

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

Gabriela Poletto

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS PELA
TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA USANDO
DIFERENTES FONTES PREBIÓTICAS**

Santa Maria, RS

2018

Gabriela Poletto

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS PELA TÉCNICA
DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA USANDO DIFERENTES FONTES
PREBIÓTICAS**

Dissertação 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 grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes

Santa Maria, RS
2018

Poletto, Gabriela

Desenvolvimento de micropartículas simbióticas pela técnica de gelificação iônica externa usando diferentes fontes prebióticas / Gabriela Poletto.- 2018.

100 p.; 30 cm

Orientador: Cristiano Ragagnin de Menezes
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2018

1. microencapsulação 2. Lactobacillus acidophilus 3. inulina 4. farelo de arroz 5. hi-maize I. Ragagnin de Menezes, Cristiano II. Título.

Sistema de geração automática de ficha catalográfica da UPSM. 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.

© 2018

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

E-mail: gabriela.poletto@hotmail.com

Gabriela Poletto

**DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS PELA TÉCNICA
DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA USANDO DIFERENTES FONTES
PREBIÓTICAS**

Dissertação 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 grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia dos Alimentos**.

Aprovado em 21 de fevereiro de 2018:

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

Cristiane Codevilla, Dr^a. (UFSM)

Elisângela Colpo, Dr^a. (UNIFRA)

Santa Maria, RS,
2018

AGRADECIMENTOS

À Deus, pela oportunidade da vida, por vigiar o meu caminho, por estar sempre comigo e por ter me permitido desfrutar o privilégio de ter uma família linda e amigos maravilhosos.

Pai José, mãe Rosi e mano Rodrigo, vocês são meus exemplos de amor, bondade, honestidade, união, coragem e força. Sem vocês, a realização deste sonho não seria possível! Amo-os com todo o meu coração!

Ao meu amor Guilherme, obrigada por todo amor, carinho, compreensão, paciência e apoio ao longo desses anos, você foi fundamental para essa conquista! Amo-te muito, para sempre!

Aos amigos de longe e perto, em especial às amigas Alexandra, Andressa, Bianca, Carolina e Fabiane, que apesar da distância sempre se fizeram presentes, me apoiando, motivando e alegrando meus dias! E à amiga Greice, uma irmã que Deus me deu de presente durante essa trajetória acadêmica, obrigada por compartilhar comigo os conhecimentos, as análises, as alegrias e também os dias difíceis!

Agradeço à Universidade Federal de Santa Maria e ao Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos pela oportunidade.

Ao professor Cristiano Ragagnin de Menezes, pelos ensinamentos, empatia, sensibilidade, bondade, competência profissional e orientação.

A CAPES, pelo apoio financeiro através da bolsa de estudos.

Ao Laboratório 106 do Núcleo de Tecnologia em Alimentos (NTA), pela ajuda essencial na realização deste trabalho.

Ao Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQUIA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria, pelas análises granulométricas, em especial aos professores Érico Marlon Moraes Flores e Edson Irineo Muller.

A professora Cristiane de Bonna da Silva do Departamento de Farmácia da Universidade Federal de Santa Maria pelas análises de tamanho de partícula.

À banca, por aceitar o convite de participação e pelas contribuições fornecidas.

Enfim, agradeço de coração a todos que contribuíram para que eu concluísse este trabalho.

RESUMO

DESENVOLVIMENTO DE MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA USANDO DIFERENTES FONTES PREBIÓTICAS

AUTORA: Gabriela Poletto

ORIENTADOR: Cristiano Ragagnin de Menezes

O crescente interesse dos consumidores por produtos alimentares benéficos para a saúde tem motivado a pesquisa para o desenvolvimento de alimentos funcionais, entre eles, destacam-se os probióticos, que quando consumidos em quantidades adequadas conferem benefícios a microbiota intestinal. No entanto, devido a fatores como armazenamento em baixas temperaturas, acidez e a passagem pelo trato gastrointestinal humano prejudicam a viabilidade destes microrganismos. A microencapsulação bem como o uso de prebióticos nas micropartículas vem como alternativa de proteção e aumento de viabilidade destes probióticos. Desta maneira, o objetivo desse estudo foi desenvolver micropartículas úmidas e liofilizadas de alginato (2%) e compará-las com micropartículas de alginato adicionadas de diferentes fontes prebióticas a 10%, sendo elas farelo de arroz, inulina e hi-maize (amido resistente), ambas contendo *Lactobacillus acidophilus* utilizando a técnica de gelificação iônica externa. Analisou-se o tamanho e distribuição das micropartículas, a eficiência de encapsulação, a viabilidade em simulação gastrointestinal e estabilidade durante diferentes condições de armazenamento (-18, 7 e 25 °C) por 120 dias para úmidas e 75 dias para liofilizadas. Para as micropartículas úmidas, houve uma variação de tamanho de 79.7 – 117.70 µm, enquanto as liofilizadas apresentaram diâmetros de 127.5 – 234.6 µm. A matriz de encapsulação inulina apresentou a maior eficiência de encapsulação (96.75%) para as micropartículas úmidas, já para as liofilizadas, a maior eficiência de encapsulação foi resultante da matriz de encapsulação farelo de arroz (95.02%). Tanto as micropartículas úmidas como as liofilizadas protegeram os microrganismos frente aos testes gastrointestinais simulados. Quanto ao armazenamento em diferentes condições para as micropartículas úmidas, a 25 °C os tratamentos alginato, farelo de arroz e hi-maize mantiveram os probióticos viáveis por 120 dias. Na condição de armazenamento -18 °C, apenas inulina manteve-se estável durante os 120 dias. Em 7 °C, farelo de arroz (AFA) e inulina (AIN) conservaram os probióticos viáveis ao longo dos 120 dias de armazenamento. Já para as micropartículas liofilizadas, a 25 °C o tratamento farelo de arroz manteve os probióticos viáveis por 30 dias. Nas condições de armazenamento -18 °C e 7°C os tratamentos contendo os prebióticos hi-maize e farelo de arroz mantiveram os microrganismos probióticos viáveis por um período maior de 60 dias. As micropartículas desenvolvidas neste estudo podem ser um meio alternativo e viável para a obtenção de um produto simbiótico a ser incorporado em alimentos, de modo a permitir uma maior sobrevivência das bactérias.

Palavras chave: microencapsulação. *Lactobacillus acidophilus*. inulina. farelo de arroz. hi-maize

ABSTRACT

DEVELOPMENT OF SYMBIOTIC MICROPARTICLES BY THE EXTERNAL IONIC GELIFICATION TECHNIQUE USING DIFFERENT PREBIOTIC SOURCES

AUTHOR: Gabriela Poletto

ORIENTER: Cristiano Ragagnin de Menezes

The growing consumer interest in health food products has motivated research for the development of functional foods, among which are the probiotics, which when consumed in adequate quantities confer benefits to intestinal microbiota. However, because of factors such as storage at low temperatures, acidity and passage through the human gastrointestinal tract harm the viability of these microorganisms. Microencapsulation as well as the use of prebiotics in the microparticles comes as an alternative to protect and increase the viability of these probiotics. Thus, the objective of this study was to develop wet and lyophilized alginate microparticles (2%) and to compare them with alginate microparticles added from different 10% prebiotic sources, being rice bran, inulin and hi-maize (resistant starch), both containing *Lactobacillus acidophilus* using the external ionic gelation technique. Microparticle size and distribution, encapsulation efficiency, viability in gastrointestinal simulation and stability during different storage conditions (-18, 7 and 25 ° C) for 120 days for wet and 75 days for lyophilized were analyzed. For the wet microparticles, there was a size variation of 79.7 - 117.70 µm, while the lyophilized ones had diameters of 127.5 - 234.6 µm. The inulin encapsulation matrix presented the highest encapsulation efficiency (96.75%) for the wet microparticles, whereas for the lyophilized microparticles, the highest encapsulation efficiency was due to the rice bran encapsulation matrix (95.02%). Both wet and lyophilized microparticles protected the microorganisms against the simulated gastrointestinal tests. As for storage under different conditions for wet microparticles, at 25 °C the alginate, rice bran and hi-maize treatments maintained viable probiotics for 120 days. In the storage condition - 18 ° C, only inulin remained stable during the 120 days. At 7 ° C, rice bran (ARB) and inulin (AIN) preserved viable probiotics throughout the 120 days of storage. For lyophilized microparticles, at 25°C the rice bran treatment kept the probiotics viable for 30 days. Under storage conditions -18 ° C and 7 ° C, treatments containing prebiotics hi-maize and rice bran kept viable probiotic microorganisms for a longer period of 60 days. The microparticles developed in this study may be an alternative and viable means for obtaining a symbiotic product to be incorporated into foodstuffs, in order to allow a greater survival of the bacteria.

Keywords: microencapsulation. *Lactobacillus acidophilus*. inulin. rice bran. hi maize

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1. OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo geral	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 PROBIÓTICOS	12
2.1.1 Gênero <i>Lactobacillus</i>	15
2.2 PREBIÓTICOS.....	15
2.2.1. Inulina.....	16
2.2.2 Amido resistente (hi-maize)	17
2.2.3 Farelo de arroz.....	18
2.3 SIMBIÓTICOS	18
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO	20
2.4.1 Métodos de Microencapsulação	22
2.4.2 Gelificação iônica externa / extrusão	22
2.4.3 Liofilização	24
2.5 MATERIAIS ENCAPSULANTES	25
2.5.1 Alginato.....	26
3. MANUSCRITO I.....	29
1. Introduction	30
2. Material and Methods.....	31
3. Results and discussion.....	34
4. Conclusion.....	39
5. References	40
4. MANUSCRITO 2	50
1. Introdução.....	51
3. Resultados e discussão	55
4. Conclusões.....	62
5. Referências	63
5. DISCUSSÃO GERAL	74
6. CONCLUSÃO	80
7. REFERÊNCIAS	81

1. INTRODUÇÃO

Atualmente, devido ao grande interesse dos consumidores por uma alimentação saudável, que favoreça o bem estar físico e auxilie na prevenção de doenças, a indústria de alimentos busca cada vez mais inovações, fato que tem ocasionado um aumento no mercado de alimentos funcionais (ABD-EL-SALAM; EL SHIBINY, 2015). Alimentos funcionais são aqueles que além das funções nutricionais básicas, quando consumidos na dieta usual, produzem efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde, devendo ser seguro para o consumo sem supervisão médica. Os efeitos funcionais dos alimentos devem ser referentes à manutenção geral da saúde, ao papel fisiológico dos nutrientes e à redução de riscos de doenças e não à cura de doenças (MARTIROSYAN; SINGH, 2015; SANDERS, 2003). Os probióticos são exemplos atuais de ingredientes alimentares funcionais.

Entre as bactérias probióticas, as bifidobactérias e os lactobacilos demonstraram desempenhar papéis significativos na manutenção do ecossistema intestinal e estimulação do sistema imunológico do hospedeiro (SAARELA et al., 2002; SHAH, 2007). A ingestão diária dos probióticos pode proporcionar melhorias dos movimentos peristálticos do intestino, aumentando a absorção de nutrientes; o equilíbrio da microbiota; a prevenção e/ou controle de infecções intestinais; a modulação do sistema imune; prevenção de alguns tipos de câncer; redução do LDL-colesterol; melhoria na digestão da lactose; proteção contra infecções no trato urinário, entre outras ações (ANDRADE, 2010; SANTOS; VARAVALHO, 2011).

No entanto, a concentração destas bactérias deve ser elevada no produto para que a ação de colonizar e proliferar aconteça e o efeito benéfico no intestino ocorra (DUNCAN; FLINT, 2013; TRIPATHI; GIRI, 2014). Desta forma, a introdução e manutenção destes microrganismos em alimentos funcionais são desafios tecnológicos, uma vez que podem não sobreviver em número suficiente quando submetidos a certas condições, incluindo armazenamento a baixas temperaturas e passagem através do trato gastrointestinal humano (POP et al., 2015; ESPITIA et al., 2016). Uma alternativa que tem se mostrado eficiente para proteger os probióticos dessas condições adversas, mantendo sua viabilidade e funcionalidade, é a microencapsulação.

A microencapsulação é um processo no qual as culturas probióticas são incorporadas em uma matriz ou membrana encapsuladora que pode proteger as células da degradação pelos fatores prejudiciais no ambiente e liberar a taxas controladas em condições particulares (CORBO et al., 2013). Entre as diversas técnicas, a extrusão / gelificação externa é o método mais popular por sua simplicidade, baixo custo e condições suaves de formulação que

asseguram a alta viabilidade celular (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). Muitas vezes, para manter a viabilidade das micropartículas probióticas frente ao armazenamento por longos períodos, torna-se necessário secá-las após a sua produção. A liofilização é a técnica mais adequada para a desidratação de materiais sensíveis ao calor, sendo caracterizada por manter um alto nível de viabilidade celular (DESAI; PARK, 2005).

Uma maneira de melhorar a estabilidade dos probióticos é a adição de prebióticos na formulação das micropartículas (RODRÍGUEZ et al., 2007). Os prebióticos são fibras não digeríveis que ao atingirem o cólon, estimulam seletivamente a proliferação ou atividade de população de bactérias probióticas, produzindo desta maneira efeitos benéficos à microbiota colônica (SREENIVAS; LELE, 2013). Os efeitos prebióticos relacionados ao aumento do número dessas bactérias levam à estimulação do sistema imune, produção de vitaminas do complexo B, inibição de patógenos, redução dos níveis de colesterol sanguíneo e a restauração da microbiota normal (PATEL; GOYAL, 2012; WANG, 2009).

Os prebióticos típicos são fibras dietéticas que consistem geralmente em inulina, oligossacarídeos e amido resistente (hi-maize) (BUTTRISS; STOKES, 2008). A inulina é uma fibra solúvel, sendo um carboidrato de reserva que se encontra em frutas e vegetais como, por exemplo, banana, alho e cebola (VALERO-CASES; FRUTOS, 2015). Já o amido resistente (hi-maize) é um homo-polissacarídeo constituído por um número de unidades de monossacarídeos ligadas entre si com ligações α -Glc (1-4) e α -Glc (1-6) (HOMAYOUNI et al., 2014). Ambos vêm sendo estudados e além de agregarem valor nutricional aos produtos, conferem proteção às bactérias probióticas.

Entretanto, estudos recentes têm demonstrado que o farelo de arroz é um subproduto com propriedades desejáveis para ser um potencial prebiótico como polifenóis, ácidos graxos essenciais, antioxidantes (oryzanol, tocoferol, tocotrienol e ácido ferrulico) e fibras alimentares (arabinogalactano, hemicelulose, arabinoxilano, proteoglicano, xiloglicano e rafinose), podendo ser uma fonte potencial para formulações simbióticas (DEMIRCI et al., 2017; ZUBAIDAH et al., 2012).

Diante do exposto, a aplicação de técnicas que promovam o fornecimento das bactérias probióticas em quantidades adequadas para que exerçam seus efeitos benéficos, como a microencapsulação com adição de prebióticos, desperta o interesse para a pesquisa científica, sendo proposta como uma alternativa de proteção desses microrganismos, demonstrando a relevância do presente trabalho.

1.1. OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi produzir micropartículas simbióticas úmidas e secas contendo *Lactobacillus acidophilus* em diferentes fontes prebióticas utilizando a técnica de gelificação iônica externa assistida por liofilização.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver micropartículas de alginato contendo *Lactobacillus acidophilus* em diferentes prebióticos, sendo eles: farelo de arroz, inulina e hi-maize;
- Avaliar a eficiência de encapsulação das micropartículas úmidas e secas;
- Caracterizar físico-química das micropartículas úmidas e secas quanto à morfologia, umidade e atividade de água;
- Avaliar a estabilidade das micropartículas úmidas e secas frente a condições que simulem o ambiente gastrointestinal;
- Avaliar a vida útil das micropartículas em diferentes condições de armazenamento (25, -18 e 7 °C) por 120 dias.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

Os probióticos são definidos como ingredientes alimentares microbianos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, alteram a microbiota intestinal e conferem benefícios para a saúde do hospedeiro (HILL; GUARNER; REID, 2013; FAO/WHO, 2006). Para serem considerados probióticos os microrganismos devem apresentar resistência à acidez gástrica e aos sais biliares; aderir-se nas células da mucosa intestinal; produzir substâncias antimicrobianas contra patógenos intestinais (restaurando a composição da microflora); ser seguros em alimentos e durante o uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos; ter capacidade de ser produzido em grande escala e de forma viável. É importante que permaneçam viáveis e ativos no produto que servirá de veículo e preferencialmente serem isolados do trato gastrointestinal humano, pois são mais seguros e mais efetivos na microbiota intestinal humana (MAZOCHI et al., 2010).

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, é importante ressaltar que tais benefícios somente ocorrem se os mesmos estiverem totalmente viáveis nos produtos onde serão incluídos, ou seja, que sobrevivam durante seu processamento e condições de armazenamento e também devem ser capazes de suportar as condições ácidas do estômago, bem como as condições biliares no intestino delgado já que estes são os principais obstáculos para a sobrevivência dessas bactérias (KENT; DOHERTY, 2014; PINTO et al., 2015). Na Tabela 1 estão descritos diversos benefícios atribuídos ao consumo diário dos probióticos.

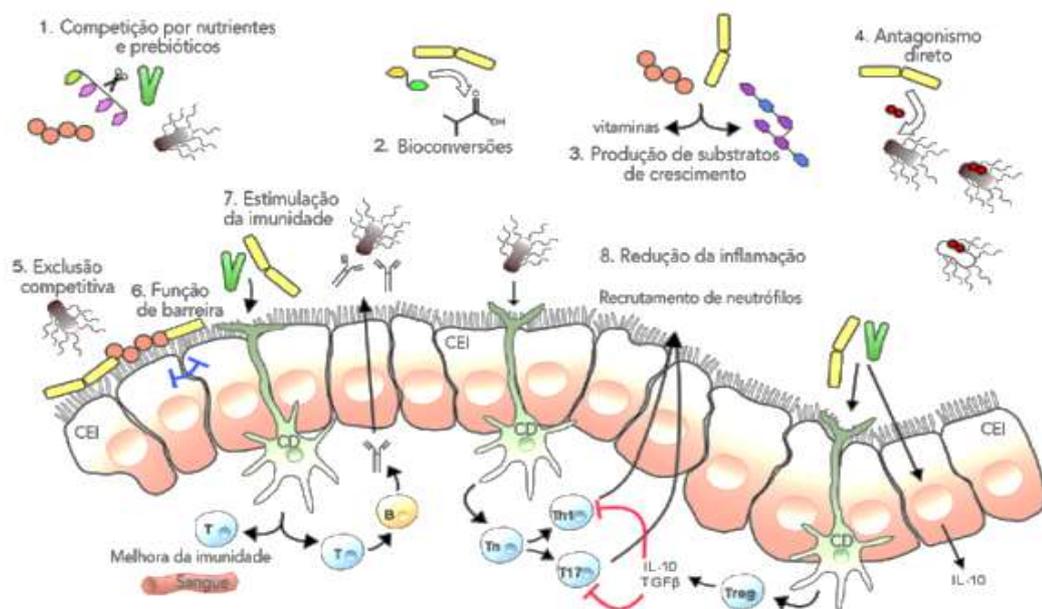
Um alimento com alegações probióticas deve conter um número de células viáveis de culturas probióticas de, no mínimo, 10^6 a 10^7 UFC g^{-1} (FAO/OMS, 2001). No Brasil, a quantidade mínima viável de microrganismos probióticos deve estar situada entre 10^8 e 10^9 log UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, o que equivale ao consumo de 100 g de produto contendo entre 10^6 a 10^7 UFC de microrganismos (BRASIL, 2008).

Tabela 1 – Benefícios nutricionais atribuídos à ingestão diária de microrganismos probióticos.

Benefícios dos Probióticos	Autores
Regulação do trânsito intestinal	OLIVEIRA; MARCHINI, 2008
Síntese de vitaminas e proteínas pré-digeridas	SAAD, 2006
Inibição de patógenos	COOK et al., 2012;
Reconstituição da microbiota intestinal após o uso de antibióticos	MAZIADE et al., 2015
Aumento da imunidade	DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010
Redução da atividade ulcerativa de <i>Helicobacter pylori</i> ,	GOLDIN; GORBACH, 2008
Controle da colite	CRUZ et al., 2012
Efeito hipocolesterolêmico	KUMAR et al., 2011
Diarreia aguda	LEE et al., 2015
Intolerância à lactose	ALMEIDA et al., 2012
Doenças inflamatórias intestinais	CLARKE et al., 2012
Auxílio contra doenças alérgicas	RAUTAVA et al., 2012
Atividade anticarcinogênica do cólon	NAMI et al., 2014
Síntese de ácidos graxos voláteis de cadeia curta (propiónico, acético, butírico)	MATOS, 2010
Melhora da utilização de nutrientes e, por conseguinte, o valor nutricional dos alimentos em humanos.	SAAD et al., 2013

Esses benefícios ocorrem por alguns mecanismos de ação dos probióticos que são justificados pela competição por sítios de adesão formando uma barreira física contra agentes patogênicos (LAZADO et al., 2011), competição por nutrientes impedindo a colonização de outros microrganismos, inativação das toxinas e seus receptores e pela estimulação da fagocitose e das respostas imunológicas específicas e inespecíficas contra agentes patogênicos (SILVA et al., 2004; MATSUMOTO et al., 2005). Além da produção de substâncias antibacterianas, que tem ação bacteriostática ou bactericida em relação às bactérias patogênicas (LIMA et al., 2007). Na figura 1 estão ilustrados alguns mecanismos de ação dos probióticos.

Figura 1 - Mecanismos de ação potenciais ou conhecidos dos probióticos.



Esses mecanismos incluem (1) competição por ingredientes alimentares usados como substratos de crescimento, (2) bioconversão de, por exemplo, açúcares em produtos de fermentação com propriedades inibitórias, (3) produção de substratos de crescimento, por exemplo, EPS ou vitaminas, para outras bactérias, (4) antagonismo direto por bacteriocinas, (5) exclusão competitiva para sítios de ligação, (6) melhora na função de barreira, (7) redução da inflamação, alterando, portanto, as propriedades intestinais para facilitar a colonização e permanência, e (8) estimulação da resposta imunológica inata (mecanismos subjacentes desconhecidos). CEI, células epiteliais; CD, células dendríticas; T, células-T. Fonte: O'Toole; Cooney (2008).

Fonte: O'TOODE; COONEY (2008).

Os principais microrganismos probióticos estudados são espécies de lactobacilos e bifidobactérias, como por exemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* *Bifidobacterium bifidum* e *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium bifidum*,

Bifidobacterium breve, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium adolescentis* (HOMAYOUNI, et al., 2008; KALASAPATHY; SULTANA, 2003; TURGUT; CAKMAKCI, 2009). Também são considerados probióticos *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus* (MORAIS, 2006).

2.1.1 Gênero *Lactobacillus*

Os *Lactobacillus* são bactérias gram-positivas, geralmente anaeróbicos facultativos, não formadores de esporos, não flagelados, predominantes no intestino delgado (PARK, 2007). Além disso, são bactérias estritamente fermentativas, acumulando ácido lático no meio como produto de seu metabolismo primário (GOMES, MALCATA, 1999). A atividade antimicrobiana das bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus* está relacionada à capacidade de produzir ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, podendo ser divididas em três subgêneros, com base na temperatura ótima de crescimento e metabolismo (homofermentativos estritos, heterofermentativos facultativos, heterofermentativos estritos) (SAMOT et al., 2011).

Cerca de 56 espécies do gênero *Lactobacillus* foram listadas segundo GOMES e MALCATA (1999), entre as espécies mais indicadas para dietas alimentares, se encontram os *Lactobacillus acidophilus*. Os *Lactobacillus acidophilus* são classificados como anaeróbios e homofermentativos estritos, por produzirem ácido lático como resultado da fermentação de carboidratos, proteínas, vitaminas do complexo B, ácidos graxos livres e minerais (ANJUM et al., 2014). A produção de ácido lático contribui para redução do pH do meio onde atuam, resultando em um ambiente desfavorável aos microrganismos patogênicos.

Os *Lactobacillus acidophilus* produzem também um antimicrobiano natural, conhecido como bacteriocinas, que auxilia na manutenção da microbiota bacteriana saudável. Se desenvolvem em pH ótimo entre 5,5 a 6,0 podendo resistir a pH inferiores a 4,0. Sua temperatura ótima de atuação se encontra entre 35 a 40°C. Apresentam largura de 0,6 a 0,9 µm e comprimento de 1,5 a 6,0 µm e são intolerantes à presença de sais (ANJUM et al., 2014; ANTUNES et. al., 2007; PADILHA, 2013).

2.2 PREBIÓTICOS

Os prebióticos são componentes alimentares não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente a proliferação ou atividade de populações de bactérias desejáveis no cólon (STEFE; ALVES; RIBEIRO, 2008; LI; WANG; DONAVAM,

2014). Adicionalmente, os prebióticos podem inibir a multiplicação de patógenos, garantindo benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Esses componentes atuam mais frequentemente no intestino grosso, embora eles possam ter também algum impacto sobre os microrganismos do intestino delgado (SAAD, 2006; ROBERFROID et al., 2010).

Para que um ingrediente (ou grupo de substâncias) possa ser definido como tal, deve cumprir os seguintes requisitos (DENIPOTE et. al., 2010; PARK, FLOCH, 2007; RODRÍGUEZ, 2003):

- Formar parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas;
- Não ser digerida por enzimas digestivas, nem absorvida na porção superior do trato gastrointestinal;
- Ser seletivamente fermentado por uma colônia de bactérias potencialmente benéficas ao cólon, alterando para uma composição da microbiota mais saudável;
- Ser osmoticamente ativo.

Dentre as principais substâncias prebióticas, temos os fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS), a lactulose, lactiol, xilitol, inulina, oligossacarídeos da soja, pectina, xilooligossacarídeos (XOS), amido resistente (SIRÓ et al., 2008). Frutanos, inulina e oligossacarídeos, são os prebióticos mais utilizados como ingredientes funcionais em alimentos (DAVIS, MARTINEZ, WALTER, & HUTKINS, 2010). Diversos efeitos benéficos são atribuídos à ingestão de prebióticos, entre eles estão a estimulação seletiva de bactérias benéficas presentes no cólon; potencial para reprimir patógenos e limitar virulência por imunoestimulação; modulação da absorção de cálcio e do metabolismo lipídico, redução de colesterol, glicose e do risco de câncer de cólon (SAAD et al., 2013).

