

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

Greice Carine Raddatz

**ESTUDO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS EM
MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus*
acidophilus LA-5 OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA**

Santa Maria, RS,

2018

Greice Carine Raddatz

**ESTUDO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS EM MICROPARTÍCULAS
SIMBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* LA-5 OBTIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA**

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
Co-orientador: Prof. Dr. Eduardo Jacob-Lopes

Santa Maria, RS,
2018

Raddatz, Greice Carine
Estudo da adição de diferentes prebióticos em
micropartículas simbióticas contendo *Lactobacillus*
acidophilus LA-5 obtidas por gelificação iônica interna /
Greice Carine Raddatz.- 2018.
92 p.; 30 cm

Orientador: Cristiano Ragagnin de Menezes
Coorientador: Eduardo Jacob-Lopes
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. Emulsificação 3. Probióticos 4.
Prebióticos I. Menezes, Cristiano Ragagnin de II. Jacob
Lopes, Eduardo III. Título.

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

© 2018

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

E-mail: greiceraddatz@hotmail.com

Greice Carine Raddatz

**ESTUDO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS EM MICROPARTÍCULAS
SIMBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* LA-5 OBTIDAS POR
GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA**

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 23 de fevereiro de 2018:

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

Pablo Teixeira da Silva, Dr. (UFSM)

Juliano Smanioto Barin, Dr. (UFSM)

Santa Maria, RS
2018

AGRADECIMENTOS

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

Aos professores Cristiano Ragagnin de Menezes e Eduardo Jacob-Lopes pela orientação, sensibilidade, bondade, confiança, apoio e competência profissional.

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

Agradeço a Deus, por ser meu guia nessa trajetória e me dar forças para seguir em frente.

A minha mãe, que mesmo não estando mais entre nós, foi e sempre será meu exemplo de persistência e garra. Obrigada por me ensinar o amor, você continua me inspirando a ser uma pessoa melhor todos os dias...

Minhas irmãs, Jéssica, Joice e Carla, vocês são parte de mim, da minha história, obrigada por compartilharem comigo das minhas alegrias e frustrações, me acompanharem e me darem todo apoio necessário para a realização deste sonho.

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

Aos amigos que foram essenciais para que eu conseguisse cumprir essa etapa da minha vida, me dando conselhos e me ajudando de todas as formas possíveis.

Em especial, agradeço à amiga Gabriela Poletto, por todos os momentos que compartilhamos dentro e fora do laboratório, pelos conselhos, companheirismo, por ter suavizado os momentos mais difíceis, além de estar presente nos mais alegres.

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

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

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

Enfim, agradeço a todos que me acompanharam de forma direta e indireta e me deram apoio nesta caminhada, contribuindo para que eu concluísse este trabalho.

RESUMO

ESTUDO DA ADIÇÃO DE DIFERENTES PREBIÓTICOS EM MICROPARTÍCULAS SIMBIÓTICAS CONTENDO *Lactobacillus acidophilus* LA-5 OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA INTERNA

AUTORA: Greice Carine Raddatz
ORIENTADOR: Cristiano Ragagnin de Menezes
CO-ORIENTADOR: Eduardo Jacob-Lopes

Os probióticos vêm recebendo crescente enfoque na área de alimentos uma vez que, podem afetar benéficamente uma ou mais funções alvo no corpo quando administrados em quantidades adequadas. Entretanto, a viabilidade destas culturas pode ser prejudicada quando expostas a condições adversas como, por exemplo, o armazenamento em diferentes temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano. Em função disso, tornam-se necessários o estudo e a implementação de novas técnicas que garantam a produção destes em larga escala, e com efeitos benéficos comprovados, podendo assim atender às necessidades do consumidor. Para que o produto possa garantir o efeito benéfico desejado, utiliza-se comumente a técnica de microencapsulação. Dentre as diversas técnicas de microencapsulação, está a gelificação iônica interna. Ainda, para que a viabilidade probiótica possa ser mais prolongada, tem se estudado o efeito dos prebióticos na microencapsulação. Desta forma, o objetivo desse estudo foi desenvolver micropartículas de pectina (1%) e compará-las com micropartículas de pectina adicionadas de diferentes fontes prebióticas a 10%, sendo elas hi-maize, inulina e farelo de arroz, ambas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5, utilizando a técnica de gelificação iônica interna. As micropartículas foram produzidas na forma úmida e liofilizada. Foi analisada a sobrevivência dos probióticos sob condições gastrointestinais simuladas, sua viabilidade em armazenamento sob diferentes temperaturas (-18, 7 e 25 °C) por 120 dias, além da sua caracterização físico-química, morfologia e distribuição de tamanho. Para as micropartículas úmidas, houve uma variação de tamanho de 24,4 – 462 µm, enquanto isso, o tamanho das micropartículas liofilizadas variou de 166 µm a 345 µm. As matrizes de encapsulação farelo de arroz e inulina apresentaram a maior eficiência de encapsulação para as micropartículas úmidas, de 91.24% e 90.59%, respectivamente, já para as liofilizadas, a maior eficiência de encapsulação foi resultante da matriz de encapsulação pectina + inulina, de 68,11%. Tanto as micropartículas úmidas como as liofilizadas protegeram os microrganismos frente aos testes gastrointestinais simulados. Quanto ao armazenamento em diferentes condições de temperatura, para as micropartículas úmidas na temperatura de 25 °C, os probióticos permaneceram viáveis em todos os tratamentos no decorrer dos 120 dias. Já na temperatura de -18 °C, os tratamentos PHM e PRB foram capazes de manter o microrganismo viável por um maior período de tempo, de 90 dias. A 7 °C o tratamento PRB se destacou, permanecendo viável ao final dos 120 dias. Já para as partículas liofilizadas, nas temperaturas de 25 °C e -18°C, os tratamentos que continham prebióticos mantiveram os microrganismos probióticos viáveis por um maior período de tempo. Em 7 °C, o tratamento PRBL foi capaz de manter o *L. acidophilus* viável por 120 dias. Sendo assim, as micropartículas desenvolvidas nesse estudo além de permitirem uma viabilidade estendida do probiótico *L. acidophilus*, representam uma alternativa viável para a incorporação de simbióticos em matrizes alimentares.

Palavras-chave: microencapsulação. emulsificação. probióticos. prebióticos.

ABSTRACT

STUDY OF THE ADDITION OF DIFFERENT PREBIOTICS IN SYMBIOTIC MICROPARTICLES CONTAINING *Lactobacillus acidophilus* LA-5 OBTAINED BY INTERNAL IONIC GELATION

AUTHOR: Greice Carine Raddatz
ADVISOR: Cristiano Ragagnin de Menezes
CO-ADVISOR: Eduardo Jacob-Lopes

Probiotics have been given increasing focus in the area of foods, since they can beneficially affect one or more target functions in the body when administered in adequate amounts. However, the viability of these cultures may be impaired when exposed to adverse conditions such as storage at different temperatures and passage through the human gastrointestinal tract. As a result, it is necessary to study and implement new techniques that guarantee the production of these in a large scale and with proven beneficial effects, making it possible to meet consumer needs. In order for the product to guarantee the desired beneficial effect, the microencapsulation technique is commonly used. Among the various techniques of microencapsulation is the internal ionic gelation. Also for probiotic viability to be longer, the effect of prebiotics on microencapsulation has been studied. Thus, the objective of this study was to develop pectin microparticles (1%) and to compare them with pectin microparticles added from different prebiotic sources at 10%, being hi-maize, inulin and rice bran, both containing *Lactobacillus acidophilus* LA -5 using the internal ionic gelation technique. The microparticles were produced in wet and freeze-dried form. The survival of probiotics under simulated gastrointestinal conditions, their viability in storage under different temperatures (-18, 7 and 25 ° C) for 120 days, in addition to their physico-chemical characterization, morphology and size distribution were analyzed. For the moist microparticles, there was a size variation of 24.4-462 µm, meanwhile, the size of the lyophilized microparticles ranged from 166 µm to 345 µm. The encapsulation matrices of rice bran and inulin had the highest encapsulation efficiency for the moist microparticles of 91.24% and 90.59%, respectively. For the lyophilized microparticles, the highest encapsulation efficiency was due to the pectin + inulin encapsulation matrix, of 68.11%. Both the moist and lyophilized microparticles of all treatments protected the microorganisms against the simulated gastrointestinal tests. In relation to storage at different temperature conditions, for moist microparticles at 25 ° C, probiotics remained viable in all treatments over the course of 120 days. At the temperature of -18 ° C, the PHM and PRB treatments were able to keep the microorganism viable for a longer time period, of 90 days. At 7 ° C the PRB treatment stood out, remaining viable at the end of the 120 days. For lyophilized particles, at temperatures of 25 ° C and -18 ° C, treatments containing prebiotics maintained viable probiotic microorganisms for a longer period of time. At 7 ° C, PRBL treatment was able to maintain *L. acidophilus* viable for 120 days. Thus, the microparticles developed in this study, besides allowing an extended viability of the probiotic *L. acidophilus*, represent a viable alternative for the incorporation of symbiotics in food matrices.

Key words: microencapsulation. emulsification. probiotics. prebiotics.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
1.1 OBJETIVOS	11
1.1.1 Objetivo geral.....	11
1.1.2 Objetivos específicos.....	11
2. REVISÃO DA LITERATURA.....	12
2.1 PROBIÓTICOS	12
2.2 GÊNERO <i>Lactobacillus</i>	14
2.3 PREBIÓTICOS.....	15
2.3.1 Farelo de arroz.....	16
2.3.2 Hi-maize	17
2.3.3 Inulina.....	17
2.4 SIMBIÓTICOS	18
2.5 MICROENCAPSULAÇÃO	19
2.6 MÉTODOS DE MICROENCAPSULAÇÃO	21
2.6.1 Gelificação iônica interna / emulsificação	21
2.7 MATERIAIS ENCAPSULANTES	23
2.7.1 Pectina	24
3. ARTIGO 1.....	26
ABSTRACT	26
1. Introduction	27
2. Material and Methods	28
3. Results and discussion	31
4. Conclusions	37
5. References	38
4. ARTIGO 2.....	48
ABSTRACT.....	48
1. Introduction	49
2. Material and Methods.....	50
3. Results and Discussion	53
4. Conclusion.....	59
5. References	60
5. DISCUSSÃO GERAL	70
6. CONCLUSÕES.....	76
7. REFERÊNCIAS	77

1. INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, tem aumentado largamente a demanda dos consumidores por produtos que além de fornecer nutrição básica, também promovam efeitos celulares ou fisiológicos desejáveis no corpo, sendo estes caracterizados como alimentos funcionais. A crescente busca por estes produtos se dá por fatores como o aumento na expectativa de vida da população, o aumento nos custos dos cuidados com a saúde, os custos sociais das doenças não-transmissíveis e a busca por uma qualidade de vida melhor (BIMBO et al., 2017; MARINO et al., 2017).

Os produtos probióticos são a área que mais cresce no desenvolvimento de novos produtos alimentares, por serem considerados componentes importantes da promoção da saúde de alimentos funcionais, (HEMAISWARYA et al., 2013; RATHER et al., 2017). Os probióticos são capazes de aderir às linhas celulares intestinais humanas e colonizar o intestino, desempenhando um papel importante, por exemplo, na manutenção da microflora intestinal normal, produzem substâncias antimicrobianas como bacteriocinas, quebram açúcares e carboidratos para promover uma boa digestão, mantêm o pH intestinal adequado, competem com sucesso com microrganismos patogênicos, reduzem o nível de colesterol sérico e da pressão arterial e promovem a prevenção de alguns tipos de câncer (ANADÓN et al., 2016; KHANI et al., 2012). Além disso, os probióticos também influenciam na imunidade inata e adaptativa pelo contato direto com células epiteliais e imunes, ou pela sua capacidade de modificar a composição e atividade da microbiota intestinal (CASTILLO, PERDIGÓN & LEBLANC, 2011).

Os probióticos mais utilizados pertencem aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Os lactobacilos são microrganismos gram-positivos, microaeróbicos ou anaeróbicos que variam amplamente no crescimento e nas características metabólicas (ROKKA & RANTAMAKI, 2010).

Para que os probióticos possam exercer seus efeitos benéficos sobre o hospedeiro, é imprescindível, no entanto, que permaneçam viáveis, tanto quanto o seu local de ação, uma vez que, depois de ingeridos, devem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal humano e colonizar o cólon (BURGAIN et al., 2011; LI et al., 2011).

No entanto, a exposição desses microrganismos ao suco gástrico e / ou exposição ao oxigênio, além da exposição ao ambiente de processamento e armazenamento, podem levar à perda de sua viabilidade, gerando assim um desafio para o desenvolvimento de produtos

probióticos (SCHELL & BEERMANN, 2014; SHORI, 2017). Em função disso, diferentes técnicas têm sido utilizadas para aumentar a viabilidade dos probióticos frente a condições adversas, onde uma das mais promissoras destas técnicas é a microencapsulação, que é um método eficaz para a introdução dos microrganismos probióticos em sistemas alimentares (ARSLAN et al., 2015; ARSLAN-TONTUL & ERBAS, 2017).

A microencapsulação se baseia no revestimento ou empacotamento de um material sólido, líquido ou de gás dentro de outro material e pode ser utilizada, por exemplo, na liberação controlada e prolongamento da vida útil do material ativo, controle de reações oxidativas e mascaramento de sabores, cores e substâncias odoríferas (BURGAIN et al., 2011).

Entre as várias técnicas disponíveis para microencapsulação, a emulsificação / gelificação iônica interna tem se mostrado um método bastante eficaz para aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos, além de ser um método capaz de produzir micropartículas de pequeno diâmetro em grande quantidade (AHMED et al., 2013). A gelificação iônica interna consiste na liberação de íons cálcio a partir de um sal de cálcio solúvel em ácido em solução encapsulante emulsionada. A formação de hidrogel é obtida por meio da acidificação com um ácido solúvel em óleo, que divide-se à fase aquosa dispersa do material encapsulante e libera o cálcio solúvel que permite a gelificação (BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al., 2016).

Outra abordagem para o aumento na viabilidade dos microrganismos probióticos é o uso de prebióticos, que podem também auxiliar na sobrevivência dos probióticos durante o processamento e armazenamento (SHIN et al., 2000). Os prebióticos são definidos como "ingredientes fermentados seletivamente que permitem alterações específicas, tanto na composição como na atividade da microbiota gastrointestinal que confere benefícios ao bem-estar e à saúde do hospedeiro" (GIBSON et al., 2004).

Levando em consideração os estudos em vivo já realizados, os prebióticos estabelecidos são inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS) e galacto-oligossacarídeos (GOS), enquanto os prebióticos emergentes incluem isomalto-oligossacarídeos (IMO), Xilolossacarídeos (XOS), amido resistente e oligossacarídeos de soja (SOS) (CHARALAMPOPOULOS & RASTALL, 2012). Além disso, o farelo de arroz é outro composto que vem ganhando atenção como substância prebiótica, produto que, além de possuir quantidades significativas de nutrientes essenciais como carboidratos, proteínas e lipídios (especialmente ácidos graxos insaturados), ainda possui vitaminas, sais minerais e alta concentração de fibras insolúveis (MALEKIAN et al., 2000).

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 Objetivo geral

O objetivo desse estudo foi produzir micropartículas de pectina adicionadas de diferentes fontes prebióticas, sendo elas: hi-maize, inulina e farelo de arroz, ambas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5, utilizando a técnica de gelificação iônica interna, na forma úmida e liofilizada.

1.1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 com pectina a 1% comparando o efeito da adição de diferentes prebióticos a 10%, sendo eles: hi-maize, inulina e farelo de arroz;
- Caracterizar a físico-química das micropartículas como: umidade, atividade de água, lipídios, cinzas, proteínas e carboidratos;
- Avaliar a morfologia e a distribuição de tamanho das micropartículas úmidas e liofilizadas;
- Avaliar a eficiência de encapsulação das micropartículas úmidas e liofilizadas;
- Avaliar a estabilidade das micropartículas úmidas e liofilizadas frente a condições que simulem o ambiente gastrointestinal;
- Avaliar a vida útil das micropartículas úmidas e liofilizadas em diferentes condições de armazenamento nas temperaturas de -18, 7 e 25 °C, durante o período de 120 dias.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

O conceito de probióticos teve sua origem no começo do século XX, quando os efeitos benéficos resultantes de bactérias lácticas presentes em leites fermentados foram explicados pelo bacteriologista russo Élie Metchnikoff (Instituto Pasteur, França) (SHAH, 2007). Ele sugeriu que a saúde, o bem-estar e a longevidade das populações balcânicas em questão, estavam associados ao consumo de grandes quantidades de leite fermentado, que continham microrganismos benéficos (ANUKAM & REID, 2007). Atualmente, os probióticos são definidos como microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas (WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANIZATION, 2011).

Muitos efeitos na saúde humana atribuídos à ingestão de probióticos estão relacionados, entre outros, ao trato gastrointestinal, onde estes microrganismos favorecem a quebra de açúcares e carboidratos resultando em uma boa digestão. Além disso, sua influência benéfica sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, de competição e efeitos imunológicos, resultando em uma proteção contra patógenos gastrointestinais. Assim, a utilização de microrganismos probióticos estimula a multiplicação de bactérias benéficas, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro e impulsionando o sistema imunológico a desempenhar um papel importante na manutenção da microflora intestinal normal, metabolismo da lactose, diarreia infantil e a manter o pH intestinal adequado (ANADÓN et al., 2016; COOK et al., 2012; DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

Além dos benefícios já citados, os probióticos vêm recebendo grande atenção devido aos seus mecanismos capazes de estabelecer atividade anticarcinogênica. Isso se deve à sua capacidade de modificar a composição da microbiota intestinal e possibilitar mudanças na sua atividade metabólica; de promover a ligação e degradação de compostos cancerígenos presentes no lúmen intestinal; de produzir compostos com atividade anticancerígena (ácidos graxos de cadeia curta e ácido linoleico conjugado); pela inibição da proliferação celular e apoptose de indução em células cancerígenas, dentre outros (DOS REIS et al., 2016).

De modo geral, os probióticos se mantêm vivos no cólon e se multiplicam, porém, não são capazes de permanecer como colonizadores perenes da mucosa intestinal, deixando de ser

detectados alguns dias depois de seu consumo ser interrompido (BOUHNİK et al., 1992). Isto se deve, em grande parte, à descamação e renovação celular do epitélio intestinal, carreando culturas aderidas. Deste modo, é aconselhável o consumo contínuo de produtos que contenham tais culturas (BEZKOROVAINY, 2001).

Para que os benefícios à saúde atribuídos à ingestão de probióticos sejam alcançados, é necessário que estes microrganismos estejam viáveis quando consumidos, devendo também permanecer vivos após o contato com o suco gástrico e bile, para se aderir à mucosa intestinal e colonizar o intestino (ARSLAN et al., 2015; CHAMPAGNE et al., 2011). Para isso, há uma recomendação diária do consumo de 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). A Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA estipula que a quantidade mínima de probióticos viáveis ingerida diáriamente para efeitos terapêuticos é de 10^8 a 10^9 UFC, o que equivale ao consumo de 100 g de produto contendo entre 10^6 a 10^7 UFC de microrganismos (BRASIL, 2008).

Os principais probióticos atualmente estudados são pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, como, por exemplo: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei* e ao gênero *Bifidobacterium*, como; *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium adolescentis*. Também são considerados probióticos *Saccharomyces boulardii*, *Propionibacterium freudenreichii*, *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus* (MORAIS & JACOB, 2006).

Para que uma bactéria seja caracterizada como probiótica, tem-se como critérios: o gênero ao qual pertence; ser de origem humana; apresentar resistência à acidez gástrica e aos sais biliares (o baixo pH gástrico é um mecanismo de defesa contra a ingestão de microrganismos, incluindo probióticos); ser capaz de colonizar o trato gastrintestinal humano (promovendo a exclusão competitiva de patógenos da superfície intestinal); produzir compostos antimicrobianos; devem ser seguros em alimentos e durante o uso clínico, mesmo em indivíduos imunocomprometidos; possuir capacidade de ser produzido em grande escala e de forma viável; ser metabolicamente ativo no intestino e não ser patogênico (DUNNE et al. 2001; OLIVEIRA et al., 2002).

A maioria dos produtos que contêm probióticos são produtos lácteos, torna-se necessário, portanto, desenvolver outras alternativas para implementar estes compostos

devido à intolerância à lactose que atinge grandes populações (RANADHEERA, BAINES & ADAMS, 2010).

2.2 GÊNERO *Lactobacillus*

Dentre os diversos microrganismos que integram o grupo das bactérias probióticas, destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, e, em particular, a espécie *Lactobacillus acidophilus* (NOGUEIRA & GONÇALVES, 2011).

Os lactobacilos são bactérias gram-positivas, geralmente anaeróbicas facultativas, não formadoras de esporos, não flageladas, predominantes no intestino delgado (PARK & FLOCH, 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 lactobacilos está relacionada à capacidade de produzir ácido lático, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Dentro do gênero estão presentes espécies homofermentativas obrigatórias, que produzem ácido lático a partir da glicose, heterofermentativas obrigatórias ou facultativas, sendo que as facultativas produzem compostos como ácido lático, acético, fórmico e succínico (BOTELHO, 2005).

O gênero *Lactobacillus acidophilus* possui dimensões na faixa de 0,5-1 a 2-10 μm , tem forma de bastonete com extremidades arredondadas, ocorrendo em pares ou cadeias curtas. O pH ótimo de crescimento deste microrganismo situa-se na faixa de 5,5 e 6,3 e possuem uma variação de temperatura ótima de crescimento entre 30-40°C (ANTUNES et al., 2007). Este microrganismo é microaerófilo e capaz de crescimento aeróbio em culturas estáticas sem agitação. São preferíveis condições anaeróbicas e seu crescimento é impulsionado em caldo ou agar. A bactéria *acidophilus* (que significa ácido) é isolada do trato intestinal de humanos e animais, sendo também relatada nas fezes de lactantes alimentados com leite e pessoas idosas que consomem dietas altas em leite, lactose ou dextrina (SELLE, KLAENHAMMER & RUSSELL, 2014).

Lactobacillus acidophilus, é a espécie de *Lactobacillus* presente em maior quantidade no trato intestinal de humanos saudáveis, e está associado ao equilíbrio microbiano intestinal (ARIHARA et al., 1998). Algumas linhagens de *L. acidophilus* são caracterizadas por possuírem a capacidade de melhorar o valor nutricional dos produtos aos quais forem adicionados. Isso se deve ao fato de serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (GOMES & MALCATA, 1999).

2.3 PREBIÓTICOS

Os prebióticos foram definidos como "um componente alimentar não viável que confere benefícios para a saúde do hospedeiro associado à modulação da microbiota" (FAO, 2007).

Para que uma substância possa ser caracterizada como prebiótico, ela deve estar de acordo com os seguintes requisitos:

- Formar parte de um conjunto heterogêneo de moléculas complexas;
- Ter origem vegetal;
- Ser osmoticamente ativo;
- Não ser digerida por enzimas digestivas, tampouco absorvida na fração superior do trato gastrointestinal;
- Ser seletivamente fermentado por bactérias potencialmente benéficas ao cólon, propiciando uma microbiota mais saudável (HAULY & MOSCATTO, 2002; RODRÍGUEZ, MEGÍAS & BAENA, 2003).

