

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

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE  
DE MICROPARTÍCULAS COM *Lactobacillus*  
*acidophilus* OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

**DISSERTAÇÃO DE MESTRADO**

**Mariana de Araújo Etchepare**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**



**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE  
MICROPARTÍCULAS COM *Lactobacillus acidophilus* OBTIDAS  
POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

**Mariana de Araújo Etchepare**

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

**Orientador: Prof. Dr. Cristiano Ragagnin de Menezes**

**Santa Maria, RS, Brasil.**

**2014**

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

Etchepare, Mariana de Araújo  
Produção, caracterização e viabilidade de micropartículas com *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica. / Mariana de Araújo Etchepare.-2014.  
120 p.; 30cm

Orientador: Cristiano Ragagnin de Menezes  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Maria, Centro de Ciências Rurais, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia dos Alimentos, RS, 2014

1. Microencapsulação 2. Probióticos 3. Prebióticos. Simbióticos 4. Alginato 5. Gelificação I. Menezes, Cristiano Ragagnin de II. Título.

---

© 2014

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

E-mail: [marianaaetchepare@hotmail.com](mailto:marianaaetchepare@hotmail.com)

---

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

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

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE  
MICROPARTÍCULAS COM *Lactobacillus acidophilus* OBTIDAS POR  
GELIFICAÇÃO IÔNICA**

elaborada por  
**Mariana de Araújo Etchepare**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA:**

---

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

---

**Leadir Lucy Martins Fries, Dr<sup>a</sup>. (UFSM)**

---

**Elisângela Colpo, Dr<sup>a</sup>. (UNIFRA)**

Santa Maria, 21 de fevereiro de 2014.



*Dedico esta Dissertação  
aos meus pais Sérgio Etchepare e Aira Etchepare,  
por inúmeras vezes abdicarem de seus sonhos em função dos meus.  
Pai, você foi fundamental na elaboração deste trabalho!*





## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus e a Nossa Senhora Mãe Rainha de Schoenstatt pela fé, confiança e tranquilidade nesta caminhada.

A Universidade Federal de Santa Maria pela oportunidade de ingresso no mestrado.

Ao Programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Ao professor Cristiano Ragagnin de Menezes pela excelente orientação, amizade e confiança. Obrigada pela paciência e pelos ensinamentos. Tens o meu eterno reconhecimento.

A todos servidores do Departamento de Tecnologia e Ciência dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Maria.

Ao Laboratório de Fisiologia de Plantas de Interesse Agrobiológico da Universidade Federal de Santa Maria, em especial a Hilda Hildebrand, obrigada pelo seu carinho e palavras de estímulo e apoio.

Ao Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, pelas análises de microscopia ótica, em especial a Mariângela Sá.

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

A Danisco Ingredients Brasil, pela doação das culturas probióticas.

Ao Laboratório 106 do Núcleo de Tecnologia de Alimentos (NTA), aos colegas e alunos de iniciação científica pela ajuda imprescindível na realização deste trabalho.

As minhas queridas colegas de mestrado pela amizade e companheirismo nas horas boas e ruins.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Anderson Bolzan e família, pelo incentivo, apoio e compreensão.

A Bárbara Cecconi Deon, pela oportunidade de ajudar no seu trabalho de pesquisa antes de meu ingresso no mestrado.

E por último, mas não menos importante, agradeço infinitamente aos meus pais amados Sérgio Etchepare e Aira Etchepare e meus irmãos queridos Gianna Etchepare e Sérgio Etchepare. Obrigada por acreditarem em mim e tornarem possível a continuidade na vida acadêmica.



## RESUMO

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

### **PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE MICROPARTÍCULAS COM *Lactobacillus acidophilus* OBTIDAS POR GELIFICAÇÃO IÔNICA**

AUTORA: MARIANA DE ARAÚJO ETCHEPARE

ORIENTADOR: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Local e data de defesa: Santa Maria, 21 de fevereiro de 2014.

No presente trabalho foi desenvolvida uma tecnologia para a produção de micropartículas probióticas onde três formulações contendo *Lactobacillus acidophilus* La-14 foram elaboradas por gelificação iônica externa, utilizando alginato de sódio como principal material de revestimento, adicionando-se também à cápsula amido resistente (Hi-maize) e quitosana. O objetivo deste estudo foi avaliar as microcápsulas na forma úmida e liofilizada, analisando a resistência dos microrganismos ao processo de secagem por liofilização, de estocagem a temperatura ambiente (25° C), de refrigeração (7° C), e de congelamento (-18° C) por 135 dias para as microcápsulas úmidas e 60 dias para as microcápsulas liofilizadas, e a tolerância “*in vitro*” quando inoculados em soluções de pHs simulando o trato gastrointestinal humano, além da morfologia das microcápsulas por microscopia ótica e eletrônica de varredura, bem como o diâmetro médio. Após a secagem por liofilização houve redução logarítmica significativa para todos os tratamentos, indicando que para uma melhor viabilidade é necessário à adição de um agente crioprotetor na formulação das microcápsulas. Em relação à viabilidade avaliada pelo tempo de estocagem para as microcápsulas úmidas, a temperatura ambiente manteve durante 135 dias a viabilidade das microcápsulas, sendo que a adição de prebiótico e quitosana na cápsula melhorou positivamente a viabilidade. Para as temperaturas de congelamento e refrigeração também houve melhores resultados para os tratamentos que continham na composição a adição de prebiótico e quitosana. Analisando as microcápsulas liofilizadas, a temperatura ambiente foi a mais nociva para a viabilidade dos microrganismos, e as temperaturas de refrigeração e congelamento foram viáveis por 60 dias para os tratamentos com adição de prebiótico e quitosana. Em relação aos testes *in vitro* simulando as condições gastrointestinais, tanto as microcápsulas úmidas como as liofilizadas foram resistentes ao pH ácido aumentando sua viabilidade conforme aumento do pH, sendo que para as microcápsulas úmidas o número de células viáveis para todos os tratamentos foi 10<sup>6</sup> log UFC/g, estando dentro dos padrões exigidos para que ocorram os benefícios exercidos pelos probióticos. Em relação ao diâmetro, as micropartículas úmidas apresentaram diâmetros inferiores a 70,37 µm para ambos os tratamentos, enquanto as liofilizadas apresentaram diâmetros maiores em função da hidratação e intumescimento. As micropartículas desenvolvidas neste estudo podem ser um meio alternativo e viável para a obtenção de um produto probiótico a ser incorporado em alimentos, de modo a permitir uma maior sobrevivência das bactérias.

**Palavras-chave:** Microencapsulação. Probióticos. Prebióticos. Simbióticos. Alginato. Gelificação.



## ABSTRACT

Master Dissertation  
Graduate Program on Food Science and Technology  
Federal University of Santa Maria

### **PRODUCTION, CHARACTERIZATION AND VIABILITY OF MICROPARTICLES WITH *Lactobacillus acidophilus* OBTAINED BY IONIC GELATION**

AUTHOR: MARIANA DE ARAÚJO ETCHEPARE

ADVISER: CRISTIANO RAGAGNIN DE MENEZES

Date and Place of Defense: Santa Maria, February, 21<sup>th</sup>, 2014.

In the current work it was developed a technology for the production of probiotic microparticles where three formulations containing *Lactobacillus acidophilus* La-14 were prepared by external ionic gelation, using sodium alginate as the primary coating material, also adding to the capsule resistant starch (Hi-maize), and chitosan. The aim of this study was to evaluate the microcapsules in wet and dry form, analyzing the resistance of microorganisms to the drying process by freeze-drying, storage at room temperature (25° C), cooling (7° C), and freezing (-18° C) for 135 days for the wet microcapsules and 60 days for lyophilized microcapsules, and "in vitro" tolerance when inoculated in solutions of pHs simulating the human gastrointestinal tract, besides the morphology of the microcapsules by optical and electronical microscopy of scanning, as well as the average diameter. After the drying by freeze-drying there was significant logarithmic reduction for all treatments, indicating that for a better viability it is necessary the addition of a cryoprotectant agent. Regarding the viability assessed by the storage time for the wet microcapsules, the room temperature kept for 135 days the viability of the microcapsules, and the addition of prebiotic and chitosan in the capsule and improved significantly the viability. For freezing temperatures and cooling also showed better results for the treatments that contained the composition the addition of prebiotic and chitosan. Analyzing the lyophilized microcapsules, the temperature was more harmful to the viability of the microorganisms, and the temperature of refrigeration and freezing was viable for 60 days for the treatments with addition of prebiotic and chitosan. Regarding to the tests in vitro simulating the gastrointestinal conditions, both wet and lyophilized microcapsules were resistant to acid pH increasing their viability as increasing pH, whereas to the wet microcapsules the number of viable cells for all treatments was 10<sup>6</sup> log UFC/g, being within the required standards so that benefits occur exercised by the probiotics. In relation to the diameter, the wet microparticles had diameters less than 70.37 µm for both treatments, while lyophilized exhibited larger diameters in function of hydration and swelling. The microparticles developed in this study may be a viable alternative for obtaining a probiotic food product be incorporated into half, to allow a higher survival of the bacteria.