De acordo com SLAVIN (2013), o mecanismo de ação dos prebióticos ocorre através de sua fermentação, uma vez que alguns metabólitos são liberados pelas bactérias no trato intestinal, em especial os ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, ácido acético, butírico e propiônico que podem atuar diretamente ou indiretamente sobre as células intestinais participando do controle de processos de carcinogênese, inflamação, alívio da constipação e na redução de infecções intestinais e redução do nível do colesterol sérico.

2.2.1. Inulina

A inulina é um polissacarídeo de reserva que se encontra em muitas frutas e vegetais como, por exemplo, raiz da chicória, cebola e alho, têm sido designada como prebiótico e

fibra alimentar solúvel por sua não digestibilidade pelas enzimas do trato digestivo humano, estímulo seletivo do crescimento e atividade de bactérias intestinais promotoras de saúde, baixo valor calórico e a influência sobre a função intestinal e sobre os parâmetros lipídicos (JUSKIEWICZ et al., 2008; RAMIREZ-FARIAS et al., 2009; ROBERFROID, 2007). Segundo a ANVISA, para a inulina ser considerada um prebiótico, ela deve ser adicionada em alimentos líquidos na concentração de 1,5% e em alimentos sólidos na de 3 % (BRASIL, 2008).

A inulina também foi estudada para outros possíveis efeitos benéficos para a saúde, como no aumento da absorção óssea de cálcio (LOBO et al., 2009; WEAVER, 2005), na resistência a infecções gastrointestinais (SAUER et al., 2007; WENDY et al., 2008), ajudando a prevenir a hipertensão arterial (RAULT-NANIA et al., 2008) e o câncer do cólon (DAVIS, MILNER, 2009; GIBSON et al., 2005; POOL-ZOBEL, SAUER, 2007).

Além de seus benefícios para a saúde, a inulina pode ser usada como um substituto de gordura nos alimentos, a fim de diminuir conteúdo energético, melhorando os aspectos sensoriais dos produtos modificados (BURITI, 2010; GUGGISBERG et al., 2009; TA'RRAGA; COSTELL, 2006; POINOT et al., 2010; PERESSINI; SENSIDONI, 2009; SUN-WATERHOUSE et al., 2010).

2.2.2 Amido resistente (hi-maize)

O hi-maize (amido de milho) ou amido resistente é a quantidade total de amido, e seus produtos de degradação, resistentes à digestão no intestino delgado pelas enzimas pancreáticas, que atingem o cólon onde sofrem fermentação por ação da microbiota intestinal (ANAL; SINGH, 2007; BURGAIN et al., 2011). O hi-maize ao ser lentamente fermentado pela microbiota intestinal, forma ácidos graxos de cadeia curta como o ácido acético, propiônico e butírico, capazes de reduzir o risco de câncer do cólon (SHARMA; YADAV; RITIKA, 2008).

Outros benefícios fisiológicos do hi-maize são: diminuição do valor calórico dos alimentos, sendo importante na prevenção da obesidade; redução do índice glicêmico; redução dos níveis de colesterol no sangue, que ajuda a prevenir e controlar doenças cardiovasculares; a prevenção de doenças inflamatórias do intestino; além de auxiliar na manutenção da integridade do epitélio intestinal (LOBO; SILVA, 2003; WALTER et al., 2005; NUGENT, 2005; SAJILATA et al., 2006). A dose diária recomendada pra a ingestão do amido resistente é de cerca de 20 g / dia, porém, a partir da ingestão de 2,5 a 5 g / dia,

efeitos prebióticos já podem ser alcançados (ANADÓN et al., 2016). Além disso, estudos indicam que o amido resistente pode proteger bactérias probióticas em meios com baixo pH e na presença de sais biliares, aumentando a resistência destas frente ao trato gastrointestinal, ao processamento e armazenamento (LI et al., 2009; BURGAIN et al., 2011).

2.2.3 Farelo de arroz

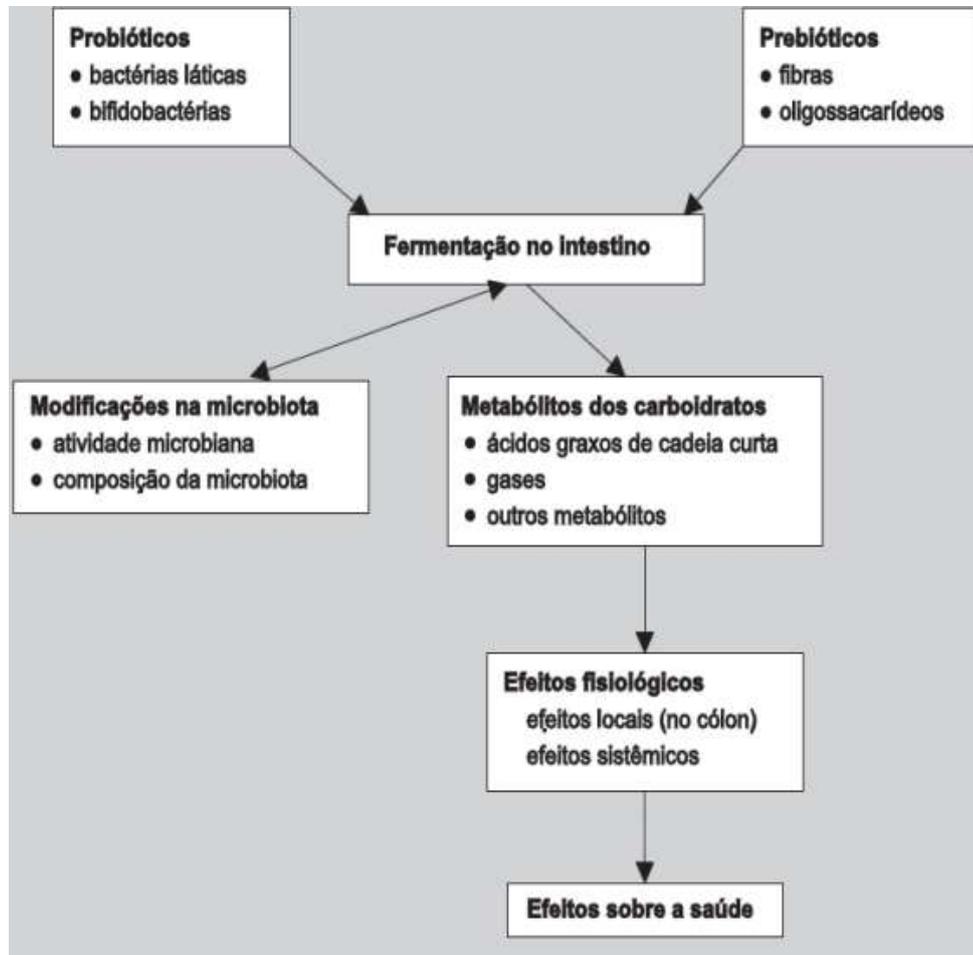
O farelo de arroz é um subproduto do beneficiamento de arroz, obtido após seu descascamento, correspondendo de 8% a 11% do peso total do grão. (PARRADO et al., 2006; SILVA; SANCHES; AMANTE, 2006). Cerca de 74 milhões de toneladas de farelo de arroz são produzidas anualmente, onde a maioria é destinada a alimentação animal ou diretamente descartada (ZHAO et al., 2018). Entretanto, o farelo de arroz é considerado um importante recurso nutricional que poderia ser incorporado nas dietas humanas para melhorar a saúde, particularmente nos países em desenvolvimento (BORRESEN; RYAN, 2014).

Os nutrientes encontrados no farelo incluem minerais, fibras, aminoácidos, antioxidantes (tocoferóis, tocotrienóis, γ -oryzanóis) e vitaminas (B1, B2, B3, B6 e E) (BURLANDO; CORNARA, 2014; MIN et al., 2011). O consumo de farelo de arroz tem sido associado à redução da incidência de câncer colorretal e constipação e doença inflamatória intestinal (KURDI; HANSAWASDI, 2015), redução do colesterol e cálculos renais (SILVA et al., 2006), quelação de metais e fixação do ferro (AMATO, 2006) e diminuição das doenças cardiovasculares (JARIWALLA, 2001). Além de todos os benefícios citados, este, ao contrário dos farelos de trigo, aveia, cevada e centeio, não possui glúten, podendo, portanto, ser utilizado por pessoas intolerantes a esta proteína (HAMMOND, 1994).

2.3 SIMBIÓTICOS

Simbióticos são alimentos contendo simultaneamente microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos, resultando em produtos com as características funcionais dos dois grupos, que em sinergia vão beneficiar a saúde do consumidor (RODRIGUES et al., 2011). Na figura 2 estão ilustradas as reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos na microbiota intestinal.

Figura 2 - Reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo a seus efeitos sobre a saúde.



Fonte: SAAD, 2006.

Os simbióticos possuem eficácia frente à diarreia viral aguda, diarreia do viajante, infecções e complicações gástricas pelo *Helicobacter pylori*, encefalopatia hepática, diarreia em pacientes portadores da síndrome da imunodeficiência adquirida, síndrome do intestino irritável, diarreia em pacientes em nutrição enteral por sonda nasogástrica, radioterapia envolvendo a pelve, doença inflamatória intestinal, carcinogênese, alergia, síndrome da resposta inflamatória sistêmica, constipação, melhoria da saúde urogenital de mulheres, redução do colesterol e triacilglicerol plasmático e efeitos benéficos no metabolismo mineral, particularmente densidade e estabilidade óssea (KARKOW; FAINTUCH; KARKOW. 2007; SCHREZENMEIR; VRESE, 2001; RAFTER et al., 2007).

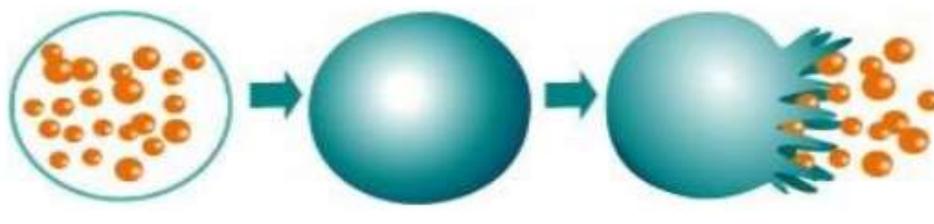
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é definida como uma tecnologia de empacotamento de um ingrediente ativo (sólido, líquido ou gasoso) dentro de um material de revestimento, a fim de ser protegido contra diversos fatores como luz, elevada concentração de oxigênio, calor e umidade, evitando a evaporação de compostos voláteis, mascarando sabores e odores desagradáveis, garantindo uma liberação controlada, além de permitir o desenvolvimento de produtos de alto valor agregado. Para a indústria de alimentos essa tecnologia tem sido bastante utilizada, visto que facilita a aplicação de ingredientes instáveis, além de melhorar o processamento e a textura dos ingredientes devido a uma menor higroscopicidade, aumento da solubilidade e capacidade de dispersão em diferentes tipos de materiais (COMUNIAN; FAVARO-TRINDADE, 2016; DE PRISCO; MAURIELLO, 2016).

Na obtenção de alimentos probióticos a microencapsulação vem sendo avaliada como uma forma de proteção das células viáveis aos extremos de calor e umidade (ZHANG et al., 2015), bem como na manutenção da viabilidade da bactéria/levedura durante a vida útil do produto, prevenindo alterações sensoriais (COOK et al., 2012; FAVARO-TRINDADE et al., 2010; FAREEZ et al., 2015). A microencapsulação também pode aumentar a resistência das bactérias no decorrer do trato digestório, visto que esse meio possui elevada acidez, além da presença de enzimas e da bile, possibilitando que as bactérias cheguem ao intestino em quantidade, com condições de sobrevivência e de colonização (ARGIN et al. 2014; CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

Alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados, tais como a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado, as características do polímero encapsulador, o processo de microencapsulação e as características do produto a ser obtido (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016). A micropartícula obtida deve ser insolúvel em água, para manter sua integridade na matriz alimentar e na parte superior do trato gastrointestinal e, finalmente, as propriedades da partícula devem permitir liberação progressiva das células no intestino (PICOT; LACROIX, 2004). Diferentes métodos podem ser utilizados para a liberação do material encapsulado (figura 3) tais como alteração de pH, ruptura mecânica, temperatura, ação enzimática, força osmótica, entre outras (GOUIN, 2004; MAESTRELLI et al., 2008).

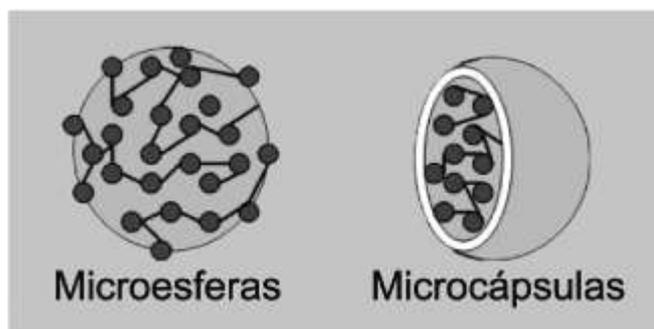
Figura 3 - Liberação da cápsula.



Fonte: MAESTRELLI et. al, 2008

A denominação de micropartículas é usual para as partículas sólidas que têm diâmetro de 1 a 1000 μm , podendo ser classificadas em microcápsulas (sistema reservatório) onde o material ativo é rodeado por um invólucro de polímero, ou microesferas (sistema matriz) onde a fase interna é molecularmente dissolvida ou heterogeneamente dispersa no polímero da matriz, conforme a Figura 4 (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008; NORDSTIERNA et al., 2010; PIMENTEL et al., 2007).

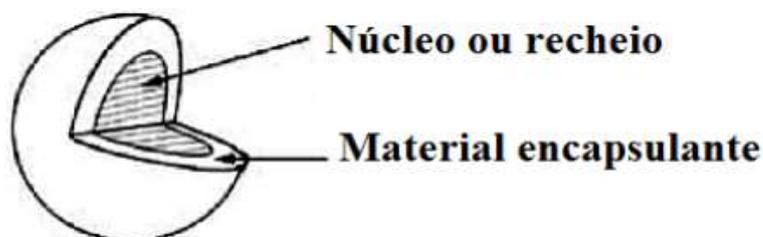
Figura 4 - Esquema ilustrativo diferenciando os dois tipos de micropartículas.



Fonte: Adaptado de PIMENTEL et al., 2007.

O material que vai ser revestido normalmente é denominado por material do núcleo, ingrediente ativo, fase interna ou carga. Já os materiais encapsulantes são denominados como material de parede, fase externa, cobertura ou agente encapsulante e são os responsáveis pela proteção dos agentes ativos e formação das micropartículas ou matrizes, conforme ilustra a Figura 5 (KAUSHIK et al., 2015).

Figura 5 - Estrutura da cápsula.



Fonte: Adaptado de GHARSALLAOUI et. al, 2007.

2.4.1 Métodos de Microencapsulação

Diversas técnicas podem ser utilizadas para microencapsulação de ingredientes alimentícios, e a escolha do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, tamanho, mecanismo de liberação e propriedades físico químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (COOK et al., 2012; SOHAIL et al., 2011; ASSUNÇÃO et al., 2014). A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou empacotamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (LAM; GAMBARI, 2014; SANTOS et al., 2000):

- Processos químicos: Inclusão molecular e polimerização interfacial.
- Processos físico-químicos: Coacervação simples e complexa, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico.
- Processos físicos: spray cooling, spray drying, pulverização em banho térmico, leiteo fluidizado, extrusão em centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização, liofilização e gelificação iônica.

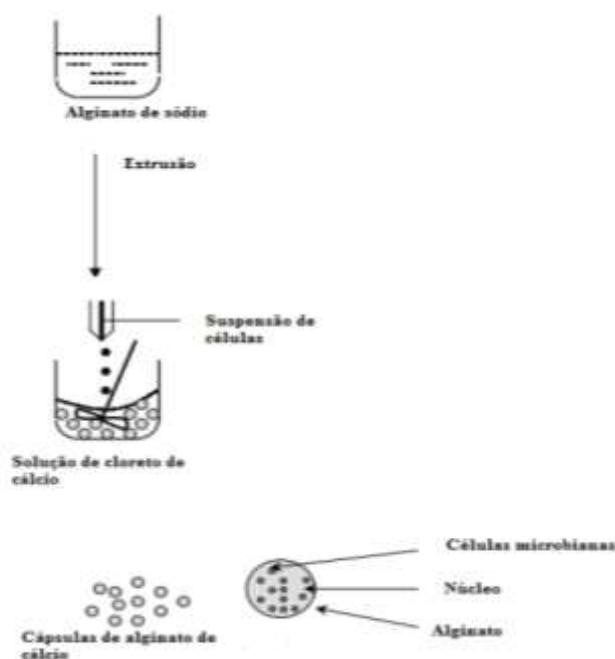
2.4.2 Gelificação iônica externa / extrusão

Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a gelificação iônica externa ou extrusão é a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de

não envolver altas temperaturas e nem solventes orgânicos (DE PRISCO et al., 2015; PEDROSO, 2011; RIBEIRO et al. 2014).

O método físico baseia-se na gelificação externa de polímeros, como alginato, pectina e carragena. Este método consiste em lançar o material, ou seja, uma solução contendo o polímero e, neste caso, a cultura probiótica, através de um bocal de alta pressão, que irá gotejar em uma solução contendo cloreto de cálcio (CaCl_2), para que ocorra a solidificação por gelificação iônica (LISERRE, RÉ, FRANCO, 2007; ETCHEPARE et. al, 2016). Nesse processo, o cálcio difunde-se para o interior das gotas do polímero (LIU et al., 2002). Assim, quando duas soluções de macromoléculas com cargas opostas são misturadas, pode-se dizer que estes complexos de polieletrólitos formados são resultado de interações eletrostáticas entre os dois íons (YAO et al., 2010). Na Figura 6 está ilustrado o esquema do fluxo de encapsulação pelo método de gelificação iônica externa.

Figura 6 - Esquema do fluxo de encapsulação de bactérias por meio da técnica de extrusão.



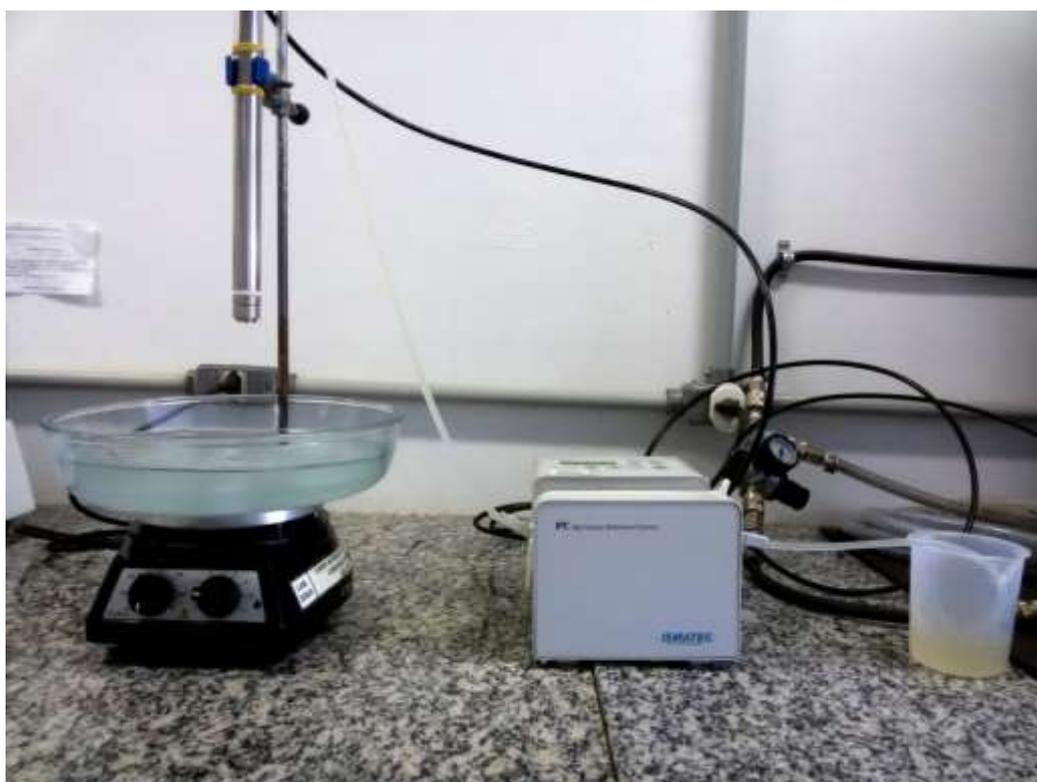
Fonte: KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003.

As micropartículas formadas pela técnica de extrusão possuem o núcleo totalmente disperso na matriz encapsulante, podendo apresentar uma parte do material encapsulado na superfície da matriz. Apresentam textura suave, com características de biocompatibilidade com membranas, em consequência da natureza hidrofílica do material e seu conteúdo de água

ao redor de 95% (DE VOS et al., 2010). A principal limitação desta técnica é o tamanho considerável das cápsulas formadas, uma vez que partículas produzidas por extrusão normalmente apresentam diâmetros que podem variar de 500 μm a 3 mm sendo que o tamanho das partículas formadas é dependente do tamanho do diâmetro da agulha usada para gotejar a solução, da viscosidade e concentração da solução de alginato, e da distância entre a seringa e a solução de cloreto de cálcio (BUREY et al., 2008; KRASAEKOOPT et al., 2003).

Pesquisas vêm sendo realizadas com o intuito de melhorar essa técnica e demonstraram que ao usar equipamentos extrusores com bicos múltiplos, discos aspersores e fluxo de ar comprimido conseguiu-se redução no tamanho da partícula, conforme figura 7 (MARK et al., 2009; ETCHEPARE et al, 2016).

Figura 7 - Método de extrusão desenvolvido por LISERE; RÉ; FRANCO (2007) e adaptado de ETCHEPARE et al. (2016)



2.4.3 Liofilização

A liofilização é uma técnica de desidratação que consiste na redução da atividade de água pelo processo de sublimação, ou seja, antes da liofilização o produto é congelado a

temperaturas abaixo de -18°C de modo que toda a água presente esteja no estado sólido e abaixo do ponto triplo da água, desta forma, a queda de pressão e aumento da temperatura para o valor ambiente faz com que a água evapore, sem passar pelo estado líquido (FELLOEWS, 2000; GARCIA, 2009; GONÇALVES, 2015).

Esta técnica é amplamente utilizada para preservar à longo prazo as bactérias probióticas uma vez que estas são sensíveis ao calor. Além disso, as atividades das enzimas são inativadas porque não há água no meio evitando que ocorram reações bioquímicas (BOSS, 2004). Outra vantagem são as mínimas perdas de nutrientes e a rápida reidratação do produto seco. Por este motivo, mostra-se aplicável à indústria de alimentos já que proporciona a obtenção de produtos de alto valor agregado (CELESTINO, 2010).

2.5 MATERIAIS ENCAPSULANTES

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo, da aplicação pretendida e do método utilizado para formar as micropartículas. De acordo com SANTOS, FERREIRA, GROSSO (2000) e SUAVE et al. (2006), o encapsulante ideal deve apresentar:

- Baixa viscosidade em concentrações elevadas;
- Ser de fácil manipulação durante o processo;
- Possuir baixa higroscopicidade para facilitar a manipulação e evitar aglomeração;
- Não ser reativo com o material a ser encapsulado;
- Ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula;
- Liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação;
- Proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos;
- Ser solúvel em solventes comumente usados;
- Possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo;
- Não apresentar sabor desagradável no caso de consumo oral;
- Ser economicamente viável.

A composição dos encapsulantes depende do tipo de aplicação a que se destinam e pode variar de comestíveis (carboidratos, proteínas) a polímeros de origem natural, semissintética ou sintética (ANSON, 2005). Os agentes de encapsulação podem ser utilizados

sozinhos ou em combinação e a composição ideal é definida para cada processo de microencapsulação particular (FERNANDES; CANDIDO; OLIVEIRA, 2012).

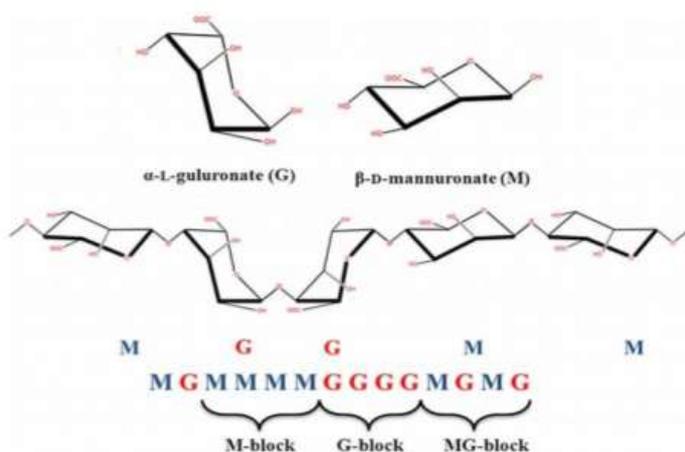
Na microencapsulação de probióticos, empregam-se principalmente, polissacarídeos como alginato de cálcio, pectina, goma xantana e carragena, pois estes constituem uma matriz cuja degradação é favorecida por micro-organismos da microbiota intestinal. Além disso, oferecerem proteção ao nível do trato gastrointestinal superior, permitindo obter uma liberação dos micro-organismos no órgão alvo (COOK et al., 2012; DE VOS et al., 2010).

2.5.1 Alginato

Diversos polissacarídeos e proteínas podem ser utilizados na produção de microcápsulas. O alginato de sódio é um dos polímeros mais empregados como material encapsulante, pois forma uma matriz altamente versátil, biocompatível e não tóxica para a proteção de componentes ativos, células e principalmente microrganismos probióticos, (PASIN et al., 2012). Sua capacidade de rápida absorção de água auxilia na formação do gel (ALBADRAN et al., 2015; SHI et. al., 2013).

O alginato de sódio é um polissacarídeo natural extraído de diferentes tipos algas, solúvel em água, é um aditivo alimentar comercialmente aceitável, apresentando-se como um pó branco pálido ou marrom amarelado, inodoro e insípido. Constitui-se de unidades de ácido D-manurônico e L-gulurônico unidos linearmente por (1-4)- glucosídico, conforme se pode observar na figura 8 (BURGAIN et al., 2011; KATOUZI et al., 2011; MARTÍN et al., 2015; MOKARRAM et al., 2009; SOHAIL et al.; 2011).