São classificados como prebióticos os carboidratos lactitol, lactulose, fruto-oligossacarídeos (FOS), inulina, galacto-oligossacarídeos (GOS), oligossacarídeos da soja, xilooligossacarídeos 23 (XOS), amido resistente, isomaltooligossacarídeos, lactossacarídeo, Palatinose®, dentre outros (RODRIGUES et al., 2012). Dentre os prebióticos citados, os mais amplamente estudados e comercialmente utilizados são a inulina, os fruto-oligossacarídeos (FOS) e os galacto-oligossacarídeos (GOS) (DAVIS et al., 2010).

Além dos prebióticos mais conhecidos como, por exemplo, os FOS e GOS, novos compostos foram estudados para a sua inclusão na lista dos prebióticos, como amidos resistentes, pectina, arabinóxilano, grãos integrais e compostos não hidratados, como polifenóis (VALCHEVA & DIELEMAN, 2016).

Os seguintes efeitos benéficos são atribuídos à ingestão de prebióticos:

- Estimulação seletiva de bactérias benéficas presentes no cólon;
- Potencial para reprimir patógenos e limitar virulência por imunestimulação;
- Modulação da absorção de cálcio e do metabolismo lipídico;
- Redução do risco de câncer de cólon (SAAD et al., 2013).

Após a fermentação dos prebióticos, metabólitos podem ser liberados pelas bactérias no trato intestinal, principalmente ácidos graxos de cadeia curta (acético, butírico e

propiónico). Esses ácidos possuem a capacidade de atuar diretamente ou indiretamente sobre as células intestinais tendo ação no controle de processos inflamatórios, de carcinogênese e eliminação de compostos nitrogenados, além de poder atuar no alívio da constipação, na redução de infecções intestinais e na redução do nível do colesterol sérico (SAAD, 2006). Além disso, os prebióticos aumentam o peso fecal, reduzem o pH do cólon luminal, diminuem os produtos nitrogenados e enzimas redutoras, além da modulação do sistema imunológico (SAAD et al., 2013).

2.3.1 Farelo de arroz

A produção de arroz tem maior destaque nos países asiáticos, seguidos do Brasil, além disso, o arroz é o segundo cereal de maior produção e consumo no mundo (FAO, 2005). O farelo de arroz é um dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz, obtido a partir de camada externa de cariátide de arroz, que representa de 8% a 11% do peso total do grão, e que é obtido a partir do seu polimento (PARRADO et al., 2006). O farelo é de baixíssimo custo e possui elevadas propriedades nutricionais, no entanto, atualmente, destina-se para alimentação animal (PARRADO et al., 2006).

No entanto, no Brasil, o aproveitamento dos subprodutos resultantes do beneficiamento do arroz ainda é pouco explorado, sendo assim, a casca e o farelo ainda são vistos como sinônimos de poluição ambiental (CARVALHO & BASSINELLO, 2006). Em virtude disso, estudos acerca do aproveitamento destes compostos são necessários.

O consumo de farelo de arroz tem mostrado diversos benefícios à saúde relacionados à prevenção de disfunções como, câncer, hiperlipidemia, hipercalciúria, cálculos renais em crianças e para doenças cardíacas. Estes efeitos não ocorrem quando se ingere o arroz branco/polido (JARIWALLA, 2001). Além disso, o farelo de arroz possui componentes bioativos como o orixanol, tocoferol e o ácido ferúlico, compostos que atuam diminuindo o colesterol e facilitando a defecação (HARTI, NURHIDAYATI & HANDAYANI, 2013).

Os polissacarídeos não amiláceos presentes no farelo de arroz exibem atividades altamente antibacterianas e antioxidantes e podem ser desenvolvidos como prebióticos (KIM et al., 2014, LIU et al., 2017). Os prebióticos à base de farelo de arroz podem prevenir a doença inflamatória intestinal e promover o impacto benéfico na mucosa intestinal através da estimulação de bactérias probióticas (HAM et al., 2015; KURDI & HANSAWASDI, 2015; MOONGNARM et al., 2012). Além disso, as propriedades hipoalergênicas e

anticancerígenas das proteínas do farelo de arroz tornam esse composto uma fonte potencial de nutrição para desenvolver alimentos funcionais para pré-escolares e populações com alergias a proteínas (FABIAN & JU, 2011; FRIEDMAN, 1996).

2.3.2 Hi-maize

O Hi-maize ou amido resistente é “a quantidade total de amido, e seus produtos de degradação, resistentes à digestão no intestino delgado de pessoas saudáveis”. O hi-maize resiste à digestão e é fermentado no intestino grosso, sendo por este motivo caracterizado como prebiótico. Sua digestão resulta na produção de ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, ácido acético, propiônico e butírico, compostos capazes de reduzir o aparecimento de células cancerígenas, reduzir a constipação e inibir a síntese de colesterol (HI-MAIZE, 2009; PEREIRA, 2007; SALGADO et al., 2005; SHARMA, YADAV & RITIKA, 2008).

Por possuir tamanho de partículas pequeno, o uso do amido resistente pela indústria de alimentos é de grande interesse. Sua adição não altera as características sensoriais do produto, além disso, a adição deste composto promove o aumento do valor nutricional e dos benefícios fisiológicos do alimento. O amido resistente confere os efeitos funcionais de uma fibra dietética e possui baixa capacidade de retenção de água (SHARMA, YADAV & RITIKA, 2008). A dose diária recomendada para 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).

2.3.3 Inulina

A inulina é um carboidrato de reserva encontrado nas plantas da família Asteraceae, sendo a espécie *Cichorium intybus* (chicória) a mais utilizada para a sua extração industrial (ROBERFROID, 2007; RONKART et al., 2009). Além do seu potencial como prebiótico, a inulina também é muito utilizada pela indústria de alimentos por sua capacidade edulcorante, além de ser um substituto para gorduras e fibras alimentares. Sua estrutura química consiste em subunidades de frutose, mistura de oligômeros e polímeros, ligados entre si por ligações β -(2-1) frutofuranosídicas e a uma glicose terminal (OLIVEIRA et al., 2009; SAAD, 2006).

A inulina é resistente à digestão na porção superior do trato intestinal, alcançando o intestino grosso praticamente intacta, onde é fermentada por bactérias, atuando como prebiótico (KNUDSEN & HESSOV, 1995; ROBERFROID, 1998). Ela estimula seletivamente o crescimento de bactérias ácido-lácticas e mantém em níveis baixos os Bacteroides, Clostridia ou coliformes contribuindo na prevenção de câncer de cólon (GIBSON & ROBERFROID, 1995).

Além disso, vários outros efeitos positivos atribuídos à ingestão da inulina já foram relatados, como por exemplo, favorecimento da absorção de cálcio no organismo, melhorando o conteúdo mineral e a densidade mineral óssea; redução nos níveis de colesterol total e séricos e atuação sobre fatores de risco para doenças coronárias como hipertensão, obesidade e diabetes (ANDERSON, 1995; ASCHERIO et al., 1992; MANSON et al., 1995).

De acordo com a legislação brasileira “A inulina contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, sendo recomendada a ingestão diária no mínimo 3 g no produto pronto para consumo (para alimentos sólidos), ou 1,5 g para alimentos líquidos (BRASIL, 2008).

2.4 SIMBIÓTICOS

Ao se levar em consideração os probióticos, sua dosagem e viabilidade são parâmetros relevantes para sua eficácia e os prebióticos têm a capacidade de melhorar a viabilidade e vitalidade do probiótico, sua sobrevivência na passagem pelo trato gastrointestinal e sua aderência e crescimento no intestino (BURGAIN et al., 2011). Caracterizam-se como simbióticos os produtos que contenham simultaneamente microrganismos probióticos e ingredientes prebióticos (SCHREZENMEIR & VRESE, 2001).

No entanto, os simbióticos não se limitam apenas a uma mistura de probióticos e prebióticos, mas se fundamentam em uma sinergia entre os dois componentes (OUWEHAND et al., 2007). Os compostos prebióticos são consumidos por probióticos no cólon como uma fonte de carbono ou energia, resultando no aumento da contagem de probióticos e na redução de patógenos no intestino (VERNAZZA, RABIU & GIBSON, 2006). Além disso, a presença de prebióticos melhora a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento do produto no qual é introduzido e durante a passagem pelo trato gastrointestinal, estimulando assim o crescimento e a atividade das bactérias endógenas já presentes no cólon, bem como das exógenas que são provenientes do alimento ingerido (PANDEY et al., 2008).

2.5 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação teve seu início na década de 30, onde foi empregada primeiramente na área farmacêutica com a técnica denominada pan coating (SANTOS, FERREIRA & GROSSO, 2001). Os primeiros estudos utilizando a microencapsulação na área de alimentos foram em meados dos anos 60, com a microencapsulação de óleos essenciais, objetivando a liberação controlada do aroma, prevenção da oxidação e perda de compostos voláteis (RÉ, 2000).

Atualmente, vários compostos vêm sendo microencapsulados, incluindo acidulantes, agentes aromatizantes, corantes, lipídios, vitaminas, minerais, enzimas e microrganismos (FANG & BHANDARI, 2010). Dentre os motivos para a utilização da microencapsulação estão: a capacidade de modificar e melhorar a aparência de um composto; evitar a reação do agente encapsulado com o ambiente externo; promover a liberação controlada do material ativo; diminuir a velocidade de difusão do agente ativo do interior da célula para o meio; mascarar odores e sabores desagradáveis, além de facilitar uma diluição homogênea do material encapsulado em uma formulação alimentícia (SHAHIDI & HAN, 1993).

Para sua ingestão, as cepas probióticas selecionadas devem ser adequadas para a produção industrial em grande escala com a capacidade de se manterem viáveis durante a produção e armazenamento como culturas congeladas ou secas, se apresentando em número suficiente no momento do consumo (TRIPATHI & GIRI, 2014). Para aumentar a resistência desses microrganismos frente às condições adversas, foram propostas diferentes abordagens, incluindo a seleção apropriada de cepas resistentes ácidas e bileas, uso de recipientes impermeáveis ao oxigênio, fermentação em dois passos, adaptação ao estresse, incorporação de micronutrientes e microencapsulação (SARKAR, 2010).

A microencapsulação é uma das formas mais eficazes de aumentar a resistência dos probióticos e tem sido amplamente utilizada na indústria de alimentos, protegendo-os das condições indesejáveis e funcionando como um veículo para entregá-los ao intestino com um número suficiente e viabilidade para exercer seus benefícios (BURGAIN et al., 2011; CHOTIKO & SATHIVEL, 2016).

A microencapsulação consiste na embalagem de elementos ativos em cápsulas minúsculas como partículas que descarregam seu conteúdo em certas proporções durante longos períodos de tempo (CORBO et al., 2013). O material a ser encapsulado é definido como núcleo ou material ativo, enquanto o material que envolve o núcleo é chamado de material de parede, carreador ou agente encapsulante (MADENE et al., 2006). Este processo

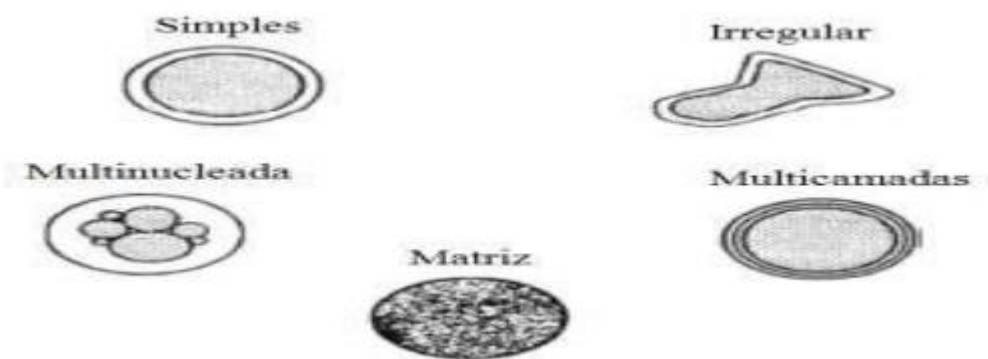
assegura diversos benefícios para as células probióticas, incluindo: proteção contra bacteriófagos e fatores prejudiciais como a liofilização, congelamento e armazenamento e convertê-los em uma forma em pó mais fácil de usar, pois aumenta sua distribuição homogênea em todo o produto (MORTAZAVIAN et al., 2007).

As micropartículas devem ser projetadas para liberar o material de núcleo no local de ação e no momento desejado. Diferentes meios de liberação podem ser utilizados para o rompimento das microcápsulas liberando o material encapsulado, tais como, forma mecânica, pH, enzimas, temperatura, força osmótica, entre outros (GOUIN, 2004; SILVA et al., 2014).

As cápsulas podem ser classificadas de duas formas, sendo elas:

- Sistema do tipo reservatório, onde o núcleo fica concentrado somente na região central, e é envolto pelo material de parede;
- Sistema matricial, definidas como microesferas ou micropartículas, onde o núcleo se encontra totalmente disperso na matriz de encapsulação, na qual uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície, conforme figura 1 (WHORTON, & REINECCIUS, 1995; RÉ, 1998).

Figura 1 - Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas.



Fonte: Adaptado de (GHARSALLAOUI, ROUDAUT, CHAMBIN, VOILLEY, & SAUREL, 2007).

No processo de encapsulação, as partículas geradas são classificadas de acordo com o seu tamanho. As macrocápsulas apresentam diâmetro acima de 5.000 μm , já as microcápsulas

entre 0.2 a 5.000 μm e as nanocápsulas possuem diâmetros menores que 0.2 μm (BORGOGNA et al., 2010; GIBBS et al., 1999).

2.6 MÉTODOS DE MICROENCAPSULAÇÃO

Os métodos de microencapsulação podem ser divididos por:

- Métodos físicos: incluem spray drying, spray cooling, pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização.
- Métodos químicos: inclusão molecular e polimerização interfacial.
- Métodos físico-químicos: coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (SANTOS, FERREIRA & GROSSO, 2000).

A escolha do melhor método para microencapsular um composto irá depender das propriedades do material a ser encapsulado, principalmente quanto a sua solubilidade e do tipo de partícula desejada, visando a sua forma de proteção e liberação, além da sua finalidade (modificações na liberação) no produto (GONSALVES et al., 2009).

A microencapsulação de células probióticas é desenvolvida principalmente por meio de três principais categorias: emulsão, extrusão e spray drying (que inclui spouted bed drying) (COOK et al., 2012).

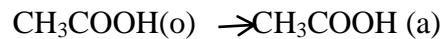
2.6.1 Gelificação iônica interna / emulsificação

A microencapsulação pela técnica de gelificação iônica interna origina micropartículas através da formação de uma emulsão do tipo água em óleo (A/O). A solução para a produção das microcápsulas contém o material encapsulante, óleo vegetal, uma fonte de cálcio como, por exemplo, o carbonato de cálcio, um surfactante e um ácido orgânico que reage com o carbonato de cálcio para formar as microcápsulas. O cloreto de cálcio também é utilizado nesta técnica, e quando adicionado à emulsão faz com que ocorra a separação de fases (COOK et al., 2012; KRASAEKOOPT, BHANDARI & DEETH, 2003).

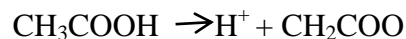
A produção das micropartículas não envolve altas temperaturas e faz uso de materiais de baixo custo, potencializando esta técnica para emprego em escala industrial (WESTERIK, SCHOLTEN & CORREDIG, 2015). Devido a isso, esta técnica é de fácil reprodução e é caracterizada por proporcionar uma alta taxa de sobrevivência do microrganismo encapsulado (LAKKIS, CHEN & CHEN, 2007).

De acordo com esta técnica, a fase aquosa, formada pelo material encapsulante (por exemplo o alginato) e a fonte de cálcio (carbonato de cálcio), é adicionada à fase oleosa (óleo vegetal, agente emulsificante e ácido acético), gerando as seguintes reações (LIU et al., 2007):

1. Difusão de ácido acético a partir da fase oleosa para a fase aquosa.



2. O íon hidrogênio é liberado do ácido acético para a fase aquosa



3. O cálcio é liberado pela reação entre o íon de hidrogênio e o sal de cálcio insolúvel.
4. A formação de gel se dá gradualmente através da reação entre cálcio e os resíduos dos ácidos glucurônicos da cadeia do material de parede (no caso do alginato), formando a estrutura conhecida como "eggbox" na qual, metaforicamente, os ovos seriam íons de cálcio.

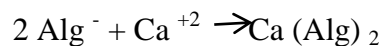
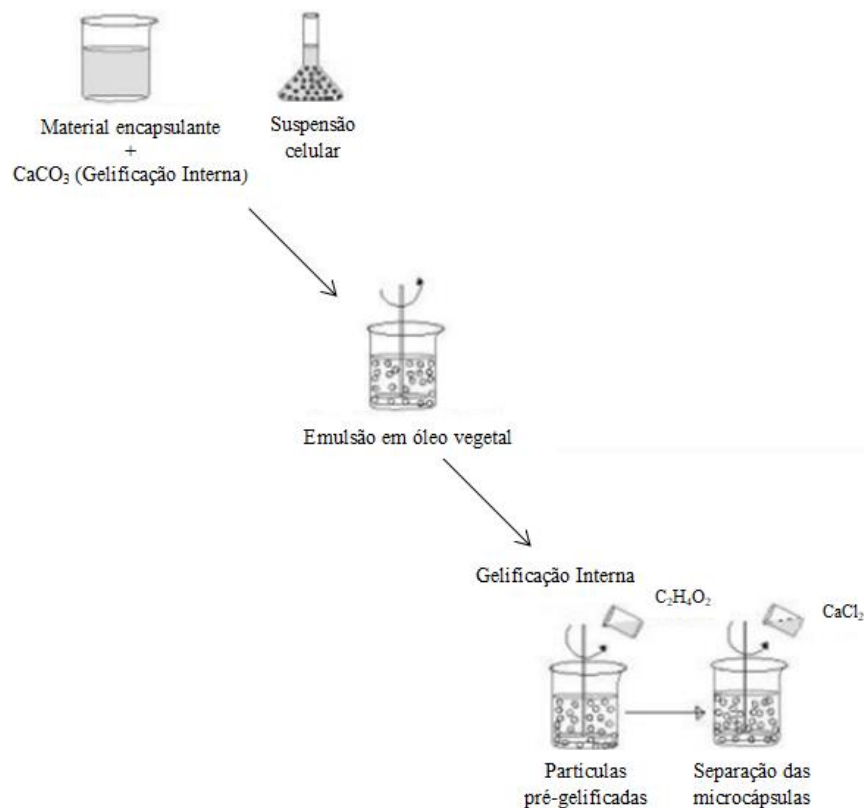


Figura 2 - Esquema do processo de gelificação iônica interna.



Fonte: Adaptado de (MARTÍN, LARA-VILLOSLADA, RUIZ, & MORALES, 2015).

Ao se comparar com a técnica de extrusão, a emulsificação permite maior controle do tamanho das partículas e além de uma produção em larga escala (KRASAEKOOPT, BHANDARI & DEETH, 2003). Diâmetros menores do que 100 μm podem ser obtidos em micropartículas produzidas pela técnica de gelificação interna, o que permite que elas sejam incorporadas em alimentos sem afetar seus atributos sensoriais (CHANDRAMOULI et al., 2004; CUI et al., 2000; HANSEN et al., 2002). Para isso, é necessário que se avalie a concentração do agente encapsulante, velocidade de rotação na emulsão e concentração de emulsificante, por serem fatores que podem interferir no diâmetro das microcápsulas (AHMED et al., 2013).

2.7 MATERIAIS ENCAPSULANTES

A seleção do material encapsulante é feita em função da aplicação pretendida, das propriedades físicas e químicas do agente ativo e do método utilizado para formar as micropartículas. A composição do agente encapsulante irá depender do tipo de aplicação a que se destina, podendo ser comestíveis (carboidratos, proteínas) ou polímeros de origem natural, semissintética ou sintética (ANSON, 2005). Além disso, para a formação das micropartículas, os agentes encapsulantes podem ser utilizados sozinhos ou em combinação (FERNANDES, CANDIDO & OLIVEIRA, 2012).

Visto que o material encapsulante pode influenciar na estabilidade dos compostos encapsulados, para a sua escolha deve-se considerar os seguintes aspectos:

- Solubilidade, massa molecular, transição vítrea, cristalinidade, difusibilidade, formação de filme e propriedades emulsionantes do material;
- Propriedades físico-químicas do núcleo;
- Compatibilidade como o material de núcleo;
- Tipo de liberação que se objetiva;
- Funcionalidade proporcionada ao produto final;
- Fatores econômicos;
- Se o composto é comestível, biodegradável e solúvel em água a um nível aceitável;
- Sabor e odor suaves;
- Apresentar fácil reconstituição e manuseamento (GHARSALLAOUI et al., 2007; NEDOVIC et al., 2011).

2.7.1 Pectina

A pectina pode ser encontrada na parede celular de plantas e nas camadas intercelulares (lamela média) de células vegetais, sendo responsável por proporcionar rigidez estrutural às plantas (THAKUR, SINGH & HANDA, 1997). A estrutura deste polissacarídeo é formada por uma cadeia linear de unidades de ácido galacturônico unidas por ligações α 1,4 em que os grupos carboxílicos do ácido galacturônico podem estar esterificados por grupamentos metil (RALET et al., 2003).

Por ser encontrado na maior parte das plantas terrestres e em vários frutos, o organismo humano está habituado a este polissacarídeo, sendo improvável que haja manifestações de intolerância gástrica pela sua ingestão, mesmo em doses muito elevadas. A propriedade mais atrativa da pectina tanto para a indústria farmacêutica quanto de alimentos é

a sua capacidade de formar géis, podendo atuar como agente gelificante, espessante ou como estabilizante (URBANO, 2004).

A percentagem de grupos ácidos na forma de ésteres metílicos presentes na cadeia de pectina designa-se por grau de esterificação. As propriedades do gel são afetadas pelo tipo de pectina (grau de esterificação), arranjo de ésteres metílicos, concentração do polissacarídeo e íon divalente, método de preparo do gel, além do tempo de reação ser o suficiente para a ligação cooperativa de íons Ca^{2+} (FRAEYE et al., 2010; HOEFLER, 2004).

As pectinas podem ser classificadas com base no grau de metoxilação em: baixa (0-40%), média (40 a 60%) e alta (mais de 60%) metoxilação (REVUELTA et al., 2016). As pectinas com baixo e médio grau de metoxilação são capazes de produzir géis reversíveis na presença de cátions multivalentes, em contrapartida, pectinas com alto grau de metoxilação formarão géis irreversíveis na presença de solutos (por exemplo, açúcares) sob pH ácido (MCCLEMENTS, 2015). Pelo fato de o grupo éster ser mais hidrofóbico que o grupo carboxílico, uma pectina com um alto grau de esterificação irá gelificar com temperaturas mais altas do que uma pectina com um grau de esterificação menor (GILABERT, 0000).