**Keywords:** Microencapsulation. Probiotic. Prebiotic. Symbiotic. Alginate. Gelation.



## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AGMU	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize úmidas
AHM	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize
AHML	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize liofilizadas
AHQ	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize aspergidas em solução de quitosana
AHQL	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize aspergidas em solução de quitosana liofilizadas
AHQU	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio + 1% de Hi-maize aspergidas em solução de quitosana úmidas
ALG	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio
ALGL	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio liofilizadas
ALGU	– Microcápsulas elaboradas com 1% de alginato de sódio úmidas
L.	– <i>Lactobacillus</i>
L. acidophilus	– <i>Lactobacillus acidophilus</i>
MRS	– Caldo padrão de crescimento de <i>Lactobacillus</i> (DE MAN, ROGOSA, SHARPE, 1960).
RPM	– Rotação por minuto
UFC	– Unidade formadora de colônias





## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo a seus efeitos sobre a saúde.....	32
Figura 2 – Estrutura da cápsula. ....	35
Figura 3 – Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas.....	35
Figura 4 – Liberação da cápsula .....	36
Figura 5 – Estrutura química do alginato de sódio a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico.....	40
Figura 6 – Estrutura química da Quitosana .....	41
Figura 7 – Modelo “caixa de ovo” para formação de gel de alginato com íons cálcio. ....	44
Figura 8 – Esquema do fluxo de encapsulação de bactérias por meio da técnica de extrusão. ....	45
Figura 9 – Aerógrafo modelo EW 110 .....	48
Figura 10 – Compressor de ar modelo MB24/BV .....	48
Figura 11 – Testes preliminares para testar a distância ideal entre o aerógrafo e a solução iônica. ....	49
Figura 12 – Fluxograma geral da produção e avaliação das microcápsulas.....	51
Figura 13 – Esquema do processo de microencapsulação utilizando um aerógrafo acoplado a um compressor de ar. ....	52
Figura 14 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 10 cm de distância entre o bico do aerógrafo da solução de $\text{CaCl}_2$ .....	61
Figura 15 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 20 cm de distância entre o bico do aerógrafo da solução de $\text{CaCl}_2$ . ....	62
Figura 16 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 30 cm de distância entre o bico do aerógrafo da solução de $\text{CaCl}_2$ . ....	62
Figura 17 – Microscopia ótica de Micropartículas de Alginato (a) Micropartícula de alginato, onde o número 1 está evidenciando o alginato de sódio no interior da partícula e o número 2 está evidenciando o microrganismo dentro da partícula (100X). (b) Micropartículas de alginato aglomeradas (40X). ....	64
Figura 18 – Microscopia ótica de Micropartículas AHM (a) Micropartículas AHM onde, número 1 evidencia o alginato de sódio no interior da partícula e número 2 evidencia o prebiótico Hi-maize (100X). (b) Micropartículas AHM aglomeradas (40X) .....	64
Figura 19 – Microscopia ótica de Micropartículas de AHQ (a) Micropartículas AHQ onde, número 1 evidencia o prebiótico Hi-maize (40X). (b) Micropartículas AHQ aglomeradas (40X). ....	65
Figura 20 – Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato (ALG), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto	

	da micropartícula (1200X); b. Aspecto da micropartícula (750X); c. Superfície da micropartícula evidenciando os microrganismos (6,500X); d. Aspecto da distribuição das partículas formadas (35x). .....	66
Figura 21 –	Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato e Hi-maize (AHM), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto da micropartícula (1,800X); b. Superfície da micropartícula evidenciando o prebiótico Hi-maize e os microrganismos (750X); c. Aspecto da distribuição das partículas formadas (90X); d. Aspecto da distribuição das partículas formadas (650X). .....	67
Figura 22 –	Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato, Hi-maize e quitosana (AHQ), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto da micropartícula (1,700X); b. Aspecto da micropartícula onde o número 1 evidencia o prebiótico Hi-maize (1000X); c. Aspecto da distribuição das partículas formadas (45X); . d. Aspecto da micropartícula (5,000X); .....	68
Figura 23 –	Viabilidade de microcápsulas probióticas nos diferentes tratamentos antes e após o processo de secagem por liofilização. ....	74
Figura 24 –	Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 1,8.....	80
Figura 25 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 1,8. ....	80
Figura 26 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 1,8. ....	81
Figura 27 –	Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 5,0.....	81
Figura 28 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 5,0. ....	81
Figura 29 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 5,0. ....	82
Figura 30 –	Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 7,5.....	82
Figura 31 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 7,5. ....	83
Figura 32 –	Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 7,5. ....	83

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Benefícios Nutricionais atribuídos à ingestão de microrganismos probióticos e possíveis mecanismos de ação.....	29
Tabela 2 – Utilização da microencapsulação em microrganismos probióticos. ....	37
Tabela 3 – Principais materiais de revestimento utilizados na microencapsulação.....	39
Tabela 4 – Etapas das técnicas de encapsulação.....	43
Tabela 5 – Tratamentos empregados na microencapsulação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 .....	53
Tabela 6 – Diâmetro médio das micropartículas produzidas nos diferentes tratamentos. ....	69
Tabela 7 – Umidade (%) das microcápsulas úmidas produzidas nos diferentes tratamentos. ....	71
Tabela 8 – Atividade de água (Aa) das microcápsulas úmidas e liofilizadas produzidas nos diferentes tratamentos.....	72
Tabela 9 – Viabilidade de microcápsulas úmidas ALGU, AHMU e AHQU frente a condições gastrointestinais simuladas, utilizando diferentes pHs, por um período de 360 minutos. ....	76
Tabela 10 – Viabilidade de microcápsulas liofilizadas ALGL, AHML e AHQL frente a condições gastrointestinais simuladas, utilizando diferentes pHs, por um período de 360 minutos. ....	78
Tabela 11 – Viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulados em diferentes tratamentos na forma úmida e liofilizada frente a condições gastrointestinais simuladas.....	84
Tabela 12 – Efeito da temperatura ambiente (25°C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias.....	85
Tabela 13 – Efeito da temperatura de congelamento (18°C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias. ....	87
Tabela 14 – Efeito da temperatura de refrigeração (7°C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias.....	88
Tabela 15 – Efeito da temperatura ambiente (25° C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias. ....	90
Tabela 16 – Efeito da temperatura de refrigeração (7° C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias. ....	91
Tabela 17 – Efeito da temperatura de congelamento (-18° C) na viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias. ....	91

Tabela 18 – Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas. ....	93
-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------	----

## LISTA DE ANEXOS

Anexo A – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio (ALGU) analisadas na forma úmida .....	119
Anexo B – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio (ALGL) analisadas na forma liofilizada .....	119
Anexo C – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Himaize (AHMU) analisadas na forma úmida .....	119
Anexo D – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Himaize (AHML) analisadas na forma liofilizada .....	120
Anexo E – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Himaize + Quitosana (AHQU) analisadas na forma úmida .....	120
Anexo F – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Himaize + Quitosana (AHQL) analisadas na forma liofilizadas.....	120



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>23</b>
<b>1.1 Objetivo geral.....</b>	<b>24</b>
<b>1.2 Objetivos específicos.....</b>	<b>24</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>27</b>
<b>2.1 Probióticos.....</b>	<b>27</b>
2.1.1 Gênero <i>Lactobacillus</i> .....	30
<b>2.2 Prebióticos .....</b>	<b>30</b>
<b>2.3 Simbióticos .....</b>	<b>32</b>
<b>2.4 Desafios tecnológicos na indústria de alimentos para produtos probióticos e simbióticos .....</b>	<b>33</b>
<b>2.5 Microencapsulação .....</b>	<b>34</b>
2.5.1 Aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos .....	36
2.5.2 Microencapsulação de probióticos .....	37
2.5.3 Materiais encapsulantes.....	37
2.5.3.1 Microencapsulação em Alginato de sódio.....	39
2.5.3.2 Quitosana.....	40
<b>2.6 Métodos de encapsulação.....</b>	<b>41</b>
2.6.1 Extrusão / Gelificação Iônica .....	43
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>47</b>
<b>3.1 Materiais.....</b>	<b>47</b>
<b>3.2 Métodos .....</b>	<b>47</b>
3.2.1 Testes Preliminares para a produção das microcápsulas .....	47
3.2.2 Preparo do inóculo.....	49
3.2.3 Produção das microcápsulas .....	49
3.2.4 Secagem das microcápsulas .....	53
3.2.4.1 Secagem por liofilização .....	53
3.2.5 Caracterização morfológica das microcápsulas.....	54
3.2.5.1 Microscopia ótica .....	54
3.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura.....	54
3.2.5.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas .....	54
3.2.6 Umidade das microcápsulas .....	55
3.2.7 Atividade de água das microcápsulas .....	55
3.2.8 Contagem das células viáveis .....	55
3.2.9 Avaliação da resistência de <i>Lactobacillus acidophilus La-14</i> microencapsulados nos diferentes tratamentos ao processo de secagem .....	56
3.2.10 Sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus La-14</i> microencapsulados nos diferentes tratamentos frente às condições gastrointestinais simuladas .....	56
3.2.11 Avaliação da viabilidade das microcápsulas úmidas durante a estocagem em diferentes temperaturas.....	57
3.2.12 Avaliação da viabilidade das microcápsulas liofilizadas durante a estocagem em diferentes temperaturas.....	58
3.2.13 Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas.....	58

