved.

coacervation are also known to be fragile under certain conditions. For this reason, specific compounds are used to obtain more resistant structures, such as transglutaminase (Comunian et al., 2016). Transglutaminase is an enzyme widely used to improve functional and texture properties of food (Djoullah, Krechiche, Husson, & Saurel, 2016). It forms intra and intermolecular covalent crosslinks between two amino acid residues in the protein structure, improving the rheological and physical properties of the gel. This process is known as crosslinking and confers significant changes in the protein molecules present in the food matrix, without negatively affecting the sensorial or nutritional quality (Gharibzadeh et al., 2017).

It is noteworthy that *L. acidophilus* has been studied in several applications in food products. Felicio et al. (2016) produced Minas cheese with sodium reduction and added *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* as probiotic cultures, in addition to arginine. It was observed that probiotics presented viability in the product and reduction of sodium and addition of arginine did not affect the technological parameters, as well as probiotic viability. The authors also mentioned that it was possible to develop a product with potentially positive effects on cardiovascular health, emphasizing the importance of the study. However, Batista et al. (2015) produced a probiotic yogurt with *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium longum* and addition of glucose oxidase, in order to compare the product obtained with commercial products, evaluating microbiological, physico-chemical and metabolic activities. It was observed that the addition of glucose oxidase decreases oxidative stress, favoring probiotic viability and that the produced yogurt presented characteristics similar to commercial products. Similarly, Cruz et al. (2013) produced yogurt with addition of probiotics and glucose oxidase and evaluated the storage in plastic packages with different rates of oxygen permeability for 28 days. The authors observed that the addition of glucose oxidase together with packaging with different oxygen permeabilities presented an interesting technological option to reduce the oxidative stress of probiotics and that the product presented a higher degree of post acidification, proteolysis and organic acid production. On the other hand, Gomes (2011) supplemented fresh Minas cheese with *Lactobacillus acidophilus* and evaluated its physical-chemical and sensorial characteristics when compared to a conventional Minas frescal cheese. It was observed that probiotic cheese showed values for appearance, aroma and texture, and that tasters preferred the conventional cheese, indicating that probiotic supplementation had negative sensory effects. Thus, the benefits of microencapsulation over probiotics can be justified.

Given the above, this article aims at developing microcapsules containing *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation, crosslinking these microcapsules with transglutaminase to improve their resistance and increase the viability of probiotics, and performing the drying of these microcapsules by freeze drying. Subsequently, it is intended to characterize the microcapsules, in the wet and dry forms, and to evaluate them in relation to the thermal resistance, the simulated gastrointestinal conditions and the storage under different temperature conditions.

## 2. Material and methods

### 2.1. Reagents

Gelatin type A (Gelita, Germany), gum arabic (CNI, Brazil), Transglutaminase (Ajinomoto, Brazil), *Lactobacillus acidophilus* (Probiotal, Italy), MRS broth (Himedia, India), MRS agar (Kasvi, Brazil).

### 2.2. Inoculum preparation

At this stage, a probiotic culture was activated in MRS broth for 16 h. Then, it was centrifuged at 2470 xg at 4 °C for 15 min and washed with saline solution (0.85%). The cells were then suspended in this

**Table 1**

Conditions of enzymatic crosslinking of *L. acidophilus* microcapsules.

Enzyme concentration (U/g PTN <sup>a</sup> )	Treatment
0.0	Control treatment
2.5	Treatment 1
5.0	Treatment 2

<sup>a</sup> U/g PTN = Unit of enzyme added per gram of protein.

solution to obtain approximately 10 log CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.3. Production of microcapsules by complex coacervation

Microcapsules were produced by complex coacervation, according to the methodology proposed by Marques da Silva et al. (2018). First, the culture was added to 100 mL of 2.5% gelatin, kept under stirring and heating (48–50 °C), for about 10 min. Then, 100 mL of 2.5% gum arabic and 400 mL of sterile distilled water were added, and the pH was adjusted to 4.0. After this step, the heating was turned off, allowing the culture to cool down naturally at about 30 °C (about 1 h), subsequently, temperature lowering was carried out until the temperature reached 10–12 °C with an ice bath, for approximately 30 min. The culture was allowed to settle and the coacervate was removed by filtration.

### 2.4. Crosslinking process

The enzymatic crosslinking was performed according to Prata, Zanin, Ré, and Grosso (2008). The transglutaminase enzyme (Ajinomoto, 100 U/g activity) was added to the ready microcapsules, under the conditions expressed in Table 1. The reaction was carried out at 25 °C during 15 h under constant stirring. The free cell is not part of this process as it is not added enzyme.

### 2.5. Drying microcapsules

The produced microcapsules was frozen (–18 °C for 24 h) on the same day it was produced. The freeze drying of these microcapsules was performed in a lyophilizer (L101, Liotop, Brazil) for 24 h after the beginning of the process (vacuum: 0.200–0.300 µHg and condenser temperature at –37 °C).

### 2.6. Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency (EE) was calculated according to Annan, Borza, and Hansen (2008).

$$EE = (N/N_0) \times 100 \quad (1)$$

where N is the number of viable cells (log CFU g<sup>-1</sup>) released from the microcapsules and N<sub>0</sub> is the number of viable cells (log CFU g<sup>-1</sup>) in the cell concentrate prior to microencapsulation.

### 2.7. Morphological characterization of microcapsules

The morphological characterization was performed by means of microscopy and the mean size of the microcapsules. Optical microscopy of the wet microcapsules was performed using optical microscope (Scope A.1, Zeiss, Germany) equipped with AxioCam MRc digital camera (Carl Zeiss). The morphology of the dried microcapsules was evaluated in Scanning Electron Microscope (Sigma 300 VP, Zeiss, England). The mean size of the wet and dry microcapsules was measured on the Mastersizer 2000 equipment (Malvern, Germany).

### 2.8. Viable cell count

The dilution of the microcapsules consisted of weighing 1 g of wet

microcapsules and 0.1 g of dry microcapsules, followed by the addition of 9 mL of sodium phosphate buffer solution (pH 7.5) according to the methodology described by Sheu, Marshall, and Heymann (1993). Appropriate dilutions were transferred in triplicate to sterile Petri dishes, followed by addition of MRS agar (Kasvi, Paraná, Brazil). The plates were incubated at 37 °C for 72 h in anaerobic jars containing anaerobic generators (Anaerobac, Probac, Sao Paulo, Brazil). The results were expressed in log CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.9. Resistance of microcapsules to simulated gastrointestinal conditions

The simulated gastrointestinal conditions for the microcapsules were performed according to Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, and Malcata (2011), with modifications. Aliquots of 2 g of wet microcapsules and 1 g of dry microcapsules were used.

In the esophagus-stomach stage, 25 mg mL<sup>-1</sup> of pepsin (Sigma) was used; this solution was added, in equal aliquots, throughout the gastric phase (0.05 mL mL<sup>-1</sup>) for 90 min; with the pH being adjusted to 2.0. In the duodenum stage, a solution containing 2 g L<sup>-1</sup> of pancreatin (Sigma) and 12 g L<sup>-1</sup> of bovine bile salts (Sigma) were used at a concentration of 0.25 mL mL<sup>-1</sup>; with the pH adjusted up to 5.0 for 20 min. Finally, the ileum stage was performed for 90 min by raising the pH to 6.5. The analysis was conducted in a refrigerated shaker incubator (TE-421, Tecnal, Brazil) maintained at 37 °C to simulate human body temperature and mechanical agitation was used in parallel to simulate intestinal peristaltic movements. At the end of each stage, aliquots were taken for the viable cell count, according to item 2.2.7. The results were expressed in log CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.10. Resistance of microcapsules to heat treatment

The thermal resistance was performed following the methodology proposed by Zhang, Lin, and Zhong (2015), with modifications. The microcapsules, 1 g of wet and 0.1 g of dried ones, were transferred to 9 mL of peptone water in test tubes. The content was then submitted to the thermal conditions of 63 °C for 30 min and 72 °C for 15 s. Then, the tubes were immediately cooled by immersion on ice for 10 min. Aliquots were collected for the viable cell count, according to item 2.2.7. The results were expressed in log CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.11. Evaluation of microcapsules under different storage conditions

Both wet and dry microcapsules were stored at room temperature (25 °C), refrigeration (7 °C) and freezing (-18 °C) for 120 days, and for comparison, the free cell (without transglutaminase) was included to compare the viability between the crosslinking process and the untreated cells. The viable cell count was performed every 15 days, according to item 2.2.7. The results were expressed in log CFU mL<sup>-1</sup>.

### 2.12. Statistical analysis

For the analyses performed in duplicate, the differences between the means were verified by Student's *t*-test ( $p < .05$ ) using Statistica 7®. For the analyses performed in triplicate, the data were submitted to the analysis of variance (ANOVA) and the differences between the means were verified by the Tukey test ( $p < .05$ ) using Statistica 7®.

## 3. Results and discussion

### 3.1. Encapsulation efficiency

The results obtained are expressed in Table 2. It is observed that, for the wet microcapsules, the treatments presented high encapsulation efficiency. In relation to the dry microcapsules, the control treatment also presented the highest encapsulation efficiency, followed by treatment 1 and treatment 2. These results are promising, since it is expected

**Table 2**

Encapsulation efficiency of *L. acidophilus* microcapsules in the different treatments.

Encapsulation efficiency (%)	Wet	Dry
Control (0.0 U/g PNT)	97.7 ± 2.06 <sup>Aa</sup>	94.4 ± 2.83 <sup>Aa</sup>
Treatment 1 (2.5 U/g PTN)	90.9 ± 0.17 <sup>Ba</sup>	87.1 ± 1.72 <sup>Bb</sup>
Treatment 2 (5.0 U/g PTN)	93.6 ± 2.91 <sup>ABa</sup>	68.2 ± 1.50 <sup>Cb</sup>

Means followed by the same letter, upper case in the column, do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% significance; and lowercase in the row, do not differ statistically from each other by the Student *t*-test at 5% significance. Means obtained in triplicate.

that the microencapsulation technique will be highly efficient.

By comparing the wet and dry forms, it was observed that the control treatment did not present statistical difference; however, treatments 1 and 2 differed from each other. Therefore, it was possible to notice that there was a significant reduction in the viable cell count in these treatments when the microcapsules were dried, which should not be attributed to the transglutaminase, but to the drying process, since the treatments in the wet microcapsules presented high encapsulation efficiency. According to Chen, Li, Liu, and Meng (2017), during the drying process, ice crystals are formed due to slow freezing and removal of the bound water. This can cause injury to membrane cells and protein surfaces, leading to inactivation of the probiotic, which may justify the higher encapsulation efficiencies of the wet microcapsules. The results are in accordance with Eratte et al. (2015), who by encapsulating *L. casei* with and without addition of omega 3 in WPI and gum arabic by complex coacervation followed by freeze drying, obtained 84.95 and 70.23% of encapsulation efficiency, respectively.

### 3.2. Morphological characterization of microcapsules

The results obtained for the mean diameter are presented in Table 3. For the microcapsules in the wet form, treatment 1 presented the smallest mean diameter, and the control treatment and treatment 2 did not differ from each other, but differed from treatment 1. On the other hand, for the dry microcapsules, all treatments differed from each other and the lowest mean diameter obtained was for treatment 2.

Moreover, it can be seen that the transglutaminase crosslinking process did not influence the mean diameter of the wet microcapsules. According to studies found in the literature (Comunian et al., 2016; Prata et al., 2008), the application of crosslinking agents does not influence the mean diameter. Even though in the dry microcapsules, it can be observed that the higher the amount of enzyme, the smaller the mean diameter. Transglutaminase acts by forming intra- and intermolecular covalent crosslinks between amino acid and protein residues (Gharibzadeh et al., 2017), thereby increasing the glutamyl and lysine bonds of the protein structure by enhancing it, which reduces particle expansion.

Comunian et al. (2016) encapsulated chia oil in gelatin and gum arabic (1:1) followed by transglutaminase crosslinking and freeze drying, where the mean diameter analysis of the microcapsules with

**Table 3**

Mean diameter of *L. acidophilus* microcapsules obtained by complex coacervation.

Mean diameter (µm)	Wet	Dry
Control (0.0 U/g PNT)	169.6 ± 0.65 <sup>Ab</sup>	511.7 ± 1.40 <sup>Aa</sup>
Treatment 1 (2.5 U/g PTN)	158.2 ± 0.17 <sup>Bb</sup>	439.2 ± 15.46 <sup>Ba</sup>
Treatment 2 (5.0 U/g PTN)	172.3 ± 1.86 <sup>Ab</sup>	297.2 ± 39.30 <sup>Ca</sup>

Means followed by the same letter, upper case in the column, do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% significance; and lowercase in the row, do not differ statistically from each other by the Student *t*-test at 5% significance. Means obtained in triplicate.

and without crosslinking was performed. Mean diameters of 45.49 and 44.87  $\mu\text{m}$  were observed for the microcapsules with and without crosslinking, respectively. Ribeiro et al. (2014) encapsulated *L. acidophilus* in pectin and whey protein by ionic gelation followed by complex coacervation coating with whey protein concentrate. A mean diameter of 253.3  $\mu\text{m}$  was observed. According to Chen et al. (2017), larger sizes of microcapsules offer greater protection to probiotics, however affect the sensory quality of the product. These studies demonstrate that the results found in the present study are in accordance with the literature.

In relation to the morphology (Fig. 1), the wet microcapsules were multinucleated, with rounded shapes and homogeneous distribution of probiotics. As for the dry microcapsules, the freeze drying provided the formation of porous agglomerates, thus losing the spherical shape. This is a characteristic behaviour of this drying process. It is noteworthy that both the wet and dry microcapsules presented characteristic forms of the process, therefore, the crosslinking process with transglutaminase did not alter the microcapsules in both wet and dry forms.

The results are in accordance with Eratte et al. (2015) who found similar results. Moreover, Comunian et al. (2016) emphasize that the addition of crosslinkers does not influence the outer structure of the microcapsules.

### 3.3. Resistance of microcapsules under simulated gastrointestinal conditions

The results obtained are expressed in Table 4. It is observed that the free cell preserved the viability throughout the gastrointestinal tract. This was expected because the probiotic should colonize the colon to provide its beneficial effects. However, the same was not verified by Ribeiro et al. (2014) when *L. acidophilus* LA-5 cells were submitted to the simulated gastrointestinal tract and presented a survival rate of 5.74  $\log \text{CFU g}^{-1}$  in the intestinal juice. Based on the results, it can be observed that there is a difference in the resistance of probiotics to adverse conditions relevant to the used strain. Thus, microencapsulation may be a solution for probiotics that are more vulnerable.

Regarding microcapsules in the wet form, the probiotic viability of the microencapsulated cells presented a small loss in viability in relation to the free cells due to the microencapsulation process. It was also observed that the control treatment was not as efficient in the protection of probiotics as it released them from the stomach, generating loss in viability until the end of the process. However, if we consider the addition of free cells without the protection of the microcapsules in food, with the adverse conditions encountered in processing and food matrix itself, these free cells can be drastically reduced, which can be avoided with the use of microencapsulation. In contrast, the crosslinked microcapsules were still able to protect the probiotics, mainly against the gastric conditions, releasing the probiotics only from the duodenum, maintaining high probiotic viability until the end of the process, demonstrating the relevance of the use the crosslinking. It can be noted that all treatments differed statistically and treatment 2 offered greater protection to probiotics. For the dry microcapsules, on the other hand, all treatments differed statistically from each other. Comparing the microcapsules in both the wet and dry forms, it was observed that all the treatments presented statistical difference and that the dry form, in treatments 1 and 2, was more efficient in protecting the probiotics.

Moreover, still regarding the wet microcapsules, the control treatment released the probiotics in the stomach; however, they remained viable until the end of the gastrointestinal tract. The result found is in accordance with Marques da Silva et al. (2018), who encapsulated *B. lactis* by complex coacervation and noted that the microcapsules initiated the release of probiotics when they were exposed to the contact with the stomach (5.89  $\log \text{CFU g}^{-1}$ ). It was also verified that they maintained the viability up to the ileum (7.77  $\log \text{CFU g}^{-1}$ ).

In addition, both treatments 1 and 2 initiated the release of probiotics in the stomach, releasing the entire content from the duodenum and maintaining viability in the ileum. Chen et al. (2017) used

transglutaminase to induce ionic gelation to microencapsulate *L. bulgaricus*. By exposing the microcapsules to the simulated gastrointestinal tract, it was observed that probiotics started to be released in the gastric juice (7.5  $\log \text{CFU g}^{-1}$ ) and were fully released in the intestinal juice (9.3  $\log \text{CFU g}^{-1}$ ). This is a similar result to those found in the present study, which states that transglutaminase in the crosslinking process is capable of offering greater resistance to microcapsules and, consequently, greater protection to probiotics. In addition, although the free cell has remained viable throughout the process, treatment 2 is more suitable because it offers greater protection against the stomach, a place considered to be adverse to probiotics due to its extreme acidic.

Regarding the dry microcapsules, the results obtained are similar to those found for the microcapsules in the wet form. However, the dry form proved to be more efficient, since it fully protected the microcapsules in the stage concerning the stomach, with no disruption for all treatments in this place. In this sense, it is worth mentioning the treatment 2, which also protected the microcapsules from rupture in the duodenum and released their contents only in the ileum. In view of the results obtained, it is important to note that the dried form together with the transglutaminase was highly efficient for the resistance of the microcapsules, which can be verified in the Table 4 as non-determined values (ND), which refer to the microcapsules that were not ruptured, thus, not having a viable cell count, demonstrating the protection achieved through the crosslinking together with the drying. This process would be extremely advantageous for the administration of the probiotics, since it is a way to ensure that the probiotics will reach the intestine in large quantities and with high viability, as well as for the addition of probiotics in several adverse food matrices.