A formação de géis de pectinas de baixo teor de metoxilação ocorre após ligação dos íons bivalentes de cálcio aos grupos carboxila ácido D-gulurônico, constituindo o modelo da “caixa de ovos” (BRACCINI & PÉREZ, 2001).

Para as pectinas com baixo grau de metoxilação, a formação de gel ocorre na presença de cátions bivalentes (geralmente íons cálcio), que atuam como pontes entre pares de grupos carboxílicos (AXELOS & THIBAUT, 1991). As interações entre os cátions e os grupos carboxílicos são descritas através do modelo “caixa-de-ovos” envolvendo um processo de duas fases de dimerização inicial e subsequente agregação das “caixas-de-ovos” pré-formadas (GRANT et al., 1973; POWELL et al., 1982).

Além de despertar interesse pela sua capacidade como agente gelificante, espessante e estabilizante, estudos demonstram que a fermentação da pectina aumenta a massa fecal e apresenta propriedades bifidogênicas e prebióticas (NAZZARO et al., 2012).

3. ARTIGO 1

Use of different prebiotic sources in the development of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal ionic gelation

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the influence of the addition of hi-maize, inulin and rice bran prebiotics on the survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microencapsulated in pectin by internal ionic gelation. Microparticle size, physical-chemical characterization, encapsulation efficiency, gastrointestinal simulation, and storage stability were analysed. The size of the microparticles ranged from 24.4 µm (PEC treatment) to 462 µm (PIN treatment). High levels of humidity were observed (80.61% - 96.16%). Ash content ranged from 0.43 to 1.60% and lipid and carbohydrate levels varied between 1.15 - 2.76% and 1.29 - 15.64%, respectively. The PRB treatment showed higher levels of protein in relation to the other treatments (2.12%). The PRB and PIN encapsulation matrices presented the highest encapsulation efficiency, 91.24% and 90.59%, respectively. All treatments provided greater protection to the microorganism after passage through the simulated gastrointestinal tract when compared to the free microorganism. Regarding the viability in different storage conditions, at 25 °C the probiotics remained viable in all treatments for 120 days. At the temperature of -18 °C, the PHM and PRB treatments preserved the microorganism viable for 90 days. At 7 °C, the PRB treatment remained viable during the 120 days of storage. Thus, the microparticles developed in this study, besides allowing a long viability of the probiotic *L. acidophilus*, still represent an efficient system for the introduction of symbiotic compounds in food matrices, impelling the development of new functional foods.

Keywords: microencapsulation, probiotics, inulin, rice bran, hi-maize, emulsification, synbiotics.

1. Introduction

In recent years, it has increased worldwide the consumption of foods that promote well-being, health and reduce the risk of diseases, such as probiotic and prebiotic products (Silveira et al., 2014). Probiotics are “live microorganisms which when administered in adequate amounts confer a health benefit on the host” (FAO/WHO, 2006), on the other hand, prebiotics are considered as nondigestible food ingredients that benefit the host by selectively stimulating the growth of beneficial bacteria (Roberfroid et al., 2010).

Typical prebiotics are dietary fibres which generally consist of inulin, oligosaccharides and resistant starch (hi-maize) (Buttriss, & Stokes, 2008). Recent studies have shown that rice bran is an appropriate byproduct with suitable properties as a prebiotic potential, and contains beneficial substances such as polyphenols, essential fatty acids, antioxidants (oryzanol, tocopherol, tocotrienol and ferulic acid), food fibers (arabinogalactan, hemicellulose, arabinoxylan, proteoglycan, xyloglucan and raffinose), among others, that contribute to the development of functional products (Demirci, Aktas, Sözeri, Öztürk, & Akın 2017; Kataoka et al., 2008; Sierra et al., 2005, Zubaidah, Nurcholis, Wulan, & Kusuma 2012).

Once consumed, it is necessary for probiotics to survive the low pH and bile acids present in the intestine, in order to reach the colon in large quantities to facilitate colonization and thus to exert a beneficial effect on the host (Agrawal, 2005; Ferrando, Quiberoni, Reinheimer, & Suarez, 2015; Li, Chen, Sun, Park, & Cha, 2011). Similarly, when introduced into food, they should resist factors such as low pH, oxygen, storage temperature and composition of the food matrix (Patrignani et al., 2017).

The combination of probiotic and prebiotic agents gives rise to a synbiotic product, which can improve the survival of probiotic bacteria in the upper gastrointestinal tract and increase its effect on the large intestine (Al-Sheraji et al., 2013). In combination to this, to improve the resistance of probiotic cells, there is the effective method called microencapsulation (Arslan-Tontul, & Erbas, 2017; Rather, Akhter, Masoodi, Gani, & Wani, 2017). Microencapsulation is the process in which a core material is conditioned within a thin layer of coating material and is widely used in the stabilization, solubilisation and release of active components, it also provides the protection of the encapsulated material against bacteriophage, harmful factors of the freeze drying steps, passage through the gastrointestinal tract and storage temperatures (Dias, Botrel, Fernandes, & Borges 2017; Fernandes et al., 2016; Timilsena, Wang, Adhikari, & Adhikari, 2017).

Among different existing microencapsulation methods, there is the emulsification/internal ionic gelation. In this technique, calcium is dispersed in the form of an

insoluble salt in the encapsulating solution. This mixture is emulsified in an oil phase in order to obtain a water-in-oil type emulsion. The calcium present in the internal phase is released by acidification of the external oil phase causing gelation of the encapsulating material (Poncelet et al., 1992).

An important criterium for the production of the microparticles is the selection of a suitable encapsulating material. Pectin is a polysaccharide which constitutes the cell walls of most plants, being generally extracted from fruits and has been widely used in the food and pharmaceutical industry as a gelling agent, thickener and stabilizer (Esfanjani, Jafari, & Assadpour 2016; Munarin, Tanzi, & Petrini, 2012). Moreover, oligosaccharides obtained from pectin were classified as excellent candidates for emerging prebiotics (Hotchkiss, Olan-Martin, William, Gibson, & Rastall, 2003).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different prebiotics (inulin, hi-maize and rice bran) at 10% in 1% pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA5 and produced by the emulsification/ionic gelation technique, when exposed to the gastrointestinal tract simulation and storage at different temperatures (25 °C, 7 °C and -18 °C).

2. Material and Methods

2.1 Materials

For encapsulation, pectin of low degree of methoxylation (CP Kelco, Limeira, São Paulo, Brazil), hi-maize (National Starch Food Innovation, Indianapolis, Indiana, USA), inulin (Metachem, Higienópolis, São Paulo, Brazil) and rice bran (Hnutri, Ipiranga, São Paulo, Brazil) were used. Sunflower oil (Salada, Poço Grande, Gaspar, Santa Catarina, Brazil). CaCO₃ (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brazil). Other products such as Tween 80, C₂H₄O₂ and CaCl₂.2H₂O (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Inoculum

The probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Christian Hansen) was activated in MRS broth (Himedia) and incubated for 18 h at 37 °C. Then, it was centrifuged at 5460 rpm for 15 minutes and the culture was washed with NaCl solution (0.85%). Cells were suspended in saline to obtain a solution containing around 11 log CFU g⁻¹.

2.3 Microencapsulation process

Four microparticles solutions were produced, one containing only 1% pectin (PEC), the second containing 1% pectin + 10% hi-maize (PHM), another containing 1% pectin + 10% inulin (PIN) and the last containing 1% pectin + 10% rice bran (PRB). Microparticles were produced by the emulsification/internal ionic gelation technique according to Poncelet et al., (1992) and Holkem et al., (2016), with modifications. For this purpose, 40 mL of pectin solution (1%), prebiotic (10%), probiotic culture and 2 mL of CaCO₃ suspension (500 mM Ca²⁺) were mixed. The mixture was dispersed in 200 mL of sunflower oil containing 1.5% Tween 80 at 900 rpm for 15 minutes using a mechanical stirrer (Quimis®, Diadema, São Paulo, Brazil). After, 40 mL of sunflower oil containing 160 µL of glacial acetic acid was added to the emulsion and stirred for 5 minutes. After 5 minutes, the stirring was stopped and the microparticles were separated by adding 300 mL of a 0.05M CaCl₂-2H₂O solution and then filtered through a 0.038 mm sieve (400 mesh) and washed in distilled water at pH 4.0 for oil removal.

2.4 Enumeration of microencapsulated *Latobacillus acidophilus* LA-5

Serial dilutions were transferred to sterile Petri plates containing MRS agar (Himedia Curitiba, Paraná, Brazil), in triplicate. Plates were incubated at 37 °C for 72 h in anaerobic jars containing anaerobic generator (Oxoid, São Paulo, Brasil). The dilution of the microparticles comprised weighing 1 g of microparticles followed by the addition of 9 mL sterile phosphate buffer solution (pH 7.5), according to the methodology described by Sheu, Marshall, & Heymann (1993). Results were shown as log colony forming units per gram (log CFU g⁻¹).

2.5 Characterization of microparticles

2.5.1 Morphology and particle size distribution

The morphology of the microparticles was evaluated using an optical microscope (Carl Zeiss Axio Scope.A1, Oberkochen, Germany) equipped with an Axio Cam MRc digital camera (Carl Zeiss). Particle size distribution was determined using the Mastersizer 2000 laser diffraction equipment (Malvern, Germany).

2.5.2 Composition of the microparticles

The microparticles were characterized for moisture (% w/w), lipids (% w/w), proteins (% w/w) and ash (% w/w) according to AOAC (Association of Official Analytical Chemists) methodologies (2005). The carbohydrate content was calculated by the difference between 100 and the sum of the proteins, lipids, ashes and moisture.

2.6 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE%) is the survival rate of the microorganisms during the microencapsulation process, calculated according to Eq. (1), as proposed by Martin, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales (2013).

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

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. The viable cell count was performed as described in Section 2.4.

2.7 Evaluation of the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 exposed to simulated gastrointestinal conditions

The method proposed by Madureira et al., (2011), with adaptations, was used to submit the microparticles under simulated gastrointestinal conditions. The viability of the bacteria was determined on average by simulating different 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 performed in a TE 421 Shaker (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), at 37 °C, simulating body temperature. Aliquots were collected after 90 min (esophagus/stomach), 110 min (duodenum) and 200 min (ileum) to determine the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Probiotic cultures were counted in MRS medium as described in Section 2.4.

2.8 Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 at different storage conditions

The viability of the microencapsulated bacteria during storage under three temperature conditions (-18 °C, 7 °C and 25 °C) was investigated to determine the shelf life of the microparticles. Viable cells were enumerated after 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 days of storage using MRS agar as described in Section 2.4.

2.9 Statistical analysis

The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) using Statistica version 7.0 software (2004; Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), followed by Tukey's means comparison test at a level of 5% significance of treatments showing possible significant differences. All the tests were performed in triplicate and the data expressed as means \pm standard deviations.

3. Results and discussion

3.1 Characterization of the microparticles

The morphology of the microparticles was observed through an optical microscope. According to Fig. 1, it is possible to observe that in general the treatments presented microparticles with spherical shape and smooth surface, as well a relatively uniform size.

In the internal gelation/emulsification technique, the particle size can be controlled by the concentration of the encapsulating agent, the stirring speed and the concentration of the emulsifier used, which can result in microparticles ranging from 2 mm to 25 μm (Ahmed, El-Rasoul, Auda, & Ibrahim, 2013; Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2014). In this study, the mean diameter of the microparticles from the different treatments ranged from 24.4 – 462 μm (Table1), and the smallest particle size was obtained in the PEC treatment, whereas the treatment with the largest mean diameter was PIN. The treatments PHM and PRB presented particle size of 37.6 μm and 79.1 μm , respectively. Similar results were found by Song, Yu, Gao, Liu, & Ma (2013) who prepared microparticles containing probiotics by emulsification/internal ionic gelation technique, which presented a size distribution ranging from 35 to 373 μm . For food application, it is desirable that the microparticles present a diameter of no more than 100 μm , since above that they may have a negative impact on the sensory characteristics of the product (Costa et al., 2015).

The size distribution of the microparticles obtained by internal ionic gelation depends on the size of the emulsion droplets (Song, Yu, Gao, Liu, & Ma, 2013). The microparticles containing prebiotics were significantly ($p < 0.05$) larger than those containing only pectin (Table 1), which may have occurred due to the increase in the polymer concentration of the wall matrix due to the incorporation of the prebiotic. By increasing the polymer concentration, the viscosity of the internal phase of the primary emulsion can also be increased, causing the strength to break into smaller droplets and result in larger sizes of microparticles (Lee, & Heo, 2000; Lokhande, Deshmukh, & Patil, 2013).

The highest mean diameter observed in microparticles of inulin treatment may have occurred because due to its long chain length, when incorporated into water, inulin has the ability to form microcrystals. Such a gel is composed of a tri-dimensional network of insoluble crystalline inulin particles in water, and large amounts of water are immobilised in this network (Franck, 2002).

Valero-Cases & Frutos (2015) studied the effect of the addition of different concentrations of inulin (1% and 2%) on alginate microparticles obtained through microencapsulation by internal gelation and observed that the capsules with 2% of inulin were significantly ($p < 0.05$) higher than those with 1% of inulin and without inulin.

Table 1 shows the physical-chemical characterization of microparticles. High moisture levels were observed, on average 95.11%, 80.61%, 96.16% and 87.50% for PEC, PHM, PIN and PRB treatments, respectively, due to the large water retention capacity of the wall material (Aguilar et al., 2015). The ash content ranged from 0.43 - 1.60%, and the lipid and carbohydrate contents ranged from 1.15 - 2.76% and 1.29 - 15.64%, respectively, probably due to the oil residue that remained on the surface of the capsules after the microencapsulation process and the compounds used as wall material. Higher protein levels were observed for PRB treatment (2.12%), while PEC, PHM and PIN treatments presented protein value of 0.14, 0.54 and 0.58%, respectively. The highest protein content in PRB treatment is due to the addition of rice bran, which, according to Moongngarm, Daomukda, & Khumpika (2012), has a protein content of 12.07-13.66%.

Recent studies have shown satisfactory results in the incorporation of probiotic microorganisms into foods of different categories (Lalicic-Petronijevic et al., 2015, Pimentel, Madrona, & Prudencio, 2015). However, there are still few studies that report the effect of the addition of microparticles containing probiotic bacteria on the sensory characteristics of these products.

3.2 Encapsulation efficiency

Encapsulation efficiency is one of the most important parameter indicating the effect of encapsulation process and selected wall matrix (Çabuk, & Harsa, 2015). As shown in Table 1, all treatments presented high encapsulation efficiency (EE%), ranging from 82.65% to 91.24%, with significant difference ($p < 0.05$) among treatments, except for PIN and PRB ($p < 0.05$). The best EE% results were obtained in treatments PRB and PIN (91.24 % and 90.59 %, respectively).

Similar to our study, Jantarathin, Borompichaichartkul, & Sanguandeeikul, (2017) observed an EE% of (88.19%) by using the extrusion technique to microencapsulate the probiotic *L. acidophilus* in sodium alginate together with inulin.

In another study, using the internal gelation technique, Zou et al., (2011) produced alginate microspheres with blending or coating with other polymers containing *B. bifidum* F-35, and the mean EE% varied from 43% to 50%. The authors assigned the low results to the fact that the addition of glacial acetic acid during the internal gelation process had a negative effect on the survival of probiotic cells. In our study, the internal ionic gelation technique, together with the wall materials used, proved to be efficient to guarantee the survival of the microorganism to the microencapsulation process.

3.3 Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 exposed to simulated gastrointestinal conditions

The results for the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 by emulsification/internal ionic 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 9.61 ± 0.12 , 9.10 ± 0.11 , 10.06 ± 0.07 and 10.56 ± 0.22 log CFU g⁻¹ for the PEC, PHM, PIN and PRB treatments, respectively. On the other hand, the free microorganism presented initial count of 11.28 ± 0.12 log CFU g⁻¹. To produce beneficial effects on the host, probiotics must survive the passage through the stomach and reach the intestine in large quantities (Sanz, 2007).

The stomach is considered a crucial section for probiotic microorganisms because they are components sensitive to low pH. In fasting, the stomach has a pH range of 1.3 to 2.5 for healthy individuals (Kong, & Singh, 2008). After the first 90 min of esophageal/stomach passage simulation (in the presence of pepsin and pH 2.0), a reduction of 0.34 log CFU g⁻¹ was observed for the free microorganism when compared to time zero, proving sensitive to acidic conditions. Mokarram, Mortazavi, Habibi Najafi, & Shahidi (2009) found that the unencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus* probiotics were sensitive to the acid environment of the gastric juice simulation (pH 1.5 for 2h), showing a reduction from their initial count of 5 and 6 log for *L. acidophilus* and *L. Rhamnosus*, respectively.

Meanwhile, after exposure of the microencapsulated cells to acidic conditions, a significant reduction ($p < 0.5$) was observed for all treatments when compared to their initial

count. This reduction is not due to the loss of viability, but to the fact that there was no total rupture of the particles, thus resulting in the non-release of the microorganism.

After 110 min of analysis, corresponding to the simulation of the passage through the duodenum (in the presence of bile salts, pancreatin and pH 5.0), the viable cell population of the free microorganism decreased even more significantly ($p < 0.5$), with a reduction of 2.86 log CFU g^{-1} compared to its initial count.

In relation to the microencapsulated microorganism, larger populations of *L. acidophilus* La-5 were observed, thus demonstrating that a slight rupture of the particles may have occurred, which led to a higher cell count compared with the acidic conditions, as seen in Table 2. However, there was no total microorganism release, since it was protected by the microparticles.

At the end of the analysis, after passage through the ileum (pH 6.5), it was observed that the number of viable cells remained above 6 log CFU g^{-1} for both the free and microencapsulated microorganisms, being within the requirements for probiotic benefits (FAO / OMS, 2001). Nonetheless, it was observed that the microencapsulation of cells in pectin, as well as in association with the different prebiotics, conferred greater protection to the bacterial cells during exposure to the GIT simulation compared to the free cells, once after the passage through the ileum, the free microorganism presented reduction of 3.30 log in its viability when compared to time zero. Meanwhile, for the microencapsulated microorganism, the reduction was 0.11, 0.9, 1.63 and 2.37 log for the treatments PEC, PHM, PIN and PRB, respectively, in relation to time zero. Therefore, both microparticles containing prebiotics and those with pectin alone were efficient to guarantee the viability of *L. acidophilus* LA-5 in the simulation of the GIT passage, reaching the ileum with a count of 9.50 ± 0.22 , 8.20 ± 0.17 , 8.43 ± 0.33 and 8.19 ± 0.12 for the PEC, PHM, PIN and PRB treatments, respectively.

In contrast, Etchepare et al., (2016), Chen, Chen, Liu, Lin, & Chiu (2005), Krasaekoopt, & Watcharapoka (2014) and Hassan, Nawaz, & Rasco (2014) reported lower bacteria survival in alginate microparticles obtained by extrusion when compared to microcapsules containing prebiotics (hi-maize, fructooligosaccharides, galactooligosaccharides / inulin, fruit oligosaccharides, monosaccharides and galactooligosaccharides, respectively) submitted to simulation of simulated gastric juice.

The results of this study are in accordance with the one developed by Chen, Li, Liu, & Meng (2017), who compared the viability of free and microencapsulated *Lactobacillus bulgaricus* by emulsification in relation to the simulated gastric juice and bile tolerance tests and observed that the mortality of probiotic cells significantly reduced when

microencapsulated in comparison to free cells. In another study, Ribeiro et al., (2014) developed yogurts containing free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 by ionic gelation and complex coacervation techniques using pectin and whey protein as coating materials, respectively. After five hours exposure to 1% bile solution, the authors observed a reduction of 3.5 log and 1.37 log for free and microencapsulated *L. acidophilus* LA-5, respectively. Thus, the survival of free *L. acidophilus* LA-5 was lower when compared to the yogurt with microencapsulated *L. acidophilus* LA-5. Furthermore, Holkem et al., (2016) microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 by internal gelation and concluded that the microparticles offered a greater protection to the microorganism during 200 minutes simulation of passage through the GIT when compared to the free microorganism.

Taking into consideration the different treatments of the microparticles, the one that provided greater viability at the end of the simulation was the PEC treatment, since it did not present significant difference ($p < 0.5$) when comparing its initial count with the count of the released microorganisms in the ileum. Pectin has been receiving attention because it is less sensitive to chemical agents and more resistant to the gastrointestinal environment than alginate (Chotiko, & Sathivel, 2016). In another recent study, Gebara et al. (2013) developed pectin microcapsules containing *Lactobacillus acidophilus*. Microencapsulated probiotic cells remained intact after exposure to simulated gastric juice at pH 1.2 and 3.0 for 120 minutes and simulated intestinal juice at pH 7.0 for 300 minutes. There was less reduction in the viability of encapsulated cells than in non-encapsulated cells.

3.4 Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in different storage conditions

Table 3 shows the stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during 120 days of storage at 25 °C, 7 °C and -18 °C, simulating different environmental conditions. In order for probiotics to exert their beneficial effects on the host, the food must contain a number of viable cells of probiotic cultures equal to or superior than 6 log CFU g⁻¹ (Roy, 2005). During storage of the microparticles, high probiotic viability is desirable since the number of viable probiotic bacteria in food products depends on the number of probiotics lost during their formulation, processing, storage and during passage through the gastrointestinal tract (Saarela, Virkajärvi, Nohynek, Vaari, & Mättö, 2006). At room temperature (25 °C), the number of viable cells of *L. acidophilus* maintained the required standards by the legislation for all treatments during the 120 days. The PEC treatment reached the end of the 120 days with the highest count of 7.61 ± 0.02 CFU g⁻¹, showing a significant difference ($p < 0.5$) from the other treatments. The PHM, PIN and PRB treatments did not

present significant differences ($p < 0.5$) after the 120 days, with counts of 7.26 ± 0.15 , 7.11 ± 0.03 and 7.31 ± 0.05 log UFC g^{-1} , respectively.

These are very positive results since studies performed by Okuro, Thomazini, Balieiro, Liberal, & Fávoro-Trindade (2013) did not obtain the same satisfactory results when evaluating solid lipid microparticles in which *Lactobacillus acidophilus* was co-encapsulated with prebiotics, either inulin or polydextrose using spray chilling technology. The stability was evaluated for 120 days at 22 °C with controlled relative humidity. It was observed that both the treatment without prebiotic as well as those containing it did not promote the viability of the microorganism during the 120 days. Treatment without prebiotics remained viable for a period ranging from 0 to 7 days, while treatment containing inulin remained viable for between 7 and 30 days and treatment containing polydextrose remained viable for about 60 days.

In relation to storage at freezing temperature, the microorganism remained viable during 15 days only for the PEC treatment, after this period, there was a significant reduction ($p < 0.05$) of 6.26 log CFU g^{-1} in its viability up to the 120 days of storage. For the PIN treatment, viability was maintained for 30 days (6.53 ± 0.20 log CFU g^{-1}). The viability reduction at -18 °C may be related to the cold-induced injury to the cells, which eventually lead to the probiotic cell death.