3.2.14 Análises estatísticas.....	58
<b>4 RESULTADOS E DISCUSSÕES .....</b>	<b>61</b>
<b>4.1 Testes preliminares para a produção das microcápsulas .....</b>	<b>61</b>
<b>4.2 Caracterizações morfológicas das microcápsulas .....</b>	<b>63</b>
4.2.1 Microscopia ótica .....	63
4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura .....	65
4.2.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas.....	68
<b>4.3 Umidade das microcápsulas .....</b>	<b>70</b>
<b>4.4 Atividade de água das microcápsulas (Aa) .....</b>	<b>71</b>
<b>4.5 Avaliação da resistência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulados nos diferentes tratamentos ao processo de secagem .....</b>	<b>73</b>
<b>4.6 Sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-14 microencapsulados nos diferentes tratamentos frente às condições gastrointestinais simuladas.....</b>	<b>75</b>
<b>4.7 Viabilidade das microcápsulas úmidas durante estocagem em diferentes temperaturas.....</b>	<b>85</b>
<b>4.8 Viabilidade das microcápsulas liofilizadas durante estocagem em diferentes temperaturas.....</b>	<b>89</b>
<b>4.9 Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas.....</b>	<b>92</b>
<b>5 CONCLUSÕES .....</b>	<b>95</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>97</b>
<b>ANEXOS .....</b>	<b>117</b>



# 1 INTRODUÇÃO

A crescente preocupação dos consumidores em conhecer as características dos alimentos levou ao desenvolvimento de produtos que promovam saúde e bem estar além de sua função nutricional (TYOPPONEN et al., 2003). Alimentos funcionais são todos os alimentos ou bebidas que, consumidos na alimentação cotidiana, podem trazer benefícios fisiológicos específicos, graças à presença de substâncias fisiologicamente ativas (CÂNDIDO; CAMPOS, 2005), como por exemplo, os probióticos.

O interesse pela adição de microrganismos probióticos em vários alimentos vêm crescendo como forma de aumentar seus valores nutricionais e terapêuticos (O'SULLIVAN, 2001). Porém, o maior problema encontrado pelas indústrias na aplicação de bactérias probióticas em alimentos funcionais está relacionado à manutenção e viabilidade destas culturas.

As culturas probióticas podem não sobreviver em número suficientemente alto quando submetidas a determinadas condições, como por exemplo, o armazenamento em baixas temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano (HAMILTON-MILLER et al., 1999; KAILASAPATHY; RYBKA, 1997).

Além disso, o efeito dos probióticos está diretamente relacionado com a sua atividade no trato digestivo, e esta depende de sua sobrevivência nesse ambiente. Por isso, essas bactérias devem ser resistentes aos mecanismos de defesa do hospedeiro, incluindo os processos fisiológicos e fisico-químicos do trato gastrintestinal. Portanto, estes microrganismos devem estar presentes no produto em concentração significativa e para que ocorra ação benéfica efetiva no intestino devem ser capazes de sobreviver à alta acidez do estômago e à presença de bile, para colonizá-lo e proliferar (TUOMOLA et al., 2001; BURITI et al., 2005).

Diversas pesquisas têm focado a proteção e viabilidade das culturas probióticas durante a produção, armazenamento e passagem do produto probiótico pelo trato gastrintestinal. Os estudos têm mostrado que as culturas podem ser significativamente protegidas através da técnica de microencapsulação e de imobilização em uma série de substratos, que incluem proteínas do leite e polissacarídeos (ROSS; DESMOND; STANTON, 2005).

O alginato de sódio é um dos polímeros mais empregados como material encapsulante, pois forma uma matriz altamente versátil, biocompatível e não tóxica para a proteção de componentes ativos, células e principalmente microrganismos probióticos, sensíveis ao calor, pH, oxigênio, entre outros fatores em que os alimentos são expostos durante seu processamento e armazenamento (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

Dentre as diversas técnicas de produção de microcápsulas está o processo de gelificação iônica que é simples e de baixo custo, ocorrendo quando uma solução polimérica de alginato de sódio contendo o material núcleo é gotejada sobre uma solução iônica em concentrações adequadas, podendo-se obter níveis de encapsulamento e cápsulas de diferentes formas e tamanhos. Este método resulta na formação instantânea de micropartículas que encapsulam células ou drogas dentro de uma rede tridimensional (VOS et al., 2009).

Com isso, fazem-se necessários mais estudos de novas estratégias para a manutenção destes microrganismos, sendo a microencapsulação um método promissor para a proteção dos probióticos.

## 1.1 Objetivo geral

Produzir, caracterizar e avaliar a viabilidade de micropartículas de *Lactobacillus acidophilus* obtidas por gelificação iônica.

## 1.2 Objetivos específicos

- Desenvolver uma tecnologia para a obtenção de microcápsulas com tamanho adequado para a aplicação em alimentos contendo *Lactobacillus acidophilus* como probiótico;
- Avaliar a influência do prébiótico (amido resistente) e quitosana na sobrevivência do microrganismo na cápsula.
- Avaliar o método de secagem de liofilização na sobrevivência do microrganismo na cápsula.

- Avaliar a estabilidade das microcápsulas úmidas e liofilizadas em diversas condições de pHs, simulando as condições do trato gastrointestinal humano;
- Avaliar a forma, diâmetro e distribuição das microcápsulas úmidas e liofilizadas;
- Acompanhar a viabilidade da cultura probiótica durante o período de tempo de 135 dias para as microcápsulas úmidas e de 60 dias para as microcápsulas liofilizadas nos diferentes tratamentos em temperatura ambiente, de refrigeração e de congelamento.



## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Probióticos**

O conceito de probiótico surgiu no início do século 20 pelo cientista russo Élie Metchnikoff que propôs que a saúde, o bem-estar e a longevidade das populações balcânicas eram atribuíveis ao consumo de grandes quantidades de leite fermentado, contendo microrganismos benéficos (ANUKAM; REID, 2007).

Atualmente, após diversas definições propostas, a definição mais aceita refere-se ao conceito contemporâneo de que probióticos são organismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro quando administrados em quantidades adequadas, cuja ingestão leva a importantes mudanças fisiológicas ao organismo, através do equilíbrio da microbiota intestinal (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF UNITED NATIONS & WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2001; BRASIL, 2008; FOOD AND DRUG ADMINISTRATION, 2004; ANAL; SINGH, 2007).

Para ser classificado como probiótico, o microrganismo deve apresentar as seguintes características: ter identificação taxonômica exata, ser geneticamente estável, ser habitante normal das espécies alvos, ser atóxico e não patogênico, aderir e colonizar o cólon, sobreviver, proliferar e estimular as atividades metabólicas no trato gastrointestinal, resistir ao pH do suco gástrico e a bile, competir no trato gastrointestinal, resistir a bacteriocinas, ácidos e outras substâncias antimicrobianas produzidas pela microbiota residente, ser antagonista a patógenos, exercer efeitos benéficos a saúde (documentados e validados clinicamente) (SUSKOVIC et al., 2001), e deve também, sobreviver, mantendo sua atividade e estabilidade durante o armazenamento do produto (HELLER, 2001).

De acordo com Saier e Mansour (2005) e Oelschlaeger (2010), os probióticos possuem três mecanismos de promoção da saúde humana:

- Fornecer produtos finais da fermentação anaeróbica de carboidratos, como ácidos orgânicos, que podem ser absorvidos pelo hospedeiro, sendo que estes produtos finais são capazes de influenciar o humor, o nível de energia e habilidades cognitivas. Tais ações podem resultar em inativação de toxinas e detoxificação no intestino do hospedeiro.

- Competir diretamente com outros microrganismos, comensais e/ou patogênicos, ou seja, a “exclusão competitiva”, em que os probióticos competiriam com os patógenos por sítios de fixação (HAVENAAR et al., 1992), por nutrientes e/ou através da produção de compostos antimicrobianos, impedindo sua ação transitoriamente. Este princípio é importante para a prevenção e terapia de infecções e restauração do equilíbrio da microbiota e explicaria a necessidade da administração contínua do alimento a fim de conferir seus efeitos benéficos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; KAUR et al., 2002).

- Estimular a resposta imune do hospedeiro pela produção de polissacarídeos específicos, incluindo o sistema imune inato, bem como o adquirido. Este modo de ação é importante para a prevenção e terapia de doenças infecciosas, mas também para o tratamento de inflamação crônica do trato digestivo. Além disso, esta ação pode ser importante para a erradicação das células hospedeiras neoplásicas. No entanto, até o momento, os modos de ação das bactérias probióticas ainda não são totalmente conhecidos (OELSCHLAEGGER, 2010), porém estão sendo estudados.

Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, porém, é importante ressaltar que tais benefícios somente ocorrem se os mesmos estiverem totalmente viáveis nos produtos onde serão incluídos, ou seja, que sobrevivam durante seu processamento e condições de armazenamento, sendo assim ingeridos em quantidades adequadas, alcançando um número viável de microrganismos que permitam exercer resistência sobre os microrganismos patogênicos através da geração de substâncias antimicrobianas como, por exemplo, o ácido lático e outros metabólitos como peróxido de hidrogênio e diacetil, (TAMINE, 1995). Na tabela 1, estão descritos vários benefícios atribuídos ao consumo diário de probióticos com seus possíveis mecanismos de ação.

Outro fator importante é a recomendação diária do consumo de probióticos para que determinados benefícios ocorram. Segundo a FAO/WHO (2002) e Shah (2007) a recomendação é com base na porção diária de microrganismos viáveis que devem ser ingeridos no mínimo 10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup> UFC/g do produto. No Brasil, a legislação recomenda 10<sup>8</sup> – 10<sup>9</sup> UFC na recomendação diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2012a).