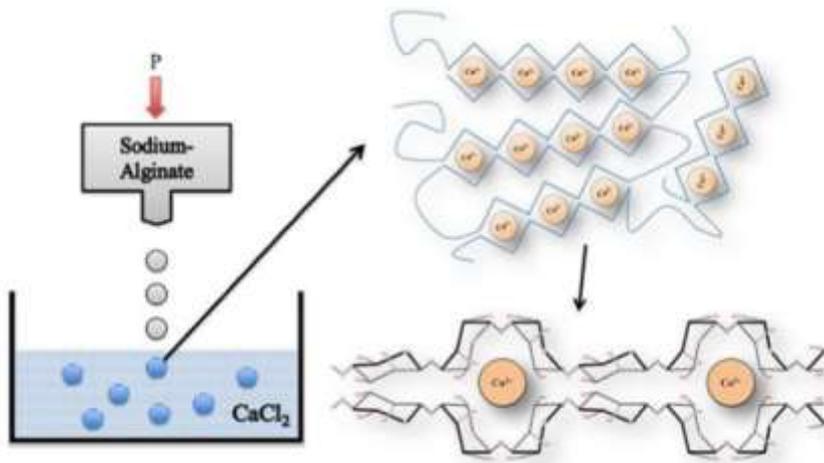
Figura 8 - Estrutura química do alginato.



Fonte: JUÁREZ et al., 2014.

Em presença do cálcio e outros íons divalentes, o alginato de sódio pode trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, ocorrendo a gelificação ionotrópica. Isso ocorre devido à interação intermolecular ionotrópica entre cátions e grupos carboxílicos das cadeias do alginato, promovendo uma estrutura tridimensional gelatinosa que permite a inclusão de algumas moléculas bioativas em sua matriz polimérica por meio de interações eletrostáticas e de Van Der Waals, devido à perda de água (NAYAK et al., 2013). A gelificação do alginato de sódio ocorre através da troca do Na^+ dos blocos G com os cátions divalentes (Ca^{2+}). Estas ligações entre os cátions bivalentes com as cadeias dos blocos G se acomodam em cavidades eletronegativas de maneira tridimensional para formar uma estrutura no formato de “caixa de ovo” ou “egg-box”. (JIAO et al., 2016; NAYAK; PAL, 2011), conforme ilustra a Figura 9.

Figura 9 - Modelo “egg box” para formação de gel de alginato com íons cálcio.



Fonte: JUÁREZ et. al, 2014.

Os materiais e métodos bem como resultados e discussão serão apresentados em dois manuscritos intitulados “Use of prebiotics rice bran, inulin and hi-maize in increasing the viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by external ionic gelation” e “Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e diferentes agentes prebióticos por gelificação iônica externa assistidas por liofilização”, na sequencia discussão e conclusão geral.

3. MANUSCRITO I

Use of prebiotics rice bran, inulin and hi-maize in increasing the viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by external ionic gelation

ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the influence of the addition of probiotics rice bran, inulin and resistant starch (hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated in alginate by external ionic gelation. The viability of probiotics was studied for resistance to simulated gastrointestinal conditions and stability at different storage conditions during 120 days. The microparticles size ranged from 79.7 μm (alginate) to 117.70 μm (rice bran). Inulin as encapsulating matrix presented the highest encapsulation efficiency, 96.75%. All treatments provided better protection for probiotics after exposure to simulated gastrointestinal juice when compared to the free culture. As for storage under different conditions, at 25°C the alginate, rice bran and hi-maize treatments maintained viable probiotics for 120 days. At -18°C, only inulin remained stable during the 120 days. At 7°C, ARB and AIN preserved viable probiotics over the 120 days of storage.

Keywords: extrusion, alginate, probiotics, inulin, hi-maize, rice bran.

1. Introduction

The growing consumer interest in health food products has motivated research into the development of functional foods. Among them, probiotics are highlighted, and described as "live organisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host" (Fao/Who, 2006).

However, the viability of probiotics added to food products is affected by several factors, including low pH, presence of oxygen, storage at low temperatures and passage through the human gastrointestinal tract (Espitia, Batista, Azeredo and Otoni, 2016). Therefore, the development of a suitable technology for the maintenance of probiotic viability is a key research for industrial production of functional food (Sarao and Arora, 2017).

Microencapsulation is one of the most efficient methods, because in addition to protecting probiotic cells from the harmful external environment, it also complies with the release at controlled rates and/or under specific conditions (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Fritzen-Freire, Prudêncio, Pinto, Munoz & Amboni, 2013; Iravani, Korbekandi, & Mirmohammadi, 2015). Among the various techniques, extrusion / external gelation is the most popular method because of its simplicity, low cost and mild formulation conditions that ensure high cellular viability (Krasaekoopt, Bhandari & Deeth, 2003).

One way to improve the stability of probiotics is to add prebiotics in the microparticle formulation (Chen, Chen, Liu, Lin, & Chiu, 2005). Prebiotics are defined as "non-digestible food ingredient that beneficially affects the host by selectively stimulating the growth and/or activity of one or a limited number of bacteria in the colon, and thus improves host health" (Roberfroid et al., 2010).

Typical prebiotics are dietary fibers which usually consist of inulin, oligosaccharides and resistant starch (hi-maize) (Valcheva, & Dieleman, 2016). However, recent studies have found that rice bran has prebiotic potential due to its functional properties, containing about 22.9% dietary fiber, such as hemicellulose, arabinogalactan, arabinoxylan, xyloglucan, proteoglycan, arabinofuranosid and raffinose. In addition, it is also rich in some nutrients such as proteins, vitamins, minerals, fatty acids and antioxidants such as oryzanol, tocopherol, tocotrienol and ferulic acid (Demirci et al., 2017; Kataoka et al., 2008; Sierra et al., 2005; Zubaidah et al., 2012).

Since it contains several essential nutrients, rice bran helps prevent some chronic degenerative diseases, such as high cholesterol, some types of cancers, and diabetes. It also

helps prevent vitamin B1 deficiency, as well as helping to remove heavy metals, such as lead. It has in its composition niacin (vitamin B3), which has a soothing effect on the nervous system (depression, schizophrenia) and thiamine (vitamin B1) that helps in heart problems and constipation, as well as assist in the digestion of sugars (Iqbal, Bhanger & Anwar, 2005; Younas et. al., 2011). In addition to all the above benefits, unlike wheat bran, oats, barley and rye, rice bran has no gluten and can therefore be used by people intolerant to this protein (Hammond, 1994).

Thus, the aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different prebiotics (inulin, hi-maize and rice bran) in alginate microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* and produced by extrusion / external ionic gelation technique, when exposed to gastrointestinal tract passage simulation and storage at different temperatures.

2. Material and Methods

2.1 Material

In order to produce the microparticles, the following compounds were used: Sodium Alginate (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil); Inulin (Metachen, Sao Paulo, Brazil); Hi-maize (National Starch Food Innovation, Indianápolis, Indiana, USA); Rice bran (Hnutri, Ipiranga, Sao Paulo, Brazil); Calcium Chloride (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil) and probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* obtained by Crealys® Science Park (Belgium).

2.2 Inoculum

The probiotic culture *L. acidophilus* (Crealy® Science Park) was activated in MRS broth (Himedia Curitiba, Parana, Brazil) and incubated for 15-18h at 37°C. Then, it was centrifuged at 4670 g for 15 minutes and washed with NaCl solution (0.85%). Cells were suspended in saline to obtain a solution containing about 14 log CFU g¹.

2.3 Microencapsulation process

Microparticles were produced according to the extrusion technology developed by Liserre, Re and Franco (2007), with adaptations of Etchepare et al. (2016). For that, an

aerograph (nozzle size: 0.3 mm) model EW 110 was coupled to an air compressor model MB24/BV, on air pressure of 2.72 kgf/cm², using the height of 30 cm between the atomizing nozzle and the CaCl₂ solution.

Four solutions were prepared in the following formulations: 2% sodium alginate (ALG); 2% sodium alginate + 10% rice bran (ARB); 2% sodium alginate + 10% hi-maize (AHM) and 2% sodium alginate + 10% inulin (AIN).

After complete dispersion of the polymers, strains of *L. acidophilus* were added and solutions (ALG, ARB, AHM and AIN) were sprayed in 0.1 M CaCl₂ (Vetec, Rio de Janeiro, Brazil). The particles were kept under stirring for 30 min in CaCl₂ solution to ensure complete gelation, and then removed from the solution using a sieve 0.038 mm (400 mesh), sterilized, and washed with sterile distilled water.

2.4 Enumeration of microencapsulated *Latobacillus acidophilus*

The viable cell count was performed according to the methodology proposed by Sheu & Marshall (1993) with modifications. One gram of microparticles was added in 9 ml of phosphate buffer solution (0.1 M, pH 7.5) followed by homogenization in a stomacher for 10 minutes. Then, the samples were serially diluted with water peptone (0.1 g 100 g⁻¹) and plated on MRS agar (Himedia Curitiba, Paraná, Brazil). The plates were incubated in anaerobic jars with the Anaerobac system (Probac, Sao Paulo, Brazil) at 37 °C for 72 h. Following incubation, viable probiotic cells were enumerated and the results were expressed in log colony-forming units per gram (log CFU g⁻¹).

2.5 Characterization of the microparticles

2.5.1 Morphology and particle size distribution

The morphology of the microcapsules was performed using an optical microscope (Carl Zeiss Axio Scope.A1, Oberkochen, Germany) equipped with an AxioCam MRc digital camera (Carl Zeiss). The particle size distribution was determined in the Mastersizer 2000 laser diffraction equipment (Malvern, Germany).

2.5.2 Physico-chemical characterization

The microcapsules were analysed for water activity and moisture according to the methodology described by AOAC (2005).

2.6 Encapsulation Efficiency

The equation Eq. (1) proposed by Martín, Laravilloslada, Ruiz & Morales (2013) was used to calculate the survival rate of the microorganism during the microencapsulation process, that is, the encapsulation efficiency (EE%),

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

Where N is the number of viable cells (log CFU g⁻¹) released from the microparticles and N₀ is the number of viable cells (log CFU g⁻¹) in the cell concentrate used for microencapsulation.

2.7 Viability of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* exposed to simulated gastrointestinal conditions

The simulation of gastrointestinal conditions was performed according to the method proposed by Madureira et al. (2011) with modifications. Therefore, the microparticles were submitted to different pHs, simulating the sections of the gastrointestinal tract, such as esophagus/stomach (addition of pepsin, pH adjusted to 2.0 for 90 minutes), duodenum (addition of pancreatin and bile salts, pH adjusted to 5.0 for 20 min) and ileum (pH adjusted to 7.5 for 90 min). The analysis was carried out in a shaking refrigerated incubator (TE-421, Tecnal, Piracicaba, Brazil) at 37°C to simulate body temperature at agitation conditions (130 rpm for esophageal/stomach assay, and 45 rpm for duodenum and ileum assay) to simulate the peristaltic movements of the digestive tract. During the procedure, aliquots were taken after 0 and 90 min (esophagus/stomach), 110 min (duodenum), and 200 min (ileum), and the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* was analysed by enumeration on MRS agar according to Section 2.4.

2.8 Viability of *Lactobacillus acidophilus* at different storage conditions

The microparticles of *Lactobacillus acidophilus* were stored at room temperature (25°C), refrigeration (7°C) and freezing (-18°C) for 120 days and enumerated after 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 days of storage as described in Section 2.4.

2.9 Statistical analysis

Data were subjected to analysis of variance (ANOVA) using Statistica Software version 7.0 (2004, Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), followed by the Tukey test to compare means, at a 5% significance level, if there are significant differences between treatments. All tests were performed in triplicate and data were expressed as mean \pm standard deviation.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of the microcapsules

According to Fig 1, it is possible to observe that all treatments presented spherical, uniform microparticles with core material distributed throughout the matrix.

The microparticles size has an important influence on the viability of probiotics and the sensory effect on food. Usually, how bigger the microparticles, the better the protection for probiotics (Lee & Heo, 2000), but the worse the sensory effect (Hansen, Allan-Wojtas, Jin & Paulson, 2002). Microparticles within the size range 100-200 μ provide an ideal balance between the two conflicting requirements (Nag, Han, & Singh, 2011). In this study, the mean diameter of the microparticles of the different matrices varied from 79.7 - 117.70 μm (Table 1), and the smallest particle size was obtained in the alginate treatment, while the treatment with the largest mean diameter was rice bran. The inulin and hi-maize treatments presented particle size of 91.58 μm and 106.6 μm , respectively. Krasaekoopt & Watcharapoka (2014) and Chavarri et al. (2010) observed an increased diameter in microparticles containing prebiotics (galacto-oligosaccharides and inulin / quercetin, respectively). These results are in accordance with those found in this study, since the addition of prebiotics increased the size of the microparticles.

Table 1 shows the physico-chemical characterization of the microparticles in the percentage of moisture and water activity. High moisture levels were observed, on average of 94.94%, 89.46%, 90.97% and 81.64% for the treatments ALG, ARB, AIN e AHM, respectively. The lowest value found was for the microparticles containing hi-maize, this may be explained because as the time passes and the temperature decreases, the starch chains tend to interact more strongly with each other, forcing the water out and thus determining the called syneresis (Thompson, 2000; Cereda et al., 2001).

High levels were also observed for water activity, on average 0.99 for all treatments. Several studies justify that these high values are characteristic of microparticles produced with gel-forming polysaccharides due to their large water retention capacity (Aguilar et. al, 2015).

3.2 Encapsulation Efficiency

From the results presented in Table 1 it is observed that the external ionic gelation technique promoted high encapsulation efficiency (EE%) of *Lactobacillus acidophilus* (76.17 to 96.75%) with significant differences ($p < 0.05$). The best encapsulation efficiencies were observed in the inulin, rice bran and alginate treatments with 96.75, 94.87 and 94.10% respectively. The high encapsulation efficiency observed in this study may be due to the natural resistance of the microorganism and the encapsulation conditions, which was performed at room temperature (25°C), without using organic solvents (Souza et al., 2012).

In another study, Jantarathin, S., Borompichaichartkul C. and Sanguandeeikul, R. (2017) produced microspheres where Jerusalem artichoke and inulin were separately co-encapsulated with *Lactobacillus acidophilus* TISTR 1338 in the sodium alginate matrix and coated with chitosan by extrusion technique and the average encapsulation efficiency ranged from 88.19-90.40%.

Nunes et al. (2018), produced gum arabic microparticles containing the prebiotics inulin, resistant starch (hi-maize) and trehalose by the spray drying technique and reported that among the studied encapsulation matrices, resistant starch (hi-maize) and inulin produced the best viability of the *Lactobacillus acidophilus*, however, no significant difference ($p > 0.05$) was observed between them. Due to this improved viability, these two encapsulating matrices provided the highest survival rates of 94.26% and 93.12%, respectively, followed by trehalose (90.34%) and gum arabic (89.68%).

3.3 Viability of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 after exposure to simulated gastrointestinal conditions

The results for the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* by extrusion / external gelation in the different treatments exposed to simulated gastrointestinal conditions are presented in Table 2. After the microencapsulation process, the

initial count of *L. acidophilus* was 13.85 ± 0.05 , 13.94 ± 0.20 , 14.24 ± 0.05 and 11.21 ± 0.09 log CFU g⁻¹ for alginate (ALG), rice bran (ARB), inulin (AIN) and hi-maize (AHM) respectively. The free microorganism presented initial count of 14.72 ± 0.02 log CFU g⁻¹. For a strain to be considered probiotic, the first step is the tolerance of the microorganism to the gastrointestinal tract adverse conditions, so that they can reach, adhere and proliferate in the intestine, performing the health benefits on the host. In addition, it is extremely important that it remains viable when incorporated into food until the time of consumption, without compromising the sensorial attributes (ANVISA, 2008).

The stomach is considered a crucial section for probiotics, since the pH of the gastric juices is about 1.5-3.0 (Kos et al., 2000). After 90 minutes at pH 2.0 (simulating esophageal / stomach environment) a reduction of 7.6 log CFU g⁻¹ ($p < 0.05$) was observed in the free cells when compared to the initial count of probiotics (14.72 ± 0.02), showing that they are sensitive to acidic conditions. Gebara et al. (2013) observed that the unencapsulated *Lactobacillus acidophilus* probiotic was sensitive to exposure to simulated gastric juice (120 min / pH 1.2 and 3.0), presenting a reduction of 6.25 log from its initial count.

When the microencapsulated probiotics were submitted to acidic conditions, it was observed that there was no total rupture of the microparticles since all the treatments presented low counts when compared to their initial count.

After exposure to simulated duodenal conditions (bile salts, pancreatin and pH 5.0), free cells presented an even more significant decrease ($p < 0.05$) in the viable cell population (8.52 log CFU g⁻¹) when compared to the initial count. On the other hand, the microencapsulated probiotic presented 4.74 ± 0.06 , 5.64 ± 0.06 , 3.04 ± 0.13 and 5.03 ± 0.12 log CFU g⁻¹ for the ALG, ARB, AIN and AHM treatments, respectively, suggesting that there was a greater rupture of the microparticles in comparison with the acidic conditions.

Finally, at the end of the analysis, after exposure to the simulated ileum conditions (pH 6.5), it was observed that the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in alginate, as well as associated to the different prebiotics, conferred greater protection to the probiotic during the exposure to the simulated gastrointestinal tract, since after passage through the ileum, treatments containing alginate, rice bran, inulin and hi-maize presented counts of 11.18 ± 0.13 , 8.06 ± 0.01 , 8.93 ± 0.09 and 9.47 ± 0.23 log CFU g⁻¹, respectively. This meets the requirements for probiotics to have beneficial effects (FAO / WHO, 2001), while the free microorganism remained below these values (5.69 ± 0.08 log CFU g⁻¹).

The results presented in this study are in accordance with other studies that show the microencapsulation efficiency in the protection of probiotics during exposure to

gastrointestinal conditions. Chavarri et al. (2010) used chitosan as coating material in alginate microparticles to encapsulate *Lactobacillus gasseri* and *Bifidobacterium bifidum*, and found improved survival during exposure to the gastrointestinal tract conditions. Shi et al (2013) developed milk-alginate microparticles containing *Lactobacillus bulgaricus* and found that bacteria encapsulated by extrusion exhibited significantly more viable cells than the free cells, presenting counts of 9.24 and 8.48 log CFU g⁻¹ after exposure to 1% bile salt solution during 1 and 2 h, respectively, and 8.65 and 7.86 log CFU g⁻¹ after exposure to 2% bile salt solution for 1 and 2 h, respectively. Etchepare et al. (2016) produced alginate and alginate + hi-maize microparticles by the extrusion technique and reported that after 360 minutes of exposure to the gastrointestinal simulated environment, the treatment with hi-maize showed little loss of viability, with a 6.87 log CFU g⁻¹ count, evidencing the efficacy of adding prebiotics to the alginate microparticles.

In another study, Darjani, Nezhad, Kadkhodae & Milani (2016) developed *Lactobacillus casei* microparticles where native inulin, long-chain and short-chain inulin were incorporated separately into alginate and chitosan by the extrusion technique. They reported that probiotic viability was greater in microparticles than in free cells. In the same way, Nunes et al. (2018) produced *Lactobacillus acidophilus* La-5 microparticles containing inulin, hi-maize and trehalose by spray drying and observed that the microparticles of hi-maize and trehalose allowed greater protection to the probiotic when compared to the free cells.

3.4 Viability of *Lactobacillus acidophilus* at different storage conditions

Table 3 shows the stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* during 120 days of storage under temperatures of 25°C, 7°C and -18°C, simulating different environmental conditions.

The efficiency of probiotic-containing food products depends on the number of viable cells (equal to or greater than 6 log CFU g⁻¹) at the time of consumption (Roy, 2005; Korbekandi, Mortazavian, & Iravani, 2011). It is therefore essential to ensure a high survival rate of probiotics during production as well as during the shelf life of the product (Cruz et al., 2010).

In relation to the storage at room temperature (25°C), the number of viable cells of *L. acidophilus* remained stable for 120 days in the ALG, ARB and AHM treatments, showing no significant difference ($p < 0.05$) in the microparticles added with the prebiotics rice bran (7.79 ± 0.04 log CFU g⁻¹) and hi-maize (7.61 ± 0.08 log CFU g⁻¹). This may be explained because

probiotic bacteria are gram-positive and present specific proteins on their cell surface, thus adhering to the starch by a link between these proteins and a α -1,4-linked glucose saccharides present in the starch (Crittenden et al., 2001), the same should occur with the rice bran structure as it contains a large source of starch.

Studies by Etchepare et al. (2016) corroborate with the results found in this study. After encapsulating *Lactobacillus acidophilus* using alginate and resistant starch (hi-maize), it was observed that the microparticles remained stable for 135 days of storage at 25°C with counts of 6.53 ± 0.12 log CFU g⁻¹ for alginate and 7.03 ± 0.25 log CFU g⁻¹ for hi-maize. Conversely, in a study performed by Holkem et al. (2016), microparticles composed of alginate and *Bifidobacterium* BB12 by internal gelation technique did not demonstrate the same protective effect to the microorganism, remaining viable for only 60 days during storage at 25°C for 120 days. Furthermore, Tomás et al. (2015) used the extrusion technique to encapsulate *Lactobacillus reuteri* using xanthan gum and gellan gum as coating materials and lyophilisation for drying the microcapsules with and without the addition of cryoprotectants lactose and skim milk. After lyophilisation, the microcapsules were stored at room temperature for 150 days. It was observed that both treatments with and without cryoprotectants did not promote the viability of the microorganism during the 150 days of storage. The treatments without cryoprotectants remained viable for a period of 21 days, while the treatments containing lactose and skim milk remained viable for 60 days.

Regarding the freezing temperature, it was observed that alginate microparticles (ALG), and rice bran (ARB) remained stable for 75 days with counts of 8.58 ± 0.11 and 6.71 ± 0.22 log CFU g⁻¹, respectively. The hi-maize microparticles presented 6.43 log CFU g⁻¹ counts at 105 days of storage, but the treatment containing inulin (AIN) showed better results, since the microorganism remained viable during the 120 days with counts of 6.34 log CFU g⁻¹. Studies prove that inulin has many health benefits as it stimulates the proliferation of beneficial intestinal bacteria, reduces the risk of gastrointestinal diseases, regulates blood glucose, promotes mineral absorption and boosts the immune system (Shoaib et al., 2016). In addition, this study suggests that the addition of this prebiotic to alginate microparticles may increase the survival of encapsulated *Lactobacillus acidophilus* for a longer period during storage at -18°C in comparison to the other microparticles.

In another study, Sousa, et al. (2015) showed that the storage at -20°C presented a negative impact on the strain stability of *B. animalis* BB-12, *L. acidophilus* Ki, *Lactobacillus casei*-01 and *Lactobacillus paracasei* L26 when encapsulated in 2% alginate microparticles

by the extrusion technique, since the cells had a significant reduction in their viability in 60 days.

Regarding the refrigeration storage (7°C), all treatments presented satisfactory results, once the ALG and AHM microparticles remained viable up to 105 days of storage, with counts of 6.24 log CFU g⁻¹ and 6.17 log CFU g⁻¹, respectively, whereas ARB and AIN remained above 6 log CFU g⁻¹ during the 120 days, meeting the basic requirements for conferring health benefits. Therefore, the use of prebiotics rice bran and inulin had a positive effect on alginate microparticles, increasing the survival of the encapsulated microorganism during storage at 7°C for a longer period.

Mirzaei et al. (2012) studied the impact of microencapsulation of resistant starch and calcium alginate on the survival capacity of *Lactobacillus acidophilus*. They found that microencapsulation in resistant starch and calcium alginate was able to increase the survival rate of *L. acidophilus* after storage in cheese at 5°C for 182 days. Coghetto et al. (2016) developed microparticles of alginate and alginate-pectin containing *Lactobacillus plantarum* by the electro-spray technique and observed that the microparticles maintained the stability of the microorganism during storage at 4°C for a period of 21 days.

4. Conclusion

Alginate microparticles as well as those added from the prebiotics produced by the extrusion / external gelation technique, promoted the resistance of *Lactobacillus acidophilus* during gastrointestinal tract passage simulation. The alginate, rice bran and hi-maize treatments provided the viability of the microorganism at 25°C for 120 days. At -18°C, the use of the prebiotic inulin positively affected the survival of the microencapsulated microorganism, once it was the only treatment that maintained the microparticles viable for 120 days. Likewise, at 7°C the best results were achieved in the microparticles containing the prebiotics inulin and rice bran. However, rice bran stands out in this study once it is a by-product and currently little studied, and presented excellent results as to its prebiotic action. Therefore, in addition to prebiotics conferring health benefits, thus providing a functional microparticle, it can be concluded that the incorporation of them, mainly rice bran, into alginate microparticles by the extrusion / external gelation technique, represents an efficient system to promote the resistance of *Lactobacillus acidophilus* to adverse conditions such as passage through the gastrointestinal tract and different storage conditions.

5. References

- Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos. Comissões e Grupos de Trabalho. Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/ Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. Atualizado em: julho de 2008. IX- Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: < http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 25 junho. 2017
- Aguilar, K. C., Tello, F., Bierhalz, A. C. K., Garnica Romo, M. G., Martínez Flores, H. E., Grosso, C. R. F. (2015). Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation, *Journal of Food Engineering*, v. 154, p. 17-24. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2014.12.020>
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the association analytical chemists. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.
- Cereda, M. P. et al. Propriedades gerais do amido. São Paulo, Fundação Cargill, 221 p. (Série: Culturas de tuberosas amiláceas Latino-americanas, v. 1) 2001.
- Chavarri, M., Maranon, I., Ares R., Ibanes, F. C., Marzo, F., Villaran Mdel, C. (2010). Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. *International Journal of Food Microbiology*, 142 (1e2) pp. 185-189, 10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022
- Chen, K. N., Chen, M. J., Liu, J. R., Lin, C.W., & Chiu, H.Y. (2005). Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation. *Journal of Food Science*, 70, 260-266. Doi: 10.1111/j.1365-2621.2005.tb09981.x
- Coghetto, C. C., Brinques, G. B., Siqueira, N. M., Pletsch, J., Soares, R. M. D., Ayub, M. A. Z. (2016). Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. *Journal of Functional Foods*, 24, 316–326. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.03.036>
- Cook, M.T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012) Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *J Control Release*. Aug 20;162(1):56-67. doi: 10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
- Cruz, A. G., Faria, J. A., Walter, E. H., Andrade, R. R., Cavalcanti, R. N., Oliveira, C. A., & Granato, D. (2010). Processing optimization of probiotic yogurt containing glucose oxidase using response surface methodology. *Journal of Dairy Science*, 93(11), 5059-5068. PMID:20965320. <http://dx.doi.org/10.3168/jds.2010-3336>

- Darjani, P., Nezhad, H. M., Kadkhodae, R., Milani, E. (2016) Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 73, Pages 162-167 <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.05.032>
- Demirci, T., Aktas, K., Sözeri, D., Öztürk, H. I., & Akın, N. (2017). Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. *Journal of Functional Foods*, 36, 396–403. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.019>
- Espitia J.P., Batista R. A., Azeredo H.M.C., Otonide C. G. (2016). Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International*, v. 90, p. 42-52., <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>
- Etchepare, M. A., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, E. M. M., Barin, J. S., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate, *Journal of Functional Foods*, 21, 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.025>
- Fao/Who (2006). Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food and Nutritional Paper No. 85, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.
- Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization. (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]. <http://isappscience.org/wp-content/uploads/2015/12/FAO-WHO-2001-Probiotics-Report.pdf>
- Fritzen-Freire, C.B., Prudencio, E.S., Amboni, R.D.M.C., Pinto, S.S., Negrao-Murakami, A.N., Murakami, F.S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45 (1), pp. 306-312, doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.020
- Gebara, C., Chaves, K. S., Ribeiro, M. C. E., Souza, F. N., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2013). Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectine whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 51(2), 872-878. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>
- George M., Abraham T. E. (2006). Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan--a review. *J Control Release*. 2006 Aug 10;114(1):1-14.
- Hammond, N. (1994). Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. *American Cereal Chemists*, Saint Paul, v. 39, n. 10, p. 752-754.