On the other hand, the produced microparticles of hi-maize (PHM) and rice bran (PRB) showed better results, keeping the microorganism viable for a period of 90 days, with counts of 6.74 ± 0.04 and 6.11 ± 0.11 log UFC g^{-1} and presenting significant differences ($p < 0.5$) among themselves. Resistant starches and rice bran produce granules with better assimilated structures as well as conferring prebiotic effects on lactic acid bacteria (Chotiko, & Sathivel, 2016; Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi, 2008), which may explain the longer viability period in PHM and PRB treatments. These results suggest that the addition of prebiotics hi-maize and rice bran to pectin microparticles can enhance the survival of the encapsulated microorganism during storage at -18 °C in comparison to microcapsules without the prebiotic.

In another study, Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi (2008) produced synbiotic ice creams, which contained probiotics *L. casei* and *B. lactis* encapsulated together with resistant starch. Microcapsules containing resistant starch were also efficient to guarantee the viability of the microorganisms, presenting reduction of only 1.4 log in 180 days of storage at -20 °C for *L. casei*, whereas *B. lactis* showed a reduction of 0.7 log.

Regarding the effect of the refrigeration temperature, it was observed that the best results were reached for the rice bran microparticles (PRB), which remained stable at the end of the 120 days of storage with counts of $8.36 \pm 0.08 \log \text{ UFC g}^{-1}$, meanwhile PEC treatment remained viable for 60 days ($6.08 \pm 0.07 \log \text{ CFU g}^{-1}$) and the PHM and PIN treatments maintained stable the viable cell number for 45 days, with counts of 6.23 ± 0.01 and $8.16 \pm 0.22 \log \text{ UFC g}^{-1}$, respectively. This demonstrates that the addition of rice bran is able to confer greater protection to the microorganisms in pectin microparticles obtained by emulsification/internal ionic gelation during the course of 120 days at 7 °C.

Pedroso, Thomazini, Heinemann, & Favaro-Trindade (2012) produced lipid particles containing *Lactobacillus acidophilus* by spray chilling and observed that the microparticles maintained the stability of the microorganism during storage at 7 °C, from 30 to 60 days. Oliveira et al. (2007) showed that *L. acidophilus* presented greater viability in a storage at 7 °C when microencapsulated by complex coacervation, however, in this work the microcapsules were dehydrated by spouted bed system. The microparticles showed viability between 90 and 120 days when stored at 7 °C, but showed loss of viability before 90 days of storage at 37 °C.

4. Conclusions

It was observed that both microparticles, with or without addition of prebiotics, prepared by emulsification/internal gelation, represent an efficient system for promoting the resistance of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during the simulation of passage through the gastrointestinal tract. All treatments were able to promote viability of the microorganism at 25 °C for 120 days. At -18 °C, the use of prebiotics positively affected the survival of the microencapsulated microorganisms, since the produced hi-maize and rice bran microcapsules showed the best results to guarantee the viability of the microorganism. The same occurred at 7 °C, in which the treatment that stood out was the one with the rice bran addition, being the only one able to keep the microorganism viable for 120 days. Therefore, incorporation of prebiotics into microencapsulation by internal gelation/emulsification using pectin is considered to be advantageous in providing the development of a functional capsule. Moreover, it is also an efficient means to enhance the protection of *L. acidophilus* from adverse conditions such as passage through the gastrointestinal tract and different storage conditions.

5. References

- Agrawal, R. (2005). Probiotics: An emerging food supplement with health benefits. *Food Biotechnology*, 19, 227–246.
- 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.
- Ahmed, M. M., El-Rasoul, S. A., Auda, S. H., & Ibrahim, M. A. (2013). Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticles. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 21 (1), 61-69.
- Al-Sheraji, S. H., Ismail, A., Manap, M. Y., Mustafa, S., Yusof, R. M., & Hassan, F. A. (2013). Prebiotics as functional foods: a review. *Journal of Functional Foods*, 5(4), 1542-1553.
- Arslan-Tontul, S., & Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling, *LWT - Food Science and Technology*.
- Association of Official Analytical Chemists - AOAC. Official methods of analysis of the association analytical chemists. 18th. Edition. Maryland, USA, 2005.
- Buttriss, J. L., & Stokes, C. S. (2008). Dietary fibre and health: An overview. *Nutrition Bulletin*, 33, 186–200.
- Çabuk, B., & Harsa, S. T. (2015). Protection of *Lactobacillus acidophilus* NRRL-B 4495 under in vitro gastrointestinal conditions with whey protein/pullulan microcapsules. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, xx, 1-7.
- 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.
- 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.
- Chotiko, A., & Sathivel, S. (2016). Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-bran extract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. *LWT - Food Science and Technology*, 66, 420-427.
- Costa, J. M. G., Silva, E. K., Hijo, A. A. C. T., Azevedo, V. M., Malta, M. R., Alves, J. G. L. F., & Borges, S. V. (2015). Microencapsulation of Swiss cheese bioaroma by spray-drying: Process optimization and characterization of particles. *Powder Technology*, 274, 296-304.

- 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.
- Dias, D. R., Botrel, D. A., Fernandes, R. V. B., & Borges, S. V. (2017). Encapsulation as a tool for bioprocessing of functional foods. *Current Opinion in Food Science*, 13, 31–37.
- Esfanjani, A. F., Jafari, S. M., & Assadpour, E. (2016). Preparation of a multiple emulsion based on pectin-whey protein complex for encapsulation of saffron extract nanodroplets. *Food Chemistry*, 221, 1962-1969.
- 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.
- FAO/WHO (2001). Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina.
- 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.
- Fernandes, R. V. B., Botrel, D. A., Silva, E. K., Borges, S. V., Oliveira, C. R., & Yoshida, M. I. (2016). Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. *Carbohydrate Polymers*, 153, 133–142.
- Ferrando, V., Quiberoni, A., Reinhemer, J., & Suarez, V. (2015). Resistance of functional *Lactobacillus plantarum* strains against food stress conditions. *Food Microbiology*, 48, 63-71.
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87, S287-S291.
- 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.
- Hassan, A., Nawaz, M., & Rasco, B. (2014). Microencapsulation, survival and adherence studies of indigenous probiotics. *African Journal of Microbiology Research*, 8 (8), 766-775.

- 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. (2016). Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. *LWT - Food Science and Technology*, xxx, 1-6.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111, 50-55.
- Hotchkiss, A. T., Olano-Martin, E., William, E. G., Gibson, G. R., & Rastall, R. A. (2003). Pectic Oligosaccharides as Prebiotics. *American Chemical Society: Washington*.
- 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.
- Jantarathin, S., Borompichaichartkul, C., & 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*, 4, 6166–6172.
- Kong, F., & Singh, R. P. (2008). Disintegration of solid foods in human stomach. *Journal of Food Science*, 73(5), R67–R80.
- 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*, 57, 761-766.
- Lalicic-Petronijevic, J., Popov-Raljic, J., Obradovic, D., Radulovic, Z., Paunovic, D., Petrušić, M., Pezo, L. (2015). 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*, 15, 541–550.
- 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.
- Li, X. Y., Chen, X. G., Sun, Z. W., Park, H. J., & Cha, D. S. (2011). Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. *Carbohydrate Polymers*, 83, 1479–1485.

- Lokhande, A. B., Deshmukh, T. A., & Patil, V. R. (2013). Evaluation of repaglinide encapsulated nanoparticles prepared by sonication method. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 5, 517-520.
- 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.
- Martin, 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.
- Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., & Morales, M.E. (2014). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*.
- 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*, 42, 1040–1045.
- Moongngarm, A., Daomukda, N., & Khumpika, S. (2012). Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEE Procedia*, 2, 73–79.
- Munarin, F., Tanzi, M.C., & Petrini, P. (2012). Advances in biomedical applications of pectin gels. *International Journal of Biological Macromolecules*, 51, 681-689.
- Okuro, P. K., Thomazini, M., Balieiro, J. C. C., Liberal, R. D. C. O., & Fávares-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.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Baliero, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., & Favares-Trindade, C. S. (2007). 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.
- Patrignani, F., Siroli, L., Serrazanetti, D. I., Braschi, G., Betoret, E., Reinheimer, J. A., & Lanciotti, R. (2017). Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk. *Food Research International*, 97, 250–257.

- 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.
- Pimentel, T. C., Madrona, G. S., Garcia, S., Prudencio, S. H. (2015). Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. *LWT—Food Science and Technology*, 63(1): 415–422.
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J., & Fournier, A. (1992). Production of alginate beads by emulsification internal gelation. 1. Methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 39-45.
- Rather, S.A., Akhter, R., Masoodi, F.A., Gani, A., & Wani, S.M. (2017). Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. *LWT - Food Science and Technology*.
- 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.
- 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.
- Roy, D. (2005). Technological aspects related to the use of bifidobacteria in dairy products. *Lait*, 85, 39–56.
- Saarela, M., Virkajärvi, I., Nohynek, L., Vaari, A., & Mättö, J. (2006). Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. *International Journal of Food Microbiology*, 112(2), 171–178.
- Sanz, Y. (2007). Ecological and functional implications of the acid-adaptation ability of *Bifidobacterium*: A way of selecting improved probiotic strains. *International Dairy Journal*, 17, 1284-1289.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.

- 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.
- Silveira, E. O., Neto, J. H. L., Silva, L. A., Raposo, A. E.S., Magnani, M., & Cardarelli, H. R. (2014). The effects of inulin combined with oligofructose and goat cheese whey on the physicochemical properties and sensory acceptance of a probiotic chocolate goat dairy beverage. *LWT - Food Science and Technology*, xxx 1-7.
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96, 181–189.
- Timilsena, Y. P., Wang, B., Adhikari, R., & Adhikari, B. (2017). Advances in microencapsulation of polyunsaturated fatty acids (PUFAs)-rich plant oils using complex coacervation: A review. *Food Hydrocolloids*, 69, 369-381.
- 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.
- Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Zhang, H., & Chen, H. (2011). 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.
- 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.

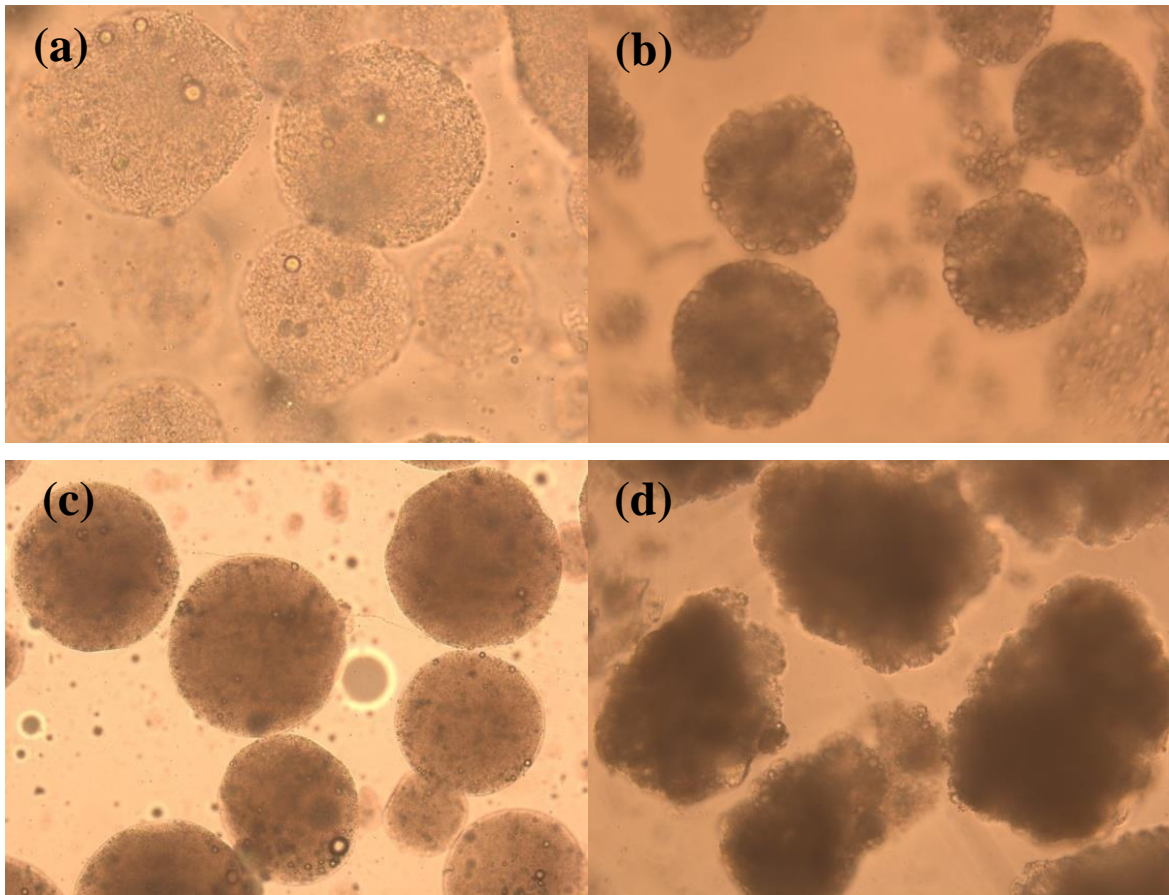


Fig 1. Optical microscopy of pectin microparticles with different prebiotic sources containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal ionic gelation.

(a) = pectin microparticles 1% (PEC) (40x); (b) = pectin microparticles 1% + hi-maize 10% (PHM) (20x); (c) = pectin microparticles 1% + inulin 10% (PIN) (10x); (d) = pectin microparticles 1% + rice bran 10% (PRB) (20x).

Table 1 - Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microparticles obtained by internal ionic gelation with pectin and different prebiotic sources.

	PEC	PHM	PIN	PRB
Particles size (μm)	$24.4 \pm 7.41^{\text{d}}$	$37.6 \pm 1.99^{\text{c}}$	$462 \pm 2.90^{\text{a}}$	$79.1 \pm 1.16^{\text{b}}$
Moisture (%)	$95.11 \pm 0.67^{\text{a}}$	$80.61 \pm 0.99^{\text{c}}$	$96.16 \pm 0.72^{\text{a}}$	$87.50 \pm 1.16^{\text{b}}$
Fat (%)	$2.36 \pm 0.34^{\text{ab}}$	$2.76 \pm 0.92^{\text{a}}$	$1.15 \pm 0.21^{\text{b}}$	$2.17 \pm 0.28^{\text{ab}}$
Protein (%)	$0.14 \pm 0.03^{\text{c}}$	$0.54 \pm 0.00^{\text{b}}$	$0.58 \pm 0.02^{\text{b}}$	$2.12 \pm 0.08^{\text{a}}$
Carbohydrates (%)	$1.29 \pm 0.50^{\text{c}}$	$15.64 \pm 0.76^{\text{a}}$	$1.56 \pm 0.87^{\text{c}}$	$6.57 \pm 1.06^{\text{b}}$
Ash (%)	$0.55 \pm 0.04^{\text{b}}$	$0.43 \pm 0.01^{\text{b}}$	$0.53 \pm 0.10^{\text{b}}$	$1.60 \pm 0.36^{\text{a}}$
Encapsulation efficiency (EE%)	$88.04 \pm 1.04^{\text{b}}$	$82.65 \pm 0.64^{\text{c}}$	$90.59 \pm 0.36^{\text{a}}$	$91.24 \pm 0.43^{\text{a}}$

PEC = pectin microparticles 1%; PHM = pectin microparticles 1% + hi-maize 10%; PIN = pectin microparticles 1% + inulin 10%; PRB = pectin microparticles 1% + rice bran 10%.

*Means followed by the same lowercase letter in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

Table 2 – Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in the different treatments after each step through the gastrointestinal tract passage simulation.

	Free culture	PEC	PHM	PIN	PRB
Initial count	11.28 ± 0.12 ^{aA}	9.61 ± 0.12 ^{aD}	9.10 ± 0.11 ^{aE}	10.06 ± 0.07 ^{aC}	10.56 ± 0.22 ^{aB}
Esophagus / stomach 90 min / pH 2.0	10.94 ± 0.09 ^{bA}	2.96 ± 0.17 ^{cD}	2.15 ± 0.27 ^{dE}	5.94 ± 0.26 ^{cC}	7.17 ± 0.34 ^{cB}
Duodenum 20 min / pH 5.0	8.42 ± 0.02 ^{cA}	4.16 ± 0.05 ^{bD}	4.03 ± 0.29 ^{cD}	6.33 ± 0.11 ^{cC}	7.85 ± 0.09 ^{bB}
Ileum 90 min / pH 6.5	7.98 ± 0.08 ^{dB}	9.50 ± 0.22 ^{aA}	8.20 ± 0.17 ^{bB}	8.43 ± 0.33 ^{bB}	8.19 ± 0.12 ^{bB}

PEC = pectin microparticles 1%; PHM = pectin microparticles 1% + hi-maize 10%; PIN = pectin microparticles 1% + inulin 10%; PRB = pectin microparticles 1% + rice bran 10%. Means followed by the same lowercase letter in column and uppercase in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

Table 3 – Effect of the room temperature (25 °C), freezing (-18 °C) and refrigeration (7 °C) on the viability of microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 produced with different encapsulating matrices during storage for 120 days.

Temperature		Room (25 °C)			
Treatments	PEC	PHM	PIN	PRB	
Time (Days)					
0	9.79 ± 0.11 ^{aB}	9.20 ± 0.05 ^{aC}	10.07 ± 0.03 ^{aA}	10.14 ± 0.04 ^{aA}	
15	9.20 ± 0.14 ^{bA}	8.28 ± 0.21 ^{bB}	9.05 ± 0.16 ^{bA}	8.39 ± 0.35 ^{bB}	
30	7.85 ± 0.38 ^{efA}	8.35 ± 0.10 ^{bA}	7.09 ± 0.01 ^{fB}	8.03 ± 0.07 ^{bcA}	
45	8.61 ± 0.24 ^{cA}	8.32 ± 0.05 ^{bAB}	8.24 ± 0.17 ^{cAB}	8.00 ± 0.00 ^{bcB}	
60	8.50 ± 0.28 ^{cdA}	8.42 ± 0.01 ^{bA}	7.48 ± 0.29 ^{deB}	7.94 ± 0.09 ^{cAB}	
75	8.25 ± 0.03 ^{cdeA}	8.23 ± 0.06 ^{bA}	7.56 ± 0.08 ^{dC}	7.80 ± 0.00 ^{cdB}	
90	7.81 ± 0.06 ^{efA}	7.88 ± 0.07 ^{cA}	7.53 ± 0.06 ^{dB}	7.71 ± 0.07 ^{cdA}	
105	7.96 ± 0.09 ^{defA}	7.67 ± 0.08 ^{cb}	7.50 ± 0.04 ^{dB}	7.43 ± 0.12 ^{deB}	
120	7.61 ± 0.02 ^{fA}	7.26 ± 0.15 ^{dB}	7.11 ± 0.03 ^{efB}	7.31 ± 0.05 ^{eb}	
Temperature		Freezing (-18 °C)			
Treatments	PEC	PHM	PIN	PRB	
Time (Days)					
0	9.79 ± 0.11 ^{aB}	9.20 ± 0.05 ^{aC}	10.07 ± 0.03 ^{aA}	10.14 ± 0.04 ^{aA}	
15	8.91 ± 0.18 ^{bC}	8.41 ± 0.13 ^{bD}	9.53 ± 0.20 ^{bB}	9.96 ± 0.03 ^{bA}	
30	5.88 ± 0.03 ^{cd}	7.92 ± 0.03 ^{cb}	6.53 ± 0.20 ^{cc}	8.29 ± 0.05 ^{cA}	
45	4.69 ± 0.04 ^{dC}	7.84 ± 0.02 ^{cA}	5.06 ± 0.15 ^{dB}	7.86 ± 0.04 ^{dA}	
60	4.65 ± 0.01 ^{dD}	7.30 ± 0.08 ^{dA}	5.03 ± 0.03 ^{dC}	6.34 ± 0.02 ^{eb}	
75	4.18 ± 0.01 ^{eD}	6.98 ± 0.06 ^{eA}	4.84 ± 0.01 ^{dC}	6.15 ± 0.04 ^{fB}	
90	3.01 ± 0.04 ^{fD}	6.74 ± 0.04 ^{fA}	4.41 ± 0.10 ^{eC}	6.11 ± 0.11 ^{fB}	
105	2.94 ± 0.03 ^{fD}	3.59 ± 0.14 ^{gC}	3.87 ± 0.07 ^{fB}	5.06 ± 0.07 ^{gA}	
120	2.65 ± 0.03 ^{gD}	3.49 ± 0.04 ^{gC}	3.63 ± 0.04 ^{fB}	4.79 ± 0.05 ^{hA}	
Temperature		Refrigeration (7 °C)			
Treatments	PEC	PHM	PIN	PRB	
Time (Days)					
0	9.79 ± 0.11 ^{aB}	9.20 ± 0.05 ^{aC}	10.07 ± 0.03 ^{aA}	10.14 ± 0.04 ^{aA}	
15	9.65 ± 0.04 ^{aA}	7.77 ± 0.17 ^{bB}	9.75 ± 0.08 ^{bA}	9.54 ± 0.11 ^{bA}	
30	7.69 ± 0.21 ^{bc}	7.40 ± 0.07 ^{bc}	8.18 ± 0.12 ^{cb}	8.97 ± 0.02 ^{cA}	
45	6.81 ± 0.20 ^{cc}	6.23 ± 0.01 ^{cAD}	8.16 ± 0.22 ^{cAB}	8.90 ± 0.01 ^{cdA}	
60	6.08 ± 0.07 ^{dB}	4.53 ± 0.03 ^{dD}	5.39 ± 0.06 ^{dC}	8.78 ± 0.08 ^{deA}	
75	5.92 ± 0.06 ^{dB}	4.01 ± 0.28 ^{dD}	5.20 ± 0.02 ^{dC}	8.63 ± 0.06 ^{efA}	
90	4.42 ± 0.05 ^{eB}	4.16 ± 0.06 ^{deC}	4.20 ± 0.10 ^{fC}	8.81 ± 0.04 ^{cdeA}	
105	4.32 ± 0.06 ^{eC}	3.79 ± 0.19 ^{eD}	4.70 ± 0.00 ^{eb}	8.57 ± 0.01 ^{fA}	
120	3.51 ± 0.13 ^{fD}	3.79 ± 0.03 ^{eC}	4.61 ± 0.01 ^{eb}	8.36 ± 0.08 ^{gA}	

PEC = pectin microparticles 1%; PHM = pectin microparticles 1% + hi-maize 10%; PIN = pectin microparticles 1% + inulin 10%; PRB = pectin microparticles 1% + rice bran 10%. Means followed by the same lowercase letter in column and uppercase in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

4. ARTIGO 2

Enhanced viability of probiotic *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microencapsulated by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the influence of the addition of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the survival of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in pectin microparticles obtained by internal gelation and submitted to the freeze-drying process. Microparticle size, encapsulation efficiency, gastrointestinal simulation, and storage stability were analysed. The pectin + inulin encapsulation matrix presented the highest encapsulation efficiency, 68.11%. Microparticle size ranged from 166 µm (pectin + hi-maize) to 345 µm (pectin + inulin). The microparticles added from the different prebiotics showed an increase in the microorganism protection, which presented greater viability under the gastrointestinal simulation. Under storage conditions of 25°C and -18°C, treatments containing hi-maize, inulin and rice bran maintained the probiotic microorganisms viable for a longer period of time. At 7°C, the pectin + rice bran treatment stood out, being able to maintain probiotic stability during the 120 days of storage.