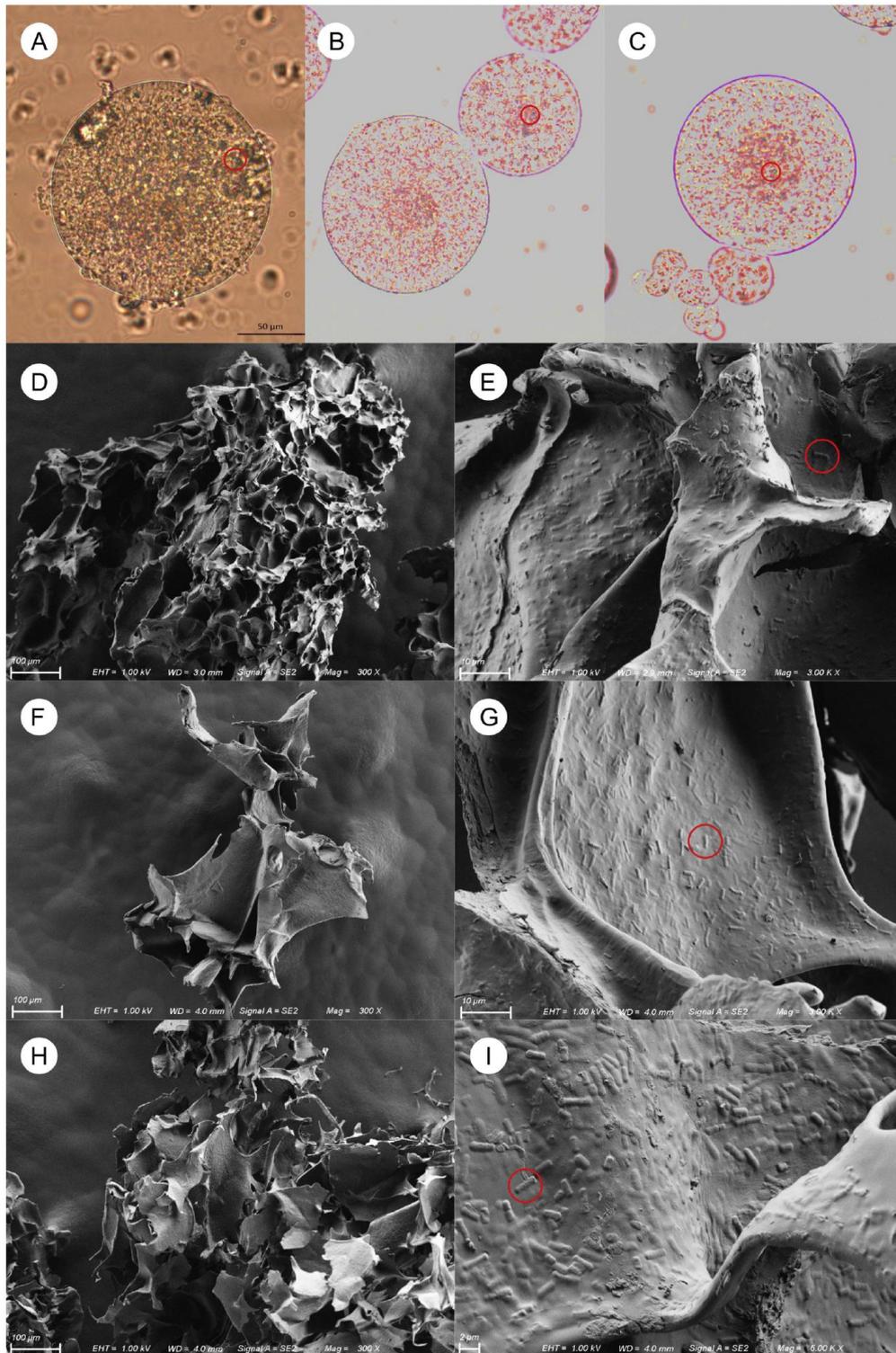
Similarly, Nunes et al. (2018) added hi-maze to the formulation of microcapsules produced by spray drying for the encapsulation of *L. acidophilus* and observed that the survival rate of probiotics increased, with viable cell counts of 10.49  $\log \text{CFU g}^{-1}$  in the stage concerning the ileum. However, Marques da Silva et al. (2018) encapsulated *B. lactis* by complex coacervation followed by freeze drying and found that the microcapsules started to release the contents in the stomach, but probiotics remained viable until the end of the process (8.75  $\log \text{CFU g}^{-1}$ ). Therefore, in view of the studies found in the literature, protection can be related to the combination of the drying process with crosslinking by transglutaminase, since in the studies cited above, the drying process was not effective in improving protection.

### 3.4. Resistance of microcapsules to heat treatment

In the present work, the slow and the quick types of pasteurization were simulated, in order to analyze the resistance of the microcapsules as well as the probiotics under these conditions.

The results obtained for the resistance of the microcapsules to the heat treatment are expressed in Fig. 2, where in the treatment 63  $^{\circ}\text{C}$  30  $\text{min}^{-1}$ , for the wet form, the crosslinked microcapsules presented greater resistance. Treatment 2 proved to be more efficient, when compared to the microcapsules without crosslinking, however, presented no statistical difference in relation to the control treatment. For the dry form, treatments 1 and 2 were significantly more efficient, presenting a statistical difference in relation to the control treatment. In the treatment 72  $^{\circ}\text{C}$  15  $\text{s}^{-1}$ , for the wet form, treatment 2 was substantially more efficient, presenting statistical difference of the other treatments. In relation to the dry form, all the treatments were efficient, but the treatments 1 and 2 were outstanding, nevertheless, all the treatments did not present any difference among themselves. Furthermore, the dry form is highlighted, because when compared especially to the control treatment, it promoted greater protection and viability of the probiotics. In this sense, taking into account the food manufacturing process, the use of transglutaminase can be extremely advantageous, as it will offer greater resistance to the microcapsules, which will facilitate the processing.

Bosnea, Moschakis, Nigam, and Biliaderis (2017) encapsulated *L.*



**Fig. 1.** Optical and scanning electron microscopy of *Lactobacillus acidophilus* microcapsules in wet and dry forms, respectively. Wet control treatment (40 $\times$ ) (A); wet treatment 1 (40 $\times$ ) (B); wet treatment 2 (40 $\times$ ) (C); dry control treatment (300 $\times$ ) (D); dry control treatment (3000 $\times$ ) (E); dry treatment 1 (300 $\times$ ) (F); dry treatment 1 (3000 $\times$ ) (G); dry treatment 2 (300 $\times$ ) (H); dry treatment 2 (3000 $\times$ ) (I). Red circles indicate the presence of probiotics. (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Table 4

Behaviour of *L. acidophilus* after microencapsulation process exposed to simulated gastrointestinal conditions (log CFU g<sup>-1</sup>).

	Wet				Dry			
	Initial	Stomach	Duodenum	Ileum	Initial	Stomach	Duodenum	Ileum
Free cell	9.21 ± 0.03 <sup>Ab</sup>	8.77 ± 0.07 <sup>Ad</sup>	9.83 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	9.09 ± 0.02 <sup>Ac</sup>	9.21 ± 0.03 <sup>Bb</sup>	8.77 ± 0.07 <sup>Ad</sup>	9.83 ± 0.01 <sup>Aa</sup>	9.09 ± 0.02 <sup>Bc</sup>
Control	8.40 ± 0.13 <sup>Cb</sup>	6.71 ± 0.07 <sup>Bd</sup>	6.08 ± 0.05 <sup>Ce</sup>	6.13 ± 0.03 <sup>Ce</sup>	9.03 ± 0.08 <sup>Ca</sup>	ND <sup>a</sup>	6.06 ± 0.03 <sup>Be</sup>	8.04 ± 0.03 <sup>Cc</sup>
Treatment 1	8.58 ± 0.20 <sup>Cc</sup>	6.75 ± 0.10 <sup>Be</sup>	8.09 ± 0.02 <sup>Bd</sup>	8.05 ± 0.05 <sup>Bd</sup>	9.78 ± 0.03 <sup>Aa</sup>	ND <sup>a</sup>	4.22 ± 0.04 <sup>Cf</sup>	9.49 ± 0.01 <sup>Ab</sup>
Treatment 2	8.84 ± 0.12 <sup>Bb</sup>	4.98 ± 0.16 <sup>Cd</sup>	8.20 ± 0.18 <sup>Bc</sup>	8.08 ± 0.06 <sup>Bc</sup>	9.46 ± 0.12 <sup>Ba</sup>	ND <sup>a</sup>	ND <sup>a</sup>	9.07 ± 0.07 <sup>Bb</sup>

Means followed by the same letter, uppercase in the column and lowercase in the row, do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% significance. Means obtained in triplicate.

\* Not Determined: Microcapsules were not disrupted during the process

*plantarum* and *L. paracasei* in WPI and gum arabic by complex coacervation and analysed the behaviour of the microcapsules exposed to the heat treatment at 65 °C 30 min<sup>-1</sup>. A low survival of approximately 2.6 and 2.0 log CFU g<sup>-1</sup>, respectively, was observed. By comparing these results with the results obtained in the present study, it can be concluded that the transglutaminase crosslinking process offered a higher resistance to the microcapsules, thus offering greater protection to probiotics.

Furthermore, the results obtained are in accordance with Zhang et al. (2015) who observed higher survival of *L. salivarius* at 72 °C 15 s<sup>-1</sup>, which justifies that the pasteurization process at high temperature and in a shorter time is preferable for encapsulated probiotics, since the heat stability may be explained by the low rate of water diffusion. In addition, it is not only the heating that causes injury to probiotic cells, but also the destruction of water molecules that are bound to the cell surface.

Moreover, in the dry form, the probiotic presented greater viability, except in the control treatment in slow pasteurization. Therefore, for both the slow and quick pasteurization, it is recommended to use the dry microcapsule in order to resist the heat, conferring greater viability to the probiotic.

The best results presented in our study differ in relation to others found in the literature due to the differences in the heat treatment conditions, the bacterial strains and the environment involving the probiotic cells, that is, the type of microcapsule and, in this case, transglutaminase crosslinking (Zhang et al., 2015).

### 3.5. Evaluation of microcapsules under different storage conditions

Fig. 3 shows the effect of freezing (-18 °C), refrigeration (7 °C) and room (25 °C) temperature on the viability of wet and dry encapsulated *L. acidophilus*.

At freezing temperature, wet microcapsules (Fig. 3.A) remained viable for 60 days, with viable cell counts of 9.59 log CFU.g<sup>-1</sup> for the control treatment, 8.49 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 1 and 8.19 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 2. Microcapsules in dry form (Fig. 3.B) also remained viable for 60 days, with viable cell counts of 8.51 log CFU.g<sup>-1</sup>

for the control treatment, 6.66 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 1 and 6.76 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 2. The results showed that the wet form was more efficient in the protection of probiotics because there are losses during the drying process, mainly due to the slow freezing and among treatments, the control treatment was the most efficient, probably due to its higher encapsulation efficiency.

The results obtained are in accordance with the ones found by Chen et al. (2017), in which *L. bulgaricus* remained viable for 60 days in microcapsules produced by emulsion with transglutaminase-induced gelation and alginate coating exposed to storage under freezing temperature. In addition, these authors state that the low storage temperature was favourable to maintain cell viability, because lower temperatures reduce the metabolic activities of the probiotic, thus reducing harmful chemical reactions.

At refrigeration temperature storage, the wet microcapsules (Fig. 3.C) remained viable for 60 days, with viable cell counts of 6.09 log CFU.g<sup>-1</sup> for the control treatment, 7.80 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 1 and 6.53 log CFU.g<sup>-1</sup> for treatment 2. On the other hand, in the dry microcapsules (Fig. 3.D), the control treatment maintained viability for 60 days, with viable cell counts of 7.44 log CFU.g<sup>-1</sup> and treatments 1 and 2 maintained viability for 30 days, with viable cell counts of 7.05 and 6.95 log UFC.g<sup>-1</sup>, respectively. Additionally, treatments 1 and 2, which contain transglutaminase crosslinking, were more efficient for the wet microcapsules, since the control treatment was more efficient for the dry microcapsules. Thus, we can consider that the wet form offered greater protection, highlighting transglutaminase crosslinking in this condition.

Bosnea et al. (2014) encapsulated *L. paraplantarum* and *L. paracasei* by complex coacervation and stored the microcapsules at refrigeration temperature for 60 days. They found that probiotics survived at a rate of approximately 9.5 and 9.0 log CFU.g<sup>-1</sup>, respectively. Likewise, Bosnea, Moschakis, and Biliaderis (2017) encapsulated *L. paracasei* by complex coacervation and observed the viability of probiotics for 45 days at refrigeration temperature, identifying a survival rate of 7.14 log CFU.g<sup>-1</sup>.

At room temperature storage, for wet microcapsules (Fig. 3.E), the control treatment remained viable for 60 days, with viable cell counts of

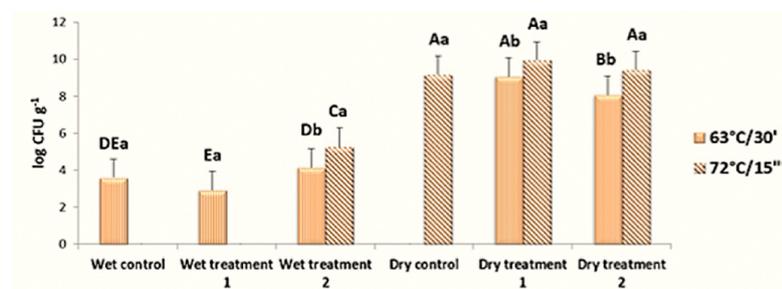


Fig. 2. Resistance of *L. acidophilus* microcapsules to heat treatment. Wet control - microcapsule without addition of enzyme in the wet form; wet treatment 1 - microcapsule with addition of 2.5 U enzyme/g protein in wet form; wet treatment 2 - microcapsule with addition of 5 U enzyme/g protein in the wet form; dry control - microcapsule without addition of enzyme in dry form; dry treatment 1 - microcapsule with addition of 2.5 U enzyme/g protein in the dry form; dry treatment 2 - microcapsule with addition of 5 U enzyme/g protein in the dry form. Means followed by the same letter, upper case for wet and dry forms and lower for temperatures, do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% significance. Means obtained in triplicate.

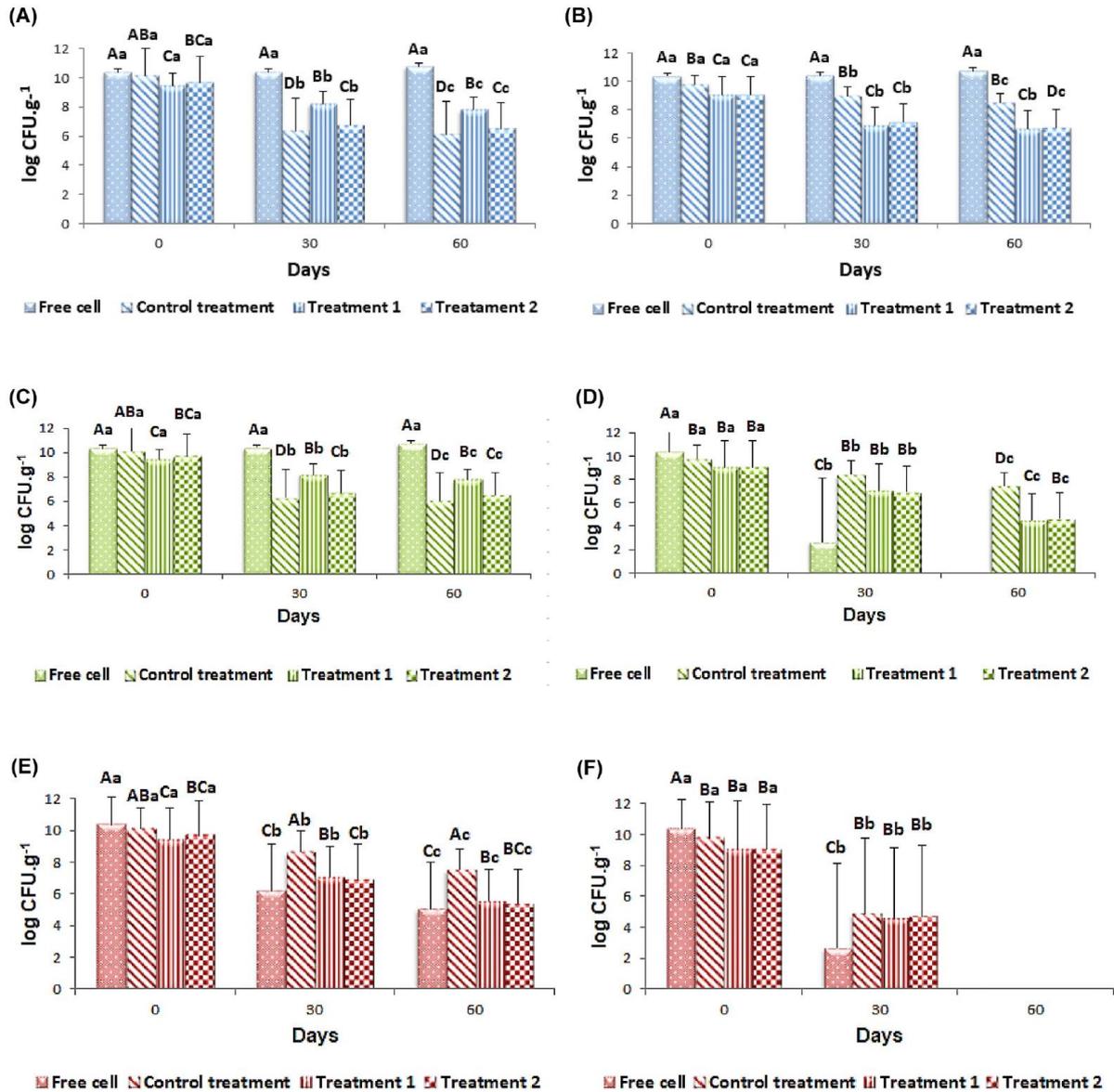


Fig. 3. Storage at different temperatures of *L. acidophilus* microcapsules. Freezing temperature for wet form (A) and dry (B); Refrigeration temperature for wet form (C) and dry (D); Room temperature for wet form (E) and dry (F). Control treatment - microcapsules without enzyme addition; treatment 1 - microcapsule with addition of 2.5 U enzyme/g protein; treatment 2 - microcapsule with addition of 5 U enzyme/g protein. Means followed by the same letter, uppercase for treatments and lowercase between treatments, do not differ statistically from each other by the Tukey test at 5% significance. Means obtained in triplicate.