- Hansen, T. L., Allan-Wojtas, P., Jin, Y., Paulson, A., (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol*, v 19, pages 35–45. Doi: <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0452>
- Holkem, A.T., Raddatz, G.C., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Muller, E. I., Codevilla, C. F., Jacob-Lopes, E., Grosso, & C. R. F., Menezes, C.R. (2017). Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, xxx, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.07.013>
- Iqbal, S., Bhangar, M. I., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, v. 93(2), pages 265–272. Doi: 10.1016/j.foodchem.2004.09.024
- Iravani, S., Korbekandi, H., & Mirmohammadi, V. S. (2015) Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. *J Food Sci Technol*, v; 52(8), pages 4679–4696. Doi: 10.1007/s13197-014-1516-2
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul C. e Sanguandeeikul, R. (2017) Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its effect on viability under heat process in shrimp feeding. *Materials Today: Proceedings*. Volume 4, Issue 5, Part 2, Pages 6166-6172. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.matpr.2017.06.111>
- Kataoka, K., Ogasa, S., Kuwahara, T., Bando, Y., Hagiwara, M., Arimochi, H, Nakanishi, S., Iwasaki, T., & Ohnishi, Y. (2008). Inhibitory effects of fermented brown rice on induction of acute colitis by dextran sulfate sodium in rats. *Digestive Diseases and Sciences*, 53, 1601–1608. DOI 10.1007/s10620-007-0063-3
- Korbekandi H, Mortazavian AM, Iravani S (2011) Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotics In: Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to the human health. Shah, N.P., da Cruz, A.G., Faria, J.A.F. (Eds.), Nova Science Publishers, Inc. USA.
- Kos, B., Šušković, J., Goreta, J. and Matošić, S. (2000) Effect of protectors on the viability of *Lactobacillus acidophilus* M92 in simulated gastrointestinal conditions. *Food Technology and Biotechnology* 38, 121 – 128.
- Krasaekoopt, W., Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT – Food Science and Technology*, v. 57, pp. 761-766. Doi: 10.1016/j.lwt.2014.01.037
- Krasaekoopt W., Bhandari B., Deeth H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *Int. Dairy J.* v.13, pages 3–13. Doi: 10.1016/S0958-6946(02)00155-3

- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869-873.
- Liserre, A.M., Ré, M.I., Franco, B.D.G.M. (2007) Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, v. 21 (1), pp. 1-16. Doi: <https://doi.org/10.1080/08905430701191064>
- Madureira, A. R., Amorim, 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*, v. 44, pages 465-470. Doi: 10.1016/j.foodres.2010.09.010
- Martín, M. J., Lara-villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, v. 53(2), pages 480-486. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- Mirzaei, H., Pourjafar, H., Homayouni A. (2012). Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. *Food Chemistry*, v. 132, pp. 1966-1970, Doi: 10.1016/j.foodchem.2011.12.033
- Mokarram, R. R., Mortazavi, S. A., Habibi Najafi, M.B., & Shahidi, F. (2009). The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, v. 42, pages 1040–1045. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.04.023>
- Nag, A.; Han, K.; Sing, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 247-253. Doi: 10.1016/j.idairyj.2010.11.002
- Nunes L. G., Etchepare A. M., Cichoski J. A., Zepka Q. L., Lopes J. E., Barin S. J., Flores M. M. E., Silva B. C., Menezes R. C. (2018) Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., & Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, v. 104, S1–S63. Doi: 10.1017/s0007114510003363

- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, 85, 39–56.
- Sarao L. K, Arora M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Crit Rev Food Sci Nutr*. Jan 22;57(2):344-371. 10.1080/10408398.2014.887055
- Sierra, S., Lara-Villoslada, F., Olivares, M., Jimenez, J., Boza, J., & Xaus, J. (2005). Increased immune response in mice consuming rice bran oil. *European Journal of Nutrition*, 44, 509–516. DOI 10.1007/s00394-005-0554-y
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of *Lactobacilli* in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- Shi L. E., Li H. Z., Li T. D., Min Xu, Chen Y. H., Zhang L. Z., Tang X. Z.(2013). Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Engineering* p.99–104. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2013.02.012>
- Shoaib M., Shehzad A., Omar M., Rakha A., Raza H., Sharif H. R., Shakeel A., Ansari A., Niazi S. (2016). Inulin: Properties, health benefits and food applications. *Carbohydr Polym*. 2016 Aug 20;147:444-54. doi: 10.1016/j.carbpol.2016.04.020
- Sousa, S., Gomes, M. A., Pintado M. M., Silva, J. P., Costa, P., Amaral, H. M., Duarte C. A., Rodrigues, D., Rocha-Santos, A. P. T., Freitas C. A (2015). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioproducts Processing*, Volume 93, Pages 90-97 <https://doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.007>
- Souza F. N., Gebara C, Ribeiro M.C.E., Chaves K.S., Gigante M.L., Grosso C.R.F. (2012). Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. *Food Research International*, 49, pp. 560-566. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2012.07.041>
- Thompson D. B (2000); Strategies for the manufacture of resistant starch. *Trends in Food Science & Technology*, 11, 245-253. Doi: [http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244\(01\)00005-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0924-2244(01)00005-X)
- Tomás J. M. S., De Gregorio P. R., Leccese Terraf M. C., Nader-Macías M. E. (2015). Encapsulation and subsequent freeze-drying of *Lactobacillus reuteri* CRL 1324 for its potential inclusion in vaginal probiotic formulations. *Eur J Pharm Sci*. 15;79:87-95. doi: 10.1016/j.ejps.2015.08.010.
- Valcheva, R.; Dieleman, L. A. Prebióticos: definição e mecanismos de proteção. *Best Practice & Research Gastroenterologia Clínica*, v. 30, n. 1, p. 27-37, 2016. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bpg.2016.02.008>.

Younas A, Bhatti M S, Ahmed A and Randhawa M A. (2011) Effect of rice bran supplementation on cookie baking quality, Pak J Agri Sci,v.48, p.129-134. ISSN (Print) 0552-9034,

Zubaidah, E., Nurcholis, M., Wulan, S. N., & Kusuma, A. (2012). Comparative study on synbiotic effect of fermented rice bran by probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* and newly isolated *Lactobacillus plantarum* B2 in Wistar Rats. *APCBEE Procedia*, 2, 170–177. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.03

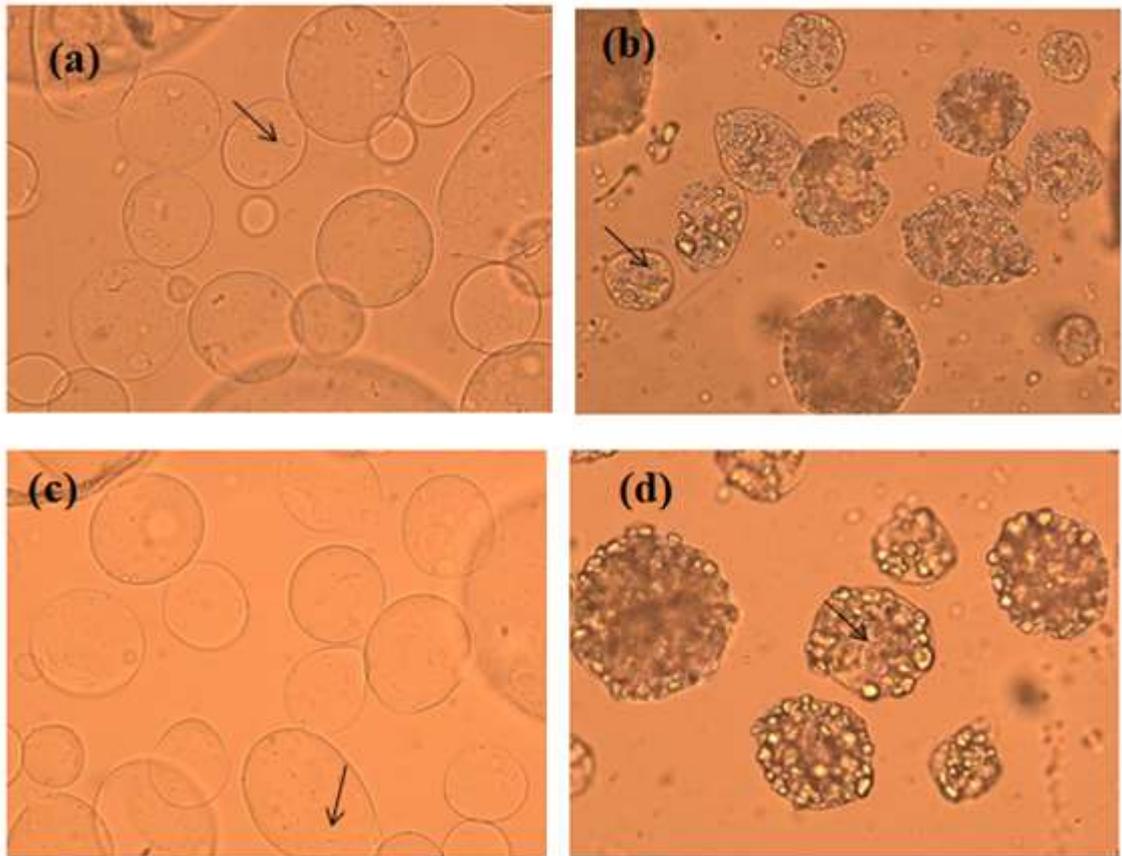


Fig 1. Optical microscopy of alginate microparticles with different prebiotic sources containing *Lactobacillus acidophilus* obtained by internal ionic gelation.

(a) = 2% alginate microparticles (ALG) (40x); (b) = 2% alginate microparticles + 10% rice bran (ARB) (40x); (c) = 2% alginate microparticles + 10% inulin (AIN) (40x); (d) = 2% alginate microparticles + 10% hi-maize (AHM) (40x).

Table 1 - Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* microparticles obtained by external ionic gelation with alginate and different prebiotic sources.

	ALG	ARB	AIN	AHM
Particles size (μm)	79.7 \pm 0.11 ^D	117.70 \pm 0.82 ^A	91.58 \pm 0.37 ^C	106.6 \pm 0.69 ^B
Moisture (%)	94.94 \pm 0.09 ^A	89.46 \pm 0.10 ^B	90.97 \pm 4.78 ^B	81.64 \pm 1.31 ^C
Water activity	0.995 \pm 0.0002 ^D	0.997 \pm 0.0004 ^B	0.996 \pm 0.0003 ^C	0.999 \pm 0.0005 ^A
Encapsulation efficiency (EE%)	94.10 \pm 0.37 ^B	94.87 \pm 1.51 ^{AB}	96.75 \pm 0.34 ^A	76.17 \pm 0.65 ^C

ALG = 2% alginate microparticles; ARB = 2% alginate microparticles + 10% rice bran; AIN = 2% alginate microparticles + 10% inulin; AHM = 2% alginate microparticles + 10% hi-maize. * Means followed by the same letter, lowercase in the row, do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Averages found in triplicate.

Table 2 - Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* in the different treatments after each step of the simulated gastrointestinal conditions.

	Free culture	ALG	ARB	AIN	AHM
Initial count	14.72 ±0.02 ^{Aa}	13.85±0.05 ^{aD}	13.94±0.20 ^{aCD}	14.24±0.05 ^{aB}	11.21±0.09 ^{aE}
Esophagus / stomach 90 min / pH 2.0	7.12±0.08 ^{bA}	4.25±0.07 ^{dC}	5.51±0.01 ^{cB}	2.66±0.10 ^{dD}	4.23±0.01 ^{dC}
Duodenum 20 min / pH 5.0	6.20±0.05 ^{cA}	4.74±0.06 ^{cC}	5.64±0.06 ^{cB}	3.04±0.13 ^{dD}	5.03±0.12 ^{cC}
Ileum 90 min / pH 6.5	5.69±0.08 ^{dE}	11.18±0.13 ^{bA}	8.06±0.01 ^{bD}	8.93±0.09 ^{bC}	9.47±0.23 ^{bB}

ALG = 2% alginate microparticles; ARB = 2% alginate microparticles + 10% rice bran; PIN = 2% alginate microparticles + 10% inulin; AHM = 2% alginate microparticles + 10% hi-maize. Averages followed by the same letter, lowercase in the column and upper case in the row, do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Averages found in triplicate.

Table 3 - Effect of the ambient temperature (25 ° C), freezing (-18 ° C) and cooling (7 ° C) on the viability of microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* produced with different encapsulating matrices during storage for 120 days.

Temperature		Room (25 ° C)			
Treatments Time (Days)	ALG	ARB	AIN	AHM	
0	13.85 ± 0.05 ^{aC}	13.94 ± 0.20 ^{aBC}	14.24 ± 0.05 ^{aA}	11.21 ± 0.09 ^{bD}	
15	13.40 ± 0.11 ^{bB}	13.71 ± 0.05 ^{aA}	13.13 ± 0.06 ^{bC}	11.69 ± 0.14 ^{aD}	
30	12.50 ± 0.13 ^{cA}	12.86 ± 0.12 ^{bA}	9.16 ± 0.3 ^{cB}	7.84 ± 0.05 ^{deC}	
45	12.22 ± 0.10 ^{dA}	11.95 ± 0.03 ^{cA}	8.60 ± 0.3 ^{dB}	7.75 ± 0.02 ^{deC}	
60	11.95 ± 0.03 ^{eA}	8.98 ± 0.18 ^{dB}	8.28 ± 0.01 ^{dC}	7.84 ± 0.07 ^{deD}	
75	8.53 ± 0.02 ^{fA}	8.25 ± 0.09 ^{eB}	7.62 ± 0.07 ^{eC}	7.34 ± 0.08 ^{fD}	
90	7.08 ± 0.04 ^{hC}	8.04 ± 0.05 ^{efA}	7.39 ± 0.04 ^{efB}	8.11 ± 0.01 ^{cA}	
105	7.61 ± 0.06 ^{gB}	7.10 ± 0.07 ^{gC}	7.08 ± 0.08 ^{fC}	7.90 ± 0.13 ^{cdA}	
120	7.39 ± 0.05 ^{gB}	7.79 ± 0.04 ^{fA}	5.56 ± 0.10 ^{gC}	7.61 ± 0.08 ^{eA}	
Temperature		Freezing (-18 ° C)			
Treatments Time (Days)	ALG	ARB	AIN	AHM	
0	13.85 ± 0.05 ^{aC}	13.94 ± 0.20 ^{aBC}	14.24 ± 0.05 ^{aA}	11.21 ± 0.09 ^{aA}	
15	12.83 ± 0.12 ^{bA}	13.06 ± 0.33 ^{bA}	12.66 ± 0.18 ^{bA}	10.48 ± 0.19 ^{bB}	
30	12.71 ± 0.24 ^{bA}	8.21 ± 0.06 ^{cB}	12.58 ± 0.27 ^{bA}	9.77 ± 0.04 ^{cC}	
45	12.61 ± 0.21 ^{bA}	7.48 ± 0.09 ^{dD}	11.50 ± 0.17 ^{cB}	9.45 ± 0.08 ^{cC}	
60	9.03 ± 0.12 ^{cA}	7.17 ± 0.11 ^{deC}	7.27 ± 0.11 ^{dC}	7.87 ± 0.18 ^{dB}	
75	8.58 ± 0.11 ^{dA}	6.71 ± 0.22 ^{eC}	7.60 ± 0.05 ^{dB}	7.26 ± 0.09 ^{eB}	
90	5.49 ± 0.04 ^{eB}	5.53 ± 0.02 ^{fB}	7.37 ± 0.06 ^{dA}	7.34 ± 0.21 ^{eA}	
105	4.98 ± 0.07 ^{fB}	5.03 ± 0.23 ^{fB}	6.44 ± 0.05 ^{eA}	6.43 ± 0.07 ^{fA}	
120	4.56 ± 0.06 ^{gC}	3.95 ± 0.13 ^{gD}	6.34 ± 0.07 ^{eA}	5.48 ± 0.05 ^{gB}	
Temperature		Refrigeration (7 ° C)			
Treatments Time (Days)	ALG	ARB	AIN	AHM	
0	13.85 ± 0.05 ^{aC}	13.94 ± 0.20 ^{aBC}	14.24 ± 0.05 ^{aA}	11.21 ± 0.09 ^{aD}	
15	13.02 ± 0.17 ^{bB}	12.99 ± 0.02 ^{bB}	13.81 ± 0.02 ^{bA}	9.93 ± 0.01 ^{bC}	
30	12.40 ± 0.17 ^{cA}	12.43 ± 0.51 ^{bA}	7.82 ± 0.13 ^{cB}	9.29 ± 0.08 ^{cdC}	
45	12.92 ± 0.09 ^{bA}	7.88 ± 0.09 ^{cC}	7.48 ± 0.05 ^{eD}	9.74 ± 0.07 ^{bcB}	
60	11.73 ± 0.24 ^{dA}	7.46 ± 0.12 ^{cC}	7.61 ± 0.17 ^{deC}	8.85 ± 0.49 ^{deB}	
75	10.97 ± 0.15 ^{eA}	7.36 ± 0.02 ^{cdC}	6.79 ± 0.09 ^{fD}	8.43 ± 0.05 ^{eB}	
90	6.36 ± 0.22 ^{fB}	6.79 ± 0.09 ^{deA}	6.58 ± 0.10 ^{f^gAB}	6.46 ± 0.02 ^{f^gAB}	
105	6.24 ± 0.08 ^{fA}	6.47 ± 0.19 ^{eA}	6.45 ± 0.09 ^{gA}	6.17 ± 0.11 ^{fA}	
120	5.53 ± 0.04 ^{gB}	6.23 ± 0.03 ^{eA}	6.41 ± 0.12 ^{gA}	5.54 ± 0.08 ^{gB}	

ALG = 2% alginate microparticles; ARB = 2% alginate microparticles + 10% rice bran; PIN = 2% alginate microparticles + 10% inulin; AHM = 2% alginate microparticles + 10% hi-maize. Averages followed by the same letter, lowercase in the column and upper case in the row, do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Averages found in triplicate.

4. MANUSCRITO 2

Encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e diferentes agentes prebióticos por gelificação iônica externa assistidas por liofilização

RESUMO

O objetivo desse estudo foi investigar a influência da adição dos prebióticos farelo de arroz, inulina e hi-maize, na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* em micropartículas de alginato obtidas por gelificação externa e submetidas ao processo de liofilização. Analisou-se o tamanho das micropartículas, a eficiência de encapsulação, a viabilidade em simulação gastrointestinal e estabilidade durante armazenamento. O tamanho das micropartículas variou de 127.5 µm a 234.6 µm. A matriz de encapsulação farelo de arroz apresentou a maior eficiência de encapsulação, de 95,02%. As micropartículas adicionadas dos diferentes prebióticos demonstraram um aumento na proteção do microrganismo, que apresentou maior viabilidade frente à simulação gastrointestinal. Quanto ao armazenamento em diferentes condições, a 25 °C o tratamento farelo de arroz manteve os probióticos viáveis por 30 dias. Nas condições de armazenamento -18 °C e 7°C os tratamentos contendo os prebióticos hi-maize e farelo de arroz mantiveram os microrganismos probióticos viáveis por um período maior de 60 dias.

Palavras chave: microencapsulação, probióticos, farelo de arroz, inulina, hi-maize.

1. Introdução

Os alimentos funcionais são aqueles que, além das funções nutricionais básicas, quando consumidos como parte da dieta usual, produzem efeitos metabólicos, fisiológicos e/ou benéficos à saúde, prevenindo doenças crônicas, degenerativas, cardiovasculares, entre outras (Martirosyan & Singh, 2015). Assim, o consumo destes alimentos vem crescendo mundialmente, destacando-se os probióticos.

Os probióticos são definidos como “microrganismos vivos que quando ingeridos em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro” (Fao/Who, 2006). Entretanto, um grande desafio na incorporação de bactérias probióticas nos alimentos é a manutenção de sua viabilidade durante o processamento devido a fatores como baixo pH, presença de oxigênio, temperatura, composição da matriz alimentar (atividade da água, pH, presença de antimicrobianos naturais, disponibilidade de nutrientes) e condições de embalagem e armazenamento (Granato, Branco, Cruz, Faria & Shah, 2010; Pop, Brandau, Schwinn, Vodnar & Socaciu, 2015). Além disso, as condições do trato gastrointestinal podem afetar a viabilidade das bactérias probióticas durante a passagem (Barbosa & Teixeira, 2017). Sendo assim, a microencapsulação surge como uma alternativa viável para a proteção de probióticos, conferindo maior viabilidade às cepas e maior eficácia da ação probiótica devido à liberação controlada (Anal & Singh, 2007; Ranadheera, Baines, & Adams, 2010; Argin et al. 2014).

Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada, pois apresenta condições simples e acessíveis para a produção das micropartículas, pois não utiliza temperatura e solvente (De Prisco et al., 2015; Ribeiro et al., 2014; Krasaekoopt et al., 2003). A secagem das micropartículas é um fator importante na melhoria das propriedades de armazenamento das cápsulas devido à remoção de água e à facilidade de uso e distribuição homogênea em todo o produto (Mortazavian, Razavi, Ehsani & Sohrabvandi, 2007). Sendo assim, a liofilização é considerada um dos mais efetivos métodos de secagem para a maioria dos microrganismos, uma vez que não utiliza altas temperaturas em seu processo (Desai & Park, 2005).

Entretanto, o grau de viabilidade celular após liofilização varia de acordo com inúmeros fatores, incluindo a estirpe de microrganismo e também a eficácia do agente protetor utilizado durante o processo de secagem (Morgan et al., 2006). Desta maneira, o uso de prebióticos na cápsula pode aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos, uma vez que podem estimular a multiplicação e / ou atividade dos probióticos durante o

processamento e armazenamento (Rodríguez et al., 2007; Shin, 2000). Os prebióticos são fibras específicas, resistentes às ações das enzimas salivares e intestinais que ao atingirem o cólon, produzem efeitos benéficos à microbiota colônica (Sreenivas & Lele, 2013). Desta forma, quando os microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos encontram-se simultaneamente unidos, resultam em produtos simbióticos com as características funcionais dos dois grupos, que em sinergia vão beneficiar a saúde do consumidor (Burgain, 2011). A inulina é um polissacarídeo de reserva que se encontra naturalmente em frutas e vegetais como, por exemplo, raiz da chicória, cebola e alho e têm sido designada como um prebiótico por ser uma fibra alimentar solúvel (Saad, 2006). O amido resistente é um tipo de amido que não é digerido no intestino delgado pelas enzimas pancreáticas, como amilase e atinge o cólon onde sofre uma fermentação por ação da microbiota intestinal, sendo desta forma outro prebiótico já conhecido (Anal & Singh, 2007; Burgain et. al., 2011). No entanto, um prebiótico que vem recebendo bastante atenção por não ser muito estudado é o farelo de arroz. O farelo de arroz contém nutrientes essenciais como minerais, fibras, aminoácidos e antioxidantes (Younas et. al., 2011) e têm efeitos benéficos sobre a saúde humana em termos de proteção contra câncer gastrointestinal, prevenção à constipação e doença inflamatória intestinal (Iqbal, Bhangar & Anwar, 2005; Kurdi & Hansawasdi, 2015).

Portanto, o objetivo desse estudo foi avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em micropartículas de alginato contendo diferentes fontes prebióticas (farelo de arroz, inulina e hi-maize), produzidas pela técnica de gelificação iônica externa seguidas de liofilização, quando expostas a condições gastrointestinais simuladas e ao armazenamento sob diferentes condições de temperatura.

2. Material e Métodos

2.1 Material

Para produzir as micropartículas, foram utilizados os seguintes compostos: Alginato de Sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil); Inulina (Metachen, São Paulo, Brasil); Hi-maize (National Starch Food Innovation, Indianápolis, Indiana, USA); Farelo de arroz (Hnutri, Ipiranga, São Paulo, Brasil); Cloreto de Cálcio (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brasil) e cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* obtida por Crealys® Science Park (Bélgica).

2.2 Inóculo

A cultura probiótica *L. acidophilus* (Crealy® Science Park) foi ativada em caldo MRS (Himedia) e incubada durante 15-18 h a 37 °C. Então, foi centrifugada em 4670 g durante 15 minutos e lavada com solução de NaCl (0,85%). As células foram suspensas em solução salina para obter uma solução contendo cerca de 12 log UFC g⁻¹.

2.3 Produção de micropartículas

As micropartículas foram produzidas de acordo com a tecnologia de extrusão desenvolvida por Liserre, Ré e Franco (2007), com adaptações de Etchepare (2016). Para isso, um aerógrafo (tamanho do bocal: 0,3 mm) modelo EW 110 foi acoplado a um compressor de ar modelo MB24 / BV, na pressão do ar de 2,72 kgf/cm², usando a altura de 30 cm entre o bocal da atomização e a solução de CaCl₂.