Keywords: microencapsulation, pectin, probiotics, prebiotics, emulsification.

1. Introduction

The interest of the food industry in developing new functional food products has increased along with consumer awareness and concern about food that provides health benefits. Within the functional group of compounds are probiotic microorganisms and prebiotic compounds. As defined by the FAO/WHO committee in 2006, probiotics are "live organisms which when administered in adequate amounts confer health benefits on the host."

On the other hand, prebiotics have been gaining increasing attention in research as a way of improving probiotic viability during their production and storage (De Prisco, & Mauriello, 2016). The combination of probiotic and prebiotic agents originates a symbiotic product, which can improve the survival of probiotic bacteria in the upper gastrointestinal tract and increase its effect on the large intestine (Ozer, 2005). Inulin is a soluble fiber characterized by being one of the most known prebiotics. It is a reserve carbohydrate found in many fruits and vegetables such as onions, garlic and bananas (Flamm, Glinsmann, Kritchevsky, Prosky & Roberfroid, 2001; Valero-Cases & Frutos, 2015). Another well studied prebiotic is the resistant starch (hi-maize), which is a homo-polysaccharide composed of a number of monosaccharide units linked to each other with α -Glc (1-4) and α -Glc (1-6) (Homayouni et al., 2014).

A less studied prebiotic that has gained attention is the rice bran. Studies show that rice bran prebiotics have positive effects on human health in terms of protection against gastrointestinal cancer; it can also prevent inflammatory bowel disease and promote beneficial impact on the intestinal mucosa (Ham et al., 2015; Iqbal, Bhangar & Anwar, 2005; Komiyama et al., 2011; Kurdi & Hansawasdi, 2015; Moongngarm, Daomukda & Khumpika, 2012). These benefits are due to the presence of beneficial substances in their composition, such as polyphenols, essential fatty acids, antioxidants (oryzanol, tocopherol, tocotrienol and ferrulic acid) and dietary fibers (arabinogalactan, hemicellulose, arabinoxylan, proteoglycan, xyloglucan and raffinose) (Demirci, Aktas, Sözeri, Öztürk & Akın 2017; Kataoka et al., 2008; Sierra et al., 2005, Zubaidah, Nurcholis, Wulan & Kusuma 2012).

In order for the health benefits attributed to probiotic ingestion to be achieved, it is necessary, however, that probiotics are viable when consumed and must withstand the processing and storage conditions to which they will be subjected, in addition to remaining alive after passage through gastrointestinal tract, to adhere to the intestinal mucosa and colonize the intestine. In association with prebiotics, an alternative that has proven to be effective in protecting probiotics from these adverse conditions, while maintaining its viability and functionality, is microencapsulation.

One of the most common microencapsulation techniques is the emulsification technique, which is easy to perform and generates high productivity (Pankasemsuk, Apichartsrangkoon, Worametachanon & Techarang, 2016). In this technique, a small volume of the cell-polymer suspension (discontinuous phase) is added to a large volume of a vegetable oil (continuous phase). The mixture is homogenized to form a water-in-oil emulsion. Upon formation of the emulsion, the water-soluble polymer must be insolubilized to form tiny gel particles within the oil phase. The insolubilization method depends on the type of supporting material used (Krasaekoopt, Bhandari & Deeth, 2003).

One of the key factors to be considered for microencapsulation of probiotics to be successful is the choice of a suitable wall material, as it accurately reflects the morphological and functional properties of the particles. It was reported that the use of pectin hydrogels as a matrix for the encapsulation of probiotics improves cell viability under gastrointestinal conditions. Pectin is a soluble fiber resistant to gastrointestinal conditions and is considered a highly fermentable substance for intestinal microflora (Cabrera, Cambier & Cutsem, 2011; Chotiko & Sathivel, 2016). In addition, pectin was also investigated for its prebiotic properties, increasing the growth of *Bifidobacterium* and *Lactobacillus sp* (Nazzaro, Fratianni, Nicolaus, Poli & Orlando, 2012; Wicker et al., 2014).

In order to maintain the viability of the probiotic microparticles under storage for long periods, it is often necessary to dry them after their production. This is especially important for their addition in dry foods such as cereal products or beverage powders (O’Riordan, Andrews, Buckle & Conwa, 2001). Freeze-drying is the most suitable technique for the dehydration of heat-sensitive materials and is characterized by maintaining a high level of cellular viability (Desai & Park, 2005). However, freeze-drying has traditionally been used to stabilize probiotic bacteria, but the combination of freeze-drying and encapsulation is a relatively new concept (Solanki et al., 2013).

Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of the addition of different prebiotics (inulin, hi-maize and rice bran) on pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA5, produced by the emulsification / internal ionic gelation technique and followed by freeze-drying, when exposed to simulation of the gastrointestinal tract and storage under different temperature conditions (25°C, 7°C and -18°C).

2. Material and Methods

2.1 Materials

For encapsulation, pectin of low degree of methoxylation (CP Kelco, Limeira, São Paulo, Brazil), hi-maize (National Starch Food Innovation, Indianapolis, Indiana, USA), inulin (Metachem, Higienópolis, São Paulo, Brazil) and rice bran (Hnutri, Ipiranga, São Paulo, Brazil) were used. Sunflower oil (Salada, Poço Grande, Gaspar, Santa Catarina, Brazil). CaCO_3 (Neon Comercial Ltda, São Paulo, Brazil). Other products such as Tween 80, $\text{C}_2\text{H}_4\text{O}_2$ and $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, Brazil).

2.2 Inoculum

The probiotic culture *Lactobacillus acidophilus* LA-5 (Christian Hansen) was activated in MRS broth (Himedia) and incubated for 18 h at 37 °C. Then, it was centrifuged at 5460 rpm for 15 minutes and the culture was washed with NaCl solution (0.85%). Cells were suspended in saline to obtain a solution containing around 11 log CFU g⁻¹.

2.3 Microencapsulation process

Four microparticles solutions were produced, one containing only 1% pectin (PECL), the second containing 1% pectin + 10% hi-maize (PHML), another containing 1% pectin + 10% inulin (PINL) and the last containing 1% pectin + 10% rice bran (PRBL). Microparticles were produced by the emulsification/internal ionic gelation technique according to Poncelet et al., (1992) and Holkem et al., (2016a), with modifications. For this purpose, 40 mL of pectin solution (1%), prebiotic (10%), probiotic culture and 2 mL of CaCO_3 suspension (500 mM Ca^{2+}) were mixed. The mixture was dispersed in 200 mL of sunflower oil containing 1.5% Tween 80 at 900 rpm for 15 minutes using a mechanical stirrer (Quimis®, Diadema, São Paulo, Brazil). Next, 40 mL of sunflower oil containing 160 µL of glacial acetic acid was added to the emulsion and stirred for 5 minutes. After 5 minutes, the stirring was stopped and the microparticles were separated by adding 300 mL of a 0.05M $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ solution and then filtered through a 0.038 mm sieve (400 mesh) and washed in distilled water at pH 4.0 for oil removal.

2.4 Freeze-drying

The microparticles produced were frozen (-18°C for 24 hours) on the same day they were produced. Frozen microcapsules (-18°C) were freeze-dried in a Liotop L101 freeze dryer (São Carlos, São Paulo, Brazil) and removed from the freeze dryer 24h later (vacuum: 0.200 - 0.300 µHg and condenser temperature of -37°C).

2.5 Enumeration of microencapsulated *Latobacillus acidophilus* LA-5

Serial dilutions were transferred to sterile Petri plates containing MRS agar (Himedia Curitiba, Paraná, Brazil), in triplicate. Plates were incubated at 37 °C for 72 h in anaerobic jars containing anaerobic generator (Oxoid, São Paulo, Brasil). The dilution of the microparticles comprised weighing 0,1 g of microparticles followed by the addition of 9 mL sterile phosphate buffer solution (pH 7.5), according to the methodology described by Sheu, Marshall, & Heymann (1993). Results were shown as log colony forming units per gram (log CFU g⁻¹).

2.6 Characterization of microparticles

2.6.1 Morphology and particle size distribution

The morphology of freeze-dried microparticles was evaluated using a scanning electron microscope (JEOL, JM6360). The microcapsules were deposited on aluminum beads using a double-sided adhesive tape and then spray-coated with a thin layer of gold. The particle size distribution was determined with the Mastersizer 2000 laser diffraction equipment (Malvern, Germany).

2.6.2. Water Activity

The water activity was measured at 25°C using an Aqualab 4 TE (Decagon Devices, Pullman, WA, USA).

2.7 Encapsulation efficiency

The encapsulation efficiency (EE%) is the survival rate of the microorganisms during the microencapsulation process, calculated according to Eq. (1), as proposed by Martin, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales (2013).

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

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. The viable cell count was performed as described in Section 2.5.

2.8 Evaluation of the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 exposed to simulated gastrointestinal conditions

The method proposed by Madureira et al., (2011), with adaptations, was used to submit the microparticles under simulated gastrointestinal conditions. The viability of the bacteria was determined on average by simulating different 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 performed in a TE 421 Shaker (Tecnal, Piracicaba, SP, Brasil), at 37 °C, simulating body temperature. Aliquots were collected after 90 min (esophagus/stomach), 110 min (duodenum) and 200 min (ileum) to determine the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5. Probiotic cultures were counted in MRS medium as described in Section 2.5.

2.9 Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 at different storage conditions

The viability of the microencapsulated bacteria during storage under three temperature conditions (-18 °C, 7 °C and 25 °C) was investigated to determine the shelf life of the microcapsules. Viable cells were enumerated after 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 and 120 days of storage using MRS agar as described in Section 2.5.

2.9 Statistical analysis

The data were submitted to an analysis of variance (ANOVA) using Statistica version 7.0 software (2004; Statsoft Inc., Tulsa, OK, USA), followed by Tukey's means comparison test at a level of 5% significance of treatments showing possible significant differences. All the tests were performed in triplicate and the data expressed as means \pm standard deviations.

3. Results and Discussion

3.1 Characterization of microparticles

Fig. 1 shows the scanning electronic microscopy (SEM) images of the microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 produced with different encapsulating agents by internal gelation technique followed by freeze-drying. From the analysis of the images captured by the SEM, it was possible to observe details of the morphology and microstructure of the microparticles. The freeze-dried microparticles presented agglomeration and/or

adhesion of the particles, which formed irregular lamellar structures. In addition, they presented an elliptical shape with a wrinkled surface. The wrinkled surface can be explained due to loss of water during the freeze-drying process. In a study developed by Zou et al., (2011), aggregations and irregular lamellar structures were also reported in microcapsules containing *Bifidobacterium Bifidum* F-35 in alginate by emulsification/internal gelation followed by freeze-drying.

The SEM images also revealed the absence of free bacteria, confirming the formation of microparticles and their ability to trap the microorganisms for all the encapsulating agents. Probiotic microorganisms as well as their distribution in the particle could be observed according to Fig.1, mainly in the PHML and PRBL (Fig. 1b and 1d) treatments, being possible to infer that the wall material and the microorganisms are mixed.

A wide range of microparticle size distribution has been reported by several researchers, with the optimal size of these particles being an important factor between the encapsulation efficiency and the sensory properties of the product into which they will be introduced (Nag, Han & Singh, 2011). A minimum diameter of 100 μm was proposed to offer a better protection of the bioactive compound in the gastric juice, and an optimal range between 100-200 μm (McMaster, Kokott & Slatter, 2005). The mean diameter of the microparticles produced in this study by emulsification/internal gelation with different coating materials was within that limit, except for the PINL treatment (Table 1).

The probiotic formulation of pectin together with inulin (PINL) had a mean particle size diameter of 345 μm (Table 1), while the other formulations presented diameters of 192, 166 and 200 μm for PECL, PHML and PRBL treatments, respectively. The highest mean diameter observed in inulin treatment (PINL) microparticles can be explained by the fact that, when hydrated, inulin has the ability to form microcrystals. This gel is composed of a tri-dimensional network of crystalline inulin particles insoluble in water, which has the capacity to immobilize large amounts of water (Franck, 2002).

Zou et al., (2011), produced freeze-dried alginate microspheres containing *Bifidobacterium bifidum* F-35 prepared by emulsification/internal gelation which were enhanced by mixing with pectin or hi-maize or coating with chitosan or poly-L-lysine. The mean diameter of the enhanced alginate microspheres ranged from 117 to 178 μm .

Krasaekoopt & Watcharapoka (2014) and Chavarri et al., (2010) observed an increased diameter in microcapsules containing prebiotics (galacto-oligosaccharides and inulin / quercetin, respectively). The same occurred in this study, with the exception of the PHML treatment, which presented smaller sizes of mean diameter (166 ± 2.17).

All the microparticles presented water activity values below 0.3 (Table 1), which, according to Tonon, Brabet, Pallet, Brat & Hubinger (2009), is very positive for the stability of powders, since represents less free water available for biochemical reactions and, therefore, greater storage convenience.

3.2 Encapsulation Efficiency

According to Song, Yu, Gao, Liu & Ma (2013), probiotic viability after microencapsulation is a parameter of great importance for the production of microparticles containing probiotic cells. Probiotic bacteria tend to be sensitive to freeze-drying due to deterioration of the physiological state of the cell (Kets, Teunissen & De Bont, 1996).

In this study, EE% values above 64% were obtained (Table 1) and a significantly higher encapsulation efficiency ($p < 0.5$) was obtained in the PINL treatment (68.11%). The other microparticles presented encapsulation efficiency of 64.86%, 66.68% and 66.24% for PECL, PHML and PRBL treatments, respectively. From these data, it was observed that the treatments containing the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran significantly increased ($p < 0.5$) the survival of the microorganism under the freeze-drying process.

The greater EE% in the PHML, PINL and PRBL treatments can be explained by the fact that the addition of prebiotics possibly helped reduce cellular losses by stabilizing the pectin networks. Nunes et al., (2018) also reported an increased EE% with the use of inulin and hi-maize in microcapsules containing *L. acidophilus*.

3.3 Viability of free and freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microparticles after exposure to simulated gastrointestinal conditions.

The results for the survival of free and freeze-dried *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microparticles obtained by emulsification/internal ionic gelation in the different treatments exposed to simulated gastrointestinal conditions are presented in Table 2. The initial count of *L. acidophilus* was 7.08 ± 0.05 , 7.55 ± 0.23 , 7.70 ± 0.02 and 7.13 ± 0.08 log CFU g⁻¹ for the PECL, PHML, PINL and PRBL treatments respectively. The free microorganism had an initial count of 11.28 ± 0.12 log CFU g⁻¹. Gastric juice is generally the greatest barrier to the survival of probiotic microorganisms during passage through the gastrointestinal tract, followed by pancreatic juice and bile salts from the small intestine (Del Piano et al., 2011). Therefore, it is of fundamental importance to test the novel probiotic formulations for their resistance to gastric and intestinal juices. The cell encapsulation can increase its survival due to the protection conferred by the wall material.

In relation to the viability of the freeze-dried microparticles, after 90 min exposure to simulated esophagus/stomach conditions at pH 2.0, a significant reduction ($p < 0.5$) was observed for all treatments when compared to their initial count. This reduction is not due to the loss of viability, but to the fact that there was no total rupture of the particles, thus resulting in the non-release of the microorganism.

After exposure of the microparticles to the acidic environment, probiotic survival was higher in the microparticles with the pectin (PECL) and pectin + hi-maize (PHML) treatments compared to the others, since they presented a smaller reduction in their initial count. Similarly, Etchepare et al., (2016) reported lower *Lactobacillus acidophilus* loss of viability in freeze-dried microcapsules containing hi-maize during simulated gastrointestinal tract conditions compared to microcapsules without the prebiotic.

Regarding the free microorganism, after simulation of the acidic conditions, it presented a reduction of 0.34 log in relation to its initial count. This study is in accordance with the one developed by Laelorspoen, Wongsasulaka, Yoovidhya & Devahastin (2014), who observed a reduction in the number of free *L. acidophilus* cells after incubation in simulated gastric fluid at pH 1.2 for 2h. Similarly, Kim et al. (2008) suggested that unencapsulated *L. acidophilus* ATCC 43121 was sensitive to the acidic environment (pH 1.2 and 1.5) and ingestion of unencapsulated probiotic may result in reduced viability.

After the passage simulation through the duodenum (pH 5.0 with presence of pancreatin and bile salts), the viable cell population of the free microorganism decreased even more significantly ($p < 0.5$), with a reduction of 2.86 log CFU g⁻¹ compared to its initial count. In relation to the microencapsulated microorganism, PINL and PRBL treatments did not present significant difference in comparison to the results obtained after simulation of the acidic conditions. On the other hand, a significant increase ($p < 0.5$) in the quantity of probiotics released from the microparticles was observed for the PECL and PHML treatments, thus demonstrating a greater rupture of the microparticles. As for the consequent increase in the cell count in comparison with the acidic conditions, however, there was no total release of the microorganism, since the microcapsules promoted its protection.

After 200 min (passage simulation through the ileum at pH 6.5), the free microorganism presented reduction of 3.30 log CFU g⁻¹ in relation to its initial count. On the other hand, logarithmic reductions of 1.28, 0.1, 1.6 and 1.03 were observed for the PECL, PHML, PINL and PRBL microparticles, respectively, when compared with time zero. Therefore, in comparison to the free microorganism, the microparticles of all treatments offered greater protection to probiotics at the end of the gastrointestinal simulation.

Maciel, Chaves, Grosso & Gigante (2014) microencapsulated *L. acidophilus* La-5 in microcapsules of sweet whey or skimmed milk by spray drying and observed that in comparison with free microorganisms, the survival of microencapsulated *L. acidophilus* La-5 was significantly higher at the end of the simulated gastrointestinal conditions, indicating the protective effect of microencapsulation in both materials. Coghetto et al., (2016) used electrospraying to microencapsulate *Lactobacillus plantarum* in sodium alginate or in sodium alginate + citric pectin matrices and observed large losses of viability of free probiotic cells when incubated during 120 min of gastric juice simulation and in simulated intestinal juice. In contrast, when the cells were microencapsulated in both treatments, they presented significant resistance under the same simulation. Holkem et al., (2016b) microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 by internal gelation followed by freeze-drying and concluded that microencapsulated probiotics presented higher resistance during 200 minutes through the gastrointestinal tract passage simulation when compared to the free microorganism.

Moreover, microparticle rupture of all treatments was observed in greater quantity in the ileum, releasing the *Lactobacillus acidophilus* cells at their desired location. Nevertheless, to exert its beneficial effects on the host, it is recommended that probiotics should contain at least a viable cell number of 10^6 - 10^7 CFU/g (Tian et al., 2015). Both the free microorganism and the microparticles of the PHML, PINL and PRBL treatments were within the required conditions. The PECL treatment, however, reached the end of simulation with a count of 5.80 ± 0.17 log CFU g⁻¹.

It was observed that treatment containing hi-maize (PHML) presented little loss of viability, showing the best stability (7.45 ± 0.03 log CFU g⁻¹) at the end of the gastrointestinal conditions simulation ($p < 0.05$). In the present study, by using the internal ionic gelation technique, the prebiotic hi-maize was more efficient to protect the encapsulated probiotics than in the study developed by Zou et al. (2011), in which the addition of hi-maize to alginate microcapsules obtained by internal ionic gelation did not improve the survival of the encapsulated probiotics ($P > 0.05$) after passage through the simulated gastric juice.

3.4 Viability of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 under different storage conditions

An important aspect for the commercialization of food products containing probiotics is cell viability over the storage period. Table 3 shows the stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 during 120 days of storage under temperatures of 25°C, 7°C and -18°C, simulating different environmental conditions. In order to obtain health benefits

from the ingestion of probiotic bacteria, the concentration of live microorganisms in the product should be above 10^6 CFU g^{-1} or ml^{-1} at the moment of consumption (FAO/WHO, 2001).

At room temperature (25°C) the PINL treatment was able to maintain the number of viable *L. acidophilus* cells in the standards required by the legislation for a period of 90 days (6.35 ± 0.02 log CFU g^{-1}). However, treatments PHML and PRBL remained viable for up to 75 days (6.59 ± 0.10 and 6.08 ± 0.03 log CFU g^{-1} , respectively), with significant differences between each other ($p < 0.5$). Meanwhile, the PECL treatment lost its viability after a period of 60 days. It can be observed from these results that the addition of prebiotics (hi-maize, inulin and rice bran) increased the viability of the microencapsulated and freeze-dried probiotics during storage at 25°C.

Excellent results from the incorporation of prebiotics into microparticles containing probiotics were also reported by Silva et al., (2015), who produced dry microcapsules containing *L. acidophilus* by spray drying technique and used as wall material a mixture composed of cellulose acetate phthalate, glycerol, whole milk powder, maltodextrin, trehalose, frutoligosaccharide, hi-maize 260 and Tween 80. The microcapsules maintained their viability for a period of 120 days at 25°C. In another study developed by Shoji et al. (2013), the authors did not obtain the same positive results by microencapsulating *Lactobacillus acidophilus* by complex coacervation followed by freeze-drying. The authors reported significant loss of viability ($p < 0.05$) after 30 days at 37°C.

In relation to storage at freezing temperature, the number of viable *L. acidophilus* cells remained above 6 log CFU g^{-1} only for 30 days for the PECL treatment. In accordance with these results, Sousa et al., (2013) used alginate to microencapsulate *Lactobacillus acidophilus* by extrusion and observed that the freezing temperature (-20°C) had a negative impact on the probiotic survival for 60 days. Meanwhile, similarly at 25°C, the prebiotics microparticles presented better performances to guarantee the viability of the microorganism for a longer period. Among the prebiotic treatments, the most important were PINL and PRBL, maintaining the viability of the microorganism from 105 to 120 days with significant differences between them ($p < 0.5$). The PHML treatment, however, remained viable for 45 days (6.55 ± 0.03 log UFC g^{-1}).

Regarding the refrigeration temperature on the viability of *L. acidophilus*, it was observed that the addition of rice bran (PRBL) to the microparticles, not only benefited them with functional compounds, but also showed a remarkable performance. It promoted the protection and increase of viability of probiotics, which remained stable at the end of 120

days of storage with counts of $6.58 \pm 0.04 \log \text{CFU g}^{-1}$. Thus, the reduction of *L. acidophilus* in PRBL treatment was only 0.88 log cycles after 120 days.

The PINL treatment, also presenting a great performance, remained viable for 105 days ($6.07 \pm 0.01 \log \text{CFU g}^{-1}$) with a reduction of only 1.61 log CFU g⁻¹. The PECL treatment maintained the number of viable cells stable for 90 days, with counts of $6.40 \pm 0.05 \log \text{CFU g}^{-1}$. Finally, the PHML treatment maintained probiotic stability for 45 days ($6.32 \pm 0.01 \log \text{CFU g}^{-1}$).