Shah (2007), explica que não há uma única cepa capaz de proporcionar simultaneamente todos os benefícios mencionados, sendo importante enfatizar que os benefícios à saúde são cepa-específicos (LUYER et al., 2005; CANANI et al., 2007; KEKKONEN et al., 2007).

Tabela 1 – Benefícios Nutricionais atribuídos à ingestão de microrganismos probióticos e possíveis mecanismos de ação.

<b>Efeitos Benéficos</b>	<b>Possíveis causas e mecanismos</b>
Melhora da digestibilidade e do valor nutricional	- Quebra parcial de proteínas, lipídios e carboidratos; Eleva a concentração de vitamina B e certos aminoácidos como metionina, lisina e triptofano.
Melhora a utilização da lactose	- Reduz a lactose no produto e disponibiliza a lactase.
Ação antagônica aos patogênicos entéricos	- Produção de ácido lático e de acetato, reduzindo o pH do meio, tendo assim, um efeito antibacteriano.
Efeito anticarcinogênico	- Degradação do pré-carcinógeno, redução das enzimas produtoras de células cancerosas e estímulo do sistema imune.
Efeito hipocolesterolêmico	Produção de inibidores da síntese do colesterol; Uso do colesterol pela assimilação e precipitação com desconjugação de sais biliares.
Modulação imunológica	Interação na formação de macrófagos, estímulo da produção de células supressoras de $\gamma$ -interferon.

Fonte: GOMES; MALCATA (1999); OMGE, (2008).

As principais espécies probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* que fazem parte da microbiota do intestino humano, pois exercem efeitos benéficos para a saúde humana e melhoram as propriedades da microbiota nativa (SHAH, 2007; MENEZES; DURRANT, 2008; COOK et al., 2012). No Brasil são aprovadas para uso como probióticos as espécies: *L. acidophilus*, *L. casei shirota*, *L. casei var. rhamnosus*, *L. casei var. defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2012a).

### 2.1.1 Gênero *Lactobacillus*

Dentre os microrganismos probióticos mais utilizados, destacam-se várias cepas de lactobacilos. De acordo com Shah (2007), 56 espécies são reconhecidas como pertencentes ao gênero *Lactobacillus* que são caracterizados como gram-positivos incapazes de formar esporos, desprovidos de flagelos, possuindo forma bacilar ou cocobacilar e aerotolerantes ou anaeróbios.

Espécies deste gênero podem ser homofermentativas, produzindo mais de 85% de ácido láctico a partir da glicose, ou heterofermentativas, produzindo ácido láctico, CO<sub>2</sub>, etanol e/ou ácido acético. A maioria cresce melhor em condições anaeróbias ou microaerófilas. A temperatura ótima de crescimento é de 27°C a 40°C e o crescimento a 15°C ou 45°C variam entre as espécies. São acidúricos, crescendo em pH 4,5 (BERGEY; HOLT, 1994; SILVA et al., 2007).

O *Lactobacillus acidophilus* é o microrganismo mais utilizado e estudado como probiótico nos últimos anos (O'SULLIVAN, 2006). Algumas de suas linhagens podem melhorar o valor nutricional dos produtos aos quais forem adicionados por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (GOMES; MALCATA, 1999), sendo a espécie mais comumente empregada em derivados lácteos, pois seus benefícios à saúde incluem, dentre outros, a redução dos sintomas de intolerância a lactose, a inibição de microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas e a redução dos níveis de colesterol. Além disso, tal microrganismo possui a particularidade de ser pouco afetado pela salinidade do meio, tolerar valores baixos de pH e ser microaeróbio, apresentando crescimento em ambientes com pouca oxigenação, o que resulta numa maior resistência e facilidade de emprego durante a fabricação e armazenamento dos alimentos quando comparado com outras culturas probióticas (GOMES; MALCATA, 1999).

## 2.2 Prebióticos

Os prebióticos são substâncias não digeríveis, resistentes à hidrólise no estômago e no intestino delgado e, portanto, integram a categoria das fibras dietéticas, desempenhando funções importantes sob o aspecto nutricional, fisiológico e imunológico (NINESS, 1999;



GIBSON; ROBERFROID, 2008). Estas fibras afetam benéficamente o hospedeiro por estimularem seletivamente a proliferação de bactérias benéficas no cólon, melhorarem a absorção do cálcio, e possivelmente o metabolismo lipídico e reduzirem o risco de câncer do cólon (GIBSON; ROBERFROID, 1995; CHARALAMPOPOULOS et al., 2003; BIELECKA et al., 2002; SAAD, 2006), conforme figura 1.

Para um ingrediente alimentar ser classificado como um prebiótico é necessário (FOOKS, FULLER & GIBSON, 1999):

- Não sofrer hidrólise e nem ser absorvido na parte superior do trato gastrointestinal;
- Ser um substrato seletivo para um número limitado de bactérias potencialmente benéficas do cólon, que são estimuladas para crescerem e desenvolverem atividades metabólicas;
- Ser capaz de promover uma biota intestinal saudável e, como consequência, induzir efeitos no lúmen que beneficiem o hospedeiro.

O mecanismo de ação definido por Saad (2006) para os benefícios dos prebióticos seria que através de sua fermentação, alguns metabólitos são liberados pelas bactérias no trato intestinal, em especial os ácidos graxos de cadeia curta, como por exemplo, ácido acético, butírico e propiônico que atuam de alguma forma sobre as células intestinais participando do controle de processo de inflamação, de carcinogênese e eliminação de compostos nitrogenados, podendo atuar também no alívio da constipação, na redução de infecções intestinais e na redução do nível do colesterol sérico.

Como exemplos de substâncias prebióticas pode-se citar: oligofrutose, xilooligossacarídeos, inulina, lactulose e o amido resistente (CONWAY, 2001; SIRÓ et al., 2008).

O amido resistente é definido como “a quantidade total de amido, e seus produtos de degradação, resistentes a digestão no intestino delgado de pessoas saudáveis”. Se consumido conforme recomendação, de 8 gramas diárias, promove uma série de benefícios prebióticos (HI-MAIZE, 2009; SHARMA et al., 2008; SALGADO et al., 2005; PEREIRA, 2007).

Outros estudos indicam que o amido resistente pode proteger bactérias probióticas em meios com baixo pH e na presença de sais biliares, aumentando a resistência destas bactérias ao trato gastrointestinal (CONWAY, 2001).

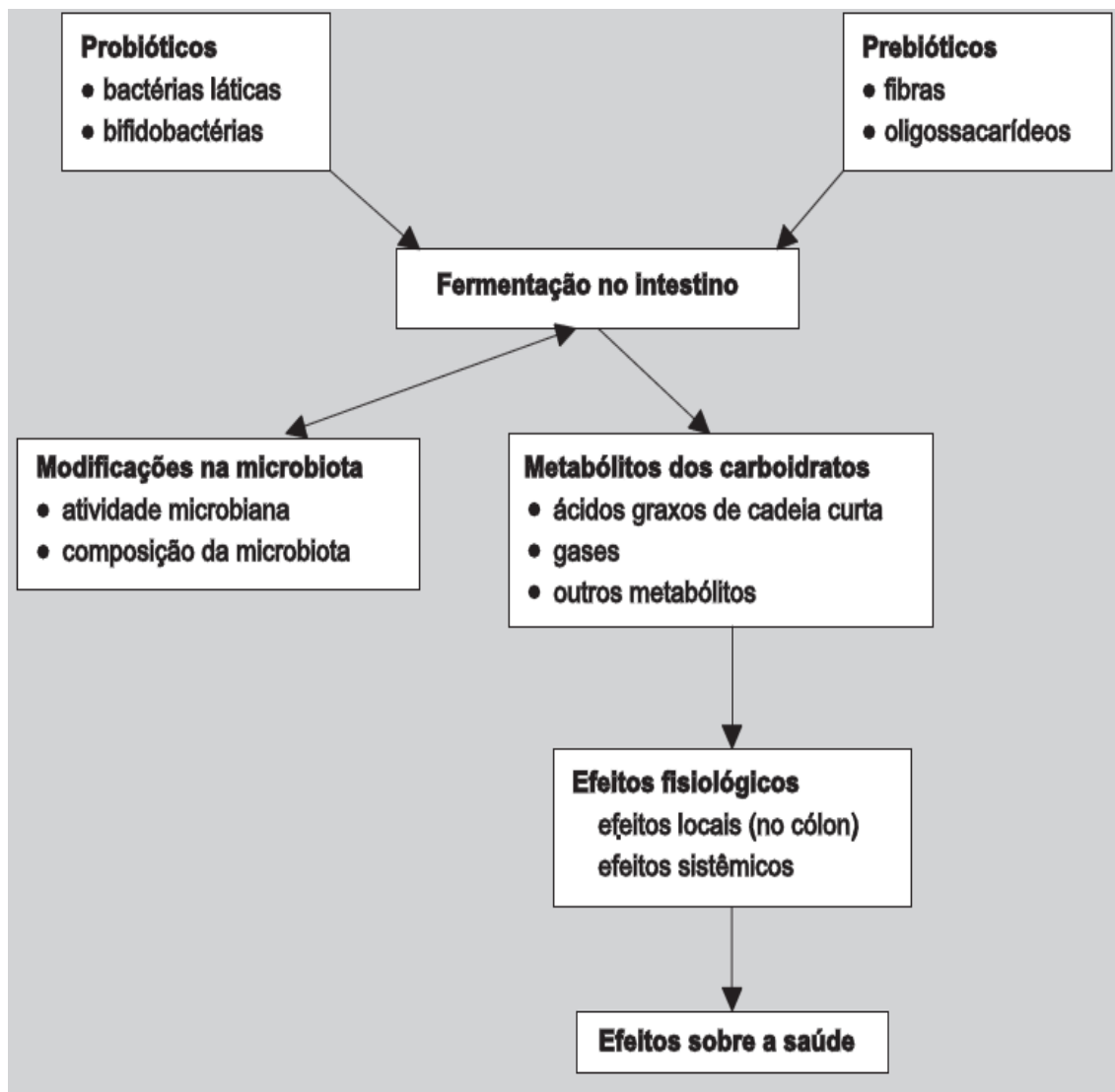


Figura 1 – Reações dos ingredientes alimentares probióticos e prebióticos com a microbiota intestinal, relativo a seus efeitos sobre a saúde.