Foram preparadas quatro soluções contendo 2% de alginato de sódio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 10% de prebiótico, nas seguintes formulações: alginato de sódio (ALGL); alginato de sódio + farelo de arroz (AFAL); e alginato de sódio + inulina (AINL) e alginato de sódio + hi-maize (AHML). Após a dispersão completa dos polímeros, adicionaram-se estirpes de *L. acidophilus* e as soluções (ALGL, AFAL, AHML e AINL) foram pulverizadas em CaCl₂ 0,1 M (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil). As partículas foram agitadas durante 30 min na solução de CaCl₂ para assegurar a gelificação completa e após filtradas utilizando uma peneira esterilizada de 0,038 mm (400 mesh) e lavadas com água destilada estéril.

2.4. Liofilização

As micropartículas produzidas foram congeladas (-18 ° C durante 24 h) no mesmo dia em que foram produzidas. As micropartículas congeladas (-18 ° C) foram liofilizadas em um liofilizador Liotop L101 (São Carlos, São Paulo, Brasil) e removidas do congelador 24 h depois (vácuo: 0,200-0,300 µHg e temperatura do condensador de -37 ° C).

2.5 Caracterização das microcápsulas

2.5.1. Morfologia e distribuição de tamanho

A morfologia das micropartículas liofilizadas foi avaliada utilizando um microscópio eletrônico de varredura (JEOL, modelo JM6360), para tanto, as micropartículas foram fixadas com uma fita dupla face em talões de alumínio e revestidas com uma fina camada de ouro. A distribuição do tamanho de partícula foi determinada no equipamento de difração a laser Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha).

2.5.2. Atividade da água (A_w)

A atividade da água foi medida a 25 °C, usando um Aqualab 4 TE (Decagon Devices, Pullman, WA, EUA).

2.6 Contagem de células viáveis

A contagem de células viáveis foi realizada de acordo com a metodologia proposta por Sheu & Marshall (1993) com modificações. Em 9 mL de solução tampão fosfato (0,1 M, pH 7,5), 0,1 g de micropartículas foi adicionado seguido por homogeneização em um stomacher durante 10 minutos. Após, as amostras foram diluídas em série com água peptona (0,1 g 100 g⁻¹) e plaqueadas em ágar MRS (Himedia Curitiba, Paraná, Brasil). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose com sistema Anaerobac (Probac, São Paulo, Brasil) a 37 °C por 72 h. Posteriormente a incubação, as células probióticas viáveis foram enumeradas e os resultados foram expressos em log unidades formadoras de colônia por grama (log UFC g⁻¹).

2.7 Eficiência de encapsulação

A equação Eq. (1) proposta por Martín, Laravilloslada, Ruiz & Morales (2013) foi utilizada para calcular a taxa de sobrevivência do microrganismo durante o processo de microencapsulação, ou seja, a eficiência de encapsulação (EE%),

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

Onde N é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹) liberado a partir das microcápsulas, e N₀ é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹) no concentrado de células para a microencapsulação.

2.8 Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em diferentes condições de armazenamento

As micropartículas de *Lactobacillus acidophilus* foram armazenadas à temperatura ambiente (25°C), refrigerada (7°C) e congelada (-18°C), por 75 dias e analisadas a cada 15 dias como descrito na Seção 2.6.

2.9 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado sob condições gastrointestinais simuladas

A simulação das condições gastrointestinais foi realizada de acordo com o método proposto por Madureira et al. (2011) com modificações. Para tanto, as micropartículas foram submetidas a diferentes pHs, simulando as seções do trato gastrointestinal, como esôfago / estômago (adição de pepsina, pH ajustado a 2,0 por 90 minutos), duodeno (adição de pancreatina e sais biliares, pH ajustado a 5,0 durante 20 min) e íleo (pH ajustado para 7,5 durante 90 min). A análise foi realizada em um agitador de incubadora refrigerada (TE-421, Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil) a 37 °C para simular a temperatura corporal em condições de agitação (130 rpm para teste esofágico / estomacal e 45 rpm para ensaio do duodeno e íleo) para simular os movimentos peristálticos do trato digestivo. Durante o procedimento, foram tomadas alíquotas após 0 min, 90 min (esôfago / estômago), 110 min (duodeno) e 200 min (íleo) e a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado foi analisada por enumeração em ágar MRS conforme Seção 2.6.

2.10 Análises estatísticas

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o Software Statistica versão 7.0 (2004; Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), seguido do teste de Tukey para comparar meios, em um nível de significância de 5%, se houver diferença significativa entre os tratamentos. Todos os testes foram realizados em triplicata e os dados foram expressos como média \pm desvio padrão.

3. Resultados e discussão

3.5 Caracterização das micropartículas

A Fig. 1 mostra as imagens da microscopia eletrônica de varredura (MEV) das micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* produzidas com diferentes agentes encapsulantes pela técnica de gelificação externa assistidas de liofilização. A partir da análise das imagens captadas pelo MEV, foi possível observar que as micropartículas apresentaram superfície rugosa, que pode ser explicada, pois a desidratação acentuada de géis de polissacarídeos liofilizados pode levar à formação de uma matriz porosa, semelhante a uma esponja. No processo de liofilização, as micropartículas são sujeitas a baixas temperaturas, levando à formação de cristais de gelo e à sublimação de cristais de gelo sob pressão reduzida, resultando em um produto seco poroso (Veelken & Pape, 1984; Dolly, Anishparvin, Joseph & Anandharamakrishnan, 2011). Resultados semelhantes foram encontrados por Mukai-Corrêa (2004), que após liofilizar as partículas de alginato, carragena, goma gelana e pectina observou perda da estrutura esférica das micropartículas. O mesmo ocorreu em um estudo de Etchepare et al, (2016) que ao liofilizarem micropartículas de alginato e alginato + hi-maize, observaram alta aglomeração entre as partículas e perda da estrutura esférica.

As imagens obtidas pelo MEV também revelaram a ausência de bactérias livres, confirmando a formação de micropartículas e sua capacidade de aprisionar os microrganismos para todos os agentes encapsulantes, principalmente nos tratamentos contendo farelo de arroz (AFAL) e hi-maize (AHML).

O tamanho das micropartículas tem influência importante na viabilidade dos probióticos e do efeito sensorial sobre os alimentos. As micropartículas dentro da faixa de tamanho 100-200 μm fornecem um equilíbrio ideal, uma vez que quanto maior as micropartículas, melhor será a proteção para os probióticos, porém ocorrerá pior efeito sensorial (Lee & Heo, 2000; Nag, Han, & Singh, 2011; Hansen, Allan-Wojtas, Jin & Paulson, 2002). Neste estudo, o diâmetro médio das micropartículas das diferentes matrizes variou de 127.5 – 234.6 μm (Tabela 1), sendo que, o menor tamanho de partícula foi conseguido no tratamento AHML enquanto o tratamento com maior diâmetro médio foi AINL. Os tratamentos AINL e ALGL não apresentaram diferenças significativas ($p < 0.05$) entre si uma vez que o tamanho das microcápsulas de alginato foi de 233.5 μm . O tratamento AFAL apresentou tamanho de partícula de 224.2 μm .

O tratamento AHML apresentou o menor tamanho, podendo ser devido à tendência das moléculas de amilose de amido em se alinharem paralelamente na presença de umidade

ou moléculas de água, formando pontes de hidrogênio entre polímeros de hidroxilo adjacentes e reduzindo assim a afinidade da água com o polímero (Shimazu, Mali & Grossmann, 2007).

Todas as micropartículas apresentaram valores de atividade de água abaixo de 0,3 (Tabela 1), que, de acordo com Tonon, Brabet, Pallet, Brat & Hubinger (2009), é muito positivo para a estabilidade de pós-processamento, uma vez que representa menos água livre disponível para reações bioquímicas e, portanto, maior praticidade de armazenamento. Resultados similares foram obtidos por Fritzen-Freire et al. (2012) para micropartículas de *Bifidobacterium* com leite desnatado reconstituído obtidas por *spray drying*. Santivarangkna et al. (2008) concluíram que, a fim de manter a viabilidade das partículas probióticas, a atividade de água deveria ser mantida a menor possível, pois de acordo com Yang et al. (2010) a viabilidade celular diminui com o aumento da atividade de água.

3.6 Eficiência de encapsulação

Segundo Moayyedi et al. (2018) o processo de secagem afeta diretamente a sobrevivência das bactérias, podendo resultar em sua completa inativação, uma vez que microrganismos probióticos são sensíveis aos processos de secagem devido à deterioração do estado fisiológico de suas células. Devido isso, é fundamental que se tenha uma alta eficiência de encapsulação. A partir dos resultados apresentados na Tabela 1 pode-se observar que a técnica de gelificação iônica externa promoveu alta eficiência de encapsulação (EE%) de *Lactobacillus acidophilus* nos tratamentos contendo farelo de arroz, alginato e inulina com valores de 95.02, 74.24 e 61.84%, respectivamente. Entretanto, o tratamento contendo hi-maize apresentou eficiência de encapsulação de 54.54%, o que pode estar associado à retrogradação do amido que ocorre a baixas temperaturas, uma vez que para serem submetidas ao processo de liofilização as microcápsulas precisam estar congeladas. Deste modo, as moléculas do amido hidrolisam-se e as ligações de hidrogênio tornam-se mais fortes, e assim as cadeias começam a reassociar-se num estado mais ordenado. Essa reassociação culmina com a formação de simples e duplas hélices, resultando no entrelaçamento ou na formação de zonas de junção entre as moléculas, formando áreas cristalinas. Como a área cristalizada altera o índice de refração, o gel vai se tornando mais fraco à medida que a retrogradação se processa (Weber et al., 2009).

Dianawati, Mishra & Shah (2013) utilizaram a liofilização para a secagem de microcápsulas à base de caseína e manitol contendo *Lactobacillus acidophilus* e *Lactococcus lactis* ssp. e demonstraram que a eficiência de encapsulação foi entre 88-99,2%. Bampi et al.

(2016) determinaram que a taxa de sobrevivência das microcápsulas de *L. acidophilus* e *B. animalis* produzidas por spray chilling foi de 96% e 97%, respectivamente.

3.7 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado sob condições gastrointestinais simuladas

A Tabela 2 mostra os resultados para a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* exposto a condições gastrointestinais simuladas, tanto para as células livres quanto para as microencapsuladas com alginato de sódio por extrusão / gelificação iônica externa seguidas de liofilização. As contagens iniciais antes da adição do sistema gastrointestinal simulado foram 9.20 ± 0.29 , 11.78 ± 0.05 , 7.67 ± 0.02 e 6.76 ± 0.08 log UFC g⁻¹ para os tratamentos alginato (ALGL), farelo de arroz (AFAL), inulina (AINL) e hi-maize (AHML), respectivamente. Já o microrganismo livre apresentou contagem inicial de 12.40 ± 0.02 log UFC g⁻¹. Para produzir os efeitos benéficos à saúde do consumidor, os probióticos devem sobreviver à passagem pelo estômago e atingir o intestino em grandes quantidades (Sanz, Nadal & Sánchez, 2007). Porém, um dos principais problemas dos probióticos é a baixa taxa de sobrevivência destes em pH gástrico e altas concentrações de sais biliares no intestino (Sabikhi et al., 2010).

Após 90 min de incubação, o potencial de hidrogenação foi gradualmente ajustado com uma solução de pepsina até atingir um valor de 2.0 (porção esôfago / estomago). A sobrevivência dos probióticos foi maior nas micropartículas de alginato adicionadas de hi-maize (AHM) em comparação com os demais tratamentos, uma vez que apresentaram menor liberação (1.76 ciclos logarítmicos) em relação à sua contagem inicial. Em outro estudo, Chan (2011) observou uma redução de 4 log na viabilidade das micropartículas *Lactobacillus casei* liofilizadas obtidas por extrusão com alginato e uma redução de 1,5 a 2 log UFC g⁻¹ quando o amido foi utilizado em conjunto com o alginato, nestas mesmas condições.

Após a exposição das células livres a condições ácidas (esôfago / estomago), ocorreu uma diminuição de 5.35 log UFC g⁻¹ (p <0,05) nas células livres em comparação com a contagem inicial devido ao baixo valor de pH neste passo no processo, resultando em baixa viabilidade da bactéria probiótica. Esses resultados corroboraram com os de Dimitrellou et al (2016), uma vez que ao ser exposto as condições ácidas o *Lactobacillus casei* ATCC 393 perdeu de forma contínua sua viabilidade sendo que as contagens de células viáveis caíram 1.46 log UFC g⁻¹ a pH 3 e 4.03 log UFC g⁻¹ a pH 2, indicando claramente a necessidade de proteção através da microencapsulação. O mesmo ocorreu no estudo de Verruck et al. (2015)

que adicionou *Bifidobacterium* BB-12 ao queijo Minas frescal feito de leite de búfala e mostrou uma diminuição significativa na viabilidade após a simulação de condições de estômago.

Após exposição a condições simuladas de duodeno (sais biliares, pancreatina e pH 5,0) as células livres apresentaram uma queda ainda mais significativa ($p < 0,05$) na população de células viáveis ($6.21 \log \text{UFC g}^{-1}$) quando comparada com a contagem inicial. Já em relação ao microrganismo microencapsulado, os tratamentos não apresentaram diferença significativa em comparação com os resultados obtidos após a simulação das condições ácidas, no entanto, não houve liberação total do microrganismo, visto que as micropartículas promoveram sua proteção.

Ao final da análise, após a exposição às condições simuladas do íleo (pH 6,5), o microrganismo livre apresentou redução de $6.69 \log \text{UFC g}^{-1}$ em relação a sua contagem inicial. Isso ocorreu devido à variação no pH durante a simulação do trato gastrointestinal, o que causou uma redução significativa na viabilidade. Por outro lado, observou-se que a microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* em alginato, bem como associado aos diferentes prebióticos, conferiu maior proteção ao probiótico durante a exposição à simulação do trato gastrointestinal, uma vez que, após a passagem pelo íleo, os tratamentos contendo alginato, farelo de arroz, inulina e hi-maize apresentaram reduções logarítmicas de 1.37, 4.14, 1.47 e 0.72 respectivamente, quando comparadas com o tempo zero, com diferenças significativas entre os tratamentos ($p < 0,05$). Apesar do tratamento AFAL ter apresentado a maior redução, as micropartículas apresentaram contagens acima de $6 \log \text{UFC g}^{-1}$, atendendo aos requisitos exigidos para que os probióticos exerçam efeitos benéficos, sendo uma potencial fonte prebiótica (FAO / OMS, 2001).

Os resultados apresentados neste trabalho corroboram outros estudos que demonstram a eficiência da microencapsulação na proteção de probióticos durante a exposição a condições gastrointestinais. Kingwatee et al. (2015) mostraram que o *L. casei* 01 seco por pulverização com suco de lichia e inulina apresentou melhor impacto na taxa de sobrevivência do probiótico nos sucos gástricos e biliares. Além disso, Pankasemsuk, Apichartsrangkoon, Worametrachanon & Techarang (2016) relataram que o *L. casei* 01 microencapsulado com 2% de alginato e 1% de amido de milho (hi-maize) permitiu uma sobrevivência ideal em ambos os fluidos gástrico e biliar.

Moayyedi et al (2018) utilizou eletrospraying, liofilização e spray drying para microencapsular *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em isolados de proteína de soro de leite (WPI), isolados de proteína de soro de leite + inulina (WPI + IN) e isolado de proteína de

soro + inulina + matriz de goma persa (WPI + IN + PG) e demonstrou que todos os tratamentos foram eficazes para proteger o probiótico ao longo de 120 minutos de simulação da passagem pelo TGI quando comparadas ao microrganismo livre. Em outro estudo, Halim et al. (2017) compararam a viabilidade de *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 livre e microencapsulado em alginato de cálcio e co-revestimento com alginato de cálcio e quitosana através da técnica de extrusão com subsequente liofilização usando 10% (p/p) de leite desnatado como crioprotetor, frente aos ensaios simulados de suco gástrico e tolerância biliar e observaram que a mortalidade das células probióticas reduziu significativamente quando microencapsuladas em comparação com células livres.

3.8 Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* em diferentes condições de armazenamento

A Tabela 3 mostra a estabilidade do *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado durante 75 dias de armazenamento sob as temperaturas de 25 °C, 7 °C e -18 °C, simulando condições ambientais distintas. O dano celular e a perda de atividade podem ocorrer durante o processamento e armazenamento. Assim sendo, um processo adequado de microencapsulação deve garantir a sobrevivência das bactérias durante as etapas de processamento e ao longo do período de armazenamento (Oliveira et al, 2007; Champagne et al, 2011).

Em 25°C, a viabilidade das bactérias microencapsuladas manteve-se até os 15 dias de armazenamento para os tratamentos alginato e inulina. As micropartículas contendo os prebióticos hi-maize e farelo de arroz mantiveram a viabilidade por 15 e 30 dias, com contagens de $6.02 \pm 0.01 \log \text{UFC g}^{-1}$ e $6.05 \pm 0.03 \log \text{UFC g}^{-1}$, respectivamente. Após este período, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) de $1.5 \pm 0.01 \log \text{UFC g}^{-1}$ para AFAL e $3.09 \pm 0.03 \log \text{UFC g}^{-1}$ para AHML na viabilidade desses microrganismos até os 75 dias de armazenamento. Esses resultados podem ser explicados pelo fato de que houve maior atividade metabólica dos microrganismos a 25°C, produzindo ácidos metabólicos e bacteriocinas resultando em morte celular e perda de viabilidade celular (Soto et al., 2011).

Okuro, Thomazini, Balieiro, Liberal & Fávoro-Trindade (2013) também não obtiveram resultados positivos a 22 °C ao avaliarem micropartículas sólido lipídicas em que *Lactobacillus acidophilus* foi co-encapsulado com prebiótico inulina ou polidextrose usando tecnologia de *spray chilling*, visto que sua estabilidade foi avaliada durante 120 dias e o tratamento sem prebiótico se manteve viável por um período entre 0 e 7 dias, enquanto o

tratamento contendo inulina permaneceu viável entre 7 e 30 dias e o tratamento contendo polidextrose se manteve viável por cerca de 60 dias.

Quanto ao efeito da temperatura de congelamento, observou-se que as micropartículas de alginato (ALGL) e inulina (AINL) mantiveram-se estáveis por 15 dias com contagens de 7.32 ± 0.13 e 7.49 ± 0.11 log UFC g⁻¹, após este período houve uma redução significativa ($p < 0.05$) até os 75 dias de armazenamento. A redução de viabilidade na temperatura de -18 °C pode estar relacionada às injúrias causadas pelo frio às células, que eventualmente levam à morte celular do probiótico.

As micropartículas adicionadas de hi-maize (AHML) apresentaram contagens de 6.24 log UFC g⁻¹ em 60 dias de armazenamento, entretanto o tratamento contendo farelo de arroz (AFAL) demonstrou melhores resultados conferindo uma maior proteção, uma vez que o microrganismo permaneceu viável durante os 75 dias com contagens de 6.12 log UFC g⁻¹. Deste modo, este estudo sugere que a adição do prebiótico farelo de arroz em micropartículas de alginato pode aumentar a sobrevivência do *Lactobacillus acidophilus* encapsulado por um período maior durante o armazenamento a -18 °C em comparação com as outras microcápsulas.

Martín et al. (2013) microencapsularam *Lactobacillus fermentum* CECT5716 usando alginato e amido pela técnica de emulsão. Após a liofilização e armazenamento em três condições de temperatura (temperatura ambiente, refrigeração e congelamento), observou-se perda de viabilidade após duas semanas à temperatura ambiente, em contraste, a melhor viabilidade dos probióticos foi observada a 4 °C e -20 °C, com valores de 8.51 e 8.66 g log UFC g⁻¹, respectivamente. Em um estudo de Etchepare et al. (2016), amido resistente (hi-maize) a uma concentração de 1% foi utilizado para a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* em esferas de alginato pela técnica de extrusão e posterior liofilização, durante o armazenamento congelado, a viabilidade das micropartículas foi mantida durante 30 dias e 60 dias para as micropartículas de alginato ($6,61 \pm 0,02$ log UFC g⁻¹) e amido resistente ($6,05 \pm 0,06$ log UFC g⁻¹), respectivamente.

Em relação ao armazenamento refrigerado (7°C) os tratamentos AFAL e AHML obtiveram contagens de 6.02 ± 0.09 e 6.15 ± 0.04 log UFC g⁻¹ durante os 75 dias de armazenamento, atendendo aos requisitos básicos para conferirem benefícios para a saúde (Roy, 2005). Sendo assim, o uso dos prebióticos farelo de arroz e hi-maize apresentou efeito positivo nas micropartículas de alginato, aumentando a sobrevivência do microrganismo encapsulado durante o armazenamento a 7 °C. Pedroso, Thomazini, Heinemann & Favaro-Trindade (2012) produziram partículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* por spray

chilling e observaram que as micropartículas mantiveram a estabilidade do microrganismo durante o armazenamento a 7 ° C por um período que variou entre 30 e 60 dias. Shoji et al. (2013) utilizaram a coacervação complexa seguida de secagem por liofilização para encapsular *L. acidophilus* em pectina/caseína, aplicando as microcápsulas em iogurte de leite de búfala. Os resultados indicaram que a viabilidade do *L. acidophilus* manteve-se estável por 120 dias sob refrigeração (7°C) com contagens de 7.23 log UFC g⁻¹.

Deste modo, ao se avaliar as três condições de armazenamento (25 °C, -18°C e 7 °C), conclui-se que a estabilidade dos probióticos microencapsulados com os prebióticos farelo de arroz e hi-maize obtiveram os melhores resultados. Entretanto, o farelo de arroz destaca-se visto que é um subproduto do beneficiamento de arroz, muito pouco estudado atualmente e que apresentou excelentes resultados quanto à ação prebiótica frente ao *Lactobacillus acidophilus*.

A estabilidade dos probióticos também aumentou com a diminuição da temperatura. Tal fenômeno ocorre, pois os micro-organismos são mantidos num estado latente, evitando rearranjos no material de parede, impedindo, dessa forma, a exposição inadequada dos micro-organismos, promovendo um aumento da vida útil das microcápsulas (Albertini et al., 2010). O mesmo ocorreu em outros estudos, Corcoran, Ross, Fitzgerald & Stanton (2004), avaliaram a sobrevivência de *L. rhamnosus* com o prebiótico (inulina) e observaram que os microorganismos probióticos sobreviveram mais a baixa temperatura. Chen, Li, Liu, & Meng, (2017), microencapsularam *Lactobacillus bulgaricus* em alginato e isolado de proteína de soro de leite pela técnica de emulsão com posterior liofilização e observaram que as baixas temperaturas (-20°C e 4°C) foram benéficas na viabilidade celular em 60 dias de armazenamento. Holkem et al. (2016), microencapsularam *Bifidum bacterium* BB12 em alginato pela técnica de emulsão com posterior liofilização e demonstraram que as micropartículas apresentaram viabilidade até 120 dias nas temperaturas de 7°C e -18°C.

4. Conclusões

As micropartículas de alginato bem como as adicionadas dos prebióticos produzidas pela técnica de extrusão / gelificação externa seguidas de liofilização promoveram a resistência de *Lactobacillus acidophilus* durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. Em relação às condições de armazenamento, nas temperaturas de -18 ° C e 7 ° C, os melhores resultados foram alcançados nas micropartículas contendo os prebióticos hi-

maize e farelo de arroz, entretanto farelo de arroz merece destaque, uma vez que é um subproduto pouco estudado atualmente e apresentou excelentes resultados na proteção para manter a viabilidade probiótica. Deste modo, conclui-se que os compostos hi-maize e farelo de arroz além de atribuírem às micropartículas efeitos prebióticos benéficos a saúde, são capazes também de aumentar a resistência das micropartículas de alginato contendo *L. acidophilus* obtidas por gelificação externa, conferindo a estas um efeito protetor e podendo ser meios alternativos para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais.

5. Referências

- Albertini B., Vitali B, Passerini N., Cruciani F., Di Sabatino M., Rodriguez L., Brigidi P. (2010). Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, v.40, n.4, p.359-366, 2010. Doi: 10.1016/j.ejps.2010.04.011.
- Anal, A.K.; Singh, K. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science & Technology*, v.18, p.240-251. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.004.
- Argin, S., Kofinas, P., Lo, Y. M. (2014). The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthane-chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. *Food Hydrocolloids*, 40, 138-144. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.02.018>
- Bampi G. B., Backes G. T., Cansian R. L., Matos F. E., Ansolin I. M. A., Poletto B. C., Corezzola L. R., Favaro- Trindade C. S. (2016). Spray Chilling Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis and Its Use in the Preparation of Savory Probiotic Cereal Bars. *Food and Bioprocess Technology*, Volume 9, Issue 8, pp 1422–1428. DOI: 10.1007/s11947-016-1724-z
- Barbosa, J.; Teixeira, P. (2017) .Development of probiotic fruit juice powders by spray-drying: A review. *Food Reviews International*. ISSN 1525-6103. Vol. 33, n.º 4 (2017), p. 335–358. Doi: 10.1080/87559129.2016.1175016
- Burgain, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, v.104, p.467-483, 2011. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>>. Accessed: Jun. 2, 2013. doi:10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.

- Chan, E. S. (2011). Preparation of Ca-alginate beads containing high oil content: Influence of process variables on encapsulation efficiency and bead properties. *Carbohydrate Polymers*, Volume 84, Issue 4, Pages 1267-1275. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2011.01.015>
- Champagne, C. P.; Ross, R. P.; Saarela, M.; Hansen, K. F.; Charalampopoulos, D. (2011). Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices, *International Journal of Food microbiology*, v. 149, p. 185-193. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005
- 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.
- Corcoran B. M., Ross R. P., Fitzgerald G. F., Stanton C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *J Appl Microbiol.*, 96(5):1024-39. DOI: 10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x
- De Prisco, A., & Mauriello, G. (2016). Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool. *Trends in Food Science & Technology*. doi: 10.1016/j.tifs.2015.11.009
- Desai, K.G.H., & Park, H.J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology*, 23 (7), 1361–1394. DOI: 10.1081/DRT-200063478
- Dianawati D., Mishra V., Shah N.P. (2013). Effect of drying methods of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactococcus lactis* ssp. cremoris on secondary protein structure and glass transition temperature as studied by Fourier transform infrared and differential scanning calorimetry. *J Dairy Sci*, 96(3):1419-30. doi: 10.3168/jds.2012-6058.
- Dimitrellou, D., Kandyliis, P., Petrović, T., Dimitrijević-Branković, S., Lević, S., Nedović, V., & Kourkoutas, Y., (2016). Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. *LWT - Food Science and Technology* 71 (2016) 169-174. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.03.007>
- Dolly P., Anishaparvin A., Joseph G.S., Anandharamakrishnan C. (2013). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (mtcc 5422) by spray-freeze-drying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *J Microencapsul*, 28(6):568-74. doi: 10.3109/02652048.2011.599435.
- Etchepare, M. A., Raddatz, G. C., Cichoski, A. J., Flores, E. M. M., Barin, J. S., Zepka, L. Q., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., & Menezes, C. R. (2016). Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate, *Journal of Functional Foods*, 21, 321-329. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2015.12.025>

FAO/WHO (2006). Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food and Nutritional Paper No. 85, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome.