Studies have reported that lower temperatures lead to improved cell viability rates due to the reduction of possible chemical reactions that are harmful to microorganisms, but the mortality of the cells increases with the storage time (Corcoran, Roos, Fitzgerald & Stanton, 2004; Tsen, Huang & King, 2007).

The present study showed better results than the ones obtained by Holkem et al., (2016a) who used the internal gelation technique to microencapsulate *Bifidobacterium* BB-12 in alginate. The produced microcapsules maintained the viability of the microorganism only for two weeks storage at 7°C, with subsequent decline ($<106 \text{CFU g}^{-1}$), which remained for 120 days. Likewise, Oliveira (2006) used pectin and casein to microencapsulate *B. lactis* by coacervation followed by spray drying. The viability of the microorganism began to decrease in the first 30 days, which resulted in a final decrease of 4.34 log after 120 days of storage under refrigeration.

From these data, it is possible to infer that the prebiotic rice bran is able to confer greater protection to the microorganisms in pectin microparticles obtained by emulsification/internal ionic gelation followed by freeze-drying during the course of 120 days at 7°C.

4. Conclusion

It has been observed that microparticles with prebiotic addition, prepared by emulsification/internal gelation, represent an efficient system to promote the resistance of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 through the gastrointestinal tract passage simulation. At 25°C and -18°C, it was observed that the addition of prebiotics presented better results to guarantee the viability of the microorganism when compared to pectin microparticles (PECL). At 7°C, the treatment that stood out was PRBL, since it was able to keep the microorganism viable for 120 days. At 25°C, the highest performance was achieved in the PINL treatment, remaining stable for 90 days, and at -18°C the treatments PINL and PRBL stood out, with viability ranging from 105 to 120 days of storage. Finally, at 7°C, the highest viability was

achieved with addition of rice bran (PRBL) for a period of 120 days. Therefore, it is concluded that the hi-maize, inulin and rice bran compounds not only attributed to the microparticles prebiotic effects of great health interest, but they are also capable of increasing the resistance of the *L. acidophilus* pectin microcapsules by internal gelation, conferring them a protective effect and may be alternative means for the development of new functional foods.

5. References

- Cabrera, J. C., Cambier, P., & Cutsem, P. V. (2011). Drug encapsulation in pectin hydrogel beads-A systematic study of stimulated digestion media. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 3(5), 292-299.
- 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), 185–189. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.06.022.
- Chotiko, A., & Sathivel, S. (2016). Three protective agents for pectin-rice bran capsules for encapsulating *Lactobacillus plantarum*. *Food Bioscience*, 16, 56–65. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2016.10.001>
- 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>
- Corcoran, B.M., Roos, R. P., Fitzgerald, G. F., Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024–1039. doi:10.1111/j.1365-2672.2004.02219.x
- Del Piano, M., Carmagnola, S., Ballare, M., Sartori, M., Orsello, M., Balzarini, M., Pagliarulo, M., Tari, R., Anderloni, A., Strozzi, G. P., Mogna, L., Sforza, F., & Capurso, L (2011). Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. *Gut Microbes*, 2(2), 120–123. DOI: 10.4161/gmic.2.2.15784
- 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>
- 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
- 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.
- Flamm, G., Glinsmann, W., Kritchevsky, D., Prosky, L., & Roberfroid, M. (2001). Inulin and oligofructose as dietary fiber: a review of the evidence. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 10.1080/20014091091841
- 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].
- Franck, A. (2002). Technological functionality of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, 87, S287-S291. DOI: 10.1079/BJN/2002550
- Ham, H., Yoon, S. W., Kim, I.-H., Kwak, J., Lee, J.-S., Jeong, H.-S., & Lee, J. (2015). Protective effects of unsaponifiable matter from rice bran on oxidative damage by modulating antioxidant enzyme activities in HepG2 cells. *LWT – Food Science and Technology*, 61(2), 602–608. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.12.047>
- 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. (2016a). 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>
- 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>
- Homayouni, A., Amini, A., Khodavirdi, A.K., Mortazavian, A.M., Esazadeh, K., Pourmoradian, S. (2014). Resistant starch in food industry: A changing outlook for consumer and producer. *Starch/Stärke*, 66, 102–114. DOI 10.1002/star.201300110

- Iqbal, S., Bhangar, 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
- 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
- Kets, E. P. W., Teunissen, P. J. M., & De Bont, J. A. M. (1996). Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. *Applied and Environmental Microbiology*, 62, 259–291.
- Kim, S.-J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O.-J., Shin, II-S., Cha, D. S., Park, H. J. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT* , 41, 493–500. doi:10.1016/j.lwt.2007.03.025
- Komiyama, Y., Andoh, A., Fujiwara, D., Ohmae, H., Araki, Y., Fujiyama, Y., Mitsuyama, K., Kanauchi, O. (2011). New prebiotics from rice bran ameliorate inflammation in murine colitis models through the modulation of intestinal homeostasis and the mucosal immune system. *Scandinavian Journal of Gastroenterology*, 46(1), 40–52. DOI: 10.3109/00365521.2010.513062
- Krasaekoopt, W., Bhandari, B., Deeth. H. (2003). Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, 13, 3-13. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00155-3](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00155-3)
- 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*, 57, 761–766. doi:10.1016/j.lwt.2014.01.037.
- 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>
- Laelorspoen, N., Wongsasulaka, S., Yoovidhya, T., Devahastin, S. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein–alginate core–shell microcapsules via electrospraying. *Journal of Functional Foods*, 7, 342–349. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.01.026>
- Maciel, G. M., Chaves, K. S., Grosso, C. R. F., & Gigante, M. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as

- encapsulating materials. *Journal of Dairy Science*, 97, 1991-1998. <https://doi.org/10.3168/jds.2013-7463>
- 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
- Martin, 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2013.03.019>
- McMaster, L. D., Kokott, S. A., & Slatter, P. (2005). Micro-encapsulation of *Bifidobacterium lactis* for incorporation into soft foods. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 21, 723–728. DOI 10.1007/s11274-004-4798-0
- Moongngarm, A., Daomukda, N., & Khumpika, S. (2012). Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ. *APCBEE Procedia*, 2, 73–79. doi: 10.1016/j.apcbee.2012.06.014
- Nag, A., Han, K.-S., Singh, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21, 247–253. doi:10.1016/j.idairyj.2010.11.002
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Nicolaus, B., Poli, A., & Orlando, P. (2012). The prebiotic source influences the growth, biochemical features and survival under simulated gastrointestinal conditions of the probiotic *Lactobacillus acidophilus*. *Anaerobe*, 18, 280 –285. doi:10.1016/j.anaerobe.2012.03.002.
- Nunes, G. L., Etchepare, M. A., Cichoski, A. J., Zepka, L. Q., Lopes, E. J., Barin, J. S., Flores, E. M. M., Silva, C. B., & Menezes, C. R. (2018). Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. *LWT - Food Science and Technology*, 89, 128–133. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>.
- Oliveira, A.C. (2006). Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP
- O’Riordan, K., Andrews, D., Buckle, K., & Conway, P. (2001). Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. *Journal of Applied Microbiology* 91 (6), 1059–1066. 10.1046/j.1365-2672.2001.01472.x

- Ozer, D. (2005). Effect of inulin and lactulose on survival of *Lactobacillus Acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium bifidum* BB-02 in acidophilus-bifidus yoghurt. *Food Science and Technology International*, 11(1), 19e24. [http:// dx.doi.org/10.1177/1082013205051275](http://dx.doi.org/10.1177/1082013205051275)
- Pankasemsuk, T., Apichartsrangkoon, A., Worametrachanon, S., & Techarang, J. (2016). Encapsulation of *Lactobacillus casei* 01 by alginate along with hi-maize starch for exposure to a simulated gut model, *Food Bioscience*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2016.07.001>
- Poncelet, D., Lencki, R., Beaulieu, C., Halle, J. P., Neufeld, R. J., & Fournier, A. (1992). Production of alginate beads by emulsification internal gelation. 1. Methodology. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 38(1), 39-45.
- Sheu, T. Y., & Marshall, R. T. (1993). Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. *Journal of Food Science*, 54(3), 557-561.
- 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>
- 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
- Silva, P. T., Fries, L. L. M., Menezes, C. R., Silva, C. B., Soriani, H. H., Bastos, J. O., Motta, M. H., Ribeiro, R. F. (2015). Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. *Ciência Rural*, 45 (7), 1342-1347. <http://dx.doi.org/10.1590/0103-8478cr20140211>
- Solanki, H. K., Pawar, D. D., Shah, D. A., Prajapati, V. D., Jani, G. K., Mulla, A. M., & Thakar, P. M. (2013). Development of Microencapsulation Delivery System for Long-Term Preservation of Probiotics as Biotherapeutics Agent. *BioMed Research International*. <http://dx.doi.org/10.1155/2013/620719>
- Song, H., Yu, W., Gao, M., Liu, X., & Ma, X. (2013). Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. *Carbohydrate Polymers*, 96, 181–189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.03.068>
- 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. (2013). Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and Bioproducts Processing*. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2013.11.007>

- Tian, W., Song, J., Wang, Y., Yue, L., Wang, J., Dan, T., & Zhang, H. (2015). Effect of different calcium salts and methods for triggering gelation on the characteristics of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* LIP-1. *RSC Advances*, 5, 73352–73362. 10.1039/C5RA13354H
- Tonon, R. V., Brabet, C., Pallet, D., Brat, P., & Hubinger, M. D. (2009). Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced with different carrier agents. *International Journal of Food Science and Technology*, 44, 1950–1958. doi:10.1111/j.1365-2621.2009.02012.x
- Tsen, J.H.; Huang, H.Y.; King, A.E. (2007). Enhancement of freezing-resistance of *Lactobacillus rhamnosus* by the application of cell immobilization. *Journal of General and Applied Microbiology*, v. 53, p. 215–219.
- 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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.06.049>
- Wicker, L., Kim, Y., Kim, M.-J., Thirkield, B., Lin, Z., & Jung, J. (2014). Pectin as a bioactive polysaccharide extracting tailored function from less. *Food Hydrocolloids*, xxx, 1-9. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2014.01.002>
- Zou, Q., Zhao, J., Liu, X., Tian, F., Zhang, H., Zhang, H., & Chen, H. (2011). 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. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2011.02685.x
- 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.2012.06.031.

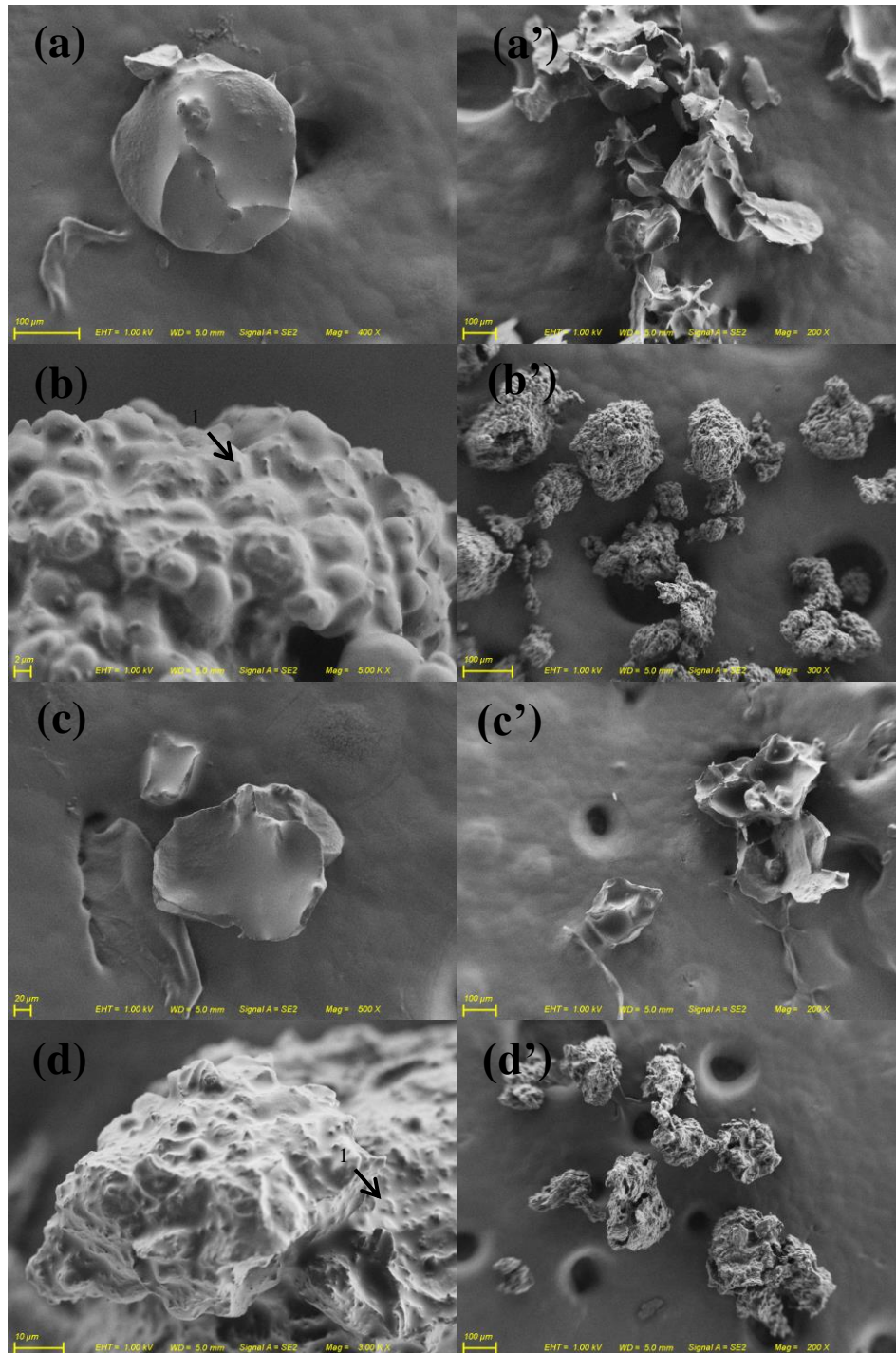


Fig 1. Scanning electron microscopy of freeze-dried pectin microparticles with different prebiotic sources containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal ionic gelation.

a) = freeze-dried microparticles of 1% pectin (PECL) (400x); a') = freeze-dried microparticles of 1% pectin (PECL) (200x); b) = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% hi-maize (PHML) (1.00 k x), where number 1 shows the presence of microorganisms in the wall material; b') = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% hi-maize (PHML) (300x); c) = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% inulin (PINL) (500x); c') = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% inulin (PINL) (200x); d) = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% rice bran (PRBL) (1.00 k x), where number 1 shows the presence of microorganisms in the wall material; d') = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% rice bran (PRBL) (200x).

Table 1 – Characteristics of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 microparticles obtained by internal ionic gelation with pectin and different prebiotic sources.

	PECL	PHML	PINL	PRBL
Particles size (μm)	192 ± 6.26^c	166 ± 2.17^d	345 ± 8.83^a	$200 \pm 4,98^b$
Water activity	0.21 ± 0.01^c	0.19 ± 0.01^d	0.25 ± 0.01^a	0.23 ± 0.01^b
Encapsulation efficiency EE (%)	64.86 ± 0.57^c	66.68 ± 0.06^{ab}	68.11 ± 0.55^a	66.24 ± 0.82^{bc}

PECL = freeze-dried microparticles of 1% pectin; PHML = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% hi-maize; PINL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% inulin; PRBL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% rice bran.

Means followed by the same lowercase letter in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

Table 2 - Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA-5 in freeze-dried form in the different treatments after each step of the simulated gastrointestinal conditions

	Free culture	PECL	PHML	PINL	PRBL
Initial count	11.28 ± 0.12 ^{aA}	7.08 ± 0.05 ^{aC}	7.55 ± 0.23 ^{aB}	7.70 ± 0.02 ^{aB}	7.13 ± 0.08 ^{aC}
Esophagus / stomach 90 min / pH 2.0	10.94 ± 0.09 ^{bA}	2.86 ± 0.03 ^{dC}	2.74 ± 0.12 ^{cC}	5.33 ± 0.09 ^{cB}	5.51 ± 0.07 ^{cB}
Duodenum 20 min / pH 5.0	8.42 ± 0.02 ^{cA}	3.81 ± 0.03 ^{cC}	3.19 ± 0.05 ^{bD}	5.33 ± 0.25 ^{cB}	5.53 ± 0.26 ^{cB}
Ileum 90 min / pH 6.5	7.98 ± 0.08 ^{dA}	5.80 ± 0.17 ^{bC}	7.45 ± 0.03 ^{aB}	6.10 ± 0.17 ^{bC}	6.10 ± 0.17 ^{bC}

PECL = freeze-dried microparticles of 1% pectin; PHML = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% hi-maize; PINL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% inulin; PRBL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% rice bran.

Means followed by the same lowercase letter in column and uppercase in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

Table 3 – Effect of room temperature (25°C), freezing (-18°C) and refrigeration (7°C) on viability of freeze-dried microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 produced with different encapsulation matrices during storage for 120 days.

Temperature		Room (25 °C)			
Treatments Time (Days)	PECL	PHML	PINL	PRBL	
0	7.31 ± 0.06 ^{abC}	7.52 ± 0.01 ^{aAB}	7.68 ± 0.06 ^{aA}	7.46 ± 0.09 ^{aBC}	
15	6.69 ± 0.08 ^{cbB}	7.45 ± 0.02 ^{aA}	7.43 ± 0.03 ^{bcA}	6.64 ± 0.18 ^{bbB}	
30	7.56 ± 0.17 ^{aA}	7.48 ± 0.03 ^{aA}	7.37 ± 0.02 ^{ca}	7.52 ± 0.18 ^{aA}	
45	7.02 ± 0.06 ^{bcB}	7.42 ± 0.12 ^{aA}	7.55 ± 0.05 ^{abA}	6.74 ± 0.05 ^{bc}	
60	6.90 ± 0.04 ^{cb}	7.09 ± 0.04 ^{ba}	6.66 ± 0.06 ^{dc}	6.55 ± 0.01 ^{bc}	
75	5.57 ± 0.04 ^{dc}	6.59 ± 0.10 ^{ca}	6.46 ± 0.04 ^{ca}	6.08 ± 0.03 ^{cb}	
90	5.33 ± 0.24 ^{dc}	5.95 ± 0.09 ^{db}	6.35 ± 0.02 ^{ca}	5.59 ± 0.13 ^{dbc}	
105	4.72 ± 0.07 ^{ec}	5.74 ± 0.11 ^{da}	3.94 ± 0.06 ^{id}	5.15 ± 0.02 ^{eb}	
120	1.94 ± 0.12 ^{id}	5.49 ± 0.09 ^{ca}	3.22 ± 0.04 ^{gc}	4.20 ± 0.10 ^{ib}	
Temperature		Freezing (-18 °C)			
Treatments Time (Days)	PECL	PHML	PINL	PRBL	
0	7.31 ± 0.06 ^{aC}	7.52 ± 0.01 ^{aAB}	7.68 ± 0.06 ^{aA}	7.46 ± 0.09 ^{aBC}	
15	6.69 ± 0.08 ^{bb}	7.16 ± 0.13 ^{ba}	6.43 ± 0.03 ^{cc}	7.29 ± 0.03 ^{abA}	
30	6.75 ± 0.12 ^{bb}	7.71 ± 0.02 ^{aA}	6.46 ± 0.11 ^{cc}	6.73 ± 0.09 ^{cb}	
45	5.40 ± 0.04 ^{cc}	6.55 ± 0.03 ^{cb}	6.85 ± 0.25 ^{bb}	7.37 ± 0.10 ^{aA}	
60	5.07 ± 0.16 ^{dc}	5.08 ± 0.13 ^{dec}	6.69 ± 0.04 ^{bcB}	7.08 ± 0.01 ^{ba}	
75	5.09 ± 0.03 ^{dc}	5.04 ± 0.04 ^{dec}	6.43 ± 0.05 ^{cb}	6.82 ± 0.08 ^{ca}	
90	4.90 ± 0.05 ^{dc}	4.99 ± 0.01 ^{dec}	6.39 ± 0.04 ^{cb}	6.71 ± 0.12 ^{ca}	
105	4.14 ± 0.02 ^{ec}	5.20 ± 0.06 ^{db}	5.20 ± 0.06 ^{db}	6.08 ± 0.02 ^{da}	
120	3.69 ± 0.16 ^{id}	4.93 ± 0.09 ^{ec}	6.86 ± 0.07 ^{ba}	5.96 ± 0.03 ^{db}	
Temperature		Refrigeration (7 °C)			
Treatments Time (Days)	PECL	PHML	PINL	PRBL	
0	7.31 ± 0.06 ^{aC}	7.52 ± 0.01 ^{aAB}	7.68 ± 0.06 ^{aA}	7.46 ± 0.09 ^{aBC}	
15	6.69 ± 0.08 ^{bcB}	6.35 ± 0.31 ^{bb}	6.43 ± 0.03 ^{cb}	7.43 ± 0.16 ^{aA}	
30	6.58 ± 0.02 ^{bcdB}	6.54 ± 0.06 ^{bb}	6.33 ± 0.08 ^{cdC}	6.88 ± 0.06 ^{ba}	
45	6.81 ± 0.09 ^{ba}	6.32 ± 0.01 ^{bcB}	6.65 ± 0.01 ^{ba}	6.74 ± 0.14 ^{ba}	
60	6.55 ± 0.05 ^{bcdA}	5.94 ± 0.02 ^{cdC}	6.24 ± 0.02 ^{deB}	6.79 ± 0.17 ^{ba}	
75	6.55 ± 0.20 ^{cdA}	5.88 ± 0.21 ^{db}	6.07 ± 0.06 ^{eb}	6.74 ± 0.09 ^{ba}	
90	6.40 ± 0.05 ^{dAB}	4.96 ± 0.10 ^{ec}	6.22 ± 0.12 ^{deB}	6.62 ± 0.16 ^{ba}	
105	3.42 ± 0.05 ^{ed}	4.65 ± 0.06 ^{ec}	6.07 ± 0.01 ^{eb}	6.87 ± 0.07 ^{ba}	
120	3.80 ± 0.02 ^{id}	4.20 ± 0.03 ^{ic}	5.76 ± 0.02 ^{ib}	6.58 ± 0.04 ^{ba}	

PECL = freeze-dried microparticles of 1% pectin; PHML = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% hi-maize; PINL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% inulin; PRBL = freeze-dried microparticles of 1% pectin + 10% rice bran.

Means followed by the same lowercase letter in column and uppercase in line do not differ statistically from each other by the Tukey test with significance of 5%. Means found in triplicate.

5. DISCUSSÃO GERAL

5.1 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS

5.1.1 Morfologia e tamanho das micropartículas

A morfologia das micropartículas úmidas foi vista através de microscopia óptica, sendo possível observar que, em geral, as micropartículas dos diferentes tratamentos apresentaram forma esférica com superfície lisa e tamanho uniforme. Já a estrutura das micropartículas liofilizadas foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV), onde as micropartículas dos quatro tratamentos apresentaram uma forma elíptica e uma superfície com aspecto rugoso. O aspecto rugoso na superfície das partículas pode estar relacionado à sublimação rápida da água congelada a partir da matriz de encapsulação, resultando na formação de cavidades em áreas onde estavam os cristais de gelo (SMRDEL et al., 2008).