Fonte: SAAD, 2006.

### 2.3 Simbióticos

O termo simbiótico é utilizado quando o ingrediente alimentar contém tanto os probióticos quanto os prebióticos que afetam o hospedeiro de maneira benéfica (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

Portanto, o consumo de simbióticos pode aumentar a população de microrganismos probióticos no trato intestinal do hospedeiro, tanto por estar ingerindo os microrganismos,

quanto por favorecer a multiplicação das bactérias endógenas através da ingestão dos prébióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995; FOOKS et al., 1999; SAAD, 2006).

#### **2.4 Desafios tecnológicos na indústria de alimentos para produtos probióticos e simbióticos**

Os alimentos probióticos dominam o *marketing* industrial de alimentos funcionais (SEMYONOV, 2010), representando cerca de 65% do mercado mundial (AGRAWAL, 2005) e segundo Jankovic et al. (2010) e Nazzaro et al. (2011) este mercado continua em expansão. Os exemplos mais conhecidos de alimentos probióticos são leites fermentados e iogurtes (NAGPAL et al., 2007), no entanto, outros derivados lácteos como queijos, sorvetes e sobremesas já estão sendo estudados. Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos e isto se deve aos avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos, que resultaram na incorporação de probióticos não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e até mesmo em produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM, 2002).

Sabe-se que o interesse pela adição de probióticos em alimentos buscando aumento do valor nutricional e terapêutico, é crescente nos últimos anos, e várias cepas probióticas têm sido estudadas e exploradas comercialmente em diversos produtos (SOCCOL et al., 2010). Entretanto, a manutenção da viabilidade destes microrganismos durante toda a vida de prateleira do produto que forem adicionados, representa um grande desafio a indústria de alimentos (DOUGLAS; SANDERS, 2008), uma vez que algumas culturas são extremamente sensíveis a fatores como meio ácido e oxigênio (KAILASPATHY; CHIN, 2000).

Justamente por esses fatores, os probióticos são comumente adicionados a produtos lácteos, pois estes contêm proteínas, gorduras, lactose, minerais e vitaminas, sendo considerados nutritivos, e veículos adequados para o desenvolvimento e a sobrevivência destes microrganismos (THAMER; PENNA, 2006). No entanto, ainda existem problemas quanto à baixa viabilidade das bactérias probióticas em alimentos lácteos. Vários fatores que afetam a viabilidade dos probióticos têm sido relatados em produtos lácteos fermentados, incluindo a acidez titulável, o valor de pH e peróxido de hidrogênio, concentração de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento, a interação com outros microrganismos contidos

nos produtos, a concentração de ácido láctico e acético, além da concentração de proteínas (KAILASAPATHY; SUPRIADI, 1996; CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

Por outro lado, alimentos com baixo valor nutritivo, reduzida atividade de água (como cereais e queijos duros) e baixo pH (como sucos), apresentam condições desfavoráveis para a sobrevivência dos mesmos. Nesses alimentos, para a incorporação de bactérias probióticas, é necessário utilizar tecnologias que protejam o microrganismo do meio externo e aumentem sua viabilidade no produto (OROSCO; KUNIGK, 2012).

Estudos indicam que a elevada população viável de bactéria probiótica em produtos alimentícios no momento do consumo não garante sobrevivência após a chegada das células ao intestino. O baixo pH do estômago, juntamente com a presença de sais biliares no intestino delgado, são as principais razões para um declínio drástico na viabilidade das células (MORTAZAVIAN; SOHRABVANDI, 2006).

Sendo assim, uma das técnicas que vem sendo estudada com o objetivo de proteger os microrganismos frente a meio ácidos, sais biliares e oxigênio é a microencapsulação (OLIVEIRA et al., 2007a).

## 2.5 Microencapsulação

A microencapsulação compreende um conjunto de diversas técnicas que permitem o desenvolvimento de formulações, em que o seu conteúdo é protegido e sua liberação pode ser modificada com o objetivo de atuar num determinado local, por um determinado período de tempo e uma velocidade específica (SUAVE et al., 2006).

Esta técnica viabiliza a proteção de compostos, sendo empregada em diversas áreas, como na indústria farmacêutica, de alimentos e de cosméticos, sendo o seu principal objetivo proteger o material encapsulado das condições adversas do meio e liberá-lo em seu sítio de ação em quantidade e no momento adequado para exercer a função desejada (SHAHIDI; HAN, 1993; GIBBS, 1999).

O material encapsulado é denominado recheio ou núcleo e o material que forma a cápsula denominando-se de encapsulante, cobertura ou parede, como exemplificado na figura 2 (GIBBS, 1999). As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro- (>5.000  $\mu\text{m}$ ), micro- (0.2 – 5.000  $\mu\text{m}$ ) e nanocápsulas (<0.2 $\mu\text{m}$ ).

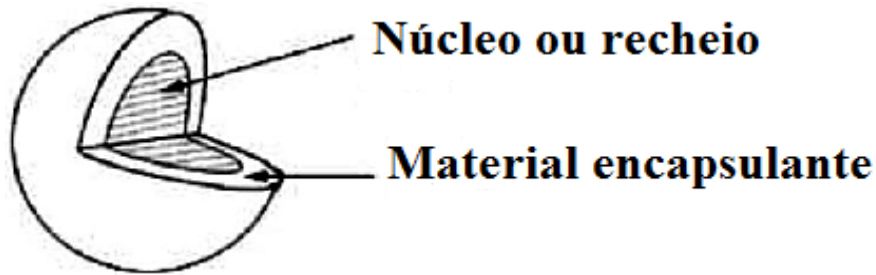


Figura 2 – Estrutura da cápsula.

Adaptado de Gharsallaoui et al. (2007).

As cápsulas podem ser classificadas como sistema do tipo reservatório, este sendo considerado o grupo das verdadeiras cápsulas, onde o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede; ou classificadas como sistema matricial, chamadas de microesferas ou micropartículas, onde o núcleo se encontra totalmente disperso em uma matriz, na qual uma pequena fração do material encapsulado permanece exposta na superfície, conforme figura 3 (KING, 1995; RÉ, 1998).

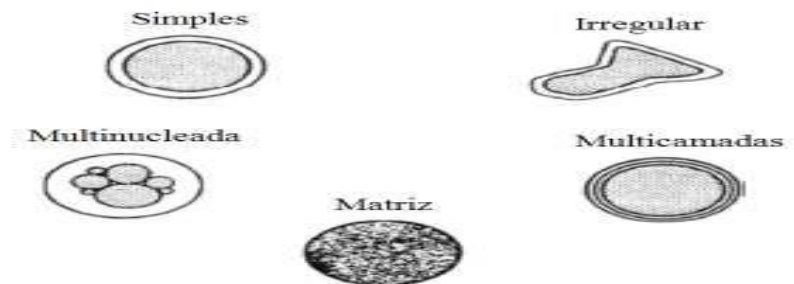


Figura 3 – Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas

Adaptado de Gharsallaoui et al. (2007).

As microcápsulas podem ser projetadas para liberar o material encapsulado (Figura 4) em quantidades gradativas e em condições de meio específicas (como por exemplo, em diferentes partes do corpo). Diferentes tipos de “gatilho” podem ser utilizados para a liberação do material encapsulado tais como alteração de pH, ruptura mecânica, temperatura, ação enzimática, força osmótica, entre outras (GOUIN, 2004; MAESTRELLI et al., 2008).



Figura 4 – Liberação da cápsula

Fonte: MAESTRELLI et al., 2008.

### 2.5.1 Aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos

Alguns dos objetivos da encapsulação de componentes de alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, alteração de cor ou perda do valor nutricional; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo (por exemplo, por evaporação, que é muito rápida no caso de compostos de sabor não encapsulados); evitar reações prematuras de um substrato; mascarar compostos de sabor indesejável; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos (DEYPERE et al., 2003; PSZCZOLA, 1998; REINECCIUS, 1991).

Tais partículas podem ser projetadas para a proteção, liberação controlada e empacotamento de vários ingredientes para alimentos, tais como lipídios, compostos bioativos, minerais, enzimas, peptídeos, fibras dietéticas, entre outros (GOUIN, 2004; CHEN, REMONDETTO; SUBIRADE, 2006; CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Essas partículas, ao serem inseridas em alimentos, não devem alterar negativamente suas características físicas além de, liberar o material encapsulado nos locais de ação desejados (como por exemplo: boca, estômago, intestino delgado e cólon) e modular as propriedades físico-químicas e sensoriais dos alimentos, como aparência, textura, estabilidade e sabor (CHEN, 2007; FOEGEDING; DRAKE, 2007; VAN DENBERG, 2008).

Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, incluem-se ácidos, bases, óleos, vitaminas, sais, gases, aminoácidos, *flavors*, corantes, enzimas e microrganismos (AUGUSTIN et al., 2001).

### 2.5.2 Microencapsulação de probióticos

A microencapsulação tem sido utilizada com a finalidade de proteger as bactérias probióticas das condições adversas do trato digestivo e também no alimento durante sua vida útil. (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Na tabela 2, estão descritos alguns estudos realizados com bactérias probióticas.

Tabela 2 – Utilização da microencapsulação em microrganismos probióticos.

<b>Utilização da microencapsulação</b>	<b>Autores</b>
Proteção contra a presença de oxigênio;	KIM; OLSON, 1989
Proteção contra as baixas temperaturas de congelamento;	SHEU e MARSHALL, 1993; SHEU et al., 1993
Proteção contra o efeito bactericida do suco gástrico e outros meios ácidos;	LEE; CHA; PARK, 2004; MUTHUKUMARASAMY et al., 2006; CHEN et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007a; OLIVEIRA et al., 2007b; ANNAN, 2008; ALBERTINI et al., 2010.
Aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura durante a estocagem do produto;	LEE; CHA; PARK, 2004; KAILASAPATHY, 2006; CAPELA et al., 2006; MUTHUKUMARASAMY e HOLLEY, 2006; OZER et al., 2008; ALBERTINI et al., 2010.
Aumentar a estabilidade e manter a viabilidade durante tratamento térmico.	KIM et al., 2008.

### 2.5.3 Materiais encapsulantes

A composição do agente encapsulante é o principal determinante das propriedades funcionais da microcápsula e de como ela pode ser usada para melhorar o desempenho de um ingrediente em particular (DESAI; PARK, 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007). A escolha do agente encapsulante deve basear-se em alguns critérios, como nas características físicas e

químicas do composto a ser encapsulado (porosidade, solubilidade), no tipo de aplicação pretendida (fármaco, aditivo alimentar, fragância, pesticida) no método de microencapsulação selecionado (SUAVE et al., 2006), além da não reatividade com o material a ser encapsulado, e o mecanismo de liberação ideal (FAVARO-TRINDADE, 2008).

Na indústria de alimentos diversos polissacarídeos, proteínas e lipídios são utilizados na fabricação de microcápsulas. A utilização de proteínas e/ou polissacarídeos depende de alguns fatores, como a capacidade dos biopolímeros em formar partículas, serem atóxicos e moduláveis a ponto de se produzir partículas com as características desejadas, com tamanho, estrutura, carga, permeabilidade e estabilidade desejados (ANAL; SINGH, 2007; GHARSALLAOUI et al., 2007; JONES; MCCLEMENTS, 2010; PATEL et al., 2011).

O uso de hidrocolóides para formação de partículas de géis tem apresentado crescente interesse por diversas áreas de aplicação, tais como alimentícia, farmacêutica e cosmética (BUREY et al., 2008). Estes hidrocolóides são particularmente atraentes por suas propriedades de formar géis e alterar a viscosidade quando dispersos em meio aquoso como o alginato, por exemplo, que tem sido empregado como material encapsulante devido a sua capacidade para absorver água, ser de fácil manipulação e inocuidade, possuindo ainda outras características como propriedades gelificantes, estabilizantes e espessantes, razões pelas quais tem sido de grande interesse para a indústria de alimentos (PASIN; AZÓN; GARRIGA, 2012).

Entre os sais de alginato mais empregados, se encontra o alginato de sódio, devido a sua alta solubilidade em água fria e características de transição de solução para gel de forma instantânea quando em contato com íons cálcio (FUNAMI et al., 2009).

Na tabela 3 estão expressos os principais materiais de revestimento utilizados na microencapsulação.



Tabela 3 – Principais materiais de revestimento utilizados na microencapsulação.

<b>Fonte</b>	<b>Exemplos</b>
Carboidratos	Amido, dextrinas, açúcar, xarope de milho, celulosas;
Gomas	Goma arábica, alginato de sódio, carragena;
Lipídios	Cera, parafina, triestearina, ácido esteárico, monoglicerídeos e diglicerídeos, óleos e gorduras hidrogenadas;
Poliésteres naturais	Poli(hidroxialcanoatos), tais como poli(3-hidroxiacetato) P(3HA), poli(3-hidroxiacetato) P(3HB), poli(3-hidroxiacetato) P(3HV) e seus copolímeros;
Polímeros sintéticos	Poli(D, L-ácido láctico) (PDLA), poliacrilatos, copolímeros de polietilenocopolipileno, poli( $\epsilon$ -caprolactona) (PCL);
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina;
Quitosana	Fonte alternativa extraída da casca de crustáceos.

Fonte: SUAVE et al., 2006; MENEZES, et al., 2013.

### 2.5.3.1 Microencapsulação em Alginato de sódio

O alginato de sódio é o polissacarídeo mais utilizado como material encapsulante de bactérias ácido lácticas, devido a facilidade de manejo, natureza não tóxica e baixo custo (SULTANA et al., 2003; KO; KOO; PARK, 2008; BASTOS; ARAÚJO; LEÃO, 2009), além de aumentar a viabilidade dessas bactérias quando submetidas a diferentes condições ao serem comparadas com bactérias não encapsuladas (ANAL; SINGH., 2007).

Em muitas aplicações, o gel de alginato de sódio torna-se insolúvel em solução por meio da adição de cátions divalentes, geralmente cálcio, resultando em géis firmes. Tais géis não são termo-reversíveis quando altas concentrações de cálcio são utilizadas, podendo ser termo-reversíveis em baixas concentrações. A força do gel depende da natureza do cátion divalente (GARCIA CRUZ; FOGGETTI; SILVA, 2008).

É um aditivo alimentar comercialmente aceitável, apresentando-se como um pó branco pálido ou marrom amarelado, inodoro e insípido. Consiste principalmente do sal sódico do

ácido algínico, ou seja, uma mistura de ácidos poliurônicos composto de resíduos de ácido D-manurônico e ácido L-gulurônico (ROWE et al., 2009), conforme pode-se observar na figura 5.

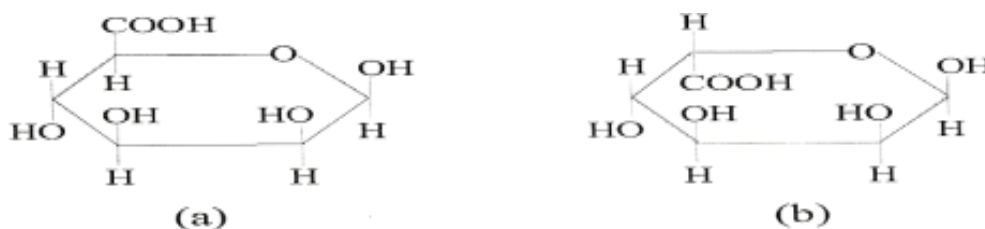


Figura 5 – Estrutura química do alginato de sódio a) ácido manurônico, b) ácido gulurônico (FRANCHETTI; MARCONATO, 2006).

Porém, uma desvantagem desse polissacarídeo é a formação de poros na superfície das cápsulas, tornando-as sensíveis as condições ácidas do meio (MORTAZAVIAN et al., 2007). Para suprir esse problema, alguns pesquisadores têm recoberto as cápsulas usando uma combinação desse polissacarídeo com outros compostos poliméricos, a fim de garantir um maior efeito protetor aos microrganismos (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004; GBASSI et al., 2009; CHÁVARRI et al., 2010) como por exemplo, a quitosana, que pode atuar como meio de revestimento das partículas, alterando o grau de difusão de substâncias encapsuladas ou como um aditivo para modificar a estrutura da partícula (PASPARAKIS; BOUROPOULOS, 2006).

### 2.5.3.2 Quitosana

A Quitosana é um polímero com caráter catiônico obtido a partir da quitina, sendo um polímero natural isolado de exoesqueleto de crustáceos aquáticos (DODANE; VILIVALAM, 1998; GEORGE; ABRAHAM, 2006).

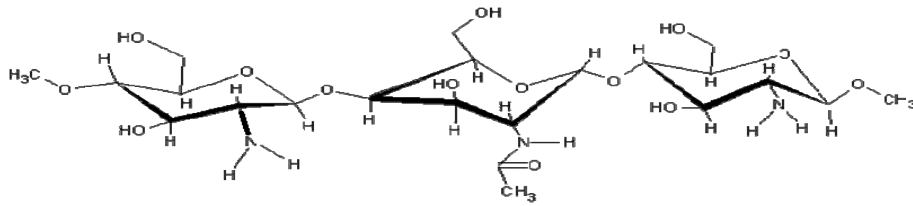


Figura 6 – Estrutura química da Quitosana

Fonte: GEORGE; ABRAHAM, 2006.

Este polímero tem sido amplamente utilizado como excipiente para formas de liberação modificada, sendo aplicada também na liberação colônica devido suas propriedades biodegradáveis pelas bactérias colônicas (SHIMONO et al., 2002), boa biocompatibilidade e não alergenicidade possuindo também propriedades mucoadesivas que otimizam a penetração de macromoléculas pelas barreiras intestinais (AHN et al., 2002).

Segundo Mortazavian et al., (2008) a quitosana apresenta uma boa capacidade de formação de película, sendo utilizada como revestimento exterior em cápsulas feitas com polímeros aniônicos como alginato. Este componente não demonstrou uma boa eficácia para aumentar a viabilidade das células por encapsulamento e deve ser utilizado de preferência, como revestimento de cápsulas e não como material encapsulante.