Food and Agriculture Organization of the United Nations, & World Health Organization. (2001) Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. [Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation]. . Accessed 05.06.17. <http://isappscience.org/wp-content/uploads/2015/12/FAO-WHO-2001-Probiotics-Report.pdf>

Fritzen-Freire, C.B., Prudencio, E.S., Amboni, R.D.M.C., Pinto, S.S., Negrao-Murakami, A.N., Murakami, F.S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45 (1), pp. 306-312, doi: 10.1016/j.foodres.2011.09.020

Granato, D., G. F. Branco, A. G. Cruz, J. A. F. Faria, and N. P. Shah. (2010). Probiotic dairy products as functional foods. *Comp. Rev. Food Sci. Food Saf.* 9:455–470. DOI: 10.1111/j.1541-4337.2010.00120.x

Halim M., Mustafa N. A. M., Othman M., Wasoha H., Kapri M. R., Ariff A. B. (2017). Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. *LWT - Food Science and Technology*, Volume 81, August 2017, Pages 210-216. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.009>

Hansen, T. L., Allan-Wojtas, P., Jin, Y., Paulson, A., (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiol.* 19, 35–45. <https://doi.org/10.1006/fmic.2001.0452>

Holkem, A. T., Raddatz, G. C., Nunes, G. L., Cichoski, A. J., Jacob-Lopes, E., Grosso, C. R. F., Menezes, C. R. (2016b). Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying. *LWT - Food Science and Technology*, 71, 302-308. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2016.04.012>

Iqbal, S., Bhanger, M. I., & Anwar, F. (2005). Antioxidant properties and components of some commercially available varieties of rice bran in Pakistan. *Food Chemistry*, 93(2), 265–272. doi:10.1016/j.foodchem.2004.09.024

Kingwatee N., Apichartsrangkoon A., Chaikham P., Worametrachanon S., Techarung J., Pankasemsuk T. (2015). Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials. *LWT - Food Science and Technology*, 62 (2015), pp. 847-853. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.007>

- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth, H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13.
- Kurdi, P., & Hansawasdi, C. (2015). Assessment of the prebiotic potential of oligosaccharide mixtures from rice bran and cassava pulp. *LWT – Food Science and Technology*, 63(2), 1288–1293. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.04.031>
- Lee, K. Y., & Heo, T. R. (2000). Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. *Applied and Environmental Microbiology*, 66, 869-873.
- Liserre, A.M., Ré, M.I., Franco, B.D.G.M. (2007) Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Biotechnology*, 21 (1), pp. 1-16
- Madureira, A. R., Amorim, 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. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.010
- Martín, M. J., Lara-villoslada, F., Ruiz, M. A., & Morales, M. E. (2013). Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *LWT - Food Science and Technology*, 53(2), 480-486. Doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- Martirosyan D. M., Sing J. (2015). A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? *Funct Foods Health Dis* 5: 209-223.
- Moayyedi M., Eskandari M. H., Rad A. H. E., Ziaee E., Khodaparast M. H. H., Golmakani M. T. (2018). Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469. *Journal of Functional Foods*, Volume 40, Pages 391-399. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.11.016>
- Mortazavian, A.M., Sohrabvandi, S. (2007), (Ed.), Probiotics and food probiotic products: Based on dairy probiotic products, *Eta Publication*, Iran pp. 131-169
- Mukai-Corrêa, R, Prata AS, Alvim ID, Grosso CR. (2004). Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying, *Current Drug Delivery*, v. 1, n. 3, p. 265-273. PMID: 16305389
- Nag, A.; Han, K.; Sing, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, v. 21, p. 247-253, doi 10.1016/j.idairyj.2010.11.002

- Oliveira, A.C. et al. (2007). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, v.25, n.10, p.1687-1693. doi: 10.1080/07373930701590939.
- Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C C., Liberal, R. D. C. O., & Fávaro-Trindade, C. S. (2013). Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. *Food Research International*, 53, 96–103. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.03.042>
- Pankasemsuk T., Apichartsrangkoon A., Worametrachanon S, Techarang J. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* 01 by alginate along with himaize starch for exposure to a simulated gut model. *Food Bioscience*, 16, 32-36. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.001>
- Pedroso, D. L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling, *International Dairy Journal*, 26 (2), 127-132. doi:10.1016/j.idairyj.2012.04.008
- Pop O. L., Brandau T., Schwinn J., Vodnar D. C., Socaciu C. (2015) The influence of different polymers on viability of *Bifidobacterium lactis* 300b during encapsulation, freeze-drying and storage. *J Food Sci Technol*, 52(7):4146-55. doi: 10.1007/s13197-014-1441-4
- Ranadheera R. D. C. S, Baines S. K., Adams M. C. (2010). Importance of food in probiotic efficacy. *Food Research International*, Volume 43, Issue 1, Pages 1-7. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2009.09.009>
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.10.019>
- Roberfroid, M., Gibson, G.R., Hoyles, L., McCartney, A.L., Rastall, R., Rowland, I., Wolvers, D., Watzl, B., Szajewska, H., Stahl, B., Guarner, F., Respondek, F., Whelan, K., Coxam, V., Davicco, M.J., Léotoing, L., Wittrant, Y., Delzenne, N.M., Cani, P.D., Neyrinck, A.M., & Meheust, A. (2010). Prebiotic effects: metabolic and health benefits. *British Journal of Nutrition*, 104, S1–S63. <http://sci-hub.io/10.1017/s0007114510003363>
- Saad, S.M.I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Rev. Bras. Ciênc. Farm.**, v.42, p.1-16, 2006.

- Sabiki, L. et al. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, v.3, n.4, p.586-593. doi: 10.1007/s11947-008-0135-1.
- Santivarangkna C., Kulozik U., Foerst P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of Applied Microbiology*, v 105, p. 1-13. Doi: 10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x
- Sanz Y., Nadal I. , Sánchez E. (2007). Probiotics as drugs against human gastrointestinal infections. *Recent Pat Antiinfect Drug Discov*, 2(2):148-56. PMID: 18221171
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of *lactobacilli* in calcium aginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- Shimazu A.A., Mali S., Grossmann M.V.E. (2007). Antiplasticizing effects of plasticizer, and glycerol and sorbitol in biodegradable films tapioca starch *Agrarian Sciences*, 28 (1), pp. 79-88 <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2007v28n1p79>
- 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. (2013). Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and Bioproducts Processing*, 9 1, 83–88. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2012.08.009>
- Soto, L.P., Frizzo, L.S., Avataneo, E., Zbrun, M.V., Bertozzi, E., Sequeira, G., et al. (2011). Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves, *Animal Science and Technology*, 165, 176–183.
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950–1958
- Veelken M., Pape H. Production of nikkomycin by immobilized *Streptomyces* cells physiological properties. *Applied Microbiology Biotechnology*, 19 (3) (1984), pp. 146-152. Doi: <https://doi.org/10.1007/BF00256445>
- Verruck S., Prudêncio E.S., Müller C.M.O., Fritzen-Freire C.B., Amboni R.D.M.C (2015). Influence of *Bifidobacterium* Bb-12 on the physicochemical and rheological properties of buffalo Minas Frescal cheese during cold storage. *Journal of Food Engineering*, 151, pp. 34-42
- Weber, F.H.; Collaeres-Queiroz F.P.; Chang, Y.K (2009). Caracterização físicoquímica, reológica, morfológica e térmica dos amidos de milho normal, ceroso e com alto teor de amilose. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v.29, n.4, p.748-753.

Yang, D. Y.; Phoon, M. C.; Sanguansri, L.; Weerakkody; R.; Burgar, I.; Augustin, M. A. (2010) Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. *Journal of Food Science*. DOI: 10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x

Younas, A., Bhatti, M.S., Ahmed, A., Randhawa, M.A. (2011). Effect of rice bran supplementation on cookie baking quality. *Pakistan Journal of Agricultural Sciences*, 48(2), 129-134.

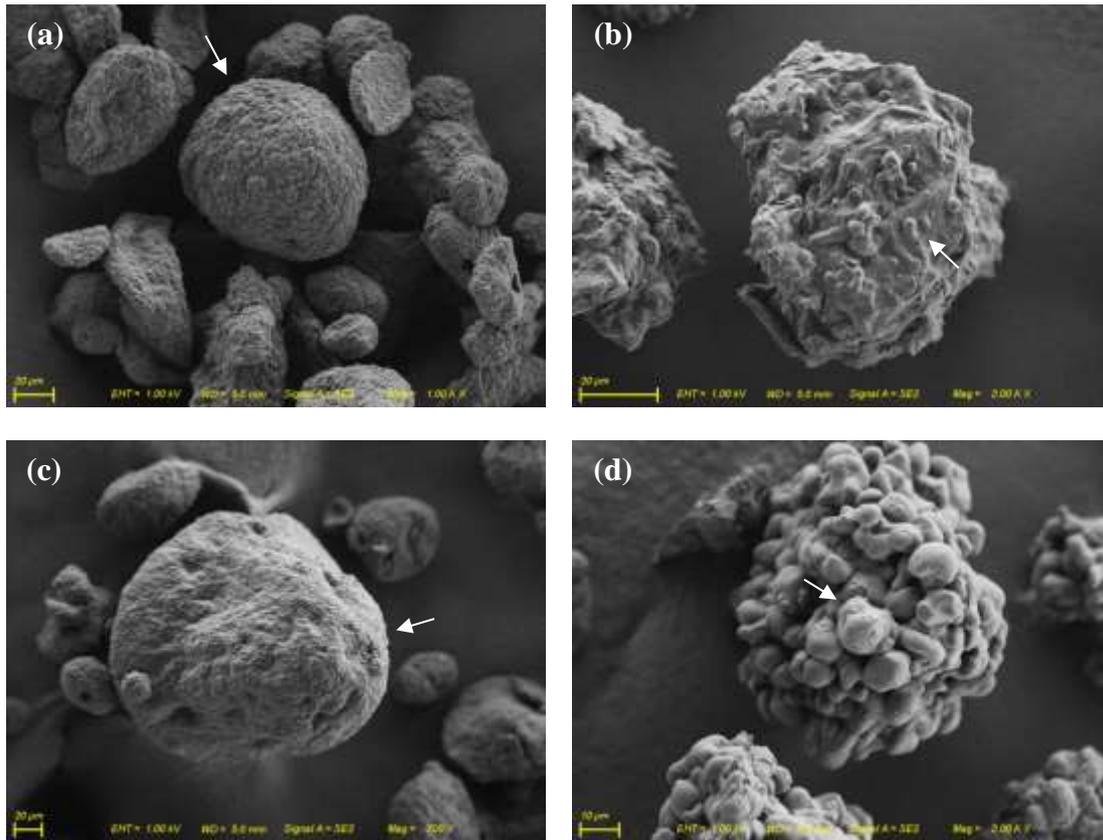


Fig 1. Microscopia eletrônica de varredura (MEV) de microcápsulas de alginato com diferentes fontes prebióticas contendo *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica externa seguidas de liofilização.

(a) = microcápsulas de alginato 2% (ALGL) (1.00 kx); (b) = microcápsulas de alginato 2% + farelo de arroz 10% (AFAL) (2.00 kx); (c) = microcápsulas de alginato 2% + inulina 10% (AINL) (700x); (d) = microcápsulas de alginato 2% + hi-maize 10% (AHML) (2.00 kx).

Tabela 1 - Características de micropartículas de *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica externa assistidas de liofilização com alginato e diferentes fontes prebióticas.

	ALGL	AFAL	AINL	AHML
Tamanho de partícula (µm)	233.50±6.43 ^A	224.20±2.57 ^B	234.6±2.79 ^A	127.5±1.58 ^C
Atividade de Água	0.1592±0.0004 ^C	0.2283±0.0004 ^A	0.1148±0.001 ^D	0.1835±0.001 ^B
Eficiência de encapsulação (EE%)	74.24±2.35 ^B	95.02±0.41 ^A	61.84±0.15 ^C	54.54±0.69 ^D

ALGL = micropartículas de alginato 2%; AFAL = micropartículas de alginato 2% + farelo de arroz 10%; AINL = micropartículas de alginato 2% + inulina 10%; AHML = micropartículas de alginato 2% + hi-maize 10%.

*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%. Médias encontradas em triplicata.

Tabela 2 - Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado nos diferentes tratamentos após cada passo das condições gastrointestinais simuladas.

	Microrganismo livre	ALGL	AFAL	AINL	AHML
Inicial	12.40 ± 0.02 ^{aA}	9.20±0.29 ^{aB}	11.78±0.05 ^{aA}	7.67±0.02 ^{aC}	6.76±0.08 ^{aD}
Esôfago / estômago 90 min / pH 2.0	7.05±0.04 ^{bA}	6.75±0.10 ^{bB}	6.05±0.04 ^{cC}	4.27±0.11 ^{dE}	5.00±0.06 ^{cD}
Duodeno 20 min / pH 5.0	6.19±0.03 ^{cB}	7.14±0.13 ^{abA}	6.28±0.18 ^{cB}	4.91±0.04 ^{cC}	5.14±0.05 ^{cC}
Íleo 110 min / pH 6.5	5.71±0.06 ^{dB}	7.83±1.69 ^{abA}	7.64±0.02 ^{bAB}	6.20±0.08 ^{bAB}	6.04±0.12 ^{bAB}

ALGL = micropartículas de alginato 2%; AFAL = micropartículas de alginato 2% + farelo de arroz 10%; AINL = micropartículas de alginato 2% + inulina 10%; AHML = micropartículas de alginato 2% + hi-maize 10%.

*Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúscula na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%. Médias encontradas em triplicata.

Tabela 3 – Efeito da temperatura ambiente (25 °C), congelamento (-18 °C) e refrigeração (7 °C) na viabilidade de micropartículas liofilizadas contendo *Lactobacillus acidophilus* produzidas com diferentes matrizes de encapsulamento durante o armazenamento por 75 dias.

Temperatura		Ambiente (25 °C)			
Tratamentos	ALGL	AFAL	AINL	AHML	
Tempo (Dias)					
0	9.20 ± 0.29 ^{aB}	11.78 ± 0.05 ^{aA}	7.67 ± 0.02 ^{aC}	6.76 ± 0.08 ^{aD}	
15	5.46 ± 0.37 ^{bB}	7.49 ± 0.31 ^{bA}	4.58 ± 0.23 ^{bC}	6.02 ± 0.015 ^{abB}	
30	2.66 ± 0.18 ^{cdD}	6.05 ± 0.03 ^{cA}	3.13 ± 0.21 ^{bcC}	4.58 ± 1.31 ^{bcAB}	
45	3.21 ± 0.14 ^{cC}	5.67 ± 0.03 ^{cA}	0.00 ± 0	4.06 ± 0.04 ^{cdB}	
60	2.32 ± 0.12 ^{deC}	5.21 ± 0.10 ^{dA}	0.00 ± 0	3.83 ± 0.14 ^{cdB}	
75	2.04 ± 0.02 ^{eC}	4.55 ± 0.09 ^{eA}	0.00 ± 0	2.93 ± 0.05 ^{dB}	

Temperatura		Congelamento (-18 °C)			
Tratamentos	ALGL	AFAL	AINL	AHML	
Tempo (Dias)					
0	9.20 ± 0.29 ^{aB}	11.78 ± 0.05 ^{aA}	7.67 ± 0.02 ^{aC}	6.76 ± 0.08 ^{aD}	
15	7.32 ± 0.13 ^{bB}	8.54 ± 0.04 ^{bA}	7.49 ± 0.11 ^{ab}	6.31 ± 0.06 ^{bC}	
30	4.75 ± 0.15 ^{cdD}	7.07 ± 0.32 ^{cA}	5.40 ± 0.24 ^{bcC}	6.32 ± 0.04 ^{bB}	
45	0.00 ± 0	6.84 ± 0.08 ^{cdA}	0.00 ± 0	6.25 ± 0.04 ^{bB}	
60	0.00 ± 0	6.54 ± 0.11 ^{dA}	0.00 ± 0	6.24 ± 0.06 ^{bB}	
75	0.00 ± 0	6.12 ± 0.08 ^{eA}	0.00 ± 0	5.49 ± 0.13 ^{bC}	

Temperatura		Refrigeração (7 °C)			
Tratamentos	ALGL	AFAL	AINL	AHML	
Tempo (Dias)					
0	9.20 ± 0.29 ^{aB}	11.78 ± 0.05 ^{aA}	7.67 ± 0.02 ^{aC}	6.76 ± 0.08 ^{aD}	
15	6.09 ± 0.03 ^{bcC}	6.84 ± 0.13 ^{bA}	3.13 ± 0.06 ^{bD}	6.60 ± 0.12 ^{abB}	
30	3.31 ± 0.04 ^{cB}	6.59 ± 0.08 ^{cA}	0.00 ± 0	6.44 ± 0.06 ^{bA}	
45	3.27 ± 0.20 ^{cB}	6.28 ± 0.02 ^{dA}	0.00 ± 0	6.38 ± 0.04 ^{bcA}	
60	0.00 ± 0	6.23 ± 0.01 ^{deA}	0.00 ± 0	6.16 ± 0.06 ^{cA}	
75	0.00 ± 0	6.02 ± 0.09 ^{eA}	0.00 ± 0	6.15 ± 0.04 ^{cA}	

ALGL = micropartículas de alginato; AFAL = micropartículas de alginato + farelo de arroz; AINL = micropartículas de alginato + inulina; AHML = micropartículas de alginato + hi-maize.

Médias seguidas pela mesma letra, minúsculas na coluna e maiúsculas na linha, não diferem estatisticamente entre si pelo teste de Tukey com significância de 5%. Médias encontradas em triplicata.

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

5.1.1 Morfologia e tamanho das micropartículas

A morfologia das micropartículas úmidas foi observada através de microscopia óptica, sendo possível observar que, em geral, em todos os tratamentos as micropartículas apresentaram forma esférica e com o material do núcleo distribuído por toda a matriz. Já a estrutura das micropartículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde as micropartículas dos quatro tratamentos apresentaram forma elíptica e superfície com aspecto rugoso. Estes efeitos na superfície das partículas, provavelmente são causados pela sublimação rápida da água congelada a partir de matriz de alginato, resultando na formação de cavidades em áreas onde estavam os cristais de gelo (SOUSA et al., 2015).

Em relação ao diâmetro, as micropartículas úmidas apresentaram diâmetros que variaram de 79.7 (alginato) – 117.70 (alginato + farelo de arroz) μm , enquanto as liofilizadas apresentaram diâmetros de 127.5 (hi-maize) – 234.6 μm (inulina). Uma ampla gama de distribuição de tamanho de micropartículas foi relatada por vários pesquisadores, geralmente, quanto maior as micropartículas, melhor é a proteção para probióticos mas pior efeito sensorial (HANSEN; ALLAN-WOJTAS; JIN; PAULSON, 2002; LEE; HEO, 2000), deste modo, um diâmetro mínimo de 100 μm foi sugerido para garantir uma melhor proteção do composto bioativo no suco gástrico, e foi proposta uma gama ótima entre 100-200 μm (MCMASTER; KOKOTT; SLATTER, 2005).

5.1.2 Análises físico-químicas

Altos níveis de umidade foram observados nas análises físico-químicas das micropartículas úmidas, em média 94.94%, 89.46%, 90.97% e 81.64% para os tratamentos alginato (ALG), alginato + farelo de arroz (AFA), alginato + inulina (AIN) e alginato + hi-maize (AHM), respectivamente. O menor valor encontrado foi para as micropartículas contendo hi-maize, isso pode ser explicado, devido à sinérese que ocorre nas cadeias de amido (CEREDA et al., 2001). Altos níveis também foram observados para atividade de água, em média 0.99 para todos os tratamentos. Estes valores podem ser justificados pela grande capacidade de retenção de água dos materiais de parede.

Quanto às micropartículas liofilizadas, todos os tratamentos apresentaram valores de atividade de água abaixo de 0,3, que de acordo com PEIGHAMBARDOUST et al., (2011) é muito positivo para a estabilidade das bactérias probióticas, uma vez que representa menos água livre disponível para reações bioquímicas, prolongando a viabilidade dos mesmos. Em outro estudo, VESTERLUND, SALMINEN & SALMINEN (2012), ao avaliarem a estabilidade de *L. rhamnosus* GG em uma matriz de linhaça triturada, observaram que a viabilidade deste probiótico foi pouco dependente da matriz em que foi veiculado, porém fortemente dependente da atividade de água, sendo que a perda de viabilidade foi rápida na maior atividade de água.

5.2 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO

A eficiência de encapsulação é um dos parâmetros mais importantes para indicar o efeito do processo de encapsulação utilizado e da matriz de parede selecionada (ÇABUK; HARSA, 2015). Neste estudo, a técnica de gelificação iônica externa promoveu alta eficiência de encapsulação (EE%) de *Lactobacillus acidophilus* (76.17 a 96.75%) com diferenças significativas ($p < 0,05$). As melhores eficiências de encapsulação foram observadas nos tratamentos inulina, farelo de arroz e alginato com 96.75, 94.87 e 94.10% respectivamente. Já em um estudo realizado por ZOU et al., (2011), onde microesferas de alginato com mistura ou revestimento com outros polímeros contendo *B. bifidum* F-35 foram produzidas pela técnica de gelificação iônica interna, a EE% média variou de 43% a 50%, sendo os baixos resultados atribuídos ao fato de que a adição de ácido acético glacial durante o processo de gelificação interna teve um efeito negativo sobre a sobrevivência das células probióticas.

Na liofilização, a eficiência de encapsulação foi de 95.02, 74.24, 61.84 e 54.54% para os tratamentos contendo farelo de arroz, alginato, inulina e hi-maize, respectivamente. Esta redução na eficiência de encapsulação pode ser explicada, pois as bactérias probióticas costumam ser sensíveis à liofilização devido à deterioração do estado fisiológico da célula (KETS; TEUNISSEN; DE BONT, 1996). Entretanto, esses valores foram superiores aos encontrados por outros autores que também utilizaram a técnica de extrusão, seguida de liofilização, e obtiveram resultados entre 19,5% a 40,2% de eficiência, com perda de até 4 log UFC g⁻¹ na viabilidade das células (CHAN et al., 2011; CHÁVARRI et al., 2010).

5.3 AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* LIVRE E MICROENCAPSULADO EXPOSTO A CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

Após o processo de extrusão, a contagem inicial de *L. acidophilus* foi de 13.85 ± 0.05 , 13.94 ± 0.20 , 14.24 ± 0.05 e 11.21 ± 0.09 log UFC g⁻¹ para alginato (ALG), farelo de arroz (AFA), inulina (AIN) e hi-maize (AHM) respectivamente. Já o microrganismo livre, apresentou contagem inicial de 14.72 ± 0.02 log UFC g⁻¹.

Na avaliação da sobrevivência dos probióticos às condições gastrointestinais simuladas pode-se perceber que as células livres nas condições simuladas do íleo (pH 6.5), ocorreu uma redução de 9.03 log UFC g⁻¹ quando comparada com a contagem inicial antes da simulação. Isso mostra que a exposição das células livres em condições ácidas e enzimas gástricas resultaram em um decréscimo significativo sobre a viabilidade das bactérias probióticas. Isto está de acordo com outros estudos que mostram que *Lactobacillus acidophilus* é uma cepa sensível ao ácido (MOKARRAM et al., 2009; LAELORSPOEN et al., 2014; KIM et al., 2008).

Quando os probióticos microencapsulados foram submetidos a condições ácidas (simulação do esôfago/estômago), observou-se que não houve ruptura total das micropartículas uma vez que todos os tratamentos apresentaram baixas contagens quando comparados à sua contagem inicial. Ao final da análise, após a exposição às condições simuladas do íleo (pH 6,5), observou-se que os tratamentos contendo alginato, farelo de arroz, inulina e hi-maize apresentaram contagens de 11.18 ± 0.13 , 8.06 ± 0.01 , 8.93 ± 0.09 e 9.47 ± 0.23 log UFC g⁻¹ respectivamente, demonstrando que a microencapsulação do *Lactobacillus acidophilus* em alginato, bem como associado aos diferentes prebióticos, conferiu maior proteção ao probiótico durante a exposição à simulação do trato gastrointestinal.

Os resultados desse estudo corroboram com o desenvolvido por CHEN, LI, LIU & MENG (2017), que compararam a viabilidade de *Lactobacillus bulgaricus* livre e microencapsulado por emulsificação frente aos ensaios simulados de suco gástrico e tolerância biliar e observaram que a sobrevivência das células probióticas foi significativamente maior quando microencapsuladas em comparação com as células livres. Em outro estudo, RIBEIRO et al. (2014) desenvolveram iogurtes contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 livre e microencapsulado por gelificação iônica e técnicas de coacervação complexa usando pectina e proteína de soro de leite como materiais de revestimento,

respectivamente. Após cinco horas de exposição a 1% de solução biliar, os autores observaram uma redução de 3,5 log e 1,37 log para *L. acidophilus* LA-5 livre e microencapsulado, respectivamente. Sendo assim, a sobrevivência de *L. acidophilus* LA-5 na forma livre foi menor quando comparado ao iogurte com *L. acidophilus* LA-5 microencapsulado.

As contagens iniciais das micropartículas liofilizadas antes da adição do sistema gastrointestinal simulado foram 9.20 ± 0.29 , 11.78 ± 0.05 , 7.67 ± 0.02 e 6.76 ± 0.08 log UFC g⁻¹ para os tratamentos alginato (ALGL), farelo de arroz (AFAL), inulina (AINL) e hi-maize (AHML), respectivamente. Já o microrganismo livre apresentou contagem inicial de 12.40 ± 0.02 log UFC g⁻¹. Após a exposição a condições gástricas simuladas em pH ácido, a sobrevivência dos probióticos foi maior nas microcápsulas de alginato adicionadas de hi-maize (AHML) em comparação com os demais tratamentos, uma vez que apresentaram menor redução (1.76 ciclos logarítmicos) em relação à sua contagem inicial. Ao final da análise, após a exposição às condições simuladas do íleo (pH 6,5), os tratamentos contendo alginato, farelo de arroz, inulina e hi-maize apresentaram reduções logarítmicas de 1.37, 4.14, 1.47 e 0.72 respectivamente, quando comparadas com o tempo zero. Apesar de o tratamento AFAL ter apresentado a maior redução, as micropartículas apresentaram contagens acima de 6 log UFC g⁻¹, atendendo aos requisitos exigidos para que os probióticos exerçam efeitos benéficos.