Em relação ao diâmetro das micropartículas, as micropartículas úmidas apresentaram diâmetros médios variando de 24,4 (pectina) - 462 μm (pectina + inulina), enquanto isso, o tamanho das micropartículas liofilizadas variou de 166 μm (pectina + hi-maize) a 345 μm (pectina + inulina), em função da hidratação e intumescimento do material de parede.

Tamanhos de micropartículas menores que 100 μm são considerados vantajosos por não interferirem no aspecto sensorial dos alimentos (HANSEN et al., 2002). Apesar disso, geralmente maiores tamanhos de micropartículas propiciam uma melhor proteção dos microrganismos contra as condições adversas do ambiente (SANDOVAL-CASTILLA, 2010). Deste modo, o tamanho ideal para uma micropartícula é um fator discutível, pois varia de acordo com as aplicações desejadas (ROSAS-FLORES, 2013).

5.1.2 Análises físico-químicas

As análises físico-químicas demonstraram altos níveis de umidade das micropartículas úmidas, em média, 95,11%, 80,61%, 96,16% e 87,50% para os tratamentos pectina (PEC), pectina + hi-maize (PHM), pectina + inulina (PIN) e pectina + farelo de arroz (PRB), respectivamente, valores que podem ser justificados pela grande capacidade de retenção de água do material de parede. Os resultados apresentaram cerca de 0,43 a 1,60% de matéria

mineral, enquanto isso, o perfil lipídico variou entre 1,15 - 2,76%, sendo este valor resultante do óleo presente na superfície da partícula decorrente da técnica de encapsulação. O teor de carboidratos variou de 1,29 - 15,64%, devido aos compostos utilizados como material de parede. Por fim, o teor de proteínas variou entre 0,14 - 2,12%.

Quanto às micropartículas liofilizadas, as micropartículas de todos os tratamentos apresentaram valores abaixo de 0,25. A capacidade de um produto sofrer alterações está diretamente relacionada com o conteúdo de água presente no alimento e é justamente nesse fator que a liofilização visa atuar. Ao se reduzir o conteúdo de água do produto, concentra-se simultaneamente os solutos, e diminui-se o risco de alterações (RIBEIRO, 2012).

5.2 EFICIÊNCIA DE ECAPSULAÇÃO

As matrizes de encapsulação farelo de arroz e inulina apresentaram a maior eficiência de encapsulação para as micropartículas úmidas, de 91.24% e 90.59%, respectivamente, já para as liofilizadas, a maior eficiência de encapsulação foi resultante da matriz de encapsulação pectina + inulina, de 68,11%. Ainda para as micropartículas liofilizadas, o tratamento PHML alcançou EE% de 66.68% e o tratamento PRBL de 66.24%, sendo possível inferir que todos os tratamentos contendo prebióticos apresentaram maior EE% quando comparados com o tratamento contendo somente pectina (64.86%).

Vários estudos têm relatado um aumento na eficiência de encapsulação de bactérias probióticas com o uso de compostos prebióticos. YING et al. (2016) estudou diferentes combinações de agentes encapsulantes para melhorar a proteção de *Lactobacillus rhamnosus* GG, descobrindo que uma combinação de agentes encapsuladores na presença de amido resistente era mais eficiente na proteção deste microrganismo. RAJAM & ANANDHARAMAKRISHNAN, (2015) relataram que a adição de galacto-oligossacarídeos e fruto-oligossacarídeos a microcápsulas de maltodextrina e a proteína de leite isolada aumentaram a viabilidade de *Lactobacillus plantarum* microencapsulado.

5.3 VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* LA-5 LIVRE EM MICROPARTÍCULAS ÚMIDAS E LIOFILIZADAS APÓS EXPOSIÇÃO A CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS.

Na avaliação da sobrevivência dos probióticos livres às condições gastrointestinais simuladas pôde-se perceber que o probiótico *Lactobacillus acidophilus* LA-5 apresentou uma redução após a simulação do estômago/esôfago. Estes resultados mostram que o probiótico *L. acidophilus* é uma cepa sensível ao ácido e às enzimas gástricas, visto que sua exposição a estas condições resultou em um decréscimo significativo sobre a sua viabilidade. Este fato está de acordo com os estudos desenvolvidos por GEBARA et al., (2013) e DIMITRELLOU et al., (2016), que mostram que este microrganismo é sensível às condições ácidas resultantes da passagem pelo trato gastrointestinal.

Quanto à viabilidade das micropartículas úmidas, a exposição das células microencapsuladas em condições ácidas (simulação do esôfago/estômago) resultou em uma redução significativa ($p < 0,5$) para todos os tratamentos quando comparados à sua contagem inicial. Esta redução não se deve à perda de viabilidade, mas sim, ao fato de que não houve ruptura total das partículas, resultando assim, na não liberação do microrganismo. Isso demonstra que o processo de microencapsulação conferiu proteção às bactérias probióticas na simulação gastrointestinal. O mesmo ocorreu para as microcápsulas liofilizadas em todos os tratamentos.

Enquanto isso, após a simulação da passagem pelo duodeno (na presença de sais biliares, pancreatina e pH 5,0) para as micropartículas úmidas, populações mais altas de *L. acidophilus* La-5 foram observadas em todos os tratamentos, demonstrando assim, que ocorreu uma maior ruptura, o que levou à maior contagem de células em comparação com as condições ácidas. No entanto, não houve liberação total dos microrganismos, visto que as micropartículas mantiveram-se íntegras. O mesmo ocorreu para as micropartículas liofilizadas para os tratamentos PECL e PHML, já os tratamentos PINL e PRBL não apresentaram diferença significativa em comparação com os resultados obtidos após a simulação da passagem pelo esôfago/estômago.

Para as micropartículas úmidas e liofilizadas, ao fim da análise, após a passagem pelo íleo (pH 6.5), observou-se que o número de células viáveis permaneceu acima de 6 log UFC g⁻¹ tanto para o microrganismo livre quanto microencapsulado, com exceção do tratamento PECL para as micropartículas liofilizadas, estando o restante dos tratamentos dentro dos requisitos exigidos para que os probióticos exerçam efeitos benéficos (FAO / OMS, 2001). Foi observado que ocorreu o rompimento de todas as micropartículas, tanto úmidas quanto liofilizadas nesta seção do trato gastrointestinal simulado, liberando as células probióticas no seu local desejado.

Também foi possível observar que, em comparação com o microrganismo livre, as micropartículas úmidas e liofilizadas de todos os tratamentos ofereceram maior proteção aos probióticos ao fim da simulação gastrointestinal, visto que, comparado a sua contagem inicial, o microrganismo sofreu menor perda de viabilidade ao final da simulação do íleo para todos os tratamentos na forma úmida e liofilizada em comparação com o microrganismo livre.

O mesmo foi relatado por, NUNES et al., (2018), que observaram que micropartículas de hi-maize e trealose contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 permitiram maior proteção ao probiótico durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal quando comparado com as células livres. Da mesma forma, KINGWATEE et al., (2015) relataram melhor impacto na taxa de sobrevivência do probiótico *L. casei* 01 microencapsulado com suco de lichia e inulina nos sucos gástricos e biliares. MOAYYEDI et al., (2018) utilizaram 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 observaram que as micropartículas ofereceram maior proteção ao probiótico ao longo de 120 minutos de simulação da passagem pelo TGI quando comparadas ao microrganismo livre.

A produção de micropartículas de pectina em associação com diferentes prebióticos tanto na forma úmida como liofilizada se mostrou um meio eficaz de entrega do probiótico *L. acidophilus* a nível intestinal, ajudando a manter a sua sobrevivência durante a passagem simulada pelo trato gastrointestinal.

5.4 VIABILIDADE DE *Lactobacillus acidophilus* LA-5 EM DIFERENTES CONDIÇÕES DE ARMAZENAMENTO NA FORMA ÚMIDA E LIOFILIZADA.

Em relação á avaliação da viabilidade dos probióticos microencapsulados durante o armazenamento em diferentes condições de temperaturas, a 25 °C as micropartículas úmidas, de todos os tratamentos se mantiveram viáveis durante o período de 120 dias de armazenamento. Já para as micropartículas liofilizadas, o número de células viáveis de *L. acidophilus* foi mantido por um período de 90 dias para o tratamento PINL (6.35 ± 0.02 log UFC g⁻¹). Já os tratamentos PHML e PRBL, se mantiveram viáveis por até 75 dias (6.59 ± 0.10 e 6.08 ± 0.03 log UFC g⁻¹, respectivamente), com diferenças significativas entre si

($p < 0,5$). Enquanto isso, o tratamento PECL se manteve viável por período de 60 dias. Observa-se a partir destes resultados que para as micropartículas liofilizadas, a adição de prebióticos (hi-maize, inulina e farelo de arroz) propiciou um aumento na viabilidade dos probióticos microencapsulados durante o armazenamento a 25 °C.

À temperatura ambiente, há uma maior atividade metabólica dos microrganismos, que podem produzir ácidos metabólicos, bacteriocinas ou sofrer perda de substratos durante o armazenamento (OKURO et al., 2013). Nesse estudo, no entanto, excelentes resultados foram obtidos, visto que tanto as micropartículas úmidas quanto liofilizadas mantiveram o microrganismo viável por um bom período de tempo.

ETCHEPARE et al. (2016) também obtiveram bons resultados ao armazenar *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado em alginato juntamente com amido resistente (hi-maize) a uma temperatura de 25°C. As micropartículas mantiveram os microrganismos estáveis por 135 dias de armazenamento. Já MARTIN et al., (2013) microencapsularam *Lactobacillus fermentum* CECT5716 usando alginato e amido pela técnica de emulsão. Após liofilização e armazenamento sob temperatura ambiente observou-se perda de viabilidade do microrganismo após duas semanas.

Em relação ao armazenamento à temperatura de congelamento o tratamento contendo apenas pectina se manteve viável por 15 dias para as micropartículas úmidas ($8.91 \pm 0.18 \log \text{ UFC g}^{-1}$) e por 30 dias para as liofilizadas ($6.75 \pm 0.12 \log \text{ UFC g}^{-1}$). Já os tratamentos contendo os prebióticos hi-maize, inulina e farelo de arroz foram capazes de estender a viabilidade probiótica tanto na forma úmida quanto liofilizada, mantendo os probióticos viáveis por um período de 90 dias para os tratamentos PHM e PRB e de 30 dias para o tratamento PIN, enquanto isso, os tratamentos PINL e PRBL se mantiveram viáveis por cerca de 105-120 dias e o tratamento PHML por 45 dias. CHEN et al. (2005) também relataram que a incorporação de prebióticos a micropartículas aumentou a sobrevivência de probióticos microencapsulados durante o armazenamento. Da mesma forma, FRITZEN-FREIRE et al. (2012) observaram que microcápsulas contendo inulina enriquecida com oligofrutose proporcionaram uma melhor proteção do probiótico *Bifidobacterium* BB-12 armazenadas a 4 e -18 ° C por 180 dias.

Enquanto isso na temperatura de refrigeração (7 °C), tanto para as micropartículas úmidas quanto liofilizadas, observou-se que o tratamento que se destacou foi o das micropartículas adicionadas de farelo de arroz, que permaneceram estáveis ao final dos 120 dias de armazenamento, com contagens $8.36 \pm 0.08 \log \text{ UFC g}^{-1}$ para o tratamento PRB e de $6.58 \pm 0.04 \log \text{ UFC g}^{-1}$ para o tratamento PRBL. A perda de viabilidade dos demais

tratamentos durante o armazenamento nesta temperatura pode ocorrer devido a fatores como, a oxidação dos ácidos graxos, formação de radicais livres na presença de oxigênio e danos no DNA celular (PEDROSO et al., 2012). Percebe-se por este resultado que a adição do prebiótico farelo de arroz às micropartículas de pectina contendo *L. acidophilus* e obtidas por gelificação interna é capaz de aumentar a viabilidade probiótica por um longo período de tempo em armazenamento a 7 °C tanto na forma úmida quanto liofilizada.

Para que a produção de micropartículas contendo probióticos possa ser realizada industrialmente e em larga escala, mais testes de estabilidade de armazenamento são necessários, como por exemplo, estabilidade de armazenamento em níveis de umidade diferentes e estabilidade em diferentes sistemas alimentares (YING et al., 2013).

6. CONCLUSÕES

As micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* LA-5 apresentaram morfologia típica e em sua maioria tamanho de partícula adequado para a aplicação em alimentos. Para as micropartículas úmidas uma maior EE% foi obtida nos tratamentos PFA e PIN, de 91,24% e 90,59% respectivamente, enquanto que para as micropartículas liofilizadas a maior EE% foi resultante do tratamento PINL de 68,11%. Tanto as micropartículas úmidas como as liofilizadas protegeram os microrganismos frente aos testes gastrointestinais simulados.

As micropartículas úmidas apresentaram altos níveis de umidade (80,61% - 96,16%). O teor de cinzas variou de 0,43 a 1,60% e os níveis de lipídeos e carboidratos variaram entre 1,15 - 2,76% e 1,29 - 15,64%, respectivamente. Em relação ao teor de proteína, o tratamento PRB apresentou níveis mais elevados em relação aos demais tratamentos (2,12%).

A seleção do melhor tratamento é dependente da matriz alimentar na qual a micropartícula será introduzida. Para as micropartículas úmidas na temperatura de 25 °C, os probióticos permaneceram viáveis em todos os tratamentos no decorrer dos 120 dias. Já na temperatura de -18 °C, os tratamentos PHM e PFA foram capazes de manter o microrganismo viável por um maior período de tempo, de 90 dias. Para as partículas liofilizadas, nas temperaturas de 25 °C e -18°C, os tratamentos que continham prebióticos mantiveram os microrganismos probióticos viáveis por um maior período de tempo. A 7 °C o tratamento PFA se destacou tanto para as partículas úmidas quanto liofilizadas, permanecendo viável ao final dos 120 dias.

Portanto, considera-se que a incorporação de prebióticos na microencapsulação por gelificação interna/emulsificação utilizando pectina além de ser vantajoso por proporcionar o desenvolvimento de uma cápsula funcional, ainda é um meio eficiente para aumentar a proteção de *L. acidophilus* produzindo micropartículas com estabilidade frente a condições adversas como a passagem pelo trato gastrointestinal e a diferentes condições de armazenamento. Além disso, esse método é caracterizado por possuir baixo custo e um potencial aumento de escala industrial.

7. REFERÊNCIAS

- AHMED, M. M.; EL-RASOUL, S. A.; AUDA, S. H.; IBRAHIM, M. A. Emulsification/internal gelation as a method for preparation of diclofenac sodium–sodium alginate microparticle, **Saudi Pharmaceutical Journal**, v. 21, n. 1, p. 61-69, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S131901641100065X>>. Acesso em: 8 ago. 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**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128021897000010>>. Acesso em: 07 jun. 2017.
- ANDERSON, J. W. Dietary fibre, complex carbohydrate and coronary heart disease. **Can. J. Cardiol**, v. 11, p. 55G-62G, 1995.
- ANSON, R. Microencapsulation: for enhanced textile performance, **Performance Apparel Markets, London**, v. 12, n. 12, p. 21-39, May 2005. Disponível em: <<https://www.textilesintelligence.com/tispam/index.cfm?pageid=3&repid=TISPAM&issueid=12&artid=1150>>. Acesso em: 02 jul. 2017.
- ANTUNES, A. E. C.; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probiotics: health promoting agents, **Nutrire: Brazilian Soc. Food Nutr.**, São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, 2007. Disponível em: <http://www.ital.sp.gov.br/tecnolat/arquivos/artigos/probioticos_agentes_promotores_de_saude.pdf>. Acesso em: 27 jul. 2017.
- ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics:100 years (1907-2007) after Élie Metchnikoff's Observation, **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, 2007. Disponível em: <http://works.bepress.com/kingsley_anukam/21/>. Acesso em: 02 jun. 2017.
- ARIHARA, K.; OTA, H.; ITOH, M.; KONDO, Y.; SAMESHIMA, T.; YAMANAKA, H.; AKIMOTO, M.; KANAI, S.; MIKI, T. *Lactobacillus acidophilus* group lactic acid bacteria applied to meat fermentation, **Journal of Food Science**, v. 63, n. 3, p. 544-547, 1998. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.1998.tb15782.x/abstract>>. Acesso em: 15 out. 2017.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying, **LWT - Food Science and Technology**, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815001875?via%3Dihub>>. Acesso em: 18 out. 2017.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling, **LWT - Food Science and Technology**, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817301986>>. Acesso em: 21 set. 2017.

ASCHERIO, A.; RIMM, E. B.; GIOVANNUCCI, E. L.; COLDITZ, G. A.; ROSNER, B.; WILLETT, W. C.; SACKS, F.; STAMPFER, M. J. A prospective study of nutritional factors and hypertension among US men. **Circulation**, v.86, p.1475-1484, 1992. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1330360>>. Acesso em: 08 dez. 2017

AXELOS, M. A. V.; THIBAUT, J. F. The chemistry of low methoxyl pectin. In R. H. Walter, ed., The Chemistry and technology of pectin, 109, **Academic Press, New York**, 1991.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ, A.; BUŠIĆ, A.; BARIŠIĆ, L.; VRSALJKO, D.; KARLOVIĆ, S.; ŠPOLJARIĆ, I.; VOJVODIĆ, A.; MRŠIĆ, G.; KOMES, D. Emulsion templated microencapsulation of dandelion (*Taraxacum officinale L.*) polyphenols and β -carotene by ionotropic gelation of alginate and pectin, **Food Hydrocolloids**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0268005X16300200>>. Acesso em: 07 set. 2017.

BEZKOROVAINY, A. Probiotics: determinants of survival and growth in the gut, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. S399-S405, 2001. Disponível em: <<http://ajcn.nutrition.org/content/73/2/399s.full.pdf+html>>. Acesso em: 11 set. 2017.

BIMBO, F.; BONANNO, A.; NOCELLA, G.; VISCECCHIA, R.; NARDONE, G.; DEVITIIS, B.; CARLUCCI, D. Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review, **Appetite**, V. 113, p. 141–154, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S019566631730274X>>. Acesso em: 25 mai. 2017.

BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system, **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416-423, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814609009364?via%3Dihub>>. Acesso em: 05 jul. 2017.

BOTELHO, L. Isolamento e Identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em Alimentos Probióticos Disponíveis no Mercado Brasileiro, 2005. Tese (Doutorado Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição), Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP, 2005.

BOUHNİK, Y.; POCHART, P.; MARTEAU, P.; ARLET, G.; GODEREL, I.; RAMBAUD, J. C. Fecal recovery in humans of viable of *Bifidobacterium sp* ingested in fermented milk, **Gastroenterology**, v. 102, n. 3, p. 875-878, 1992. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/001650859290172U>>. Acesso em: 02 ago. 2017.

BRACCINI I.; S. PÉREZ. Molecular basis of Ca²⁺-induced gelation in alginates and pectins: The Egg-Box model revisited, **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1089-1096, 2001. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bm010008g>>. Acesso em: 19 mar. 2017.

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.

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.

CARVALHO, J. L. V.; BASSINELLO, P. Z. Aproveitamento Industrial. In: SANTOS, A. B.; STONE, L. F.; VIEIRA, N. R. (Ed.). A cultura do arroz no Brasil. 2 ed. Santo Antônio de Goiás: Embrapa Arroz e Feijão, p. 1118. 2006.

CASTILLO, N. A.; PERDIGÓN, G.; LEBLANC, A. M. Oral administration of a probiotic *Lactobacillus* modulates cytokine production and TLR expression improving the immune response against *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in mice, **BMC Microbiology**, v. 11, p. 177, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/51543906_Oral_administration_of_a_probiotic_Lactobacillus_modulates_cytokine_production_and_TLR_expression_improving_the_immune_response_against_Salmonella_enterica_serovar_Typhimurium_infection_in_mice>. Acesso em: 08 nov. 2017.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices, **International Journal of Food microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21803436>>. Acesso em: 25 nov. 2017.

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus spp.* in simulated gastric conditions, **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, n. 1, p. 27-35, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0167701203002483?via%3Dihub>>. Acesso em: 01 ago. 2017.

CHARALAMPOPOULOS, D.; RASTALL, R. A. Prebiotics in foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2. p. 187-191, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958166911007713?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 ago. 2017.

CHEN, K.N., CHEN, M.J., LIU, J.R., LIN, C.W., CHIU, H.Y. Optimization of incorporated prebiotics as coating materials for probiotic microencapsulation, **J. Food Sci.** 70(5), M260-M266, 2005.

CHOTIKO, A.; SATHIVEL, S. Three protective agents for pectin-rice bran capsules for

encapsulating *Lactobacillus plantarum*, **Food Bioscience**, v. 16, p. 56–65, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212429216301092?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 mai. 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.

CRITTENDEN, R. G.; MORRIS, L. F.; HARVEY, M. L.; TRAN, L. T.; MITCHELL, H. L.; PLAYNE, M. Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. **Journal of Applied Microbiology**, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11168730>>. Acesso em: 09 nov. 2017.

CUI, J.; GOH, J.; KIM, P.; CHOI, S.; LEE, B. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 210, n. 1–2, p. 51–59, 2000. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378517300005603?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

DAVIS, L.; MARTINEZ, I.; WALTER, J.; HUTKINS, R. A dose dependent impact of prebiotic galactooligosaccharides on the intestinal microbiota of healthy adults, **International journal of food microbiology**, v. 144, n. 2, p. 285–292, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168160510005593>>. Acesso em: 18 nov. 2017.

DE PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: a focus on microencapsulation tool, **Trends in Food Science & Technology**, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S092422441530087X>>. Acesso em: 03 set. 2017.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; PETROVIĆ, T.; DIMITRIJEVIĆ-BRANKOVIĆ, S.; LEVIĆ, S.; NEDOVIĆ, V.; KOURKOUTAS, Y. Survival of spray dried microencapsulated *Lactobacillus casei* ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk, **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 169-174, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381630144X?via%3Dihub>>. Acesso em: 01 jul. 2017.

DOS REIS, S. A.; DA CONCEIÇÃO, L. L.; SIQUEIRA, N. P.; DAMIANA D. R.; DA SILVA, L. L.; PELUZIO, M. C. G. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer, **Nutrition Research**, 2016. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0271531716303943>>. Acesso em: 13 set. 2017.

DUNNE, C.; O'MAHONY, L.; MURPHY, L.; THORNTON, G.; MORRISSEY, D.; O'HALLORAN, S.; FEENEY, M.; FLYNN, S.; FITZGERALD, G.; DALY, C.; KIELY, B.; O'SULLIVAN, G. C.; SHANAHAN, F.; COLLINS, J. K. In vitro selection criteria for probiotic bacteria of human origin: correlation with in vivo findings, **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 386–92, 2001. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11157346>>. Acesso em: 12 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**, v. 21, p. 321-329, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464615006295?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 set. 2017.

FABIAN, C.; JU, Y.-H. A review on rice bran protein: its properties and extraction methods, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 51, p. 816–827, 2011. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21888532>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - a review, **Trends in Food Science & Technology**, v.21, p.510-523, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224410001925?via%3Dihub>>. Acesso em: 04 out. 2017.