Lee et al., (2004), concluíram que a microencapsulação de bactérias ácido lácticas com alginato revestido de quitosana ofereceu um meio eficaz de entrega de células bacterianas viáveis para o cólon, mantendo sua capacidade de sobrevivência durante o armazenamento refrigerado. A encapsulação de bactérias probióticas com um revestimento de alginato e quitosana assegurou a proteção contra as condições simuladas do trato gastrointestinal, sendo, portanto uma boa forma de entrega de células viáveis para o cólon (CHÁVARRI et al., 2010).

## 2.6 Métodos de encapsulação

Diversas técnicas podem ser utilizadas para microencapsulação de ingredientes alimentícios, e a escolha do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, tamanho, mecanismo de liberação e propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON; LEE, 1991).

Os métodos utilizados podem ser classificados pelas seguintes técnicas (SHAHIDI; HAN, 1993; DESAI; PARK, 2005):

- Métodos Físico-químicos: Coacervação simples e complexa, lipossomas, lipoesferas, evaporação de solvente, inclusão molecular;
- Métodos Químicos: Polimerização interfacial, polimerização *in situ*;
- Métodos Físicos: Secagem por atomização (*spray drying*), atomização a frio (*spray cooling*), gelificação iônica, leito fluidizado, co-cristalização.

Lambert et al., (2008) afirmam que algumas técnicas disponíveis, tais como secagem por atomização ou envolvimento lipossômico, podem não ser adequadas para a microencapsulação de bactérias probióticas, pois requerem o emprego de altas temperaturas ou solventes orgânicos, o que pode ser prejudicial aos microrganismos. No entanto, a utilização de outras técnicas de encapsulação como, por exemplo, a extrusão pode conferir maior proteção aos microrganismos encapsulados em função das condições utilizadas para a produção das micropartículas (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Na Tabela 4 são apresentadas as principais etapas envolvidas em algumas técnicas de encapsulação:

Tabela 4 – Etapas das técnicas de encapsulação.

<b>Processo de encapsulação (técnica)</b>	<b>Principais etapas na encapsulação</b>
Spray Drying	a. Preparação de uma emulsão; b. Homogeneização do material ativo na emulsão; c. Atomização da emulsão; d. Desidratação da emulsão atomizada.
Spray Cooling/ Spray Chilling/ Atomização	a. Preparação da emulsão; b. Homogeneização da emulsão; c. Atomização da emulsão.
Leito Fluidilizado	a. Preparação da solução de recobrimento; b. Fluidização das partículas do ativo; c. Recobrimento das partículas do núcleo.
Liofilização/ Freeze-drying	a. Mistura do material ativo em uma solução de recobrimento; b. Resfriamento da solução; c. Secagem a vácuo da mistura congelada.
Coacervação	a. Formação de três fases químicas imiscíveis; b. Deposição do coacervado; c. Solidificação do coacervado

Fonte: adaptado de GOUIN, 2004; DESAI; PARK, 2005; MADENE et al., 2006.

### 2.6.1 Extrusão / Gelificação Iônica

Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada para a obtenção de micropartículas de alginato de cálcio (PEDROSO, 2011). O método físico baseia-se na gelificação externa do alginato e consiste em incorporar o material a encapsular numa solução de alginato de sódio, para depois a mistura sofrer extrusão gota a gota, através de uma pipeta de calibre reduzido ou de uma seringa, para uma solução de cloreto de cálcio ( $\text{CaCl}_2$ ) (LIU et al., 2002; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; BURGESS; HICKEY, 1994).

A produção de micropartículas sem a utilização de solventes orgânicos torna a técnica de extrusão crescente e promissora, especialmente para a encapsulação de fármacos, células

vivas imobilizadas e para inclusão de compostos de interesse em alimentos (AGNIHOTRI, MALLIKARJUNA; AMINABHAVI, 2004; PATIL et al., 2010).

Em presença de cálcio e outros íons divalentes, o alginato de sódio pode, através de um processo de ligação cruzada, trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, geleificando o meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o íon  $Mg^{2+}$  não induzem a essa geleificação. Íons como  $Pb^{2+}$ ,  $Cu^{2+}$ ,  $Cd^{2+}$ ,  $Co^{2+}$ ,  $Ni^{2+}$ ,  $Zn^{2+}$  e  $Mn^{2+}$  possuem um uso limitado por apresentarem certa toxicidade (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003).

Os cátions divalentes se ligam aos blocos de ácidos gulurônico de uma maneira cooperativa que pode ter mais de 20 monômeros associados. Cada cadeia de alginato pode dimerizar para formar junções com muitas outras cadeias resultando em cadeias de gel (GOMBOTZ; WEE 1998). Devido a essa propriedade de geleificação, o alginato pode ser usado como matriz e assim envolver moléculas de significância biológica, tais como, enzimas, plantas, células animais e medicamentos (VALENGA, 2007). O alginato gelifica após ligação dos íons bivalentes de cálcio aos blocos de ácido gulurônico das cadeias de alginato formando uma rede tridimensional, constituindo o modelo da “caixa de ovos”, conforme figura 7 (GOMBOTZ; WEE, 1998).

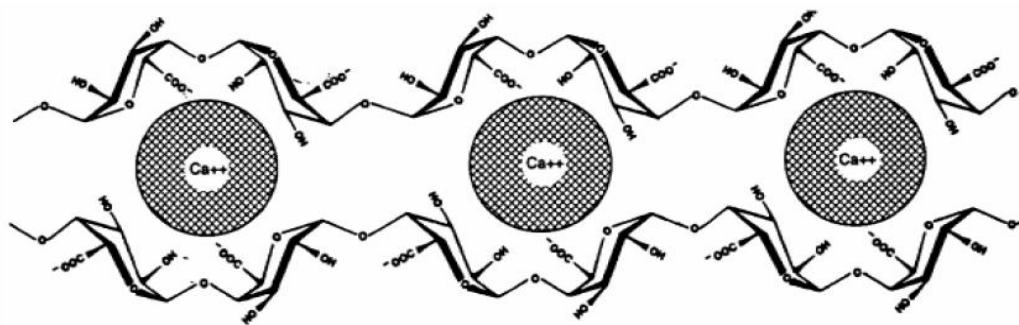


Figura 7 – Modelo “caixa de ovo” para formação de gel de alginato com íons cálcio.

Fonte: Clark e Ross-Murphy (1987).

Partículas produzidas por extrusão normalmente apresentam diâmetros que podem variar de 500  $\mu m$  a 3 mm (BUREY et al., 2008; SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990; KRASAEKOOPT et al., 2003 ) sendo que o tamanho das partículas formadas é dependente do tamanho do diâmetro da agulha usada para gotejar a solução, da viscosidade e concentração da solução de alginato, e da distância entre a seringa e a solução de cloreto de cálcio, conforme figura 8 (SMIDSROD; SKJAK-BRAEK, 1990; KRASAEKOOPT et al., 2003).

Maiores diâmetros, viscosidades e concentrações mais altas produzem partículas maiores (GACESA, 1988).

Por estes fatos, foram desenvolvidas variantes do método. Algumas destas consistem na utilização de um sistema de pressão para forçar a saída do alginato através da pipeta, um sistema de vibração para dispersar as gotas da extremidade da pipeta com o qual se obtiveram partículas com menos de 300  $\mu\text{m}$  e um método de nebulização que originou partículas com menos de 1  $\mu\text{m}$  (BURGESS, HICKEY, 1994).

Para aplicações em alimentos, o diâmetro médio das micropartículas, é uma das características mais importantes, sendo que estas devem ser suficientemente pequenas, para evitar um impacto sensorial negativo, sendo o tamanho desejável de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (HEIDEBACH, 2009; HANSEN et al., 2002).