7.54 log CFU.g<sup>-1</sup>, however, treatments 1 and 2 maintained viability for 30 days with viable cell counts of 7.06 log CFU.g<sup>-1</sup> and 6.94 log CFU.g<sup>-1</sup>, respectively. As for the dry microcapsules (Fig. 3.F), probiotics lost viability in < 30 days for the treatments.

Witzler, Pinto, Valdez, Castro, and Cavallini (2017) encapsulated *E. faecium* by extrusion and complex coacervation followed by freeze drying and observed that the probiotics encapsulated by the extrusion technique did not even survive for 14 days, and the probiotics encapsulated by coacervation survived at a rate of 6.93 log CFU.g<sup>-1</sup> for 266 days. These results show that the survival of probiotics is dependent on the strain and microencapsulation technique used.

Comparing the storage temperatures used, it can be noticed that in the dry form there were larger losses in probiotic viability for all treatments. Besides that, the cells presented higher survival in freezing temperature, even the free cell showed to be highly resistant in this condition. Marques da Silva et al. (2018) also found greater viability in the wet microcapsules of *B. lactis* produced by complex coacervation when compared to the dry microcapsules. These authors state that drying may cause some kind of injury to probiotic cells and thereby interfere with their survival during storage. In addition, the higher survival in freezing temperature is justified by the fact that this temperature offers better stability to the probiotics.

In relation to the fact that the free cell survival is greater than some of the treatments in some storage conditions, no data in the literature was found. Nevertheless, this may be related to the probiotic strain. Bosnea et al. (2014) found a survival rate of approximately 5.3 and 6.0 log CFU.g<sup>-1</sup> for *L. paraplantarum* and *L. paracasei*, respectively, stored for 60 days at refrigeration temperature. On the other hand, Chen et al. (2017) observed that *L. bulgaricus* free cells lost viability in < 14 days at 37 °C.

Furthermore, transglutaminase is not interfering with the survival of probiotics. Gharibzadeh and Chronakis (2018) added transglutaminase to yogurt and observed that the enzyme provided a higher growth rate of the microorganisms used during the fermentation, besides protecting the starter culture and the probiotic cells in the yogurt.

#### 4. Conclusion

Finally, transglutaminase crosslinking proved to be an effective way to increase the viability of probiotics by improving the resistance of microcapsules in comparison to microcapsules without crosslinking, especially in the wet form, demonstrating the importance and relevance of this work. However, the importance of drying together with crosslinking when microcapsules are exposed to heat treatment and simulated gastrointestinal conditions is the most appropriate way to use microcapsules in processes that use high temperatures, such as pasteurization. In addition, this may also facilitate processing, with proper handling, as well as the administration of probiotics. Finally, in most cases, the crosslinking has showed to be advantageous and promising for complex coacervation, being highly appropriate for the improvement of the microcapsules.

#### Acknowledgements

We thank Coordination for the Improvement of Higher Education Personnel-CAPES/1 for the financial support.

#### References

- Annan, N. T., Borza, A. D., & Hansen, L. T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis*15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, *41*, 184–193.
- Batista, A. L. D., et al. (2015). Quality parameters of probiotic yogurt added to glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical-chemical and metabolic activity analyses. *Food Research International*, *77*(3), 627–635.
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2014). Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. *Food and Bioprocess Technology*, *7*, 2767–2781.
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., & Biliaderis, C. G. (2017). Microencapsulated cells of *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* in biopolymer complex coacervates and their function in a yogurt matrix. *Food & Function*, *8*, 554–562.
- Bosnea, L. A., Moschakis, T., Nigam, P. S., & Biliaderis, C. G. (2017). Growth adaptation of probiotics in biopolymer-based coacervate structures to enhance cell viability. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 282–289.
- Champagne, C. P., Cruz, A. G., & Daga, M. (2018). Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. *Current Opinion in Food Science*, *22*, 160–166.
- Chen, H.-Y., Li, X.-Y., Liu, B.-J., & Meng, X.-H. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Functional Foods*, *29*, 248–255.
- Comunian, T. A., Gomez-Estaca, J., Ferro-Furtado, R., Conceição, G. J. A., Moraes, I. C. F., Castro, I. A., & Favaro-Trindade, C. S. (2016). Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, *150*, 319–329.
- Cruz, A. G., et al. (2013). Stability of probiotic yogurt added with glucose oxidase in plastic materials with different permeability oxygen rates during the refrigerated storage. *Food Research International*, *51*(2), 723–728.
- Djoullah, A., Krechiche, G., Husson, F., & Saurel, R. (2016). Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment. *Food Chemistry*, *190*, 197–200.
- Eratte, D., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. (2018). Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. *Trends in Food Science & Technology*, *71*, 121–131.
- Eratte, D., McKnight, S., Gengenbach, T. R., Dowling, K., Barrow, C. J., & Adhikari, B. P. (2015). Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates. *Journal of Functional Foods*, *19*, 882–892.
- Felicio, T. L., et al. (2016). Physico-chemical changes during storage and sensory acceptance of low sodium probiotic Minas cheese added with arginine. *Food Chemistry*, *196*, 628–637.
- Gharibzadeh, S. M. T., & Chronakis, I. S. (2018). Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. *Food Chemistry*, *245*, 620–632.
- Gharibzadeh, S. M. T., Koubaa, M., Barba, F. J., Greiner, R., George, S., & Roohinejad, S. (2017). Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, *107*, 2364–2374.
- Gomes, A. A. (2011). Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. *Journal of Dairy Science*, *94*, 4777–4786.
- Hill, C., et al. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Consensus Statement*, *11*, 506–514.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, *44*, 465–470.
- Marques da Silva, T., Lopes, E. J., Codevilla, C. F., Cichoski, A. J., Flores, E. M. M., Motta, M. H., ... Menezes, C. R. (2018). Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, *90*, 412–417.
- Nunes, G. L., Etchepare, M. A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., ... Menezes, C. R. (2018). Inulin,hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, *89*, 128–133.
- Prata, A. S., Zanin, M. H. A., Ré, M. I., & Grosso, C. R. F. (2008). Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probeplus vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, *67*, 171–178.
- Ranadheera, C. S., Naumovski, N., & Ajlouni, S. (2018). Non-bovine milk products as emerging probiotic carriers: Recent developments and innovations. *Current Opinion in Food Science*, *22*, 109–114.
- Ribeiro, M. C. E., Chaves, K. S., Gebara, C., Infante, F. N. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. *Food Research International*, *66*, 424–431.
- Sheu, T. Y., Marshall, R. T., & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microencapsulation. *Journal of Dairy Science*, *76*, 1902–1907.
- Veršič, R. J. (2014). Chapter 32 - The economics of microencapsulation in the food industry. *Microencapsulation in the food industry - A practical implementation guide* (pp. 409–417).
- Witzler, J. J. P., Pinto, R. A., Valdez, G. F., Castro, A. D., & Cavallini, D. C. U. (2017). Development of a potential probiotic lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183. *LWT - Food Science and Technology*, *77*, 193–199.
- Zhang, Y., Lin, J., & Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, *71*, 9–15 v.

**7 MANUSCRITO 2 – VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus*  
MICROENCAPSULADOS POR COACERVAÇÃO COMPLEXA ASSOCIADA À  
RETICULAÇÃO ENZIMÁTICA SOB APLICAÇÃO EM DIFERENTES SUCOS DE  
FRUTA**

Manuscrito formatado de acordo com as normas para submissão da revista Food Research International.



## 1 Resumo

2

3 O objetivo desse estudo foi produzir microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-  
4 02 por coacervação complexa seguida de reticulação com transglutaminase e avaliar o efeito  
5 da adição em diferentes sucos de fruta, além da viabilidade probiótica e dos sucos de fruta  
6 durante armazenamento. Para isso, os *L. acidophilus* foram microencapsulados por  
7 coacervação complexa, seguida de reticulação com transglutaminase em diferentes  
8 concentrações. Os probióticos, nas formas livre e microencapsulada, foram adicionados ao  
9 suco de laranja e ao suco de maçã em concentrações de 10 e 30%. As microcápsulas obtidas  
10 foram caracterizadas quanto à morfologia. A viabilidade dos probióticos, os efeitos de sua  
11 adição nos sucos de fruta e a caracterização desses sucos (pH e sólidos solúveis totais) foram  
12 realizadas durante 63 dias de armazenamento a 4°C. O suco de laranja se mostrou mais  
13 adequado à adição dos probióticos, sendo que a sobrevivência dos probióticos está  
14 diretamente relacionada ao pH. As microcápsulas exerceram efeito protetor aos *L.*  
15 *acidophilus*, prolongando sua sobrevivência e o processo de reticulação se mostrou adequado  
16 e promissor, assegurando a viabilidade probiótica. Assim, o processo de coacervação  
17 complexa associado à reticulação enzimática induzida propiciou a proteção dos *L. acidophilus*  
18 nos diferentes sucos de fruta, se mostrando uma metodologia adequada para a adição dos  
19 probióticos nessa matriz alimentícia adversa, garantido a sobrevivência dos *L. acidophilus* por  
20 até 63 dias e gerando produtos com apelo probiótico inovadores e promissores.

21 Palavras-chave: probióticos, microencapsulação, transglutaminase, suco de laranja, suco de  
22 maçã, armazenamento.

23

## 24 1 Introdução

25

26 Os alimentos funcionais têm despertado cada vez mais o interesse dos consumidores  
27 devido à busca por uma alimentação mais saudável. É comprovado por evidências científicas  
28 que os probióticos proporcionam inúmeros benefícios à saúde do hospedeiro, podendo  
29 protegê-lo frente a uma ampla gama de doenças, desde infecções a doenças psicológicas e até  
30 degenerativas, justificando o interesse crescente por esses alimentos, principalmente nas  
31 últimas décadas (Horáčková et al., 2018; Ester et al., 2019).

32 Os probióticos, geralmente, estão disponíveis em lácteos, pois este tipo de alimento  
33 possui excelentes condições para a manutenção da sua viabilidade, principalmente por possuir  
34 quantidades elevadas de proteínas e considerável quantidade de lipídios. Entretanto, esse pode  
35 ser considerado um fator limitante para o consumo dos probióticos se considerarmos a  
36 intolerância à lactose, alergias à proteína do leite, prevalência de colesterol elevado e o  
37 vegetarianismo (Lebaka et al., 2018). Nesse sentido, maior atenção é dada aos sucos de fruta  
38 devido ao seu alto conteúdo de compostos bioativos, sendo assim, considerados saudáveis e  
39 seu consumo por todas as faixas etárias (Horáčková et al., 2018). Dessa forma, o  
40 desenvolvimento de um suco probiótico é de extrema relevância.

41 No entanto, a adição de probióticos a sucos de frutas se torna difícil devido ao baixo  
42 pH dos sucos de frutas, além de apresentarem quantidades insuficientes de alguns peptídeos e  
43 aminoácidos livres necessários aos probióticos, nem sempre sendo adequados à aplicação dos  
44 probióticos (Antunes et al., 2013; Nualkaekul et al. 2013). Assim, a microencapsulação dos  
45 probióticos pode ser uma estratégia promissora por protegê-los de condições adversas  
46 encontradas nas matrizes alimentícias, como os sucos de fruta.

47 Para a microencapsulação de probióticos, a coacervação complexa demonstra ser uma  
48 técnica extremamente relevante por demonstrar alta eficiência de encapsulação e a proteção

49 dos mesmos (Marques da Silva et al., 2018). Essa técnica consiste em interações iônicas entre  
50 dois ou mais polímeros de cargas opostas, geralmente proteínas e polissacarídeos, que levam à  
51 formação de coacervados e a separação de fases (Timilsena et al., 2019).

52 No entanto, alguns parâmetros podem afetar a estrutura das microcápsulas formadas  
53 pela coacervação complexa e estas podem apresentar fragilidade sob certas condições  
54 (Comunian et al., 2016; Da Silva et al, 2019). Por esta razão, a reticulação associada à  
55 coacervação vem sendo aplicada. Entre os processos de reticulação, a reticulação enzimática  
56 vem sendo utilizada e, entre reticulantes enzimáticos amplamente utilizados, está a  
57 transglutaminase. Esta enzima atua formando ligações cruzadas intra e intermoleculares entre  
58 dois aminoácidos residuais presentes na estrutura da proteína, conferindo propriedades  
59 reológicas e físicas melhoradas, trazendo mudanças significativas para a molécula de proteína,  
60 sem afetar negativamente a qualidade sensorial e nutricional do produto (Da Silva et al.,  
61 2019).

62 Existem recentes pesquisas envolvendo probióticos e transglutaminase. Mituniewicz-  
63 Małek, Ziarno & Dmytrów (2014) estudaram o efeito da transglutaminase na viabilidade de  
64 *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb-12 no leite de cabra  
65 fermentado sob armazenamento a 5°C. Não foi observada influência positiva da  
66 transglutaminase na viabilidade dos probióticos nas amostras de leite de cabra fermentado.  
67 Contudo, os probióticos permaneceram acima de 6 log UFC g<sup>-1</sup> após 8 semanas de  
68 armazenamento a 5°C. Atualmente, há também investigações envolvendo a coacervação  
69 complexa, nesse sentido. Da Silva et al. (2019) estudaram o efeito da reticulação com  
70 transglutaminase na resistência de microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus*  
71 produzidas por coacervação complexa e na viabilidade probiótica, e avaliaram estas  
72 microcápsulas frente a resistência térmica, condições gastrointestinais simuladas e  
73 armazenamento sob diferentes temperaturas. Foi observado que a reticulação com

74 transglutaminase provou ser um meio efetivo no aumento da viabilidade probiótica por  
75 melhorar a resistência das microcápsulas, demonstrando ser eficiente frente às condições  
76 adversas avaliadas.

77 Porém, existem poucos estudos sobre a aplicação de compostos encapsulados em  
78 alimentos e a liberação de coacervados na matriz alimentar. Portanto, é necessária uma maior  
79 investigação sobre o processo e a aplicação da coacervação complexa na indústria de  
80 alimentos (Eghbal & Choudhary, 2018). Além disso, não foram encontradas investigações  
81 envolvendo o estudo da reticulação de microcápsulas probióticas produzidas por coacervação  
82 complexa e sua aplicação em sucos de fruta, destacando a relevância do nosso estudo.

83 Sendo assim, o objetivo do presente trabalho consistiu em produzir microcápsulas  
84 contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-02 por coacervação complexa seguida de reticulação  
85 com transglutaminase e avaliar o efeito da adição em diferentes sucos de fruta, bem como  
86 avaliar viabilidade probiótica e dos sucos de fruta sob armazenamento em refrigeração.

87

## 88 2 Material e Métodos

89

### 90 2.1 Cultura probiótica e preparo do inóculo

91 A cultura comercial probiótica liofilizada *L. acidophilus* LA-02 (Probiotal, Itália) foi  
92 gentilmente doada pela Coana Importação e Exportação Ltda. *L. acidophilus* LA-02 (1g) foi  
93 ativado por meio de incubação em caldo MRS (Merck, Alemanha) por 17 horas a 37°C. A  
94 cultura resultante foi centrifugada a 2470 x g por 15 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi então  
95 descartado e a cultura probiótica foi lavada duas vezes com solução salina 0,85%. Após a  
96 lavagem, a cultura probiótica foi suspensa nessa solução para obter aproximadamente 10 log  
97 UFC mL<sup>-1</sup>.

98

## 99 2.2 Processo de encapsulação e reticulação

100 A microencapsulação e a reticulação foram realizadas de acordo com a metodologia de  
101 Da Silva et al. (2019). A suspensão probiótica foi adicionada a solução de gelatina 2,5%  
102 (Gelita, Alemanha), sob agitação e aquecimento ( $48\pm 2^\circ\text{C}$ ). Em seguida, a solução de goma  
103 arábica 2,5% (CNI, Brasil) foi adicionada juntamente com a água destilada, mantendo a  
104 agitação e o aquecimento, e o pH foi ajustado para 4,0. Após o ajuste de pH, a agitação foi  
105 mantida e foi realizado o resfriamento natural até  $30^\circ\text{C}$  sendo, em seguida, adicionado um  
106 banho de gelo para o abaixamento rápido da temperatura até  $10^\circ\text{C}$ . Para a realização do  
107 processo de reticulação, a enzima transglutaminase (100 U/g de atividade, Ajinomoto, Brasil)  
108 foi adicionada às microcápsulas produzidas nas concentrações de 2,5 e 5,0 U/g de proteína,  
109 separadamente, correspondendo aos Tratamentos 1 e 2, respectivamente. As reações foram  
110 realizadas a  $25^\circ\text{C}$  por 15 horas, sob agitação constante.

111

## 112 2.3 Incorporação dos probióticos nos sucos de fruta

113 Os sucos de fruta de laranja e maçã (Natural One, Brasil) comercialmente disponíveis  
114 foram obtidos no mercado local de Santa Maria, RS, Brasil e foram avaliados como veículo  
115 para fornecimento dos probióticos. Para cada suco (laranja e maçã), 10 mL foram transferidos  
116 para tubos com tampa, estéreis, juntamente com a adição dos probióticos: 1g em 10 mL de  
117 suco de fruta, que corresponde a concentração de 10% de probióticos e, 3g em 10 mL de suco  
118 de fruta, que corresponde a concentração de 30% de probióticos, seguido de armazenamento a  
119  $4^\circ\text{C}$ ; amostras controle foram compostas por somente 10 mL de suco. Na Tabela 1, estão  
120 expressas todas as combinações estudadas.