Estes resultados estão de acordo com os autores XU et al. (2016) que microencapsularam *Lactobacillus casei* ATCC 393 por extrusão e posterior liofilização obtendo o número de células viáveis estabilizado (0,03 log UFC g⁻¹) durante o período de simulação gastrointestinal. MACIEL, CHAVES, GROSSO & GIGANTE (2014) microencapsularam *L. acidophilus* La-5 em soro de leite doce e leite desnatado por spray drying e observaram que em comparação com microrganismos livres, a sobrevivência do *L. acidophilus* La-5 microencapsulado foi significativamente maior no final das condições gastrointestinais simuladas, indicando o efeito protetor da microencapsulação em ambos os materiais. No presente estudo, a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* tanto na forma úmida como liofilizada ofereceu um meio eficaz de entrega de células bacterianas viáveis a nível intestinal, em condições apropriadas e ajuda a manter a sua sobrevivência durante a passagem simulada pelo trânsito gastrointestinal.

5.4 VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* DURANTE O ARMAZENAMENTO EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO

A estocagem das micropartículas úmidas foi acompanhada por 120 dias. Com relação ao armazenamento das micropartículas úmidas a temperatura ambiente (25°C), o número de células viáveis de *L. acidophilus* permaneceu estável por 120 dias nos tratamentos ALG, AFA e AHM, não demonstrando diferença significativa ($p < 0,5$) nas micropartículas adicionadas com os prebióticos farelo de arroz ($7.79 \pm 0.04 \log \text{UFC g}^{-1}$) e hi-maize ($7.61 \pm 0.08 \log \text{UFC g}^{-1}$). Quanto ao efeito da temperatura de congelamento, observou-se que as micropartículas de alginato (ALG) e farelo de arroz (AFA) mantiveram-se estáveis por 75 dias, as micropartículas adicionadas de hi-maize por 105 dias, entretanto o tratamento contendo inulina (AIN) demonstrou melhores resultados, uma vez que o microrganismo permaneceu viável durante os 120 dias com contagens de $6.34 \log \text{UFC g}^{-1}$. Esses resultados foram melhores que os que apresentados por SOUSA et al., (2015) que utilizaram alginato para microencapsular *Lactobacillus acidophilus* por extrusão e observaram que a temperatura de congelamento (-20 °C) teve um impacto negativo sobre a sobrevivência do probiótico por 60 dias. Em relação ao armazenamento refrigerado (7°C) todos os tratamentos apresentaram resultados satisfatórios, uma vez que as micropartículas dos tratamentos ALG e AHM mantiveram-se viáveis até 105 dias de armazenamento, com contagens de $6.24 \log \text{UFC g}^{-1}$ e $6.17 \log \text{UFC g}^{-1}$, respectivamente, enquanto que AFA e AIN permaneceram acima de $6 \log \text{UFC g}^{-1}$ durante os 120 dias, atendendo aos requisitos básicos para conferirem benefícios para a saúde. Esses resultados foram melhores que os encontrados por KRASAEKOOPT & WATCHARAPOKA (2014) que encapsularam *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* em galactooligossacarídeo e inulina em cápsulas de alginato revestidas com quitosana pela técnica de extrusão. As cápsulas foram adicionadas em iogurte e sumo de fruta e mantiveram a viabilidade durante armazenamento refrigerado durante 4 semanas.

A estocagem das micropartículas liofilizadas foi acompanhada por 75 dias. Em 25°C, a viabilidade das bactérias microencapsuladas manteve-se até os 15 dias de armazenamento para os tratamentos alginato e inulina. As micropartículas contendo os prebióticos hi-maize e farelo de arroz permaneceram estáveis por 15 e 30 dias, respectivamente, após este período, houve uma redução significativa ($p < 0,05$) na viabilidade desses microrganismos até os 75 dias de armazenamento. Isso pode ser explicado, pois há uma maior atividade metabólica dos microrganismos, produzindo ácidos metabólicos, bacteriocinas ou até mesmo perda de substratos durante o armazenamento (OKURO et al., 2013). Em outro estudo desenvolvido

por SHOJI et al., (2013), os autores também não obtiveram resultados positivos ao microencapsularem *Lactobacillus acidophilus* por coacervação complexa seguida de liofilização. Os autores relataram perda significativa de viabilidade ($p < 0,05$) após 30 dias a 37°C.

Quanto ao efeito da temperatura de congelamento, observou-se que as micropartículas liofilizadas de alginato (ALGL) e inulina (AINL) mantiveram-se estáveis por 15 dias, após este período houve uma redução significativa ($p < 0,05$) até os 75 dias de armazenamento. A redução de viabilidade na temperatura de -18 °C pode estar relacionada às injúrias causadas pelo frio às células, que eventualmente levam à morte celular do probiótico. As micropartículas adicionadas de hi-maize (AHML) apresentaram contagens de 6.24 log UFCg⁻¹ em 60 dias de armazenamento, entretanto o tratamento contendo farelo de arroz (AFAL) demonstrou melhores resultados conferindo uma maior proteção, uma vez que o microrganismo permaneceu viável durante os 75 dias com contagens de 6.12 log UFC g⁻¹. Já na temperatura de refrigeração (7°C) os tratamentos AFAL e AHML obtiveram contagens de 6.02±0.09 e 6.15 ± 0.04 log UFC g⁻¹ durante os 75 dias de armazenamento.

Neste estudo, não houve diferença significativa entre as temperaturas de refrigeração e congelamento sugerindo que a estabilidade das células aumenta com a diminuição da temperatura, pois em temperaturas baixas ocorre o impedimento de rearranjos de cristais e exposição do ingrediente ativo promovendo uma vida útil mais longa das micropartículas (RIBEIRO et al., 2014). Resultados semelhantes foram encontrados por LORENZ (2009), onde a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulado por spray drying com alginato de sódio foi maior que 10⁶ log UFC g⁻¹ após 90 dias a -18° C. Já OLIVEIRA et al. (2007) microencapsularam *L. acidophilus* por coacervação complexa utilizando o sistema de leite fluidizado para desidratação e mostraram que as micropartículas apresentaram maior viabilidade em um armazenamento a temperatura de 7 ° C (entre 90 e 120 dias) quando comparadas ao armazenamento a 37 ° C (90 dias).

6. CONCLUSÃO

As micropartículas de alginato bem como as adicionadas dos prebióticos (farelo de arroz, inulina e hi-maize) produzidas pela técnica de extrusão / gelificação externa bem como as liofilizadas promoveram a resistência de *Lactobacillus acidophilus* durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

Quanto ao armazenamento em diferentes condições de temperatura, os tratamentos alginato, farelo de arroz e hi-maize proporcionaram a viabilidade do microrganismo a 25 ° C por 120 dias para as micropartículas úmidas enquanto que o tratamento farelo de arroz manteve as micropartículas liofilizadas estáveis por 30 dias. Na temperatura de -18 ° C o uso do prebiótico inulina afetou positivamente as micropartículas úmidas, visto que foi o único tratamento que manteve o microrganismo viável por 120 dias. Da mesma maneira ocorreu na temperatura de 7 ° C, onde os melhores resultados foram alcançados nas micropartículas úmidas contendo os prebióticos inulina e farelo de arroz. Já nas micropartículas liofilizadas, os prebióticos hi-maize e farelo de arroz mantiveram os microrganismos probióticos viáveis por um período maior de 60 dias nas temperaturas de congelamento e refrigeração.

Sendo assim, além dos prebióticos conferirem benefícios à saúde, proporcionando deste modo uma micropartícula funcional, pode-se concluir que a incorporação destes, principalmente farelo de arroz, em micropartículas de alginato pela técnica de extrusão / gelificação externa, representa um sistema eficiente para promover a resistência de *Lactobacillus acidophilus* frente a condições adversas como a passagem pelo trato gastrointestinal e a diferentes condições de armazenamento, podendo ser meios alternativos para o desenvolvimento de novos alimentos funcionais.

7. REFERÊNCIAS

ABD EL-SALAM M. H, EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk proteins based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science & Technology**, EDP sciences/Springer, , 95 (4), pp.393-412, 2015. Disponível em: < <https://hal.archives-ouvertes.fr/hal-01297180/document>> Acesso em 30 de novembro de 2017.

ALBADRAN H. A., CHATIFRAGKOU, A., KHUTORYANSKIY, A. V., CHARALAMPOPOULOS, D. Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, 74, 208–216, 2015. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996915300053>> Acesso em: 30 novembro de 2017.

ALMEIDA C. C., LORENA SL, PAVAN CR, AKASAKA HM, MESQUITA MA. Beneficial effects of long-term consumption of a probiotic combination of *Lactobacillus casei* Shirota and *Bifidobacterium breve* Yakult may persist after suspension of therapy in lactose-intolerant patients. **Nutr Clin Pract**. Apr;27(2):247-51, 2012. doi: 10.1177/0884533612440289. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22402407>> Acesso em: 08 de junho de 2017.

AMATO, G.W. Farelo do Arroz: uma nova visão. Porto Alegre: Centro de Excelência do arroz - IRGA, 2006. Disponível em: http://www.irga.rs.gov.br/index.php?action=artigo_detalhe&id=28. Acesso em: 15 de setembro de 2017.

ANADÓN, A.; MARTÍNEZ-LARRAÑAGA, M. R.; ARÉS, I.; MARTÍNEZ, M.A. Prebiotics and Probiotics: An Assessment of Their Safety and Health Benefits, Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. **Bioactive Foods in Health Promotion**, pages 3-23, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021897000010>>. Acesso em: 09 jun. 2017.

ANAL, A.K.; SINGH, K. Recents advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p.240-251, 2007. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/>. Acesso em: 02 de outubro de 2017. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.004.

ANDRADE, A. **Microflora intestinal: uma barreira imunológica desconhecida**. Dissertação (Mestrado Integrado em Medicina) - Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar na Universidade do Porto, Porto, 2009/2010. Disponível em: <<https://repositorioaberto.up.pt/bitstream/10216/52784/2/Microflora%20intestinal%20%20uma%20barreira%20imunologica%20deconhecida.pdf>> Acesso em: 12/07/2017.

ANJUM N., MAQSOOD S., MASUD T., AHMAD A., SOHAIL A., MOMIN A. *Lactobacillus acidophilus*: characterization of the species and application in food production. **Crit Rev Food Sci Nutr**, 54(9):1241-51, 2014. doi: 10.1080/10408398.2011.621169. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24499153>> Acesso em: 17 de janeiro de 2017

ANSON, R. Microencapsulation: for enhanced textile performance. **Performance Apparel Markets**, v. 12, n. 12, p. 21-39, 2005.

ANTUNES, A. E. C. et al. Desenvolvimento de buttermilk probiótico. **Ciência Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, n.1, p. 83-90, 2007. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cta/v27n1/14>> Acesso em: 12 de setembro de 2017.

ARGIN S, KOFINAS P, Y. e LO M. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthane-chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids** v. 40, pages 138-144, 2014. Disponível em: <https://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/36570277/FoodHydro_2014.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAIWOWYYGZ2Y53UL3A&Expires=1515421434&Signature=%2BCaMgambNQ60r0bSVhRMH%2BWp4AY%3D&response-content-disposition=inline%3B%20filename%3DThe_cell_release_kinetics_and_the_swelli.pdf> Acesso em: 08 set 2017.

ASSUNÇÃO, L. S. Estudo prospectivo sobre encapsulamento de compostos bioativos. **Revista Geintec - Gestão, Inovação E Tecnologias**, v. 4, p. 1382-1391, 2014. Disponível em: <<http://www.revistageintec.net/index.php/revista/article/view/564>> Acesso em: 15 de março de 2017.

BORRESEN E. C., RYAN E. P. Chapter 22 – Rice Bran: A Food Ingredient with Global Public Health Opportunities. *Wheat and Rice in Disease Prevention and Health*, Pages 301–310, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780124017160000222>> Acesso em: 24 de junho de 2017.

BOSS, E. A. (2004). Modelagem e otimização do processo de liofilização: aplicação para leite desnatado e café solúvel. 107f. Tese (Doutorado). Universidade de Campinas. Faculdade de Engenharia Química, São Paulo. Disponível em <http://repositorio.unicamp.br/bitstream/REPOSIP/266525/1/Boss_EdinaraAdelaide_D.pdf> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. [2008] Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 28 out. 2017.

BUREY, P. et al. Hydrocolloid gel particles, formation, characterization, and application. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v.48, p.361-377, 2008. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408390701347801>> Acesso em: 24 maio 2017.

BURITI, F.C.A., CASTRO, I.A. and SAAD, S.M.I. Effects of refrigeration, freezing and replacement of milk fat by inulin and whey protein concentrate on texture profile and sensory acceptance of symbiotic guava mousses. **Food Chemistry**, Vol. 123, pp. 1190-7, 2010.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications, **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/227958505_Encapsulation_of_probiotic_living_cells_From_laboratory_scale_to_industrial_applications>. Acesso em: 22 jun. 2017.

BURLANDO & CORNARA. Therapeutic properties of rice constituents and derivatives (*Oryza sativa* L.): A review update. **Trends in Food Science & Technology**. Volume 40, Issue 1, Pages 82-98, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224414001666>> Acesso em: 14 de setembro de 2017.

BUTTRISS & STOKES. Dietary fibre and health: an overview. **Nutrition Bulletin**, v. 33, p. 186-200, 2008. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-3010.2008.00705.x/full>> Acesso em: 22 mar. 2017.

ÇABUK, B. and HARSA, S.T. 2015. Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. **J. Biosci. Bioengi.**, Issues 6/120: 650-656. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1389172315001644>> Acesso em: 10 de janeiro de 2018.

CELESTINO, S. M. C. (2010). Princípios de Secagem de Alimentos. Planaltina, DF: Embrapa Cerrados. p. 33-46.

CEREDA, M. P. et al. Propriedades gerais do amido. São Paulo, Fundação Cargill, 221 p. (Série: Culturas de tuberosas amiláceas Latino-americanas, v. 1) 2001.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184-190, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166907000328>>. Acesso em: 01 jun. 2017.

CHAN, E. S.; WONG, S. L.; LEE, P. P.; LEE, J. S.; TI, T. B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S. H.; YIM, Z. H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225-232, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710005874>> Acesso em: 17 de novembro de 2017.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. del C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 142, p. 185-189, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510003648>> Acesso em: 11 novembro de 2017.

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**, 29, 248–255, 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616304042>> Acesso em: 17 out de 2017.

CLARKE SF, MURPHY EF, NILAWEERA K, ROSS PR, SHANAHAN F, O'TOOLE PW, COTTER PD. The gut microbiota and its relationship to diet and obesity: new insights. **Gut Microbes**. V. 3(3), p.186-202, 2012. doi: 10.4161/gmic.20168. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22572830>> Acesso em: 28 abr. 2017.

COMUNIAN T. A., FAVARO-TRINDADE C. S. Microencapsulação usando biopolímeros como alternativa para produzir alimentos melhorados com fitosteróis e ácidos graxos ômega-3: uma revisão. **Hidrocolóides alimentares**, Volume 61, p.442-457, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16302521>> Acesso em: 22 jun 2017.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168365912004968>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; GALLO, M.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 18, p. 196-202, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856412001622?via%3Dihub>>. Acesso em: 09 ago. 2017.

CRUZ, A.G. et al. Probiotic yogurts manufactured with increased glucose oxidase levels: postacidification, proteolytic patterns, survival of probiotic microorganisms, production of organic acid and aroma compounds. **Journal of Dairy Science**, v.95, n.5, p.2261-2269, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22541455>> Acesso em: 12 set 2017.

DAVIS, MARTINEZ, WALTER, & HUTKINS. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults. **Int J Food Microbiol**. v.15;144(2), p.285-92, 2010. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21059476>> Acesso em: 20 abril de 2017.

DAVIS e MILNER. Gastrointestinal microflora, food components and colon cancer prevention. **J Nutr Biochem**, v. 20(10), p.743-52, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19716282>> . Acesso em: 23 março de 2017.

DE PRISCO A., MARESCA D., ONGENG D., MAURIELLO G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, Volume 61, Issue 2, Pages 452-462, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814007877>> Acesso em: 24 ago 2017.

DE PRISCO A., MAURIELLO G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, pages 27–39, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441530087X>> Acesso em: 02 de julho de 2017.

DE VOS P., FAAS M. M., SPASOJEVIC M., SIKKEMA J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **Int. Dairy J.** Volume 20, 292–302, 2010. 10.1016/j.idairyj.2009.11.008 Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694609002167?via%3Dihub>> Acesso em: 04 jun 2017.

DEMIRCI, T., AKTAS, K., SOZERI, D., OZTURK, H. I., & AKIN, N. Rice bran improve probiotic viability in yoghurt and provide added antioxidative benefits. **Journal of Functional Foods**, 36, 396–403, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2017.07.019>> Acesso em: 24 de agosto de 2017.

DENIPOTE; TRINDADE; BURINI. Probióticos e prebióticos na atenção primária ao câncer de cólon. **Arq. Gastroenterol.** [online]. vol.47, n.1, pp.93-98, 2010. ISSN 0004-2803. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/ag/v47n1/v47n1a16.pdf>> Acesso em: 05 abril 2017.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients, **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005. Disponível em: <http://www.researchgate.net/publication/244603075_Recent_Developments_in_Microencapsulation_of_Food_Ingredients>. Acesso em: 10 jun. 2017

DUNCAN, S. H.; FLINT, H. J. Probiotics and prebiotics and health in ageing populations, **Maturitas**, v. 75, n. 1, p. 44-50, 2013. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23489554>>. Acesso em: 22 jul. 2017.

ESPITIA, BATISTA, AZEREDO e OTONI. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. **Food Res Int.**, v. 90, p.42-52, 2016. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29195890>> Acesso em: 25 out. 2017

ETCHEPARE, M. A., RADDATZ, G. C., CICHOSKI, A. J., FLORES, E. M. M., BARIN, J. S., ZEPKA, L. Q., JACOB-LOPES, E., GROSSO, C. R. F., & MENEZES, C. R. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate, **Journal of Functional Foods**, 21, 321-329, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615006295?via%3Dihub>> Acesso em: 19 de março de 2017.

FAO/WHO Probiotics in Food. Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. FAO Food and Nutritional Paper No. 85, Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, 2006. Disponível em: <<http://www.fao.org/3/a-a0512e.pdf>>. Acesso em 03 nov 2017.

FAREEZ I. M., LIM S. M., MISHRA R. K., RAMASAMY K. Chitosan coated alginate-xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **Int. J. Biol. Macromol.** Volume 72, Pages 1419-1428, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S014181301400734X?via%3Dihub>>
Acesso em: 15 julho 2017.

FÁVARO-TRINDADE, C. S et al. Revisão: microencapsulação de ingredientes alimentícios, **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, 2008. Disponível em: <http://www.researchgate.net/profile/Carmen_FavaroTrindade/publication/237521407_Revisao_Microencapsulao_de_ingredientes_alimentcios/links/00b49533f021e8f11f000000.pdf>. Acesso em: 11 abr. 2017.

FAVARO-TRINDADE CS, SANTANA AS, MONTERREY-QUINTERO ES, TRINDADE MA, NETTO FM. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocoll.** V.24, p.336–340, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X09002161?via%3Dihub>> Acesso em: 17 abr 2017.

FELLOEWS, P. J. (2000). Food Processing Technology: Principles and Practice. 2nd Edition. Woodhead Publishing, Limited.

FERNANDES L. P, CANDIDO R. C., OLIVEIRA W. P. Spray drying microencapsulation of Lippia sidoides extracts in carbohydrate blends. **Food Bioprod Process**, v.90, p.425-432, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096030851100109X>> Acesso em: 25 set 2017.

GARCIA, L. P. Liofilização aplicada a alimentos. 2009. 45p. Trabalho Acadêmico (Graduação Bacharelado em Química de Alimentos) - Universidade Federal de Pelotas. Pelotas, RS, 2009. Disponível em: . Acesso em: 13 abr. 2011.

GIBSON GR, McCARTENEY AL, RASTALL RA. Prebiotics and resistance to gastrointestinal infections. **Br J Nutr.**, v.93 Suppl 1:S31-4, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15877892>> Acesso em 15 dez 2016.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, 40, p. 1107–1121, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238>> Acesso em: 19 jun 2017.

GOLDIN e GORBACH. Clinical indications for probiotics: an overview. **Clin Infect Dis.** 1;46 Suppl 2:S96-100, 2008; discussion S144-51. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18181732>> Acesso em 27 maio de 2017.

GOMES, A.M.P., MALCATA, F.X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends Food Sci. Technol.**, Amsterdam, v.10, p.139-157, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000333>> Acesso em 15 dez 2017.

GONÇALVES, O. M. A. R. (2015). Estudo comparativo de processos de desidratação por liofilização e secagem. 120f. Instituto Politécnico de Tomar. Disponível em: <<https://comum.rcaap.pt/bitstream/10400.26/12966/1/Estudo%20comparativo%20de%20processos%20de%20desidrata%C3%A7%C3%A3o.pdf>> Acesso em: 20 de janeiro de 2018.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004

GUGGISBERG, D., CUTHBERT-STEVEN, J., PICCINALI, P., BUTIKOFER, U., & EBERHARD, P. Rheological, microstructural and sensory characterization of low-fat and whole milk set yogurt as influenced by inulin addition. **International Dairy Journal**, v. 9(2), p.107-115, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694608001386>> Acesso em 19 dez. 2017.

HAMMOND, N. Functional and nutritional characteristics of rice bran extracts. **American Cereal Chemists**, Saint Paul, v. 39, n. 10, p. 752-754, 1994. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US19950144459>> Acesso em: 14 de março de 2017.

HANSEN, L. T.; ALLAN-WOJTAS, P. M.; JIN, Y. L.; PAULSON, A. T. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 62, p. 47-55, 2002. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0740002001904526?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 set. 2017.

HILL C, GUARNER F, REID G, GIBSON GR, MERENSTEIN DJ. Expert consensus document. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nat Rev Gastroenterol Hepatol**. V.11(8), p.506-14, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24912386>> Acesso em 02 jan 2018

HOMAYOUNI A, AZIZI A, EHSANI MR, YARMAND MS, RAZAVI SH (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. **Food Chem**. V.111(1), p.50-55, 2008. Disponível em: <<http://agris.fao.org/agris-search/search.do?recordID=US201300900014>> Acesso em: 05 jun 2017.

JARIWALLA. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine. **Drugs Exp Clin Res**. V.27(1), p.17-26, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11276826>> Acesso em 21 março 2017.

JIAO C., XIONG J., TAO J., XU S., ZHANG D., LIN H., CHEN Y.. Sodium alginate/graphene oxide aerogel with enhanced strength-toughness and its heavy metal adsorption study. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 83, Pages 133-141, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813015301562>> Acesso em: 20 maio 2017.

JUÁREZ G. A. P. , SPASOJEVIC M., FASS M. M. and de VOS P. Immunological and Technical Considerations in Application of Alginate-Based Microencapsulation Systems. **Front. Bioeng. Biotechnol**, 2:26, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4123607/>> Acesso em: 14 de maio de 2017.

JUSKIEWICZ J., ASMANSKAITE L., ZDUNCZYK Z., MATYSEVICIUS P., WRÓBLEWSKA M., ZILINSKIENE A. Metabolic response of the gastrointestinal tract and serum parameters of rabbits to diets containing chicory flour rich in inulin. **J Anim Physiol Anim Nutr** (Berl), v. 92, p.113–120, 2008. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18336407>> Acesso em: 02 maio de 2017.

KAILASAPATHY, K.; SULTANA, K. Survival and β -D-galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice cream. **Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 223-227, 2003. Disponível em: < <http://researchdirect.uws.edu.au/islandora/object/uws:5012>>. Acesso em: 29 fev. 2017.

KARKOW F. J. A., FAINTUCH J., KARKOW A. G. M. Probióticos: perspectivas médicas. **Rev AMRIGS**. 2007 jan/mar; 51:38- 48.

KATOUZI, S.; MAJD, A.; FALLAHIAN, F.; BERNARD, F. Encapsulation of shoot tips in alginate beads containing salicylic acid for cold preservation and plant regeneration in sunflower (*Helianthus annuus* L.) **Australian Journal of Crop Science**, v.5(11), p.1469-1474, 2011.

KAUSHIK P., DOWLING K., BARROW C. J., ADHIKARI B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of Functional Foods**, Volume 19, Pages 868-881, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S175646461400228X>> Acesso em: 20 abr 2017.

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**. 64, p. 567–576, 2014. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914005067>>. Acesso em: 20 de outubro de 2017.

KETS, E. P. W., TEUNISSEN, P. J. M., & De BONT, J. A. M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. **Applied and Environmental Microbiology**, 62, 259–291, 1996. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1388756/>> Acesso em 16 abril de 2017.

KIM, S.-J., CHO, S. Y., KIM, S. H., SONG, O.-J., SHIN, II-S., CHA, D. S., PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT**, 41, 493–500, 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643807001405>> Acesso em: 15 set de 2017.

KOLOZY-KRAJEWSKA D., DOLATOWSKI Z. J. Probiotic meat products and human nutrition. **Process Biochemistry**. V.47(12), p.1761–1772, 2012;. Disponível em <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1359511312003583>> Acesso em: 04 jun 2017.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt, **International Dairy Journal**, v. 13, n. 1, p. 3-13, 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694602001553>> Acesso em: 24 de abril de 2017.

KUMAR, R., GROVER, S., and BATISH, K.V., “Hypocholesterolaemic effect of dietary inclusion of two putative probiotic bile salt hydrolase-producing *Lactobacillus plantarum* strains in Sprague-Dawley rats”, **Br. J. Nutr.**, 105: 561-573, 2011. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/hypocholesterolaemic-effect-of-dietary-inclusion-of-two-putative-probiotic-bile-salt-hydrolase-producing-lactobacillus-plantarum-strains-in-spraguedawley-rats/3D3B69D3FE953196E32AC6CC7ABD779E>> Acesso em: 02 de setembro de 2017.

KURDI & HANSAWASDI. Potential Prebiotic Oligosaccharide Mixtures from Acidic Hydrolysis of Rice Bran and Cassava Pulp. **Plant Foods for Human Nutrition.**, Volume 72, Issue 4, pp 396–403, 2017. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs11130-017-0636-z>> Acesso em: 10 jan 2018.