FAO/ WHO. Food and Agriculture Organization of the United Nations / World Health Organization. Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria: Report of a Joint Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FAO Technical Meeting on Prebiotics. Food Quality and Standards Service (AGNS), Food and Agriculture Organization of the United Nations (FAO), September 15-16, 2007.

FERNANDES, L. P.; CANDIDO, R. C.; OLIVEIRA, W. P. Spray drying microencapsulation of *Lippia sidoides* extracts in carbohydrate blends, **Food and Bioproducts Processing**, Rugby, v. 90, n. 9, p. 425-432, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S096030851100109X?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 ago. 2017.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION - FAO. Economic and social department: the statistic division, 2005.

FRAEYE, I.; COLLE, I.; VANDEVENNE, E.; DUVETTER, T.; BUGGENHOUT, S. V.; MOLDENAERS, P.; LOEY, A. V.; HENDRICKX, M. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels, *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, V. 11, n. 2, p. 401-409, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1466856409001106?via%3Dihub>>. Acesso em: 06 jul. 2017.

FRIEDMAN, M. Nutritional value of proteins from different food sources. A review. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 44, p. 6–29, 1996. Disponível em: <<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf9400167>>. Acesso em: 22 out. 2017.

FRITZEN-FREIRE, C. B., PRUDÊNCIO, E. S., AMBONI, R. D. M. C., PINTO, S. S., NEGRÃO-MURAKAMI, A. N., & MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics, **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996911005539>>. Acesso em: 21 dez. 2017.

GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectine whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 872-878, 2013. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996913001014>>. Acesso em: 07 set. 2017.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R.. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview, **Food Research International**, v. 40, p. 1107-1121, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996907001238?via%3Dihub>>. Acesso em: 03 fev. 2017.

GIBSON, G. R.; PROBERT, H. M.; LOO, J. V.; RASTALL, R. A.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: Updating the concept of prebiotics, **Nutrition Research Reviews**, v. 17, p. 259–275, 2004. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19079930>>. Acesso em: 14 dez. 2016.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota – introducing the concept of prebiotics. **J. Nutr.**, v.125, p.1401-1412, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7782892>>. Acesso em: 15 dez. 2017.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review, **International Journal of Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213- 224, 1999. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/096374899101256>>. Acesso em: 22 mar. 2017.

GILABERT, J. P. Degradación enzimática y características físicas y químicas de la pectina del bagazo de melocotón. Tese de Doutoramento, Universitat de Lleida, Salamanca, 0000. Disponível em: <<file:///C:/Users/Greice/Downloads/degradacion-enzimatica-y-caracteristicas-fisicas-y-quimicas-de-la-pectina-del-bagazo-de-melocoton--0.pdf>>. Acesso em: 18 out. 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 in Food Science and Technology**, v. 10, n. 4, p. 139-157, 1999. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224499000333>>. Acesso em: 09 jul. 2017.

GONSALVES, J.K.M.C.; COSTA, A.M.B.; DE SOUSA, D.P.; CAVALCANTI, S.C.H.; NUNES, R.S. Microencapsulação do óleo essencial de *Citrus sinensis* (L) Osbeck pelo método da coacervação simples, **Scientia Plena**, v. 5, n. 11, p. 1-8, 2009. Disponível em: <<https://www.scientiaplenua.org.br/sp/article/view/750/403>>. Acesso em: 26 mai. 2017.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends, **Food Science and Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0924224403002723?via%3Dihub>>. Acesso em: 08 jun. 2017.

GRANT, G. T.; MORRIS, E. R.; REES, D. A.; SMITH, P. J. C.; THOM, D. Biological interactions between polysaccharides and divalent cations: the egg box model, **FEBS Letters**, v. 32, p. 195-198, 1973. Disponível em: <[http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793\(73\)80770-7/abstract;jsessionid=A68D8187E14984EE800BCE4B0CD526E8.f03t03](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1016/0014-5793(73)80770-7/abstract;jsessionid=A68D8187E14984EE800BCE4B0CD526E8.f03t03)>. Acesso em: 23 ago. 2017.

HAM, H., YOON, S. W., KIM, I.-H., KWAK, J., LEE, J.-S., JEONG, H.-S., LEE, J. Protective effects of unsaponifiable matter from rice bran on oxidative damage by modulating antioxidant enzyme activities in HepG2 cells, **LWT – Food Science and Technology**, v. 61, n. 2, p. 602–608, 2015. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814008366>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

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.

HARTI, A. S.; NURHIDAYATI, A.; HANDAYANI, D. The Potential of Rice Bran and Chito-Oligosaccharide as Natural Prebiotic on Traditional Tempe in Indonesia. **International Journal of Bioscience, Biochemistry and Bioinformatics**, v. 3, n. 6, 2013. Disponível em: <<http://www.ijbbb.org/papers/296-A30006.pdf>>. Acesso em: 12 mai. 2017.

HAULY, M. C. O.; MOSCATTO J. A. Inulina e oligofrutoses: uma revisão sobre propriedades funcionais, efeito prébiótico e importância na indústria de alimentos, **Semin. Cienc. Exatas Tecnol.**, v. 23, n. 1, p. 105-18, 2002. Disponível em: <<http://www.uel.br/revistas/uel/index.php/semexatas/article/view/1542>>. Acesso em: 02 abr. 2017.

HEMAISWARYA, S.; RAJA, R.; RAVIKUMAR, R.; CARVALHO, I. S. Mechanism of action of probiotics, *Brazilian Archives of Biology and Technology*, v. 56, p. 113–119, 2013. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-89132013000100015&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 24 abr. 2017.

HI-MAIZE NATIONAL STARCH, 2009. Disponível em <<http://www.hi-maize.com.br>> Acesso em: 01 jun. 2017.

HOEFLER, A. C. *Hydrocolloids*, **Eagan Press, Minnesota**, p.78-82, 2004.

JARIWALLA, R.J. Rice-bran products: phytonutrients with potential applications in preventive and clinical medicine, **Drugs Exp. Clin. Res.**, n. 27, p. 17-26, 2001. Disponível em:

<<https://www.ricebrantech.com/downloads/studies/Cardiac2PotentialAppsMedicine.pdf>>.

Acesso em: 19 jun. 2017.

KHANI, S.; HOSSEINI, H. M.; TAHERI, M.; NOURANI, M. R.; FOOLADI, A. A. I. Probiotics as an alternative strategy for prevention and treatment of human diseases: a review, **Inflammation and Allergy-Drugs Targets**, v. 11, p. 78-89, 2012. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22280243>>. Acesso em: 26 jul. 2017.

KIM, S.P.; PARK, S.O.; LEE, S.J.; NAM, S.H.; FRIEDMAN, M. A polysaccharide isolated from the liquid culture of *Lentinus edodes* (Shiitake) mushroom mycelia containing black rice bran protects mice against Salmonellosis through upregulation of the Th1 immune reaction, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, p. 2384–2391, 2014. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24593132>>. Acesso em: 19 ago. 2017.

KINGWATEE, N.; APICHARTSRANGKON, A.; CHAIKHAM, P.; WORAMETRACHANON, S.; TECHARUNG, J.; PANKASEMSUK, T. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials, **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 847-853, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381400783X>>. Acesso em: 01 nov. 2017.

KNUDSEN, K. E. B; HESSOV, I. Recovery of inulin from Jerusalem artichoke (*Helianthus tuberosus* L.) in the small intestine of man, **British Journal of Nutrition**, v. 74, p. 101-113, 1995. Disponível em:

<<https://pdfs.semanticscholar.org/6a1e/02f97deaa43b4a0678ab361fb03dade117c3.pdf>>.

Acesso em: 07set. 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: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694602001553?via%3Dihub>>.

Acesso em: 11 jul. 2017.

KURDI, P.; HANSAWASDI, C. Assessment of the prebiotic potential of oligosaccharide mixtures from rice bran and cassava pulp, **LWT – Food Science and Technology**, v. 63, n. 2, p. 1288–1293, 2015. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643815002996>>. Acesso em: 10 jan. 2018.

LAKKIS, J. M.; CHEN, M.J.; CHEN, K.N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products, **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. Wiley-Blackwell, USA, p. 83–107, 2007.

LIU, Q.; CAO, X.; ZHUANG, X.; HAN, W.; GUO, W.; XIONG, J.; ZHANG, X. Rice bran polysaccharides and oligosaccharides modified by *Grifola frondosa* fermentation: antioxidant activities and effects on the production of NO, **Food Chemistry**, v. 223, p. 49–53, 2017. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28069122>>.

Acesso em: 07 dez. 2017.

LIU, X.; YU, W.; LIN, J.; MA, X.; YUAN, Q. Diffusion of Acetic Acid Across Oil/Water Interface in Emulsification-Internal Gelation Process for Preparation of Alginate Gel Beads, *Chemical Research in Chinese Universities*, v. 23, n. 5, p. 579-584, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1005904007601275?via%3Dihub>>. Acesso em: 31 jul. 2017.

LI, X.Y.; CHEN, X.G.; SUN, Z.W.; PARK, H.J.; CHA, D.-S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393, **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479–1485, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861710007861>>. Acesso em: 03 ago. 2017.

MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review, **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, p. 1-21, 2006. Disponível em: <<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2005.00980.x/abstract>>. Acesso em: 25 ago. 2017.

MALEKIAN, F. et al. Lipase and lipoxygenase activity, functionality, and nutrient losses in rice bran during storage, **Bulletin of the Louisiana Agricultural Experiment Station, Baton Rouge**, n. 870, p. 1-69, 2000. Disponível em: <<http://citeseerx.ist.psu.edu/viewdoc/download?doi=10.1.1.554.8724&rep=rep1&type=pdf>>. Acesso em: 12 jan. 2018.

MANSON, J. E. et al. Body weight and mortality among women. **N. Engl. J. Med.**, v.333, p.677-685, 1995. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7637744>>. Acesso em: 04 dez. 2017.

MARINO, M.; INNOCENTE, N.; CALLIGARIS, S.; MAIFRENI, M.; MARANGONE, A.; NICOLI, M. C. Viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* in structured emulsions containing saturated monoglycerides, **Journal of Functional Foods**, v. 35, p. 51–59, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617302645?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 out. 2017.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716, **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 2, p. 480-486, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S002364381300114X?via%3Dihub>>. Acesso em: 11 out. 2017.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects, **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15–25, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S146685641400160X?via%3Dihub>>. Acesso em: 21 out. 2017.

MCCLEMENTS, D.J. Nanoparticle- and Microparticle-based Delivery Systems. **CRC Press, Boca Raton, FL**, 2015.

MOAYYEDI, M.; ESKANDARI, M. H.; RAD, A. H. E.; ZIAEE, E.; KHODAPARAST, M. H. H.; GOLMAKANI, M.-T. Effect of drying methods (electrospraying, freeze drying and spray drying) on survival and viability of microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, **Journal of Functional Foods**, v. 40, p. 391–399, 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464617306886>>. Acesso em: 18 set. 2017.

MOONGNGARM, A.; DAOMUKDA, N.; KHUMPIKA, S. Chemical compositions, phytochemicals, and antioxidant capacity of rice bran, rice bran layer, and rice germ, **APCBEE Procedia**, v. 2, p. 73–79, 2012. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2212670812000851>>. Acesso em: 03 jan. 2018.

MORAIS, M.B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice, **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 5, p. S189-S197, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0021-75572006000700009>. Acesso em: 29 set. 2017.

MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S. H.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms, **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1- 18, 2007. Disponível em: <http://ijbiotech.com/article_7032_5e3cc6d8d83997d86de1f1e9a98f632b.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2017.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; ORLANDO, P.; COPPOLA, R. Biochemical traits, survival and biological properties of the probiotic *Lactobacillus plantarum* grown in the presence of prebiotic inulin and pectin as energy source, **Pharmaceuticals**, v. 5, n. 5, p. 481–492, 2012. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3763650/>>. Acesso em: 12 out. 2017.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications, *Procedia Food Science*, v. 1, p. 1806-1815, 2011. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211601X11002665?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 set. 2017.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVES, M. C. R. Probióticos - Revisão da Literatura, **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/270061447_Probioticos_-_Revisao_da_Literatura>. Acesso em: 07 nov. 2017.

NUNES, G. L.; ETCHEPARE, M. A.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. M.; SILVA, C. B.; MENEZES, C. R. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 128–133, 2018. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643817307703?via%3Dihub>>. Acesso em: 27 nov. 2017.

OKURO, P. K.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J. C. C.; LIBERAL, R. D. C. O.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. 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, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos, **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, 2002. Disponível em: <<http://www.scielo.br/pdf/rbcf/v38n1/v38n1a02.pdf>>. Acesso em: 04 nov. 2017.

OLIVEIRA, E.G.; ROSA, G.S.; MORAES, M.A.; PINTO, L.A.A. Characteriozation of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Biosource Technology**, v. 100, p. 1297-130, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0960852408005002?via%3Dihub>>. Acesso em: 30 ago. 2017.

OUWEHAND, A.C.; TIIHONEN, K.; MÄKIVUOKKO, H.; RAUTONEN, N. Synbiotics: combining the benefits of pre- and probiotics. In: Saarela, M. (Ed.), **Functional Dairy Products**, v. 2 , p. 195–213, 2007. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9781845691530500092>>. Acesso em: 31 ago. 2017.

PANDEY, A; LARROCHE, C.; SOCCOL, C. R; DUSSAP, C.-G. Advances in Fermentation Technology, **Nova Delhi: Asiatech Publisher Inc**; 2008.

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: <https://www.researchgate.net/publication/6356915_Prebiotics_Probiotics_and_Dietary_Fiber_in_Gastrointestinal_Disease>. Acesso em: 02 nov. 2017.

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.researchgate.net/publication/223694092_Preparation_of_rice_bran_enzymatic_extract_with_potential_use_as_function_food>. Acesso em 06 nov. 2017.

PEDROSO, D. L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling, **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127132, 2012. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0958694612001021>>. Acesso em: 21 out. 2016.

PEREIRA, K. D. Amido resistente, a última geração no controle de energia e digestão saudável, **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v. 27, p. 88-92, 2007. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0101-20612007000500016&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 09 out. 2017.

POWELL, D. A.; MORRIS, E. R.; GIDLEY, M. J.; REES, D. A. Conformation and interactions of pectins. II. Influence of residue sequence on their chain dissociation in calcium

pectate gels, **Journal of Molecular Biology**, v. 155, p. 517-531, 1982. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0022283682904855?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 out. 2017.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying, **LWT-Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 773-780, 2015. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0023643814006185>>. Acesso em 29 out. 2017.

RALET, M.-C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J.-F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties, **Carbohydrate Research**, v. 336, n. 2, p. 117-125, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0008621501002488?via%3Dihub>>. Acesso em: 02 dez. 2017.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy, **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 1-7, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909002749?via%3Dihub>>. Acesso em: 22 nov. 2017.

RATHER, S.A.; AKHTER, R.; MASOODI, F.A.; GANI, A.; WANI, S.M. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297, **LWT - Food Science and Technology**, 2017. Disponível em: <https://www.researchgate.net/publication/316155921_Effect_of_double_alginate_microencapsulation_on_in_vitro_digestibility_and_thermal_tolerance_of_Lactobacillus_plantarum_NCDC201_and_L_casei_NCDC297>. Acesso em: 02 jun. 2017.

RÉ, M. I. Cápsulas inteligentes, **Ciência Hoje**, v. 27, n. 162, p. 24-29, 2000.

RÉ, M. Microencapsulation by spray drying, **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 195-236, 1998. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/07373939808917460>>. Acesso em: 24 out. 2017.

REVUELTA, M. V.; VILLALBA, M. E. C.; NAVARRO, A. S.; GÜIDA, J. A.; CASTRO, G. R. Development of Crystal Violet encapsulation in pectin - Arabic gum gel microspheres, **Reactive and Functional Polymers**. v. 106, p. 8-16, 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1381514816301274?via%3Dihub>>. Acesso em: 14 dez. 2017.

RIBEIRO, P. F. F. A C. 2012. Processo de Liofilização de Produtos Alimentares Perecíveis. Trabalho Final de Mestrado para obtenção do grau de Mestre em Engenharia Mecânica. INSTITUTO SUPERIOR DE ENGENHARIA DE LISBOA Departamento de Engenharia Mecânica.

ROBERFROID, M. B. Inulin-Type Fructans: Functional Food Ingredients, **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2493-2502, 2007.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.; GIBSON, G. R. The bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **J. Nutr.**, n.128, p.11-19, 1998. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9430596>>. Acesso em: 13 jan, 2018.

RODRIGUES, F. C; BORGES, J. T; PIROZI, M. R; FERREIRA, C. L. L. F. Yacon como alimento funcional e fonte de prebiótico. In: FERREIRA, C. L. L. F. **Prebióticos e probióticos: atualização e prospecção**. Rio de Janeiro: Editora Rubio, 2012.

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>. Acesso em: 01 nov. 2017.

RONKART, S. N.; PAQUOT, M.; FOUGNIES, C.; DEROANNE, C.; BLECKER, C. S. Effect of water uptake on amorphous inulin properties, **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 922–927, 2009.

ROKKA, S.; RANTAMAKI, P., Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications, **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, p. 1–12, 2010. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s00217-010-1246-2>>. Acesso em: 04 set. 2017.

ROSAS-FLORES, W.; RAMOS-RAMÍREZ, E. G.; SALAZARMONTOYA, J. A. Microencapsulation of *Lactobacillus helveticus* and *Lactobacillus delbrueckii* using alginate and gellan gum, **Carbohydrate Polymers**, v. 98, n. 1, p. 1011-1017, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0144861713006735?via%3Dihub>>. Acesso em: 15 ago. 2017.

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?via%3Dihub>>. Acesso em: 12 nov. 2017.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte, *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*, v. 42, n. 1, p. 1-12, 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-93322006000100002&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt>. Acesso em: 01 dez. 2017.

SALGADO, S.M.; FARO, Z.P.; GUERRA, N.B; LIVERA, A.V.S. Aspectos físico-químicos e fisiológicos do amido resistente. *Boletim Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos*, v. 23, n. 1, p. 109 – 122, 2005.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H. S.; ALVAREZ RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Textural properties of alginate-pectin beads and survivability of entrapped *Lb. Casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 111–117, 2010. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996909002750>>. Acesso em: 12 out. 2017.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C. R. F. Microcápsulas: uma alternativa viável, **Biotecnologia, ciência e desenvolvimento**. Brasília, n. 16, p. 26-30, 2001. Disponível em: <<http://docplayer.com.br/5884268-Microcapsulas-uma-alternativa-viavel.html>>. Acesso em: 15 nov. 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, **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, v. 3, n. 16, p. 26-30, 2000.

SARKAR, S. Approaches for enhancing the viability of probiotics: A review, **British Food Journal**, v. 112, p. 329 –349, 2010. Disponível em: <<http://www.emeraldinsight.com/doi/pdfplus/10.1108/00070701011034376>>. Acesso em: 12 ago. 2017.

SELLE, K.M.; KLAENHAMMER, T.R.; RUSSELL, W.M. **Encyclopedia of Food Microbiology** (Second Edition), p. 412-417, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780123847300001798>>. Acesso em: 27 out. 2017.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival, **Food Research International**, v. 62, p. 308-314, 2014. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0963996914001744?via%3Dihub>>. Acesso em: 01 nov. 2017.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition, **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361S–4S, 2001.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, Boca Raton, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399309527645>>. Acesso em: 11 dez. 2017.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262–1277, 2007.

SHARMA, A.; YADAV, B.S.; RITIKA. Resistant starch: physiological roles and food application. **Food reviews international**, v. 24, n. 2, p. 194 – 234, 2008.

SHIN, H.-S.; LEE, J.-H.; PESTKA, J. J.; USTUNOL, Z. Growth and viability of commercai *Bifidobacterium spp.* in skim milk containing oligosaccharides and inulin, **Journal of Food Science**, v. 65, p. 884–887, 2000. Disponível em:<<http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2621.2000.tb13605.x/abstract>>. Acesso em: 24 set. 2017.

SHORI, A. B.. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. HAYATI, **Journal of Biosciences**, p. 1-5, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1978301916300171?via%3Dihub>>. Acesso em: 29 nov. 2017.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; HOLKEM, A. T.; SCHWAN, C. L.; WIGMANN, E. F.; BASTOS, J. O.; SILVA, C. B., Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology, **Ciência Rural**, Santa Maria, v. 44, n. 7, 2014. Disponível em:

<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0103-84782014000701304&lng=en&tlng=en>. Acesso em: 04 dez. 2017.

SMRDEL, P.; BOGATAJ, M.; ZEGA, A.; PLANINSEK, O.; MRHAR, A. Shape optimization and characterization of polysaccharide beads prepared by ionotropic gelation, **Journal of Microencapsulation**, v. 25, n. 2, p. 90–105, 2008. Disponível em:

<<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18246487>>. Acesso em: 23 set. 2017.

THAKUR, B. R.; SINGH, R. K.; HANDA, A. K. Chemistry and uses of pectin - a review, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 37, n. 1, p. 47- 73, 1997. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/10408399709527767>>. Acesso em: 12 nov. 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: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464614001716?via%3Dihub>>. Acesso em: 19 out. 2017.

URBANO, A. P. A. Microencapsulação de fármacos peptídicos em pectina pelo método de emulsificação/gelificação interna A albumina como fármaco modelo. Dissertação de mestrado, 2004.

VALCHEVA, R.; DIELEMAN, L. A. Prebióticos: definição e mecanismos de proteção, **Best Practice & Research Gastroenterologia Clínica**, v. 30, n. 1, p. 27-37, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1521691816000123?via%3Dihub>>. Acesso em: 25 set. 2017.

VERNAZZA, C. L.; RABIU, B. A.; GIBSON, G. R. Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotics. In G. R. Gibson & R. A. Rastall (Eds.), **Prebiotics: Development & application** (p. 1–12). England: John Wiley & Sons Ltd, 2006.

WESTERIK, N.; SCHOLTEN, E.; CORREDIG, M. The effect of calcium on the composition and physical properties of whey protein particles prepared using emulsification, **Food Chemistry**, v. 177, p. 72-80, 2015. Disponível em:

<<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0308814614020081?via%3Dihub>>. Acesso em: 13 set. 2017.

WHORTON, C.; REINECCIUS, G. A. Evaluation of the mechanism associated with the release of encapsulated flavor materials from maltodextrin matrices, **Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients**, p. 143-160, 1995. Disponível em:

<<http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bk-1995-0590.ch013>>. Acesso em: 04 nov. 2017.

WORLD GASTROENTEROLOGY ORGANISATION. Probióticos e Prebióticos. Diretrizes Mundiais da Organização Mundial de Gastroenterologia, Guias Mundiais da WGO outubro, 2011.

YING, D.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHI, C.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice, **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 98-105, 2013. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464612001351>>. Acesso em: 27 ago. 2017.

YING, D. Y.; SANQUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BULL, M.; SING, T. K.; AUGUSTIN, M. A. Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics, **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 447-458, 2016. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1756464616301633>>. Acesso em: 04 nov. 2017.