121

122 Tabela 1 – Adição dos probióticos aos sucos de fruta (laranja e maçã)

Tratamento	Suco com 10% de probiótico		Suco com 30% de probiótico	
	Probiótico (g)	Suco (mL)	Probiótico (g)	Suco (mL)
Controle	0	10	0	10
Célula livre	1	10	3	10
Microcápsulas sem reticulação*	1	10	3	10
Tratamento 1 ( 2,5 U/g)*	1	10	3	10
Tratamento 2 (5,0 U/g)*	1	10	3	10

123 \*Para todas as formulações foram utilizadas microcápsulas na forma úmida.

124

#### 125 2.4 Viabilidade probiótica durante armazenamento por 63 dias a 4°C

126 Os probióticos, tanto na forma livre como nos diferentes tratamentos com  
 127 microcápsulas, foram armazenados nos sucos de fruta a 4°C por 63 dias. A análise da  
 128 viabilidade probiótica foi realizada em 0, 35 e 63 dias de armazenamento.

129 Para a determinação da viabilidade das células livres nos sucos de fruta, os sucos de  
 130 fruta foram levemente agitados, retirou-se 1 mL e realizou-se as diluições. Para a  
 131 determinação da viabilidade a partir das microcápsulas, os sucos de fruta foram previamente  
 132 centrifugados em centrífuga refrigerada (Hitachi, Japão) a 1.088 x g, 4°C por 7 minutos, para  
 133 a separação das microcápsulas dos sucos; após a centrifugação, foi pesado 1 g de  
 134 microcápsula e adicionado 9 mL de solução tampão de fosfato de sódio (pH 7,5), seguido de  
 135 rompimento em agitador com aquecimento, a 37°C por 10 minutos. Após esse processo,  
 136 retirou-se 1 mL e realizou-se a análise de determinação de viabilidade. A determinação da  
 137 viabilidade probiótica foi realizada de acordo com a metodologia descrita por Sheu, Marshall  
 138 & Heymann (1993). A partir das diluições iniciais, diluições decimais seriadas foram  
 139 realizadas e as diluições apropriadas foram transferidas em triplicata para placas de Petri  
 140 estéreis, seguidas pela adição de ágar MRS (Kasvi, Brasil). As placas foram incubadas a 37°C

141 por 72 horas em jarras de anaerobiose contendo geradores de anaerobiose (Anaerobac,  
142 Probac, Brasil). Os resultados foram expressos em log UFC mL<sup>-1</sup>.

143

#### 144 2.5 Análise morfológica das microcápsulas

145 Para monitorar as mudanças morfológicas nas microcápsulas durante o  
146 armazenamento por 63 dias a 4°C nos sucos de fruta, juntamente com as análises de  
147 viabilidade probiótica foi realizada a microscopia óptica utilizando microscópio óptico (Scope  
148 A.1, Zeiss, Alemanha) acoplado com câmera digital AxioCam MRc.

149

#### 150 2.6 Monitoramento de pH e sólidos solúveis totais dos sucos de fruta

151 Para avaliar se os sucos de fruta sofreram alguma modificação durante o  
152 armazenamento com a adição dos probióticos foi realizada a medição de pH por pHmetro  
153 (Digimed, Brasil) e sólidos solúveis totais (SST) por refratômetro de bancada (Nova, Brasil),  
154 em 0, 35 e 63 dias de armazenamento.

155

#### 156 2.5 Análises estatísticas

157 Os resultados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) e as diferenças entre  
158 as médias das triplicatas foram verificadas pelo teste de Tukey ( $p < 0.05$ ) utilizando o software  
159 Statistica 7.0® (Tulsa, OK, EUA). A análise multivariada de cluster foi utilizada para  
160 determinar a similaridade entre os sucos de fruta. Foram utilizadas na análise a ligação única  
161 como regra de amálgama e as distâncias euclidianas como medida de similaridade.

162

163

164

165

## 166 3 Resultados e Discussão

167

168 3.1 Viabilidade dos probióticos adicionados aos sucos de fruta durante armazenamento a 4°C  
169 por 63 dias

170 Os resultados obtidos para a viabilidade dos *L. acidophilus* durante armazenamento a  
171 4°C por 63 dias estão expostos na Tabela 2.

172 A partir dos resultados expressos na Tabela 2, destacam-se as maiores viabilidades dos  
173 probióticos no decorrer do período de armazenamento presentes nos sucos de laranja (8,12 log  
174 UFC mL<sup>-1</sup>). De acordo com Champagne & Gardner (2008) acredita-se que a sobrevivência de  
175 cepas probióticas em suco de frutas está relacionada ao pH, sendo valores próximos a 4,0  
176 mais adequados. Por isso, o suco de laranja (pH 3,99) mostrou ser mais adequado aos  
177 probióticos em relação ao suco de maçã (pH 3,65). Além disso, Horáčková et al. (2018)  
178 afirmam que a seleção do tipo de suco é um fator determinante para a estabilidade dos  
179 probióticos adicionados. Em seu estudo, observaram que o suco de abacaxi (pH 3,8) se  
180 mostrou mais adequado que o suco de morango (pH 3,2) para a sobrevivência de  
181 *Bifidobacterium lactis* por 28 dias de armazenamento refrigerado.

182 Também se pode considerar que além da viabilidade probiótica estar diretamente  
183 relacionada às características da matriz alimentícia, está também relacionada à cepa  
184 probiótica. Ding & Shah (2008) analisaram a viabilidade de *L. acidophilus* em suco de  
185 laranja a 4°C, observando a sobrevivência dos probióticos por aproximadamente 14 dias;  
186 Nualkaekul et al. (2012) analisaram a viabilidade de *L. plantarum* em suco de romã a 4°C,  
187 obtendo 21 dias de sobrevivência; e Sohail et al. (2012) analisaram a viabilidade de *L.*  
188 *acidophilus* em suco de laranja a 4°C, observando a sobrevivência dos probióticos também  
189 por 21 dias.

190

191 Tabela 2 – Viabilidade probiótica (log UFC mL<sup>-1</sup>) durante 63 dias de armazenamento a 4°C nos diferentes sucos de fruta.

SUCO DE LARANJA								
Tempo (d)	CL(L10)	C(L10)	T1(L10)	T2(L10)	CL(L30)	C(L30)	T1(L30)	T2(L30)
0	9,60±0,01 <sup>aB</sup>	8,91±0,11 <sup>Ac</sup>	8,70±0,23 <sup>aCD</sup>	8,00±0,09 <sup>aE</sup>	9,88±0,05 <sup>aA</sup>	8,49±0,05 <sup>aD</sup>	7,92±0,02 <sup>aE</sup>	8,64±0,01 <sup>aCD</sup>
35	7,95±0,44 <sup>bA</sup>	8,35±0,04 <sup>Ba</sup>	8,31±0,02 <sup>aA</sup>	6,56±0,01 <sup>bBC</sup>	6,95±0,11 <sup>bB</sup>	7,96±0,02 <sup>bA</sup>	6,36±0,04 <sup>bC</sup>	8,05±0,05 <sup>bA</sup>
63	3,94±0,14 <sup>cE</sup>	5,93±0,23 <sup>Cc</sup>	7,20±0,17 <sup>bB</sup>	6,23±0,05 <sup>cC</sup>	5,41±0,04 <sup>cD</sup>	7,41±0,06 <sup>cB</sup>	2,66±0,10 <sup>cF</sup>	8,12±0,02 <sup>bA</sup>
SUCO DE MAÇÃ								
Tempo (d)	CL(M10)	C(M10)	T1(M10)	T2(M10)	CL(M30)	C(M30)	T1(M30)	T2(M30)
0	7,01±0,09 <sup>aE</sup>	9,05±0,08 <sup>Aa</sup>	7,11±0,25 <sup>aE</sup>	8,44±0,02 <sup>aB</sup>	8,34±0,03 <sup>aBC</sup>	8,10±0,09 <sup>aC</sup>	7,69±0,04 <sup>aD</sup>	7,50±0,02 <sup>aD</sup>
35	5,95±0,02 <sup>bD</sup>	8,27±0,34 <sup>bA</sup>	5,27±0,08 <sup>bE</sup>	5,31±0,27 <sup>bE</sup>	6,57±0,11 <sup>bC</sup>	5,00±0,15 <sup>bF</sup>	7,68±0,10 <sup>aB</sup>	6,63±0,02 <sup>bC</sup>
63	3,92±0,03 <sup>cC</sup>	6,10±0,13 <sup>Ca</sup>	2,40±0,17 <sup>cE</sup>	3,32±0,11 <sup>cD</sup>	4,01±0,19 <sup>cC</sup>	5,00±0,22 <sup>bB</sup>	5,09±0,19 <sup>bB</sup>	3,36±0,04 <sup>cD</sup>

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

193 CL(L10) – Célula livre na concentração de 10%, CL(L30) – Célula livre na concentração de 30%, C(L10) - Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10%, C(L30) –  
 194 Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30%, T1(L10) – Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(L30) – Tratamento 1 na concentração de 30%, T2(L10) –  
 195 Tratamento 2 na concentração de 10%, T2(L30) – Tratamento 2 na concentração de 30%, CL(M10) – Célula livre na concentração de 10%, CL(M30) – Célula livre na  
 196 concentração de 30%, C(M10) - Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10%, C(M30) – Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30%, T1(M10) –  
 197 Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(M30) – Tratamento 1 na concentração de 30%, T2(M10) – Tratamento 2 na concentração de 10%, T2(M30) – Tratamento 2 na  
 198 concentração de 30%.

199

200 Com relação às formas livre e microencapsulada, foi observado que os *L. acidophilus*,  
201 em sua maioria, apresentaram maior viabilidade quando adicionados aos sucos de fruta na  
202 forma microencapsulada, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), demonstrando que o  
203 acondicionamento dos *L. acidophilus* em uma microcápsula formada por coacervação  
204 complexa com gelatina – goma arábica como revestimentos, é protetor o suficiente para  
205 prolongar sua sobrevivência. Esse resultado era esperado, visto que as microcápsulas são  
206 utilizadas para melhorar a sobrevivência dos probióticos nos produtos alimentícios  
207 (Nualkaekul et al., 2012; Horáčková et al., 2018), atuando como uma barreira de proteção  
208 contra as condições adversas dos sucos de fruta, como pH, ácidos e oxigênio. Da mesma  
209 forma, Calabuig-Jiménez et al. (2019) observaram que microcápsulas formadas com alginato  
210 foram capazes de proteger *L. salivarius*, aumentando sua sobrevivência em suco de tangerina.  
211 Rodrigues et al. (2012) encapsularam *L. paracasei* em alginato pela técnica de extrusão e  
212 adicionaram as microcápsulas a sucos de fruta de laranja e pêssago, analisando a proteção  
213 fornecida pelas microcápsulas e a viabilidade dos probióticos por 50 dias. Foi observado que  
214 as microcápsulas protegeram os probióticos durante os 50 dias, proporcionando uma alta  
215 viabilidade em ambos os sucos de fruta ( $9-10,5 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ ).

216 Além disso, os resultados encontrados para as microcápsulas reticuladas, inicialmente,  
217 foram similares aos encontrados para as microcápsulas sem reticulação, não apresentando  
218 diferenças significativas ( $p > 0,05$ ). Entretanto, ao longo do período de armazenamento, a  
219 reticulação provou ser essencial para prolongar a viabilidade dos probióticos, em relação aos  
220 outros tratamentos. Este é um ponto extremamente positivo e relevante, pois até o momento, a  
221 proteção de bactérias probióticas em microcápsulas de gelatina e goma arábica formadas pela  
222 técnica de coacervação complexa, principalmente associada à reticulação, e posterior  
223 aplicação em sucos de fruta é uma alternativa inovadora. Assim, o processo de reticulação  
224 mostra-se adequado em associação à coacervação complexa, assegurando a viabilidade dos

225 probióticos. Este fato é confirmado por Da Silva et al. (2019) que utilizaram a reticulação com  
226 transglutaminase para melhorar a resistência das microcápsulas contendo *L. acidophilus*  
227 produzidas por coacervação complexa, bem como a proteção aos probióticos. Foi observado  
228 por esses autores que os *L. acidophilus* permaneceram viáveis por 60 dias em armazenamento  
229 sob refrigeração.

230       Essa proteção inicialmente semelhante às microcápsulas sem reticulação ( $p > 0,05$ )  
231 pode ter ocorrido por alguns fatores limitantes em relação à transglutaminase, como a  
232 quantidade de enzima utilizada, a complexação da goma arábica e da gelatina, o estado de  
233 gelificação da gelatina e, conseqüentemente, sua baixa mobilidade na temperatura do processo  
234 de reação de reticulação. Também pode ser levado em conta para justificar esse  
235 comportamento a formação de uma rede descontínua de proteínas após a reticulação  
236 enzimática, característico de filmes compostos por gelatina e tratados com transglutaminase  
237 (Prata et al., 2008). Ademais, de acordo com Prata et al. (2008) e Lv et al. (2014) a reticulação  
238 proveniente da transglutaminase é considerada fraca, não sendo tão eficaz no controle da taxa  
239 de liberação. Contudo, pode-se observar que a reticulação com transglutaminase foi eficiente  
240 em nosso trabalho, com destaque para o Tratamento 2 na concentração de 30% em suco de  
241 laranja, pois protegeu os probióticos até o final do período de armazenamento (63 dias) com  
242 viabilidade muito alta ( $8,12 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ ). Esse resultado está de acordo com a análise  
243 multivariada de cluster que definiu este tratamento como o mais adequado à viabilidade  
244 probiótica (Figura 1).

245       Ainda é possível ressaltar que, nos sucos de laranja, com exceção do Tratamento 1 na  
246 concentração de 30%, as microcápsulas foram eficientes em proteger os *L. acidophilus*,  
247 assegurando sua sobrevivência por 63 dias, com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) e que  
248 apesar do Tratamento 1 não ter mantido a viabilidade probiótica por 63 dias, ele foi capaz de  
249 proteger os probióticos por até 35 dias, com  $6,36 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ . Em contrapartida, nos sucos

250 de maçã, somente o tratamento sem reticulação na concentração de 10% foi capaz de manter a  
251 viabilidade probiótica até o final do armazenamento (63 dias) com a viabilidade de 6,10 log  
252 UFC mL<sup>-1</sup>, apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) (Tabela 2).

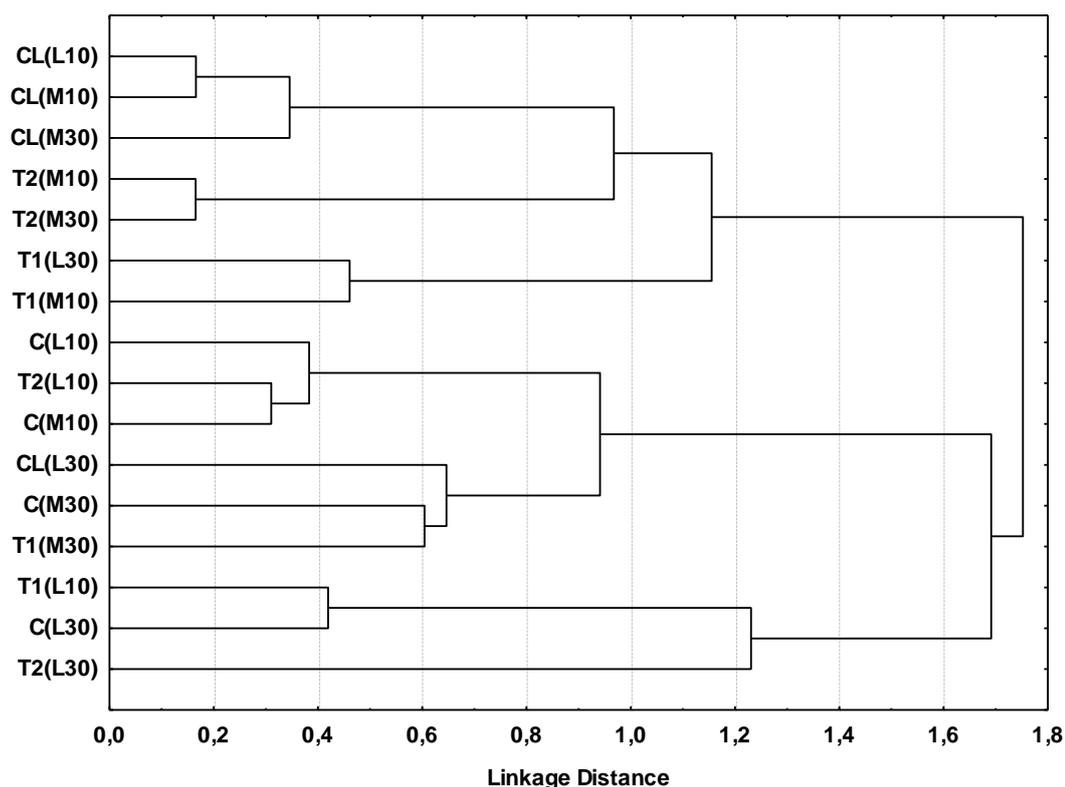
253 Ademais, em relação às concentrações de *L. acidophilus* adicionados aos sucos de  
254 fruta, podemos ressaltar que o aumento na concentração não está atrelado ao aumento da  
255 viabilidade dos probióticos, não apresentando diferenças significativas ( $p > 0,05$ ) e que a  
256 concentração de 10% já seria suficiente para o fornecimento dos probióticos na quantidade  
257 estipulada pela legislação ( $> 6 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ ) para que o consumidor tenha os benefícios  
258 oriundos dos probióticos (Brasil, 2008). No entanto, no suco de maçã, a maior concentração  
259 de probióticos associado à reticulação (tratamento 1) favoreceu o aumento da viabilidade  
260 probiótica, com diferença significativa ( $p < 0,05$ ) resultando em 7,68 log UFC mL<sup>-1</sup> em 35 dias  
261 de armazenamento (Tabela 2).