LAELORSPOEN, N., WONGSASULAKA, S., YOOVIDHYA, T., DEVAHASTIN, S. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein–alginate core–shell microcapsules via electrospraying. **Journal of Functional Foods**, 7, 342–349, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614000413>> Acesso em: 24 agosto de 2017.

LAM, P. L.; GAMBARI, R. Advanced progress of microencapsulation technologies: In vivo and in vitro models for studying oral and transdermal drug deliveries, **Journal of Controlled Release**, v. 178, n. 28, p. 25-45, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S016836591300970X>>. Acesso em: 18 abr. 2017.

LALIČIĆ-PETRONIJEVIĆ, J. et al. Viability of probiotic strains *Lactobacillus acidophilus* NCFM® and *Bifidobacterium lactis* HN019 and their impact on sensory and rheological properties of milk and dark chocolates during storage for 180 days, **Journal of Functional Foods**, v. 15, p. 541-550, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615001632>> Acesso em: 03 set. 2017

LAZADO C.C, CAINPANG C.M.A, BRINCHMANN M.F, KIRON V. In vitro adherence of two candidate probiotics from Atlantic cod and their interference with the adhesion of two pathogenic bacteria. **Vet Microbiol.**, V.148, p.252-259, 2011. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378113510004116>> Acesso em: 05 de novembro de 2017.

LEE N-K., HAN KJ, SON S-H, EOM SJ, LEE S-K, PAIK H-D. Multifunctional effect of probiotic *Lactococcus lactis* KC24 isolated from kimchi. **LWT - Food Science and Technology**, Volume 64, Issue 2, Pages 1036-1041, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815300347>> Acesso em 26 jan 2017

LI, B. et al. Fabrication of starch-based microparticles by an emulsification-crosslinking method. **Journal of Food Engineering**, v.92, p.250-254, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877408004019?via%3Dihub>> Acesso em: 06 de maio de 2017.

LI; WANG; DONAVAM. Early development of the gut microbiome and immune-mediated childhood disorders. **Semin Reprod Med**. v.32(1), p.74-86, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24390924>> Acesso em: 20 fev 2017.

LIMA. E. T. et al. Evaluation in vitro of the antagonistic substances produced by *Lactobacillus* spp. isolated from chickens. **Canadian Journal of Veterinary Research**, Ottawa, v. 71, n. 2, p. 103107, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC1829185/>> Acesso em: 20 mar 2017

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, n. 1, p. 1-16, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/08905430701191064>> Acesso em: 10 março 2017.

LIU, X. D. Characterization of structure and diffusion behaviour of ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **Journal of microencapsulation**, v.19, n. 6, p. 775-782, 2002. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/0265204021000022743>> Acesso em: 30 out 2017.

LOBO A, SILVA G. (2003). Amido resistente e suas propriedades físico-químicas. **Rev. Nutr.** vol.16, n° 2, 2003. Disponível em <<http://www.scielo.br/pdf/rn/v16n2/a09v16n2.pdf>> Acesso em: 05 ago 2017.

LOBO A. R., FILHO J. M., ALVARES E. P., COCATO M. L., COLLI C. Effects of dietary lipid composition and inulin-type fructans on mineral bioavailability in growing rats. **Nutrition**, v. 25, pages 216-225, 2009. Disponível em: <[http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007\(08\)00353-5/abstract](http://www.nutritionjrn.com/article/S0899-9007(08)00353-5/abstract)> Acesso em: 02 de junho de 2017.

LORENZ, J. G. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC. Disponível em: <<https://repositorio.ufsc.br/handle/123456789/92690>> Acesso em: 24 novembro de 2017.

MACIEL, G. M., CHAVES, K. S., GROSSO, C. R. F., & GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, 1991-1998, 2014. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24508439>> Acesso em 19 set de 2017.

MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; CORTI, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of

enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 508-518, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0939641107004055>> Acesso em: 25 mai 2017.

MARK, D.; HAEBERLE, S.; ZENGERLE, R.; DUCREE, J.; VLADISA, V.; GORAN, T. Manufacture of chitosan microbeads using centrifugally driven flow of gel-forming solutions through a polymeric micronozzel. **Journal of Colloid and Interface Science**. v. 336, n. 2, p. 634-641, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0021979709004299>> Acesso em: 19 maio 2017.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects, **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641400160X>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

MARTIROSYAN D. M. and SINGH J. A new definition of functional food by FFC: what makes a new definition unique? **Functional Foods in Health and Disease** v.5(6), p.209-223, 2015. Disponível em: <<http://functionalfoodscenter.net/files/105582267.pdf>> Acesso em 15 abril de 2017.

MATOS. Dissertação de Mestrado Integrado em Medicina. **Probióticos**. Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, Universidade do Porto, 2010. Disponível em: <<https://repositorioaberto.up.pt/bitstream/10216/53386/2/ProbiticosPedro%20MSM.pdf>> Acesso em: 25 mai 2017.

MATSUMOTO S, HARA T, HORI T, MITSUYAMA K, NAGAOKA M, TOMIYASU N, SUZUKI A, SATA M. Probiotic *Lactobacillus*-induced improvement in murine chronic inflammatory bowel disease is associated with the down-regulation of pro-inflammatory cytokines in lamina propria mononuclear cells. **Clin Exp Immunol**. V.140(3), p.417-26, 2005. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15932502>> Acesso em: 14 mai 2017.

MAZIADE PJ, PEREIRA P, GOLDSTEIN EJ. A Decade of Experience in Primary Prevention of *Clostridium difficile* Infection at a Community Hospital Using the Probiotic Combination *Lactobacillus acidophilus* CL1285, *Lactobacillus casei* LBC80R, and *Lactobacillus rhamnosus* CLR2 (Bio-K+) **Clin Infect Dis.**, v.15;60 (Suppl 2), p.144–147, 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25922400>> Acesso em: 21 abr 2017.

MAZOCHI et al. Iogurte probiótico produzido com leite de cabra suplementado com *Bifidobacterium* spp. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec.**[online]., vol.62, n.6, pp.1484-1490, 2010. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S010209352010000600027&script=sci_abstract&lng=pt> Acesso em: 24 jun 2017.

MCMMASTER, L. D., KOKOTT, S. A., & SLATTER, P. Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology and*

Biotechnology, 21, 723–728, (2005). Disponível em: <10.1007/s11274-004-4798-0> Acesso em: 18 de março de 2018.

MIN B, GU L, McCLUNG AM, CHEN MH. Phytochemicals and antioxidant capacities in rice brans of different color. **J. Food Sci.** v.76, p.C117–C126, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21535639>> Acesso em: 21 abril de 2017.

MOKARRAM R.R, MORTAZAVI S.A, NAJAFI MBH, SHAHIDI F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Res. Int.** v.42, p.1040–1045, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909001367>> Acesso em 04 jun 2017

MORAIS, M.B; JACOB, C.M.A; O Papel dos probióticos e prebióticos na prática pediátrica. **Jornal de Pediatria**, v.82, n.5, p.189-197, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S002175572006000700009&script=sci_abstract&tlng=pt> Acesso em: 19 julho de 2017.

NAG, A.; HAN, K.; SING, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 247-253, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694610002505>> Acesso em: 02 maio de 2017.

NAMI Y; ABDULLAH N.; HAGHSHENAS B.; RADIAH D.; ROSLI R.; KHOSROUSHAH A. Y. Probiotic potential and biotherapeutic effects of newly isolated vaginal *Lactobacillus acidophilus* 36YL strain on cancer cells. **Anaerobe**, Volume 28, Pages 29-36, 2014,. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S107599641400050X?via%3Dihub>> Acesso em 09 out 2017.

NANIA M., DEMOUGEOT C., GUEUX E., BERTHELOT A., DZIMIRA S., RAYSSIGUIER Y., ROCK E., MAZUR A. Inulin supplementation prevents high fructose diet-induced hypertension in rats. **Clinical Nutrition**, Volume 27, Issue 2, Pages 276-282, 2008. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0261561408000320>> Acesso em: 15 nov 2017.

NAYAK AK, PAL D. Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide-alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology. **Int J Biol Macromol.** 1;49(4):784-93, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21816168>> Acesso em 24 ago 2017.

NAYAK A. K., PAL D., PRADHAN J., M., HASNAIN S. Fenugreek seed mucilage-alginate mucoadhesive beads of metformin HCl: Design, optimization and evaluation. **International Journal of Biological Macromolecules**, Volume 54, Pages 144-154, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813012004813>> Acesso em: 10 de maio de 2017.

NORDSTIERNA, L. et. al. Comparison of release behaviour from microcapsules and microspheres, **Progress in Organic Coatings**, v. 69, n. 1, p. 49-51, 2010

NUGENT A.P. Health properties of resistant starch. **Nutrition Bulletin**. Volume 30, March 2005, Pages 27–54. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1467-3010.2005.00481.x/full>> Acesso em: 27 out 2017.

OKURO, P. K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability, **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 96-103, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913002172>>. Acesso em: 19 ago. 20147.

OLIVEIRA, J. E. Dutra de; MARCHINI, J. Sérgio. Ciências nutricionais: aprendendo a aprender. 2^a ed. São Paulo: Sarvier, 2008.

OLIVEIRA, A. C., MORETTI, T. S., BOSCHINI, C., BALIERO, J. C. C., FREITAS, L. A. P., FREITAS, O., & FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. **Drying Technology: An International Journal**, 25:10, 1687-1693, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373930701590939>> Acesso em 01 dezembro de 2017.

OLNOOD, C. G., SLEMAN B.S.M., PAUL A.I., MINGAN C. Delivery routes for probiotics: Effects on bird performance, intestinal morphology and gut microflora, **Animal Nutrition**, 2015. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2405654515300032>. Acesso em: 01 jul. 2017.

O'TOOLE e COONEY. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, Volume 2008, Article ID 175285, 9 pages, 2008. Disponível em: <<https://www.hindawi.com/journals/ipid/2008/175285/>> Acesso em 15 jul 2017.

PADILHA, M. **Queijo petit-suisse probiótico e simbiótico: características tecnológicas e emprego de técnicas dependentes e independentes de cultivo na avaliação da sobrevivência dos probióticos no produto e em ensaios de sobrevivência in vivo**. 2013. 122p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêutica, Universidade de São Paulo, 2013.

PARRADO, J.; MIRAMONTES, E.; JOVER, M.; GUTIERREZ, J. F.; TERÁN, L. C. DE; BAUTISTA, J. Preparation of a rice bran enzymatic extract with potential use as functional food, **Food Chemistry**, v.98, p.742–748, 2006. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814605005777>> Acesso em 15 de outubro de 2017.

PARK SK, PARK DI, CHOI JS, KANG MS, PARK JH, KIM HJ, CHO YK, SOHN CI, JEON WK, KIM BI. The effect of probiotics on *Helicobacter pylori* eradication. **Hepatogastroenterology**, v.54 (79):2032-6, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18251154>> Acesso em: 09 mai 2017.

PARK, J.; FLOCH, M.H. Prebiotics, probiotics, and dietary fiber in gastrointestinal disease, **Gastroenterol Clin North Am**, v. 36, n. 1, p. 47-63, 2007. Disponível em: <[http://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553\(07\)00013-1/abstract](http://www.gastro.theclinics.com/article/S0889-8553(07)00013-1/abstract)> Acesso em 22 de novembro de 2017.

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación com alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012. Disponível em: <<https://sites.google.com/site/1rvcta/v3-n1-2012/h8>> Acesso em: 27 de novembro de 2017.

PATEL, S.; GOYAL, A. The current trends and future perspectives of prebiotics research: a review. **3 Biotech** v.2, p.115–125, 2012. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s13205-012-0044-x>> Acesso em: 09 de janeiro 2018.

PEDROSO, D. L., THOMAZINI, M., HEINEMANN, R. J. B., FAVARO-TRINDADE, C. S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling, **International Dairy Journal**, 26 (2), 127-132, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001021>>. Acesso em: 21 de outubro de 2017.

PEIGHAMBARDUST, S. H. GOLSHAN TAFTI, A; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 5, p. 215-224, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224411000100>>. Acesso em 09 de janeiro de 2018.

PERESSINI, D., & SENSIDONI, A. Effect of soluble dietary fiber addition on rheological and breadmaking properties of wheat doughs. **Journal of Cereal Science**, v.49(2), p.190-201, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0733521008001641>> Acesso em: 19 out 2017.

PICOT A., LACROIX C. (2004): Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, pages 505–515. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694603002450>> Acesso em: 23 de maio de 2017.

PIMENTEL et al. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** [online], v. 43, n. 4, p. 503-514, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?pid=s151693322007000400003&script=sci_arttext&tlng=pt>. Acesso em: 24 abr. 2017

PINTO, S. S., FRITZEN-FREIRE, C. B., BENEDETTI, S., MURAKAMI, F. S., PETRUS, J. C. C., PRUDÊNCIO, E. S., AMBONI, R.D.M.C. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulated by spray drying, **Food Research International**, 67, 400-408, 2015. Disponível em <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914007522>>. Acesso em: 10 de maio de 2017.

POINOT P., ARVISENET G., GRUA-PRIOU J, FILLONNEAU C., LE-BAIL A., PROST C. Influence of inulin on bread: Kinetics and physico-chemical indicators of the formation of volatile compounds during baking. **Food Chemistry**, Volume 119, Issue 4, Pages 1474-1484, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609010735>> Acesso em: 12 março 2017.

POOL-ZOBEL e SAUER. Overview of experimental data on reduction of colorectal cancer risk by inulin-type fructans. **J Nutr.** V.137(11 Suppl), p.2580S-2584S, 2007. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17951507>> Acesso em: 18 ago 2017.

POP, BRANDAU, SCHWINN, VODNAR e SOCACIU. The influence of different polymers on viability of *Bifidobacterium lactis* 300b during encapsulation, freeze-drying and storage. **J Food Sci Technol.** 52(7):4146-55, 2015. Disponível em <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26139879>> Acesso em: 23 jun 2017.

RAFTER J., BENNETT M., CADERNI G., CLUNE Y., HUGHES R., KARLSSON P. C. et al, Dietary synbiotics reduce cancer risk factors in polypectomized and colon cancer patients. **Am J Clin Nutr**, v. 85(2):488-96, 2007. Disponível em? <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17284748>> Acesso em: 10 de setembro de 2017.

RAMIREZ-FARIAS C., SLEZAK K., FULLER Z., DUNCAN A., HOLTROP G., LOUIS P. Effect of inulin on the human gut microbiota: stimulation of *Bifidobacterium adolescentis* and *Faecalibacterium prausnitzii*. **Br J Nutr.** V.101(4): p.41-50, 2009. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18590586>> Acesso em: 14 ago 2017.

RAUTAVA S, KAINONEN E, SALMINEN S, ISOLAURI E. Maternal probiotic supplementation during pregnancy and breast-feeding reduces the risk of eczema in the infant. **J Allergy Clin Immunol.**, 130(6):1355-60 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23083673>> Acesso em 15 de janeiro de 2018.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients, **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2493-2502, 2007. Disponível em: <<http://jn.nutrition.org/content/137/11/2493S.full.pdf+html>.> Acesso em: 14 jan 2017.

ROBERFROID M., GIBSON G. R, HOYLES L., McCARTNEY A. L, RASTALL R, ROWLAND., D. et. al. Prebiotic effects: metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition An International Journal of Nutritional Science**, Volume 104, 2010 ISSN: 0007-1145. Disponível em: <<http://www.farm.ucl.ac.be/Full-texts-FARM/Roberfroid-2010-1.pdf>> Acesso em: 15 abr 2017.

RODRIGUES D, ROCHA-SANTO T, PEREIRA C, GOMES A., XAVIER MALCATA, FREITAS A. The potential effect of FOS and inulin upon probiotic bacterium performance in curdled milk matrices. **LWT – Food Sci. Technol**, 44, 100-108, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643810001878>> Acesso em: 24 jun 2017.

RODRÍGUEZ, M. B. S.; MEGÍAS, S. M.; BAENA, B. M. Alimentos Funcionales y Nutrición óptima, **Rev Esp Salud Públ.**, v. 77, n. 3, p. 317-31, 2003. Disponível em: http://scielo.isciii.es/scielo.php?pid=S1135-57272003000300003&script=sci_arttext.

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 International**, 66, 424-431, 2014. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914006656>> Acesso em: 21 dez 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas, **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, 2006. Disponível em: < http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002>. Acesso em: 30 jun. 2014.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field, **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1-16, 2013. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643812002319>>. Acesso em: 16 de junho de 2017.

SAARELA, LATHENMAKI, CRITTENDEN, SALMINEN e MATTILASANDHOLM. Gut bacteria and health foods-the european perspective. **International Journal of Food Microbiology**, Volume 78, Pages 99-117, 2002. Disponível em < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160502002350>>. Acesso em: 17 de março de 2017.

SAJILATA, M. G., SINGHAL, R. S., & KULKARNI, P. R. Resistant starch: a review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, 5(1), 1-17, 2006. Disponível em: < <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1541-4337.2006.tb00076.x/pdf>> Acesso em 09 dez 2017.

SAMOT J, LEBRETON J, BADET C. Adherence capacities of oral Lactobacilli for potential probiotic purposes. **Anaerobe**, V.17(2), p.69-72, 2011. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1075996411000527>>. Acesso em 19 de julho de 2017.

SANDERS, M.E. Probiotics: considerations for human health. **Nutr. Rev.**, New York, v.61, n.3, p.91-99, 2003. Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002> Acesso em 15 jan 2017.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável: microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biociência, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v. 3, n. 16, p. 26-30, 2000.

SANTOS, R.; VARAVALHO, M. A importância de probiótico para o controle e/ou reestruturação da microbiota intestinal. **Revista Científica do ITPAC**, São Paulo, v. 4, n. 1, p. 40-49, jan. 2011. Disponível em: < <https://assets.itpac.br/arquivos/Revista/41/5.pdf>>. Acesso em 12 de abril de 2017.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável. **Biotecnologia Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, ano 3, n. 16, p. 26- 30, 2001.

SAUER, J., RICHTER, K.K. and POOL-ZOBEL, B.L. “Products formed during fermentation of the prebiotic inulin with human gut flora enhance expression of biotransformation genes in human primary colon cells”, **British Journal of Nutrition**, Vol. 97, pp. 928-38, 2007. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/products-formed-during-fermentation-of-the-prebiotic-inulin-with-human-gut-flora-enhance-expression-of-biotransformation-genes-in-human-primary-colon-cells/ACB4488C66641E67DBD1F28E0532C893>> Acesso em: 03 de abril de 2017.

SCHREZENMEIR J., VRESE M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **Am J Clin Nutr**, Volume 73, Issue , Pages 361s–364s, 2001. Disponível em: <http://www.ajcn.org/cgi/reprint/73/2/361S?maxtoshow=&HITS=10&hits=10&RESULTFORMAT=&fulltext=probiotics+prebiotics&andorexactfulltext=and&searchid=1088567181461_1526&stored_search=&FIRSTINDEX=0&sortspec=relevance&volume=73&resourcetype=1&journalcode=ajcn> Acesso em: 18 de maio de 2017.

SHAH NP. Functional cultures and health benefits. **Int Dairy J.**, v. 17, p.1262–1277, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694607000696?via%3Dihub>> Acesso em: 30 agosto 2017.

SHARMA, A.; YADAV, B.S.; RITIKA. Resistant starch: physiological roles and food application. **Food reviews international**, v. 24, n. 2, p. 194 – 234, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/87559120801926237>.> Acesso em: 19 de junho de 2017.

SHI, LU-E., LI, ZHEN-HUA., LI, DAN-TING., XU, MIN., CHEN et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions, **Journal of Food Engineering**, 117 (1), 99-104, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877413000848>> Acesso em: 03 nov 2017.

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 Bioprocess Processing**, 9 1, 83–88, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308512000697>> Acesso em: 18 março de 2017.

SILVA, A. M. et al. Effect of *Bifidobacterium longum* ingestion on experimental salmonellosis in mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, n.1, p. 29-37, 2004. Disponível em: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15186439>> Acesso em: 15 març 2017.

SILVA, M.A.; SANCHES, C.; AMANTE, E.R. Prevention of Hydrolytic rancidity in rice bran. **Journal of Food Engineering**, v.75, v.4, p. 487-491, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877405002931>> Acesso em: 10 jun 2017.

SIRÓ, I.; KÁPOLINA, R.; KAPOLINA, B.; LUGASI, A. Functional food, product development marketing and consumer acceptance – a review. **Apettite**, p. 456-467, 2008. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0195666308004923>> Acesso em: 08 de maio de 2017.

SLAVIN J. Fiber and Prebiotics: Mechanisms and Health Benefits. **Nutrients**, v.5(4), pages 1417-1435, 2013. Disponível em: < <http://www.mdpi.com/2072-6643/5/4/1417/htm>> Acesso em: 12 março de 2017.

SOHAIL, A. et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v.145, n.1, p.162- 168, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510006975>>. Acesso em: 06 jan. 2017.

SOUSA, S., GOMES, A. M., PINTADO, M. M., SILVA, J. P., COSTA, P., AMARAL, M. H., DUARTE, A. C., RODRIGUES, D., ROCHA-SANTOS, T. A. P., FREITAS, A. C. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. **Food and Bioproducts Processing**, v.93, p. 90-97, 2015. Disponível em: < <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960308513001259>> Acesso em: 06 maio de 2017.

SREENIVAS & LELE. Prebiotic activity of gourd family vegetable fibres using *in vitro* fermentation”, **Food Bioscience**, v. 26-30, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429213000059>> Acesso em 14 Abr 2017.

STEFE, C.A.; ALVES, M.A.R.; RIBEIRO, R.L. Probióticos, Prebióticos e Simbióticos – Artigo de Revisão. *Saúde & Ambiente em Revista*, v. 3, n.1, p. 16-33, 2008

SUAVE, J.; DALL’AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente / Health and Environment Journal**, 7(2), p. 12-20, 2006. Disponível em: < https://www.researchgate.net/profile/A_Pezzin/publication/228663357_Microencapsulacao_Inovacao_em_diferentes_areas/links/5594102c08ae21086d1ebdb6/Microencapsulacao-Inovacao-em-diferentes-areas.pdf> Acesso em: 25 de maio de 2017.

SUN-WATERHOUSE D., TEOH A., MASSAROTTO C, WIBISONO R., WADHW S. Comparative analysis of fruit-based functional snack bars. **Food Chemistry**, Volume 119, Issue 4, Pages 1369-1379, 2010. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609010607>> Acesso em: 15 out 2017.

TÁRREGA, A.; COSTELL, E. Effect of composition on the rheological behaviour and sensory properties of semisolid dairy dessert. **Food Hydrocolloids**, Cardiff, v.20, n.6, p.914-922, 2006. Disponível em: < <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X0500202X>> Acesso em 17 set 2017.

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

em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001716>> Acesso em: 19 de Agosto de 2017.

TURGUT, T.; CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, 2009. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1471-0307.2009.00494.x/full>> Acesso em: 03 de maio de 2017.

VALERO-CASES, E., FRUTOS, M. J. (2015). Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, 64, 824-828. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815004764>> Acesso em: 15 de maio de 2017.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**. v. 157, n. 2, p. 319–321, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160512002644>> Acesso em: 10 de dezembro de 2017.

XU M., GAGNÉ-BOURQUE F., DUMONT M. J., JABAJI S.. Encapsulation of *Lactobacillus casei* ATCC 393 cells and evaluation of their survival after freeze-drying, storage and under gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, Volume 168, Pages 52-59, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877415003301>> Acesso em: 02 de agosto de 2017.

WALTER M., SILVA L., EMANUELLI T. (2005) Amido Resistente: Características Físico-Químicas, Propriedades Fisiológicas e Metodologias de Quantificação. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/cr/v35n4/a41v35n4.PDF>> Acesso em 23 jun 2017.

WANG, Y. Prebiotics: present and future in food science and technology. **Food Res. Int.**, v.2, pages 8–12, 2009. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996908001828>> Acesso em: 04 de julho de 2017.

WEAVER C. M. Inulin, oligofructose and bone health: experimental approaches and mechanisms. **British Journal of Nutrition**, v. 93, pages 99-103, 2005. Disponível em: <<https://www.cambridge.org/core/journals/british-journal-of-nutrition/article/inulinoligofructose-and-bone-health-experimental-approaches-and-mechanisms/6E729207DF9C9A12F46461E4DA9A692C>> Acesso em: 14 de abril de 2017.

WENDY, K.W.Y., JAMAL, M.H., DIEDERICK, M. and MANAP, Y.A. “Changes in infantis faecal characteristics and microbiota by inulin supplementation”, **Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition**, Vol. 43, pp. 59-66, 2008. Disponível em: <https://www.jstage.jst.go.jp/article/jcbtn/43/3/43_2008055/_article/-char/ja/> Acesso em: 01 de março de 2017.

YAO O.; LI, Y., O. Iodine stability in iodized salt dual fortified with microencapsulated ferrous fumarate made by an extrusion-based encapsulation process. **Journal of Food Engineering**, 99, 232–238, 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0260877410001160>> Acesso de 22 de março de 2017.

ZHANG Z., ZHANG R., CHEN L., TONG Q., McCLEMENTS D. J. Designing hydrogel particles for controlled or targeted release of lipophilic bioactive agents in the gastrointestinal tract. **Eur. Polym. J.**, v.72, p. 698–716, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0014305715000257?via%3Dihub>> Acesso em: 10 mai 2017.

ZHAO G., ZHANG R., DONG L., HUANG F., TANG X., WEI Z., ZHAN M.. Particle size of insoluble dietary fiber from rice bran affects its phenolic profile, bioaccessibility and functional properties. **LWT - Food Science and Technology**, Volume 87, Pages 450-456, 2018. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.09.016>. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817306916>> Acesso em: 15 dez 2017.

ZOU, Q., ZHAO, J., LIU, X., TIAN, F., ZHANG, H., ZHANG, H., & CHEN, H. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science and Technology**, 46, 1672–1678, 2011. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x/supinfo>> Acesso em 03 março 2017.

ZUBAIDAH, E., NURCHURCHOLI, M., WULAN, S. N., & KUSUMA, A. (2012). Comparative study on synbiotic effect of fermented rice bran by probiotic lactic acid bacteria *Lactobacillus casei* and newly isolated *Lactobacillus plantarum* B2 in Wistar Rats. **APCBEE Procedia**, 2, 170–177. Disponível em: <doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.03> Acesso em: 21 de março de 2017.