262

### 263 3.1.2 Comparações: Análise multivariada

264 A análise estatística multivariada de cluster vem sendo amplamente utilizada para  
265 desenvolver taxonomias, no intuito de organizar os dados observados em estruturas  
266 significativas (Francisco et al., 2010).

267 Na Figura 1 está exposto o dendograma da viabilidade probiótica para os diferentes  
268 tratamentos nos sucos de fruta. O dendograma mostra dois conjuntos de clusters visivelmente  
269 aparentes: cluster 1 (CL(L10), CL(M10), CL(M30), CL(L10), T2(M10), T2(M30), T1(L30),  
270 T1(M10)) e cluster 2 (C(L10), T2(L10), C(M10), CL(L30), C(M30), T1(M30), (T1(L10),  
271 C(L30), (T2(L30)). Contudo, no cluster 1 é possível observar a formação de três subclusters:  
272 subcluster 1 (CL(L10), CL(M10), CL(M30)), subcluster 2 (T2(M10), T2(M30)), subcluster 3  
273 (T1(L30), T1(M10)), no cluster 2 há a formação de dois subclusters: subcluster 4 (C(L10),  
274 T2(L10), C(M10), (CL(L30), C(M30), T1(M30)), subcluster 5 (T1(L10), C(L30), (T2(L30)).



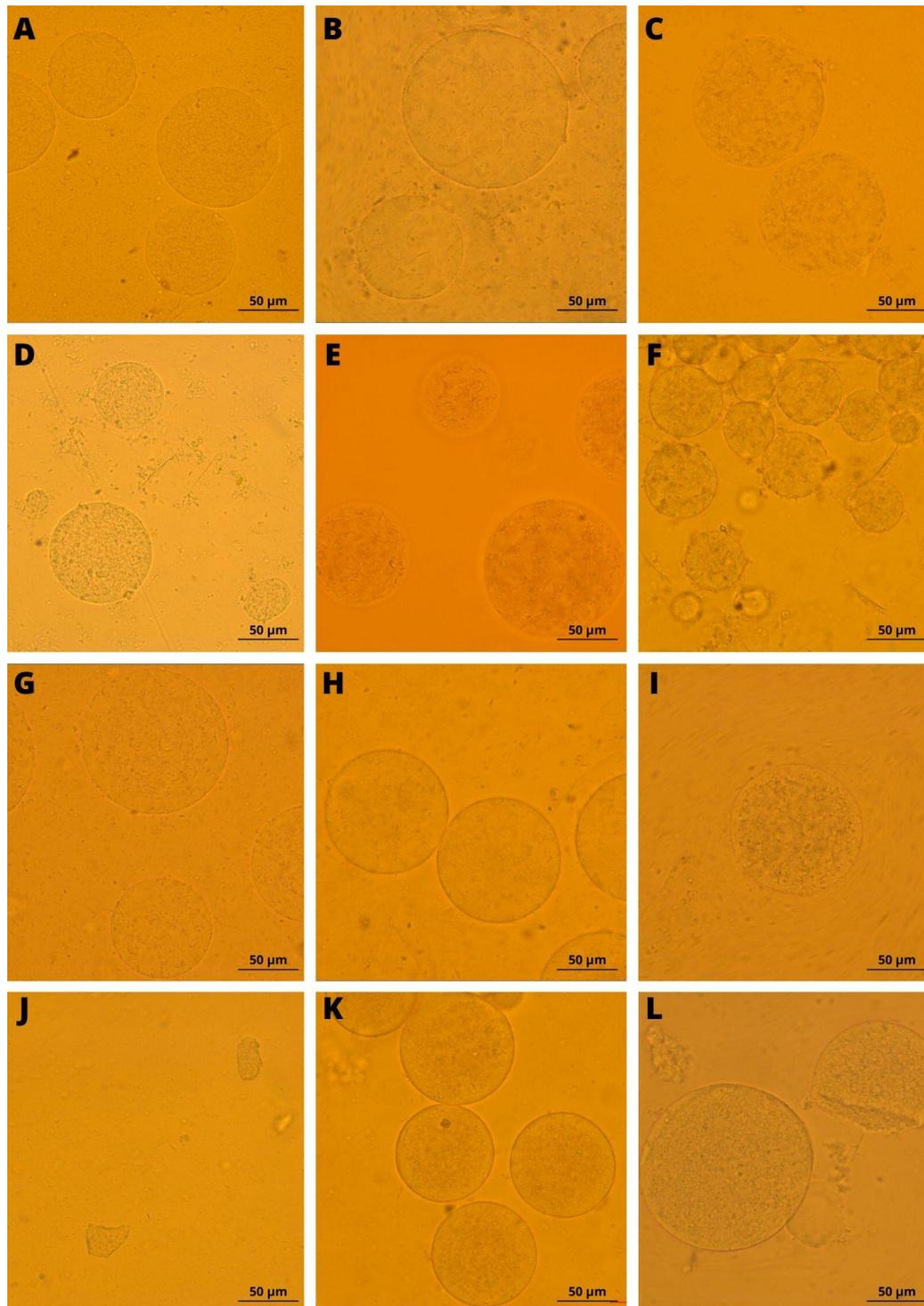
275

276 Figura 1 – Dendrograma de cluster para viabilidade probiótica no 63º dia de armazenamento a 4°C nos diferentes  
 277 sucos de fruta. CL(L10) – Célula livre na concentração de 10%, CL(L30) – Célula livre na concentração de 30%,  
 278 C(L10) - Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10%, C(L30) – Microcápsulas sem reticulação na  
 279 concentração de 30%, T1(L10) – Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(L30) – Tratamento 1 na  
 280 concentração de 30%, T2(L10) – Tratamento 2 na concentração de 10%, T2(L30) – Tratamento 2 na  
 281 concentração de 30%, CL(M10) – Célula livre na concentração de 10%, CL(M30) – Célula livre na concentração  
 282 de 30%, C(M10) - Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10%, C(M30) – Microcápsulas sem  
 283 reticulação na concentração de 30%, T1(M10) – Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(M30) – Tratamento  
 284 1 na concentração de 30%, T2(M10) – Tratamento 2 na concentração de 10%, T2(M30) – Tratamento 2 na  
 285 concentração de 30%.

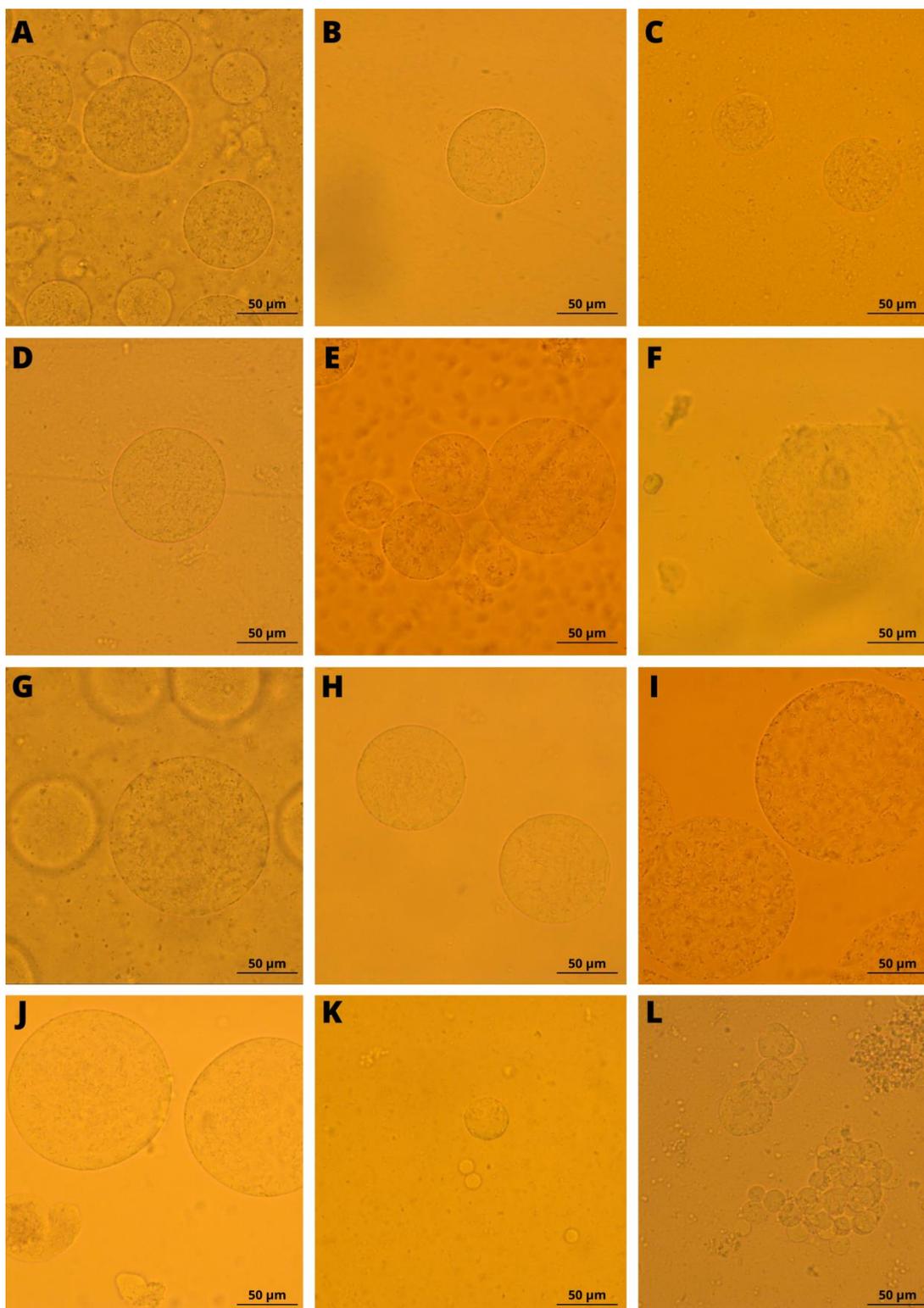
286

287 Assim, foi observado com a análise multivariada de cluster que o tratamento 2 na  
 288 concentração de 30% em suco de laranja (T2(L30)) possui alguma característica que  
 289 claramente o difere dos demais em relação à viabilidade. Assim, relaciona-se essa  
 290 característica à maior viabilidade dos probióticos encontrada para esse tratamento (T2(L30))  
 291 até o final do período de armazenamento, conforme pode ser verificado na Tabela 2. Todavia,  
 292 quando comparados os subclusters, o tratamento 1 na concentração de 10% em suco de  
 293 laranja (T1(L10)) e o tratamento com microcápsulas sem reticulação na concentração de 30%  
 294 em suco de laranja (C(L30)) também podem ser considerados adequados à viabilidade  
 295 probiótica por apresentarem similaridade ao T2(L30).

## 296 3.3 Microscopia óptica das microcápsulas nos sucos de fruta durante o armazenamento



297  
 298 Figura 2 – Microscopia óptica das microcápsulas no suco de laranja em armazenamento por 63 dias a 4°C. A)  
 299 Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10% (dia 0) 20x B) Microcápsulas sem reticulação na  
 300 concentração de 10% (dia 63) 40x C) Tratamento 1 na concentração de 10% (dia 0) 40x D) Tratamento 1 na  
 301 concentração de 10% (dia 63) 40x E) Tratamento 2 na concentração de 10% (dia 0) 40x F) Tratamento 2 na  
 302 concentração de 10% (dia 63) 40x G) Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30% (dia 0) 40x H)  
 303 Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30% (dia 63) 40x I) Tratamento 1 na concentração de 30%  
 304 (dia 0) 40x J) Tratamento 1 na concentração de 30% (dia 63) 40x K) Tratamento 2 na concentração de 30%  
 305 (dia 0) 40x L) Tratamento 2 na concentração de 30% (dia 63) 40x.



306

307 Figura 3 – Microscopia óptica das microcápsulas no suco de maçã em armazenamento por 63 dias a 4°C. A)  
 308 Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10% (dia 0) 40x B) Microcápsulas sem reticulação na  
 309 concentração de 10% (dia 63) 40x C) Tratamento 1 na concentração de 10% (dia 0) 40x D) Tratamento 1 na  
 310 concentração de 10% (dia 63) 40x E) Tratamento 2 na concentração de 10% (dia 0) 40x F) Tratamento 2 na  
 311 concentração de 10% (dia 63) 40x G) Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30% (dia 0) 40x H)  
 312 Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30% (dia 63) 40x I) Tratamento 1 na concentração de 30%  
 313 (dia 0) 40x J) Tratamento 1 na concentração de 30% (dia 63) 40x K) Tratamento 2 na concentração de 30%  
 314 (dia 0) 40x L) Tratamento 2 na concentração de 30% (dia 63) 40x.

315 Com relação à microscopia óptica das microcápsulas nos diferentes tratamentos  
316 (Figura 2 e 3), podemos observar que as microcápsulas apresentaram-se multinucleadas, com  
317 formatos arredondados, de tamanhos variados, apresentando-se menores quando reticuladas,  
318 em alguns casos, em ambos os sucos de fruta. De acordo com Rojas-Moreno et al. (2018) a  
319 camada de coacervado é formada ao redor de glóbulos de óleo, levando à formação de  
320 cápsulas multinucleadas, sendo esse mesmo comportamento observado para os probióticos.  
321 Ainda segundo esses autores, algumas microcápsulas apresentam-se grandes, com formato  
322 redondo e superfície lisa, e algumas partículas aparentemente amassadas e menores, o que  
323 também está de acordo com nossos resultados. Além disso, reforça que o comportamento foi  
324 semelhante para os tratamentos com e sem reticulação.

325 No entanto, segundo Prata et al. (2008) o processo de reticulação reduz a mobilidade  
326 das cadeias macromoleculares, diminuindo a capacidade de intumescimento das  
327 microcápsulas reticuladas em relação às microcápsulas sem reticulação. Isso justifica os  
328 menores tamanhos observados no presente trabalho para as microcápsulas reticuladas.

329 Além disso, é possível observar que no suco de laranja somente no Tratamento 1 na  
330 concentração de 30% as microcápsulas foram rompidas no decorrer dos 63 dias de  
331 armazenamento (Figura 2J), estando este resultado em concordância com a análise de  
332 viabilidade em que os probióticos permaneceram viáveis por 35 dias nessas condições.

333 Já para o suco de maçã, é possível observar um comportamento semelhante em todos  
334 os tratamentos estudados, onde em 63 dias de armazenamento a quantidade de microcápsulas  
335 reduziu consideravelmente e não foi possível detectar microcápsulas rompidas (Figura 3),  
336 indicando sua total dispersão no suco de maçã com consequente perda da viabilidade  
337 probiótica, como mostra a análise de viabilidade (Tabela 2).

338

339

### 340 3.4 Conteúdo de pH e SST dos sucos de fruta durante o armazenamento

341 As variações de pH e SST nos sucos de laranja e maçã contendo *L. acidophilus* nas  
342 formas livre e microencapsulada durante o período de armazenamento de 63 dias estão  
343 descritos na Tabela 3.

344 Segundo Rodrigues et al. (2012) as mudanças nos valores de pH, com diferenças  
345 significativas ( $p < 0,05$ ), durante o armazenamento dos sucos de fruta ocorrem devido a  
346 presença de açúcares, os quais podem ser fermentados pelos *L. acidophilus* em ambas as  
347 formas, livre e microencapsulada. De acordo com Sohail et al. (2012) as bactérias probióticas  
348 realizam a fermentação de açúcares produzindo ácidos orgânicos e, como consequência desse  
349 processo de fermentação, ocorre a redução do pH. Além disso, conforme Rodrigues et al.  
350 (2012) as variações também estão relacionadas a atividade metabólica dos probióticos. Nesse  
351 sentido, podemos observar que nos sucos de laranja as reduções no pH foram mais  
352 acentuadas, indicando que não houve a inativação metabólica dos probióticos. Esse fato  
353 também é justificado pela análise de viabilidade que mostra alta sobrevivência dos probióticos  
354 durante o armazenamento (Tabela 2).

355 Em contrapartida, nos sucos de maçã, observamos menores variações no pH, estando  
356 relacionadas com a inativação metabólica de grande parte das bactérias probióticas, sendo o  
357 mesmo resultado observado na análise de viabilidade dos probióticos (Tabela 2).

358 Tabela 3 – Resultados de pH e SST obtidos dos sucos de fruta no decorrer do armazenamento por 63 dias a 4°C.

LARANJA										
Tempo (dias)	L		CL(L10)		C(L10)		T1(L10)		T2(L10)	
	pH	SST								
0	3,99±0,01 <sup>c</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,98±0,01 <sup>a</sup>	16,75±0,01 <sup>c</sup>	4,10±0,01 <sup>a</sup>	17,75±0,01 <sup>b</sup>	4,05±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	4,07±0,01 <sup>a</sup>	16,75±0,01 <sup>c</sup>
35	4,09±0,01 <sup>a</sup>	18,55±0,01 <sup>a</sup>	3,89±0,01 <sup>b</sup>	17,62±0,01 <sup>a</sup>	3,88±0,03 <sup>b</sup>	17,75±0,01 <sup>b</sup>	4,03±0,01 <sup>b</sup>	17,25±0,01 <sup>b</sup>	4,02±0,01 <sup>b</sup>	16,80±0,01 <sup>b</sup>
63	4,02±0,01 <sup>b</sup>	18,00±0,01 <sup>b</sup>	3,86±0,01 <sup>c</sup>	17,00±0,01 <sup>b</sup>	3,88±0,01 <sup>b</sup>	17,80±0,01 <sup>a</sup>	3,99±0,01 <sup>c</sup>	17,75±0,01 <sup>a</sup>	3,93±0,01 <sup>c</sup>	17,75±0,01 <sup>a</sup>
	L		CL(L30)		C(L30)		T1(L30)		T2(L30)	
	pH	SST								
0	3,99±0,01 <sup>c</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,85±0,01 <sup>b</sup>	16,00±0,01 <sup>b</sup>	3,98±0,01 <sup>b</sup>	17,65±0,01 <sup>a</sup>	4,07±0,01 <sup>a</sup>	15,75±0,01 <sup>c</sup>	4,05±0,01 <sup>a</sup>	14,75±0,01 <sup>b</sup>
35	4,09±0,01 <sup>a</sup>	18,55±0,01 <sup>a</sup>	3,80±0,01 <sup>c</sup>	16,50±0,01 <sup>a</sup>	3,95±0,02 <sup>b</sup>	17,17±0,01 <sup>b</sup>	4,03±0,01 <sup>b</sup>	16,75±0,01 <sup>a</sup>	3,75±0,01 <sup>b</sup>	15,50±0,01 <sup>a</sup>
63	4,02±0,01 <sup>b</sup>	18,00±0,01 <sup>b</sup>	3,93±0,01 <sup>a</sup>	14,75±0,01 <sup>c</sup>	4,01±0,01 <sup>a</sup>	15,75±0,01 <sup>c</sup>	4,06±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>b</sup>	3,67±0,01 <sup>c</sup>	15,50±0,01 <sup>a</sup>
MAÇÃ										
Tempo (dias)	M		CL(M10)		C(M10)		T1(M10)		T2(M10)	
	pH	SST								
0	3,65±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,65±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,68±0,01 <sup>a</sup>	16,00±0,01 <sup>c</sup>	3,84±0,01 <sup>a</sup>	16,00±0,01 <sup>c</sup>	3,70±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>
35	3,64±0,01 <sup>a</sup>	18,75±0,01 <sup>b</sup>	3,62±0,02 <sup>a</sup>	18,75±0,01 <sup>a</sup>	3,67±0,01 <sup>a</sup>	16,75±0,01 <sup>b</sup>	3,78±0,01 <sup>b</sup>	16,40±0,01 <sup>b</sup>	3,71±0,01 <sup>a</sup>	17,80±0,01 <sup>a</sup>
63	3,55±0,01 <sup>b</sup>	18,25±0,01 <sup>a</sup>	3,51±0,01 <sup>b</sup>	17,50±0,01 <sup>b</sup>	3,64±0,03 <sup>a</sup>	18,00±0,01 <sup>a</sup>	3,72±0,01 <sup>c</sup>	16,50±0,01 <sup>a</sup>	3,72±0,02 <sup>a</sup>	17,65±0,01 <sup>b</sup>
	M		CL(M30)		C(M30)		T1(M30)		T2(M30)	
	pH	SST								
0	3,65±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,63±0,02 <sup>a</sup>	17,65±0,01 <sup>a</sup>	3,64±0,01 <sup>b</sup>	16,50±0,01 <sup>b</sup>	3,65±0,01 <sup>b</sup>	16,25±0,01 <sup>a</sup>	3,70±0,01 <sup>b</sup>	17,20±0,01 <sup>a</sup>
35	3,64±0,01 <sup>a</sup>	18,75±0,01 <sup>a</sup>	3,51±0,01 <sup>b</sup>	17,55±0,01 <sup>b</sup>	3,65±0,01 <sup>b</sup>	16,50±0,01 <sup>b</sup>	3,77±0,01 <sup>a</sup>	16,25±0,01 <sup>a</sup>	3,68±0,01 <sup>b</sup>	16,75±0,01 <sup>b</sup>
63	3,55±0,01 <sup>b</sup>	18,25±0,01 <sup>b</sup>	3,63±0,01 <sup>a</sup>	16,50±0,01 <sup>c</sup>	3,71±0,01 <sup>a</sup>	17,25±0,01 <sup>a</sup>	3,78±0,01 <sup>a</sup>	16,20±0,01 <sup>b</sup>	3,74±0,01 <sup>a</sup>	16,25±0,01 <sup>c</sup>

359 Médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey a nível de 5% de significância.

360 L – Suco de laranja, CL(L10) – Célula livre na concentração de 10%, CL(L30) – Célula livre na concentração de 30%, C(L10) - Microcápsulas sem reticulação na  
 361 concentração de 10%, C(L30) – Microcápsulas sem reticulação na concentração de 30%, T1(L10) – Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(L30) – Tratamento 1 na  
 362 concentração de 30%, T2(L10) – Tratamento 2 na concentração de 10%, T2(L30) – Tratamento 2 na concentração de 30%, M – Suco de maçã, CL(M10) – Célula livre na  
 363 concentração de 10%, CL(M30) – Célula livre na concentração de 30%, C(M10) - Microcápsulas sem reticulação na concentração de 10%, C(M30) – Microcápsulas sem  
 364 reticulação na concentração de 30%, T1(M10) – Tratamento 1 na concentração de 10%, T1(M30) – Tratamento 1 na concentração de 30%, T2(M10) – Tratamento 2 na  
 365 concentração de 10%, T2(M30) – Tratamento 2 na concentração de 30%.

366 Além disso, as maiores variações de pH também foram observadas nos tratamentos  
367 com adição de células livres, indicando que as microcápsulas foram eficientes em reduzir as  
368 interações dos probióticos com o ambiente dos sucos de fruta, ressaltando a importância da  
369 microencapsulação na viabilidade probiótica. Podemos ressaltar ainda que o processo de  
370 reticulação se mostrou adequado, nesse sentido, pois foram nos tratamentos com adição de  
371 microcápsulas reticuladas em que as menores reduções de pH foram observadas, com algumas  
372 exceções que serão discutidas abaixo.

373 Nos sucos de laranja, podemos destacar o Tratamento 2 na concentração de 30%, que  
374 apresentou as maiores reduções de pH, indicando a intensa atividade metabólica dos  
375 probióticos, corroborando com as justificativas apresentadas anteriormente por Rodrigues et  
376 al. (2012) e Sohail et al. (2012), juntamente com as altas contagens de células na análise de  
377 viabilidade (Tabela 2). O mesmo é válido para o Tratamento 1 na concentração de 30%, em  
378 que as variações de pH não apresentaram diferenças significativas ( $p > 0,05$ ), indicando a  
379 inativação metabólica dos probióticos, que também pode ser justificada pela análise de  
380 viabilidade.

381 Ademais, como mencionado anteriormente, o pH é o principal fator nos sucos de fruta  
382 relacionado à viabilidade probiótica. Assim, o suco de maçã não apresenta um pH adequado  
383 aos *L. acidophilus*, interferindo na sua sobrevivência até o final do período de  
384 armazenamento.

385 Com relação à análise de SST, para as células livres nas concentrações de 10 e 30%,  
386 para ambos os sucos de fruta, de um modo geral, ocorreu a redução dos SST (Tabela 3), com  
387 diferenças significativas ( $p < 0,05$ ), o que era esperado devido a fermentação dos açúcares  
388 presentes nos sucos de fruta pelos *L. acidophilus*. Hruyia, Deshpande & Bhate (2018) também  
389 observaram reduções mais acentuadas com a adição de diferentes espécies de *Lactobacillus*  
390 em suco de laranja doce. Todavia, para os tratamentos com a adição de 10% de

391 microcápsulas, os SST apresentaram um aumento no decorrer do período de armazenamento.  
392 Porém, para os tratamentos com a adição de 30% de microcápsulas, os SST apresentaram  
393 reduções no decorrer do período de armazenamento. Esses resultados foram observados em  
394 ambos os sucos de fruta, laranja e maçã, e estão em conformidade com Calabuig-Jiménez et  
395 al. (2019) que observaram reduções nos SST quando uma maior quantidade de microcápsulas  
396 foi adicionada em suco de tangerina.

397

#### 398 4 Conclusão

399

400 Este estudo mostrou que a técnica de coacervação complexa associada à reticulação  
401 com transglutaminase é adequada para a proteção de *L. acidophilus* em sucos de fruta. No  
402 suco de maçã, ocorreu a inativação dos probióticos quando adicionados na forma livre, sendo  
403 assim, a microencapsulação associada à reticulação proporcionou o aumento da viabilidade  
404 probiótica. No suco de laranja, a microencapsulação também demonstrou resultados  
405 satisfatórios, pois somente os probióticos microencapsulados foram capazes de sobreviver por  
406 63 dias, apresentando alta viabilidade. Além disso, o suco de laranja forneceu condições mais  
407 adequadas à sobrevivência dos probióticos, destacando o pH como um fator determinante para  
408 a viabilidade probiótica.

409 Ademais, é válido ressaltar o pioneirismo do presente estudo, visto que a adição de  
410 probióticos microencapsulados por coacervação complexa associada à reticulação com  
411 transglutaminase em sucos de fruta não foi relatada, até o momento.

412

## 413 5 Referências

- 414 Brasil. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (2008). Lista de alegações de  
415 propriedade funcional aprovadas. Brasília. [http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/  
416 tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm) Acessado em 06 out. 2019.
- 417 Calabuig-Jiménez, L., Betoret, E., Betoret, N., Patrignani, F., Barrera, C., Seguí, L., Lanciotti,  
418 R. & Rosa, MD (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L.*  
419 *salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and in vitro digestion. *Journal*  
420 *of Food Engineering*, 240, 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.012>
- 421 Champagne, CP & Gardner, NJ (2008). Effect of storage in a fruit drink on subsequent  
422 survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. *Food Research International*,  
423 41(5), 539–543. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2008.03.003>
- 424 Comunian, TA, Gomez-Estaca, J., Ferro-Furtado, R., Conceição, GJA, Moraes, ICF, Castro,  
425 IA, & Favaro-Trindade, CS (2016). Effect of diferente polysaccharides and crosslinkers on  
426 echium oil microcapsules. *Carbohydrate Polymers*, 150, 319–329. [https://  
427 doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.044](https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.05.044).
- 428 Da Silva, TM, De Deus, C., De Souza Fonseca, B., Jacob Lopes, E., Cichoski, AJ, Esmerino,  
429 EA, Da Silva, CB, Muller, EI, Flores, EMM & De Menezes, CR (2019). The effect of  
430 enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*)  
431 encapsulated by complex coacervation. *Food Research International*. 125, 108577  
432 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108577>
- 433 Ding, WK & SHAH, N. (2008). Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in  
434 orange and apple juices. *International Food Research Journal*. 15. 219-232.
- 435 Eghbal, N. & Choudhary, R. (2018). Complex coacervation: Encapsulation and controlled  
436 release of active agents in food systems. *LWT - Food Science and Technology*, 90, 254-264.  
437 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.036>

- 438 Ester, B., Noelia, B., Laura, C-J., Francesca, P., Cristina, B., Rosalba, L. & Marco, DR  
439 (2019). Probiotic survival and *in vitro* digestion of *L.salivarius* spp. *salivarius* encapsulated  
440 by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix. *LWT-Food Science  
441 and Technology*, 111, 883-888. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.088>
- 442 Francisco, E. C., Neves, D. B., Jacob-Lopes, E., Franco, T. T. (2010). Microalgae as  
443 feedstock for biodiesel production: Carbon dioxide sequestration, lipid production and biofuel  
444 quality. *J Chem Technol Biotechnol*, 85, 395-403. <https://doi.org/10.1002/jctb.2338>
- 445 Horáčková, Š., Rokytová, K., Bialasová, K., Klojdová, I. & Sluková, M. (2018). Fruit juices  
446 with probiotics – new type of functional foods. *Czech Journal of Food Science*, v. 36., p. 0-5.  
447 <https://doi.org/10.17221/39/2018-CJFS>
- 448 Hruyia, L., Deshpande, HW & Bhate, MA (2018). Probiotication of sweet orange juice using  
449 *Lactobacillus* strains. *International Journal of Food and Nutrition Science*, 7, 71-77.
- 450 Lebaka, VR, Wee, YJ., Narala, VR & Joshi, VK (2018). Development of new probiotic  
451 foods—a case study on probiotic juices. *Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods*,  
452 55-78. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814625-5.00004-2>
- 453 Lv, Y., Yang, F., Li, X., Zhang, X. & Abbas, S. (2014). Formation of heat-resistant  
454 nanocapsules of jasmine essential oil via gelatin/gum arabic based complex coacervation.  
455 *Food Hydrocolloids*, 35, 305–314. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.06.003>
- 456 Marques Da Silva, T., Lopes, E. J., Codevilla, CF, Cichoski, AJ, Flores, EMM, Motta, MH,  
457 Silva, CB, Grosso, CRF & Menezes, CR (2018). Development and characterization of  
458 microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed  
459 by freeze drying. *LWT – Food Science and Technology*, 90, 412–417.  
460 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.12.057>

- 461 Mituniewicz-Małek, A., Ziarno, M. & Dmytrów, I. (2014). Short communication:  
462 Incorporation of inulin and transglutaminase in fermented goat milk containing probiotic  
463 bacteria. *Journal of Dairy Science*, 97, 3332-3338. <https://doi.org/10.3382/ps.2014-7892>
- 464 Nualkaekul, S., Lenton, D., Cook, MT, Khutoryanskiy, V. V. & Charalampopoulos, D.  
465 (2012). Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus*  
466 *plantarum* in pomegranate juice. *Carbohydrate Polymers*, 90, 1281-1287.  
467 <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.06.073>
- 468 Nualkaekul, S., Cook, MT, Khutoryanskiy, VV, & Charalampopoulos, D. (2013). Influence  
469 of encapsulation and coating materials on the survival of *Lactobacillus plantarum* and  
470 *Bifidobacterium longum* in fruit juices. *Food Research International*, 53, 304-311.  
471 <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2013.04.019>
- 472 Prata, AS, Zanin, MHA, Ré, MI, & Grosso, CRF (2008). Release properties of chemical and  
473 enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus  
474 vetiver essential oil. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 67(2), 171–178.  
475 <https://doi.org/10.1016/j.colsurfb.2008.08.014>
- 476 Rodrigues, D., Sousa, S., Gomes, AM, Pintado, MM, Silva, JP, Costa, P., Amaral, MH,  
477 Rocha-Santos, T. & Freitas, AC. (2012). Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free  
478 cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. *Food Bioprocess*  
479 *Technology*, 5, 2748-2757. <https://doi.org/10.1007/s11947-011-0581-z>
- 480 Rojas-Moreno, S., Osorio-Revilla, G., Gallardo-Velázquez, T., Cárdenas-Bailón, F., Meza-  
481 Márquez, G. (2018). Effect of the cross-linking agent and drying method on encapsulation  
482 efficiency of orange essential oil by complex coacervation using whey protein isolate with  
483 different polysaccharides. *Journal of Microencapsulation*, 35 (2), 165-180.  
484 <https://doi.org/10.1080/02652048.2018.1449910>

- 485 Sheu, TY, Marshall, RT & Heymann, H. (1993). Improving survival of culture bacteria in  
486 frozen desserts by microentrapment. *Journal of Dairy Science*, 76, 1902-1907.  
487 [https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302\(93\)77523-2](https://doi.org/10.3168/jds.S0022-0302(93)77523-2)
- 488 Sohail, A., Turner, MS, Prabawati, EK, Coombes, AGA & Bhandari, B. (2012). Evaluation of  
489 *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a  
490 novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food*  
491 *Microbiology*, 157(2), 162–166. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.025>
- 492 Timilsena, YP, Taiwo, OA, Khalid, N., Adhikari, B. & Barrow, CJ (2019). Complex  
493 coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. *International*  
494 *Journal of Biological Macromolecules*, 121, 1276-1286.  
495 <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144>  
496

## 8 DISCUSSÃO

Diante dos resultados obtidos, o processo de reticulação foi adequado aos *L. acidophilus* LA-02, formando microcápsulas com alta eficiência de encapsulação (68,25 – 93,90%), superiores a outros estudos, como Veiga et al. (2016) que obtiveram eficiência de encapsulação variando entre 32,5 e 71,0% para microcápsulas de gelatina e goma arábica contendo óleo de café torrado produzidas por coacervação complexa e reticuladas com transglutaminase.

Também foi observado que a morfologia foi semelhante para as microcápsulas com e sem reticulação, com microcápsulas redondas e multinucleadas, e com maior diâmetro médio quando reticuladas na forma seca. Foi observado que quanto maior a adição de transglutaminase, menor o diâmetro médio das microcápsulas. Isso ocorreu devido à reticulação com transglutaminase causar a redução da mobilidade das cadeias macromoleculares e, com isso, a redução da capacidade de intumescimento das microcápsulas (PRATA et al., 2008).

Em contrapartida, sob condições gastrointestinais simuladas, as microcápsulas reticuladas apresentaram maior resistência em comparação às microcápsulas sem reticulação, demonstrando que a reticulação com transglutaminase foi essencial, favorecendo substancialmente a sobrevivência dos *L. acidophilus* e dos *L. rhamnosus* (Capítulo de livro). De acordo com Mora-Gutierrez et al. (2014) a transglutaminase forma uma rede contínua de proteínas, melhorando a liberação controlada durante a digestão no trato gastrointestinal.

A reticulação com transglutaminase também foi essencial para proteger os probióticos frente ao tratamento térmico, havendo eliminação dos *L. acidophilus* LA-02 nas microcápsulas sem reticulação, enquanto os probióticos nas microcápsulas reticuladas apresentaram viabilidade com contagens variando entre 8 e 10 log UFC g<sup>-1</sup>. Gharibzahedi et al. (2018) afirmam que a reticulação com transglutaminase é responsável por melhorar significativamente a estabilidade térmica das microcápsulas.

Além disso, foi observado que a resistência das microcápsulas, tanto ao trato gastrointestinal simulado quanto ao tratamento térmico, foi ainda mais eficiente com a reticulação associada ao processo de secagem. Segundo Alvim; Grosso (2010) o processo de secagem exerce forte influência na liberação controlada, reduzindo a quantidade de agente ativo liberada.

Quanto ao armazenamento das microcápsulas com e sem reticulação em diferentes condições de temperaturas, foi observado, no geral, que as microcápsulas na forma úmida

ofereceram maiores condições de sobrevivência aos probióticos. No processo de secagem por liofilização a viabilidade dos probióticos é afetada devido à formação de cristais de gelo maiores pelo congelamento lento, facilitando assim, a inativação de muitas células de *L. acidophilus* LA-02 no decorrer do período de armazenamento.

Na temperatura de congelamento os *L. acidophilus* LA-02 permaneceram viáveis até o final do período de armazenamento, tanto nas microcápsulas sem reticulação ( $6,09 \log \text{UFC g}^{-1}$ ) como nas microcápsulas com reticulação ( $7,80 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $6,53 \log \text{UFC g}^{-1}$ , tratamentos 1 e 2, respectivamente). Sendo assim, este tratamento foi o mais adequado à viabilidade probiótica. Contudo, o processo de reticulação com transglutaminase demonstrou proteção adicional aos probióticos presentes nas microcápsulas na forma úmida. Na forma seca, devido ao processo de liofilização, a atividade enzimática da transglutaminase pode ter sido afetada, resultando em contagens de células viáveis de  $8,15 \log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação,  $6,66 \log \text{UFC g}^{-1}$  e  $6,76$  para as microcápsulas reticuladas (tratamentos 1 e 2, respectivamente). Assim, é notável que a atividade enzimática da transglutaminase foi afetada durante o processo de liofilização, oferecendo menor proteção aos *L. acidophilus* LA-02. Esses resultados estão em conformidade com Rezaei; Temelli; Jenab (2007) que relatam que a atividade enzimática pode ser diretamente afetada por pressão e temperatura.

Na temperatura de refrigeração as microcápsulas na forma úmida apresentaram maior resistência, com *L. acidophilus* LA-02 viáveis até o final do período de armazenamento (60 dias), apresentando contagens de células viáveis de  $6,10 \log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação,  $7,85$  e  $6,49 \log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas reticuladas (tratamentos 1 e 2, respectivamente). Além disso, foi observado que o processo de reticulação com transglutaminase ocorreu, com subsequente proteção adicional aos probióticos, por meio do aumento da resistência das microcápsulas na forma úmida.

Já sob armazenamento em condições de temperatura ambiente, o processo de reticulação com transglutaminase não ofereceu proteção adicional aos probióticos por não aumentar a resistência das microcápsulas. Na forma úmida, observa-se contagens de células viáveis de  $5,56$  e  $5,39 \log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas reticuladas (tratamentos 1 e 2, respectivamente), frente a  $7,54 \log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação. Quando as microcápsulas foram secas, todos os tratamentos apresentaram contagens de células viáveis abaixo de  $6 \log \text{UFC g}^{-1}$  em 30 dias de armazenamento. De acordo com Yüksel-Bilsel; Şahin-Yeşilçubuk (2019), agentes bioativos podem ser afetados por condições desfavoráveis como temperatura e umidade mais elevadas, assim, essas condições podem ter afetado a viabilidade dos *L. acidophilus* LA-02.

Sendo assim, é possível observar que durante o armazenamento em diferentes condições a forma úmida mostrou-se mais adequada aos *L. acidophilus* LA-02 e que a condição de armazenamento em temperatura de congelamento é mais favorável à viabilidade probiótica devido à redução das atividades metabólicas dos microrganismos com consequente manutenção da viabilidade dos *L. acidophilus* LA-02.

Além disso, diante do exposto, é notável que a viabilidade dos probióticos não depende exclusivamente das microcápsulas, mas também da cepa probiótica. Em um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa (MARQUES DA SILVA et al., 2018) utilizamos a coacervação complexa com gelatina – goma arábica para proteger *L. acidophilus* LA-5 e armazenamos as microcápsulas obtidas em temperatura de congelamento, refrigeração e ambiente. Os *L. acidophilus* LA-5 foram capazes de sobreviver por 120 dias em temperatura de congelamento, 105 dias em temperatura de refrigeração e 45 dias em temperatura ambiente.

Ademais, atualmente, se tem uma carência na aplicação de microcápsulas probióticas obtidas por coacervação complexa em produtos alimentícios e, as aplicações encontradas, até o momento, são realizadas em derivados lácteos, como iogurte (SHOJI et al., 2013; BOSNEA; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014; RIBEIRO et al., 2014). Nesse sentido, realizar a aplicação dessas microcápsulas em matrizes alimentícias é de extrema relevância para a tecnologia de alimentos e para ampliar a gama de produtos alimentícios probióticos.

De acordo com Lebaka et al. (2018) os probióticos são tradicionalmente inseridos em produtos lácteos fermentados pelo fácil processamento, além destes produtos possuírem excelentes condições de manutenção da viabilidade probiótica. No entanto, nos últimos anos, o fornecimento de probióticos através de produtos não lácteos vem atraindo maior atenção dos consumidores devido, principalmente, ao aumento da população intolerante à lactose, alergias à proteína do leite, à prevalência de colesterol elevado e o aumento do vegetarianismo e veganismo.

Nesse contexto, o desenvolvimento de produtos probióticos que não sejam derivados lácteos é necessário e muito importante. Segundo Fernandes Pereira, Rodrigues (2018) sucos de frutas demonstram ser substratos adequados para a incorporação e cultivo de bactérias probióticas, pois contêm nutrientes benéficos como vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes. Dessa forma, Pimentel et al. (2015) afirmam que o suco de maçã é um meio adequado para a incorporação de probióticos, como o *Lactobacillus paracasei* e Ding; Shah (2008) trazem que o suco de laranja pode ser adequado para alguns probióticos, pois possui os

nutrientes benéficos (vitaminas, minerais, fibras e antioxidantes), sabor agradável e é consumido por ampla faixa etária.

De Miranda et al. (2019) aplicaram *Lactobacillus casei* em suco de laranja e verificaram que este suco é um substrato adequado para a adição de *L. casei*, resultando em um produto com características físico-químicas e aceitação sensorial semelhantes às do produto original, com viabilidade probiótica entre 8 e 9 log UFC g<sup>-1</sup> por 28 dias a 7°C. Sengun et al. (2019) aplicaram *Lactobacillus rhamnosus* em suco de laranja e observaram que o probiótico manteve a viabilidade durante 28 dias de armazenamento a 4°C e aumentou as atividades antioxidantes e antimicrobianas do suco de laranja. Pimentel et al. (2015) incorporaram *L. paracasei* spp. *paracasei* em suco de maçã e observaram sobrevivência dos probióticos por 21 a 4°C, sem alterar sua aceitabilidade. Ding; Shah (2008) estudaram a sobrevivência de oito cepas probióticas sob armazenamento em suco de laranja e suco de maçã por 42 dias a 4°C, nas formas livre e microencapsulada por gelificação iônica e observaram que os probióticos na forma livre sobreviveram por, no máximo, 21 dias e, os probióticos microencapsulados sobreviveram por até 35 dias. E Roberts et al. (2018) aplicaram *Lactobacillus plantarum* em suco de maçã e destacam que a imobilização de *L. plantarum* em pectina protegeu as células probióticas durante a exposição do suco de maçã à condições gastrointestinais simuladas. Diante do exposto, é importante ressaltar que ainda não há relatos de estudos da aplicação de microcápsulas probióticas produzidas por coacervação complexa e, muito menos, associada à reticulação com transglutaminase em sucos de fruta.

Neste estudo, foi observado que as microcápsulas juntamente com a reticulação protegeram os *L. acidophilus* LA-02 quando adicionados em suco de laranja e suco de maçã, sendo que a concentração de microcápsulas (10 e 30%) adicionadas aos sucos de fruta influenciou de forma significativa a viabilidade dos probióticos no decorrer do armazenamento por 63 dias a 4°C. Bosnea; Moschakis; Biliaderis (2014) ressaltam em seu estudo que a microencapsulação de probióticos por coacervação complexa possui potencial para o fornecimento dos probióticos viáveis em alimentos com baixo pH, como sucos de fruta.

Contudo, entre os sucos de fruta, o suco de laranja se mostrou mais adequado à incorporação dos *L. acidophilus* LA-02, assegurando sua sobrevivência por 63 dias em mais de 80% dos tratamentos com microcápsulas, sem e com reticulação. No estudo de Sheehan et al. (2007) o suco de laranja proporcionou maior viabilidade probiótica. Também foi observado que o fator presente no suco de fruta que está mais relacionado à viabilidade probiótica é o pH, estando em concordância com Champagne; Gardner (2008).

Por isso, o suco de maçã foi adequado à sobrevivência dos *L. acidophilus* LA-02 por 35 dias. Sheehan et al. (2007) também observaram maior perda da viabilidade probiótica quando o pH do suco de fruta foi mais baixo. Apesar disso, vale ressaltar que o processo de reticulação associado à concentração de 30% foi mais eficiente, prolongando a viabilidade probiótica. Ding; Shah (2008) também observaram a sobrevivência de *L. acidophilus* encapsulados por gelificação iônica por 35 dias a 4°C em suco de maçã.

Por fim, em ambos os sucos de frutas ocorreram mudanças nas características de pH e SST no decorrer dos 63 dias de armazenamento, indicando que houve atividade metabólica dos probióticos (CHAMPAGNE, GARDNER, 2008).



## 9 CONCLUSÃO

- O processo de reticulação com transglutaminase das microcápsulas contendo *L. acidophilus* LA-02 produzidas por coacervação complexa foi adequado, conferindo maior resistência às microcápsulas em ambas as concentrações de transglutaminase estudadas.
- As microcápsulas obtidas foram resistentes ao processo de secagem e apresentaram altas eficiências de encapsulação (68-94%), tamanhos médios variando entre 158,2 e 511,7  $\mu\text{m}$ , estando em concordância com a literatura, formatos redondos e multinucleadas, para ambas as formas (úmida e seca).
- O processo de reticulação foi extremamente eficiente para o aumento da resistência das microcápsulas e consequente proteção aos probióticos frente às condições gastrointestinais simuladas e ao tratamento térmico, principalmente para as microcápsulas na forma seca.
- Sob armazenamento em diferentes condições de temperatura, os probióticos apresentaram maior viabilidade em temperatura de congelamento e a reticulação com transglutaminase conferiu proteção adicional aos probióticos presentes nas microcápsulas na forma úmida, com 7,80 e 6,53  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para os tratamentos 1 e 2, respectivamente frente a 6,09  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação. Essa foi a condição de tratamento mais adequada à viabilidade probiótica. Na temperatura de refrigeração a viabilidade dos probióticos foi maior nas microcápsulas na forma úmida, apresentando 6,10  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação, com proteção adicional conferida pela reticulação com transglutaminase, com contagens de células viáveis de 7,85 e 6,49  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas reticuladas (tratamentos 1 e 2, respectivamente). Em temperatura ambiente, o processo de reticulação com transglutaminase não conferiu proteção adicional às microcápsulas, com contagens de células viáveis de 7,54  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas sem reticulação e 5,56 e 5,39  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para as microcápsulas reticuladas (tratamentos 1 e 2, respectivamente), para a forma úmida; na forma seca, após 30 dias de armazenamento, as contagens de células viáveis ficaram abaixo de 6  $\log \text{UFC g}^{-1}$  para todos os tratamentos analisados. Esses estudos contribuem para a adição dos probióticos em matrizes alimentícias.

- O processo de microencapsulação por coacervação complexa associada à reticulação com transglutaminase protegeu os probióticos quando adicionados em suco de laranja e suco de maçã.
- O suco de laranja ofereceu melhores condições para as microcápsulas, bem como para a viabilidade probiótica, proporcionando a sobrevivência dos probióticos até o final do período de armazenamento (63 dias), sendo que a adição de uma concentração de 10% de microcápsulas ao suco já seria suficiente para o fornecimento dos probióticos na quantidade desejada para que os efeitos benéficos ocorram ( $6 \log \text{ UFC g ou mL}^{-1}$ ).
- No suco de maçã, a adição das microcápsulas ao suco na concentração de 30% demonstrou melhores resultados, com proteção adicional fornecida pela reticulação com transglutaminase, conferindo viabilidade aos probióticos por 35 dias.
- As características dos sucos de frutas interferem na viabilidade dos probióticos, sendo o pH o principal fator envolvido na sobrevivência dos *L. acidophilus* LA-02 e quanto mais baixo o pH, menor a viabilidade probiótica.
- As variações nas características de pH e SST dos sucos de laranja e maçã estão relacionados com as atividade metabólicas das células de *L. acidophilus* LA-02 no decorrer dos 63 dias de armazenamento a 4°C.
- As microcápsulas produzidas têm potencial para proteger os *L. acidophilus* LA-02 em matrizes alimentícias, como sucos de fruta. Assim, a utilização da coacervação complexa associada à reticulação com transglutaminase demonstra relevância para a ciência e a tecnologia de alimentos, principalmente para a área de produtos funcionais com apelo probiótico, proporcionando o desenvolvimento de novos produtos alimentícios.

## REFERÊNCIAS

- ALEMZADEH, I.; HAJIABBAS, M.; PAKZAD, H.; DEHKORDI, S. S.; VOSSOUGH, A. Encapsulation of Food Components and Bioactive Ingredients and Targeted Release. **International Journal of Engineering – Transactions A: Basics**, v. 33, n. 1, p. 1-11, 2020.
- ALVIM, I.; GROSSO, R. 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**, v. 30, p. 1069-1076, 2010.
- ANTUNES, A. E. C.; LISERRE, A. M.; COELHO, A. L. A.; MENEZES, C. R.; MORENO, L.; YOTSUYANAGI, K.; AZAMBUJA, N. C. Acerola néctar with added microencapsulated probiotic. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 125-131, 2013.
- AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA – ANVISA. Aprova o regulamento técnico que estabelece as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos. Resolução n. 18, de 3 de dezembro de 1999. Disponível em: [http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES\\_18\\_1999\\_COMP.pdf/dd30fd35-e7ea-4f8d-be72-ae2e439191b0](http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2718376/RES_18_1999_COMP.pdf/dd30fd35-e7ea-4f8d-be72-ae2e439191b0) Acesso em: 06 abr. 2020.
- ARASU, M. V.; AL-DHABI, N. A.; ILAVENIL, S.; CHOI, K. C.; SRIGOPALRAM, S. *In vitro* importance of probiotic *Lactobacillus plantarum* related to medical field. **Saudi Journal of Biological Sciences**, v. 23, p. 6-10, 2016.
- ARIFIN, Z., BOEDIARSO, A. D., TAMBUNAN, T. Probiotic treatment in children with lactose intolerance – An open labeled the one group pre-test post-test experimental study. **Paediatrica Indonesiana**, v. 46(3), p. 139-143, 2016.
- ASSIS, L. M.; ZAVAREZE, E. R.; PRENTICE-HERNÁNDEZ, E. R.; SOUZA-SOARES, L. A. Revisão: Características de nanopartículas e potenciais aplicações em alimentos. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 15, n. 2, p. 99-109, 2012.
- ASSOCIAÇÃO EUROPEIA DE SUCOS DE FRUTA. **Liquid Fruit Market Report**. 2018. Disponível em: <[https://ajjn.eu/files/attachments/.598/2018\\_Liquid\\_Fruit\\_Market\\_Report.pdf](https://ajjn.eu/files/attachments/.598/2018_Liquid_Fruit_Market_Report.pdf)>. Acesso em: 17 dez. 2018.
- BAO, C.; JIANG, P.; CHAI, J. et al. The delivery of sensitive food bioactive ingredients: Absorption mechanisms, influencing factors, encapsulation techniques and evaluation models. **Food Research International**, 2019.
- BARUKČIĆ, I.; JAKOPOVIĆ, K. L.; BOŽANIĆ, R. **Whey and Buttermilk—Neglected Sources of Valuable Beverages**. *Natural Beverages*, p. 209–242, 2019.
- BETORET, E.; CALAIBUG-JIMÉNEZ, L.; PATRIGNANI, F.; LANCIOTTI, R.; ROSA, M. D. Effect of high pressure processing and trehalose addition on functional properties of mandarin juice enriched with probiotic microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 85, p. 418-422, 2017.

BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Complex coacervation as a novel microencapsulation technique to improve viability of probiotics under different stresses. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2767-2781, 2014.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em: 11 fev. 2018.

BRASIL. **Decreto nº 6.871, de 4 de junho de 2009**. Padronização, a classificação, o registro, a inspeção, a produção e a fiscalização de bebidas. Disponível em <[http://www.planalto.gov.br/ccivil\\_03/\\_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm](http://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_Ato2007-2010/2009/Decreto/D6871.htm)>. Acesso em: 10 out. 2019.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, n. 5, p. 539–543, 2008.

CHANG, P. G.; GUPTA, R.; TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, B. Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 191, p. 58–66, 2016.

CHEN, H-Y.; Li, X-Y.; Liu, B-J.; Meng, X-H. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 248–255, 2017.

CHEN, Y.-H.; TSAI, W.-H.; WU, H.-Y.; CHEN, C.-Y.; YEH, W.-L.; CHEN, Y.-H.; HSU, H.-Y.; CHEN, W.-W.; CHEN, Y.-W.; CHANG, W.-W.; LIN, T.-L.; LAI, H.-C.; LIN, Y.-H.; LAI, C.-H. Probiotic *Lactobacillus* spp. act Against *Helicobacter pylori*-induced Inflammation. **Journal of Clinical Medicine**, v. 8(1), p. 90, 2019.

COMUNIAN, T. A.; GOMEZ-ESTACA, J.; FERRO-FURTADO, R.; CONCEIÇÃO, G. J. A.; MORAES, I. C. F.; CASTRO, I. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319–329, 2016.

DA COSTA, G. M.; DE CARVALHO SILVA, J. V.; MINGOTTI, J. D.; BARÃO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT – Food Science and Technology**, v. 75, p. 195–201, 2017.

DA SILVA, T. M.; DE DEUS, C.; DE SOUZA FONSECA, B.; LOPES, E. J.; CICHOSKI, A. J.; ESMERINO, E. A.; ... DE MENEZES, C. R. The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation. **Food Research International**, v. 125, 108577, 2019.

DE ARAÚJO ETCHEPARE, M.; NUNES, G. L.; NICOLOSO, B. R.; BARIN, J. S.; MORAES FLORES, E. M.; DE OLIVEIRA MELLO, R.; RAGAGNIN DE MENEZES, C. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **LWT – Food Science and Technology**, 108601, 2019.

DE MIRANDA, R. F.; DE PAULA, M. M.; DA COSTA, G. M.; BARÃO, C. E.; DA SILVA, A. C. R.; RAICES, R. S. L.; ... PIMENTEL, T. C. Orange juice added with *L. casei*: is there

an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? **LWT – Food Science and Technology**, v. 206, p. 186-193, 2019.

DEVI, N.; SARMAH, M.; KATHUN, B.; MAJI, T. K. **Encapsulation of active ingredients in polysaccharide-protein complex coacervates**. *Advances in Colloid and Interface Science*, 2016.

DING, W.K.; SHAH, N. Survival of free and microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15. p. 219–232, 2008.

DJOULLAH, A.; KRECHICHE, G.; HUSSON, F.; SAUREL, R. Size measuring techniques as tool to monitor pea proteins intramolecular crosslinking by transglutaminase treatment. **Food Chemistry**, v. 190, p. 197-200, 2016.

DOHERTY, S. B.; AUTY, M. A.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; BRODKORB, A. Application of whey protein micro-bead coatings for enhanced strength and probiotic protection during fruit juice storage and gastric incubation. **Journal of Microencapsulation**, v. 29, p. 620–632, 2012.

DONG, Z.; XIA, S.; HUA, S.; HAYAT, K.; ZHANG, X.; XU, S. Optimization of cross-linking parameters during production of transglutaminase-hardened spherical multinuclear microcapsules by complex coacervation. **Colloids Surf B Biointerfaces**, v. 63, p. 41–47, 2008.

EGHBAL, N.; CHOUDHARY, R. Complex coacervation: Encapsulation and controlled release of active agents in food systems. **LWT - Food Science and Technology**, v. 90, p. 254–264, 2018.

EL-HOFI, M.; ISMAIL, A.; NOUR, M.; IBRAHIM, O. Isolation, purification and characterisation of transglutaminase from Rosemary (*Rosmarinus officinalis L.*) Leaves. *Acta Scientiarum Polonorum. Technologia Alimentaria*, v. 13, p. 267–278, 2014.

ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 121-131, 2018.

ERATTE, D.; MCKNIGHT, S.; GENGENBACH, T. R.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. P. Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate–gum Arabic complex coacervates. **Journal of Functional Foods**, v. 19, p. 882-892, 2015.

ERATTE, D.; WANG, B.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Survival and fermentation activity of probiotic bacteria and oxidative stability of omega-3 oil in co-microcapsules during storage. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 485–496, 2016.

FERNANDES PEREIRA, A. L.; RODRIGUES, S. **Turning fruit juice into probiotic beverages**. *Fruit Juices*, p. 279–287, 2018.

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

- GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872–878, 2013.
- GEREZ, C. L.; FONT DE VALDEZ, G.; GIGANTE, M. L.; GROSSO, C. R. F. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; CHRONAKIS, I. S. Crosslinking of milk proteins by microbial transglutaminase: Utilization in functional yogurt products. **Food Chemistry**, v. 245, p. 620–632, 2018.
- GHARIBZAHEDI, S. M. T.; KOUBAA, M.; BARBA, F. J.; GREINER, R.; GEORGE, S.; ROOHINEJAD, S. Recent advances in the application of microbial transglutaminase crosslinking in cheese and ice cream products: A review. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 2364–2374, 2017.
- GRIN, P. M.; KOWALEWSKA, P. M.; ALHAZZANI, W.; FOX-ROBICHAUDI, A. E. *Lactobacillus* for preventing recurrent urinary tract infections in women: meta-analysis. **The Canadian Journal of Urology**, v. 20(1), p. 6607–6614, 2013.
- HABIBI, A.; KERAMAT, J.; HOJJATOLESLAMY, M.; TAMJIDI, F. Preparation of fish oil microcapsules by complex coacervation of gelatin–gum arabic and their utilization for fortification of pomegranate juice. **Journal of Food Process Engineering**, p. 1–11, 2016.
- HAFFNER, F. B.; PASC, A. Freeze-dried alginate-silica microparticles as carriers of probiotic bacteria in apple juice and beer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 175–179, 2018.
- HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L.; LOBATO-CALLEROS, C.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; VERNON-CARTER, E. J. *Lactobacillus plantarum* protection by entrapment in whey protein isolate:  $\kappa$ -carrageenan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 36, p. 181–188, 2014.
- ISOLAURI, E., MAJAMAA, H., ARVOLA, T., RANTALA, I., VIRTANEN, E., RVILOMMI, H. *Lactobacillus casei* strain GG reverses increased intestinal permeability induced by cow milk in suckling rats. **Gastroenterology**, v. 105(6), p. 1643–1650, 1993.
- JAMEKHORSHID, A.; SADRAMELI, S. M.; FARID, M. A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 31, p. 531–542, 2014.
- KALITA, D.; SAIKIA, S.; GAUTAM, G.; MUKHOPADHYAY, R.; MAHANTA, C. L. Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 351–360, 2018.
- KIM, M. N.; KIM, N.; LEE, S. H.; PARK, Y. S.; HWANG, J.-H.; KIM, J.-W.; JEONG, S. H.; LEE, D. H.; KIM, J. S.; JUNG, H. C.; SONG, I. S. The Effects of Probiotics on PPI-Triple Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication. **Helicobacter**, v. 13(4), p. 261–268, 2008.

- LAN, Y.; OHM, J.-B.; CHEN, B.; RAO, J. Phase behavior, thermodynamic and microstructure of concentrated pea protein isolate-pectin mixture: Effect of pH, biopolymer ratio and pectin charge density. **Food Hydrocolloids**, v. 101, 105556, 2020.
- LEBAKA, V. R.; WEE, Y. J.; NARALA, V. R.; JOSHI, V. K. Development of new probiotic foods—a case study on probiotic juices. **Therapeutic, Probiotic, and Unconventional Foods**, p. 55-78, 2018.
- LERNER, A.; SHOENFELD, Y.; MATTHIAS, T. Probiotics: If it does not help it does not do any harm. really? **Microorganisms**, v. 7, n. 4, p. 104, 2019.
- LI, H.; ZHANG, T.; LI, C.; ZHENG, S.; LI, H.; YU, J. Development of a microencapsulated synbiotic product and its application in yoghurt. **LWT**, v. 122, 109033, 2020.
- LIN, D. C. Probiotics as functional foods. **Nutrition in Clinical Practice**, v. 18, p. 497–506, 2003.
- LU, Y.; PUTRA, S. D.; LIU, S-Q. A novel non-dairy beverage from durian pulp fermented with selected probiotics and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 265, p. 1-8, 2018.
- MALIN, M., SUOMALAINEN, H., SAXELIN, M., ISOLAURI, E. Promotion of IgA Immune Response in Patients with Crohn's Disease by Oral Bacteriotherapy with *Lactobacillus* GG. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 40(3), p. 137–145, 1996.
- MARQUES DA SILVA, T.; LOPES, E. J.; CODEVILLA, C. F.; CICHOSKI, A. J.; FLORES, E. M. M.; MOTTA, M. H.; SILVA, C. B.; GROSSO, C. R. F.; MENEZES, C. R. Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying. **LWT – Food Science and Technology**, v. 90, p. 412–417, 2018.
- MARTÍN, R.; CHAMIGNON, C.; MHEDBI-HAJRI, N.; CHAIN, F.; DERRIEN, M.; ESCRIBANO-VÁZQUEZ, U.; ... LANGELLA, P. The potential probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CNCM I-3690 strain protects the intestinal barrier by stimulating both mucus production and cytoprotective response. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019.
- 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.
- MORA-GUTIERREZ, A.; ATTAIE, R.; KIRVEN, J. M.; FARRELL, H. M. Cross-linking of bovine and caprine caseins by microbial transglutaminase and their use as microencapsulating agents for  $\omega$ -3 fatty acids. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 49, n. 6, p. 1530–1543, 2014.
- MURPHY, R. W.; FARKAS, B. E.; JONES, O. G. Effect of crosslinking on the physical and chemical properties of  $\beta$ -lactoglobulin (Blg) microgels. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 505, p. 736–744, 2017.
- NAABER, P.; MIKELSAAR, M. **Interactions between lactobacilli and antibiotic-associated diarrhea**. *Advances in Applied Microbiology*, 2004.

NARUSZEWICZ, M.; JOHANSSON, M.-L.; ZAPOLSKA-DOWNAR, D.; BUKOWSKA, H. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 76(6), p. 1249–1255, 2002.

NAWONG, S.; OONSIVILAI, R.; BOONKERD, N.; HANSEN, L. T. Entrapment in food-grade transglutaminase cross-linked gelatin–maltodextrin microspheres protects *Lactobacillus* spp. during exposure to simulated gastro-intestinal juices. **Food Research International**, v. 85, p. 191-199, 2016.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 685–693, 2007.

O'MAHONY, L.; MCCARTHY, J.; KELLY, P.; HURLEY, G.; LUO, F.; CHEN, K.; O'SULLIVAN, G. C.; KIELY, B.; COLLINS, J. K.; SHANAHAN, F.; QUIGLEY, E. M. M. *Lactobacillus* and bifidobacterium in irritable bowel syndrome: Symptom responses and relationship to cytokine profiles. **Gastroenterology**, v. 128(3), p. 541–551, 2005.

PAVUNC, A. L.; BEGANOVIC, J.; KOS, B.; BUNETA, A.; BELUHAN, S.; SUSKOVIC, J. Influence of microencapsulation and transglutaminase on viability of probiotic strain *Lactobacillus helveticus* M92 and consistency of set yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 254-261, 2011.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015.

PRADHAN, D.; MALLAPPA, R. H.; GROVER, S. Comprehensive approaches for assessing the safety of probiotic bacteria. **Food Control**, v. 108, 2020.

PRADO, F. C.; PARADA, J. L.; PANDEY, A.; SOCCOL, C. R. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, p. 111-123, 2008.

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Departamento de Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, São Paulo, 2006. Disponível em: <[http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver\\_documento.php?did=211](http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=211)>. Acesso em: 28 set. 2018.

PRATA, A. S.; ZANIN, M. H. A.; RÉ, M. I.; GROSSO, C. R. F. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 171–178, 2008.

RAHMANI, P.; MORADZADEH, A.; FARAHMAND, F. **Giving probiotics to your children for gastrointestinal problems: In the light of scientific findings**. *PharmaNutrition*, 100164, 2019.

- REZAEI, K.; TEMELLI, F.; JENAB, E. Effects of pressure and temperature on enzymatic reactions in supercritical fluids. **Biotechnology Advances**, v. 25, n. 3, p. 272–280, 2007.
- RIBEIRO, M. C. E.; CHAVES, K. S.; GEBARA, C.; INFANTE, F. N. S., GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research Internacional**, v. 66, p. 424–431, 2014.
- ROBERTS, D.; REYES, V.; BONILLA, F.; DZANDU, B.; LIU, C.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT**, v. 97, p. 144–150, 2018.
- ROSENFELDT, V.; MICHAELSEN, K. F.; JAKOBSEN, M.; LARSEN, C. N.; MØLLER, P. L.; TVEDE, M.; WEYREHTER, H.; VALERIUS, N. H.; PÆRREGAARD, A. Effect of probiotic *Lactobacillus* strains on acute diarrhea in a cohort of nonhospitalized children attending day-care centers. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, v. 21(5), p. 417–419, 2002.
- RUSSO, F.; ORLANDO, A.; LINSALATA, M.; CAVALLINI, A.; MESSA, C. Effects of *Lactobacillus Rhamnosus GG* on the Cell Growth and Polyamine Metabolism in HGC-27 Human Gastric Cancer Cells. **Nutrition and Cancer**, v. 59(1), p. 106–114, 2007.
- SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 1, jan./mar., 2006.
- SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. **Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Livraria Varela, 2011.
- SAAVEDRA, J. M.; BAUMAN, N. A.; OUNG, I.; PERMAN, J. A.; YOLKEN, R. H. Feeding of *Bifidobacterium bifidum* and *Streptococcus thermophilus* to infants in hospital for prevention of diarrhoea and shedding of rotavirus. **The Journal of Pediatrics**, v. 126(5), p. 841–842, 1995.
- SANTOS, A. B.; BOTTONI, S. de S.; SILVA, D. A.; SÃO JOSÉ, J. F. B. de; SILVA, E. M. M. da. Study of the consumers of ready-to-drink juices and fruit nectars. **Food Science and Technology**, v. 38, n. 3, p. 504–512, 2017.
- SENGUN, I. Y.; KIRMIZIGUL, A.; ATLAMA, K.; YILMAZ, B. The viability of *Lactobacillus rhamnosus* in orange juice fortified with nettle (*Urtica dioica* L.) and bioactive properties of the juice during storage. **LWT – Food Science and Technology**, 108707, 2019.
- SHIDA, K.; TAKAHASHI, R.; IWADATE, E.; TAKAMIZAWA, K.; YASUI, H.; SATO, T.; HABU, S.; HACHIMURA, S.; KAMINOGAWA, S. *Lactobacillus casei* strain Shirota suppresses serum immunoglobulin E and immunoglobulin G1 responses and systemic anaphylaxis in a food allergy model. **Clinical Experimental Allergy**, v. 32(4), p. 563–570, 2002.
- 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.

SILVA, T. M. da; BARIN, J. S.; LOPES, E. J.; CICHOSKI, A. J.; FLORES, E. M. de M.; SILVA, C. de B. da; MENEZES, C. R. de. Development, characterization and viability study of probiotic microcapsules produced by complex coacervation followed by freeze-drying. **Ciência Rural**, v. 49, n. 7, 2019.

SYNGAI, G. G.; GOPI, R.; BHARALI, R.; DEY, S.; LAKSHMANAN, G. M. A.; AHMED, G. Probiotics - the versatile functional food ingredients. **Journal of Food Science and Technology**, v. 53, p. 921–933, 2015.

SONI, R.; JAIN, N. K.; SHAH, V.; SONI, J.; SUTHAR, D.; GOHEL, P. Development of probiotic yogurt: effect of strain combination on nutritional, rheological, organoleptic and probiotic properties. **Journal of Food Science and Technology**, 2020.

STÜRMER, E. S.; CASASOLA, S.; GALL, M. C.; GALL, M. C. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**, v. 27, n. 4, p. 264–272, 2012.

TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276-1286, 2019.

VANDEN BRABER, N. L.; DÍAZ VERGARA, L. I.; ROSSI, Y. E.; AMINAHUEL, C. A.; MAURI, A. N.; CAVAGLIERI, L. R.; MONTENEGRO, M. A. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. **LWT – Food Science and Technology**, 108844, 2019.

VEIGA, C. C.; SIMONI, R. C.; ALMEIDA, M. M. C.; GONÇALCES, O. H.; SHIRAI, M. A.; LEIMANN, F. V. Microencapsulation of roasted coffee oil by complex coacervation with gelatin/gum arabic enzymatically crosslinked. **Brazilian Journal of Food Research**, Campo Mourão, v. 7, n. 2, p. 156-172, maio/ago. 2016.

WANG, L., GUO, M.-J., GAO, Q., YANG, J.-F., YANG, L., PANG, X.-L., JIANG, X.-J. The effects of probiotics on total cholesterol. **Medicine**, v. 97(5), e9679, 2018.

WEISS, J.; SALMINEN, H.; MOLL, P.; SCHMITT, C. Use of molecular interactions and mesoscopic scale transitions to modulate protein-polysaccharide structures. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2019.

WGO - WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. **World Gastroenterology Organisation Global Guidelines: Probiotics and prebiotics**. 2017. Disponível em: <<https://www.worldgastroenterology.org/guidelines/global-guidelines/probiotics-and-prebiotics/probiotics-and-prebiotics-english>>. Acesso em: 05 fev. 2018.

WITZLER, J. J. P.; PINTO, R. A.; VALDEZ, G. F.; CASTRO, A. D., CAVALLINI, D. C. U. Development of a potential probiotic lozenge containing *Enterococcus faecium* CRL 183. **LWT – Food Science and Technology**. v. 77, p. 193-199, 2017.

XIAO, Y.; HAN, C.; YANG, H.; LIU, M.; MENG, X.; LIU, B. Layer (whey protein isolate) - by-layer (xanthan gum) microencapsulation enhances survivability of *L. bulgaricus* and *L. paracasei* under simulated gastrointestinal juice and thermal conditions. **International Journal of Biological Macromolecules**, 2020.

YEW, S.; LIM, T.; LEW, L.; BHAT, R.; MAT-EASA, A.; MIN-TZE, L. Development of a probiotic delivery system from agrowastes, soy protein isolate, and microbial transglutaminase. **Journal of Food Science**, v. 76, p. 108-115, 2011.

YING, D. Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, p. 98-105, 2013.

YÜKSEL-BILSEL, A.; ŞAHİN-YEŞİLÇUBUK, N. Production of probiotic kefir fortified with encapsulated structured lipids and investigation of matrix effects by means of oxidation and in vitro digestion studies. **Food Chemistry**, v. 296, p. 17-22, 2019.