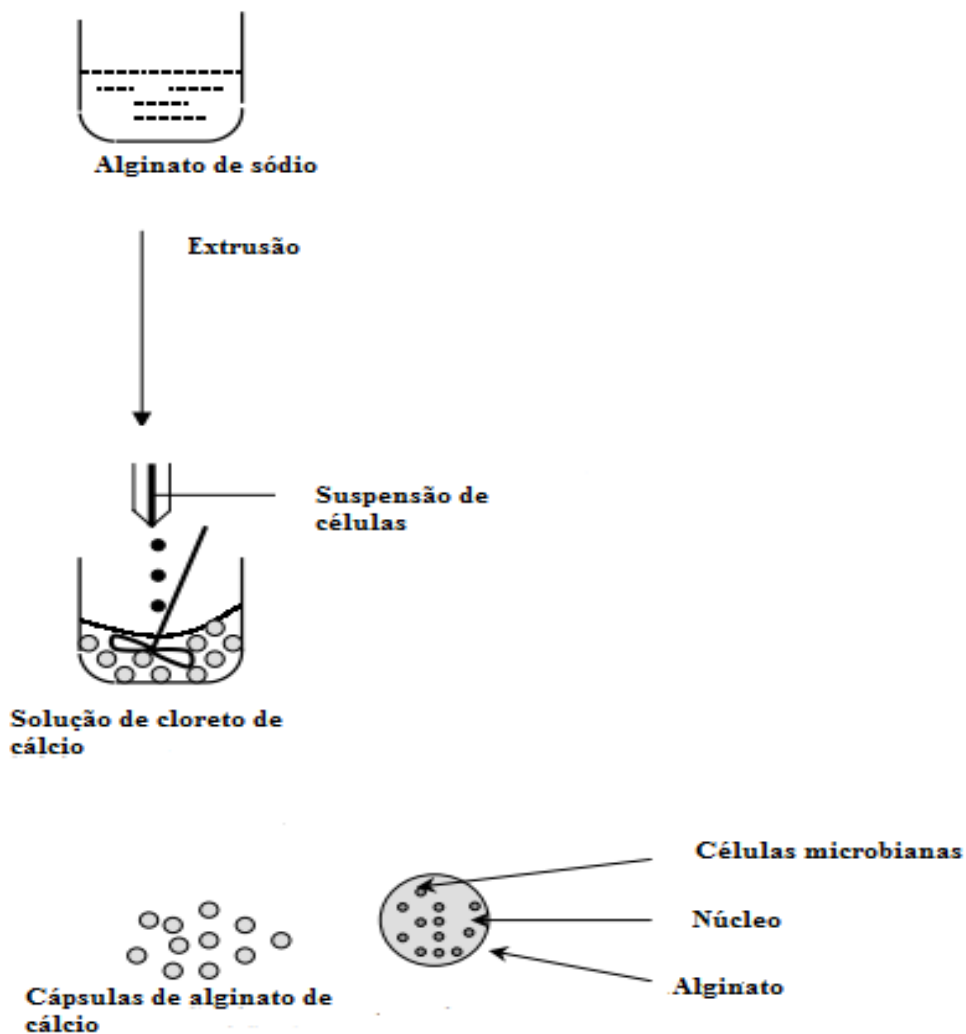


Figura 8 – Esquema do fluxo de encapsulação de bactérias por meio da técnica de extrusão.

Fonte: (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2000).





## **3 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3.1 Materiais**

Para a formação das microcápsulas foram utilizados: Alginato de sódio de baixa viscosidade (Vetec Química Fina); Amido resistente Hi-maize (National Starch Food Innovation); Quitosana em pó (Santos Flora); Cloreto de cálcio dihidratado (Vetec Química Fina); Cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* (La-14) gentilmente doada pela Danisco Ingredients Brasil.

### **3.2 Métodos**

#### **3.2.1 Testes Preliminares para a produção das microcápsulas**

Antes da produção das microcápsulas foram realizados testes preliminares a fim de se obter microcápsulas de diâmetro em torno de 100µm. A produção das microcápsulas foi realizada utilizando a técnica de extrusão / aspersão desenvolvida por Liserre, Ré e Franco (2007), modificada por Boscarioli (2010) com adaptações. Foi desenvolvida uma tecnologia utilizando um aerógrafo modelo EW 110 (figura 9), acoplado a um compressor de ar modelo MB24/BV (figura 10) sobre pressão de ar de 2,72 Kgf/cm<sup>2</sup>. Para determinar a distância ideal entre a formação do *spray* e a solução iônica (figuras 11) foram realizados testes preliminares onde três alturas foram testadas: 10, 20 e 30 cm.



Figura 9 – Aerógrafo modelo EW 110



Figura 10 – Compresor de ar modelo MB24/BV



Figura 11 – Testes preliminares para testar a distância ideal entre o aerógrafo e a solução iônica.

### 3.2.2 Preparo do inóculo

Até o momento da utilização, a cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* foi mantida a  $-18^{\circ}\text{C}$ . Para o preparo do inóculo, a cultura probiótica foi ativada em caldo MRS e incubada durante 15 horas a  $37^{\circ}\text{C}$ . Após, foi centrifugada a  $4670 \times g$  por 15 minutos e lavada em solução de NaCl (0,85%) por duas vezes. As células foram então suspensas na solução salina para obtenção de uma solução com aproximadamente  $10^9 - 10^{10}$  UFC/mL.

### 3.2.3 Produção das microcápsulas

Foram preparadas três soluções de alginato de sódio 1,0%. A primeira solução contendo apenas alginato de sódio (ALG), a segunda solução contendo alginato de sódio + 1% de prebiótico Hi-maize (AHM) e a terceira solução contendo alginato de sódio + 1% Hi-maize que recebeu tratamento com quitosana (AHQ). Após completa dispersão dos polímeros, em capela de fluxo laminar, os microrganismos *Lactobacillus acidophilus*, foram adicionados.

As duas primeiras soluções (ALG) + (AHM) foram aspergidas em solução de cloreto de cálcio 0,1 M. A última solução (AHQ) foi aspergida em solução de cloreto de cálcio 0,1 M, contendo 0,4% de solução de quitosana seguindo a metodologia de Gaserod (1998) com adaptações, onde, 0,4g de quitosana foram dissolvidas em 90 ml de água destilada acidificada com 0,4 ml de ácido acético glacial até alcançar a concentração final de 0,4 % (p/v). O pH foi então ajustado com NaOH 1M, até atingir  $5,8 \pm 0,2$ . A mistura foi filtrada em papel filtro e o volume foi ajustado a 100 ml. Após foi autoclavado a  $121^{\circ}\text{C}$  por 15 minutos e misturado à solução de cloreto de cálcio.

O fluxograma a seguir (figura 12), resume os itens e as caracterizações que foram efetuadas no presente trabalho.

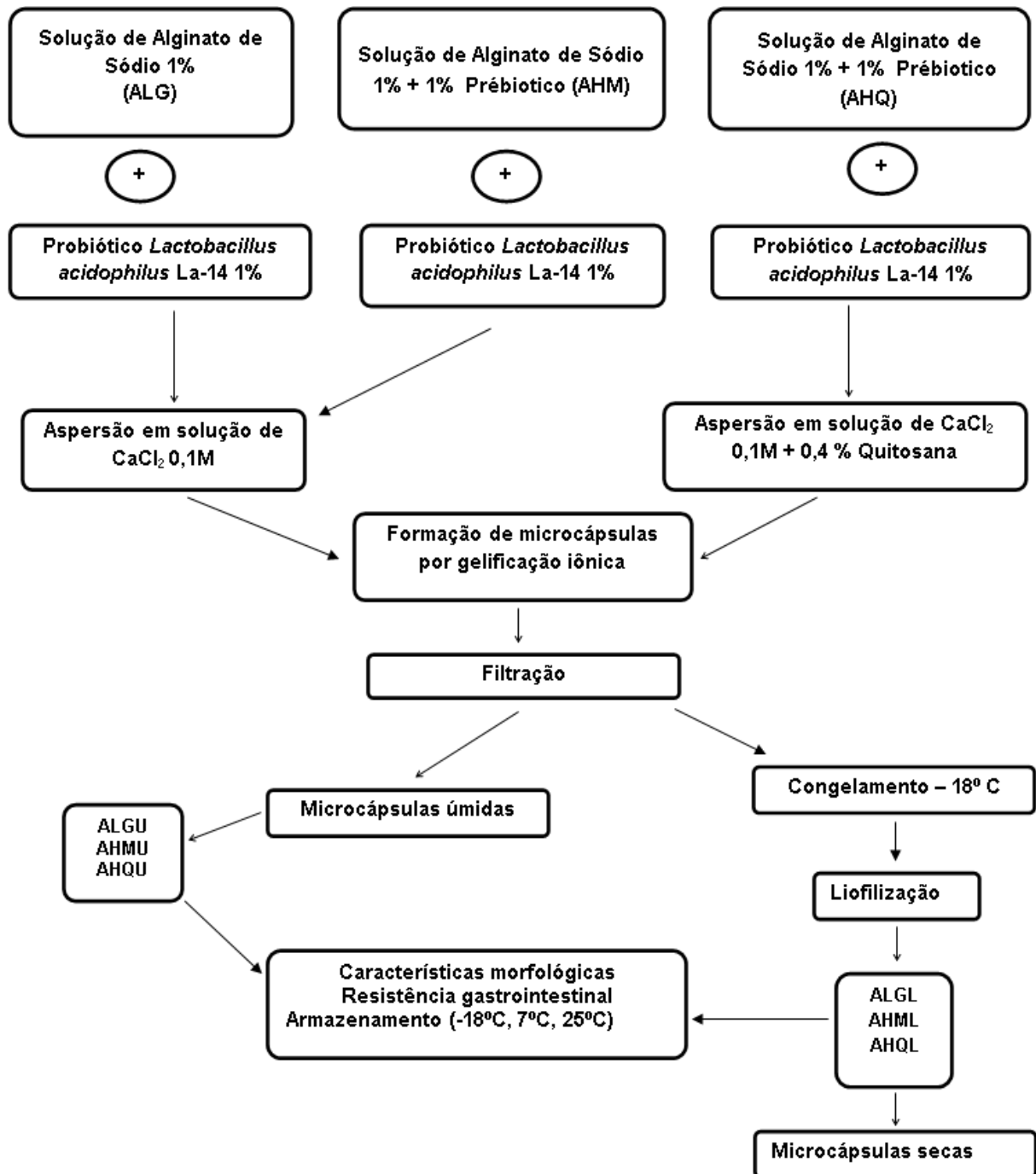


Figura 12 – Fluxograma geral da produção e avaliação das microcápsulas

As partículas foram mantidas sob agitação durante 30 minutos na solução de  $\text{CaCl}_2$  para assegurar reação completa. A figura 13 demonstra o esquema do processo de microencapsulação utilizando um aerógrafo acoplado a um compressor de ar. Após, foram retiradas das soluções por peneiras de aço inoxidáveis esterilizadas e lavadas com água destilada estéril.

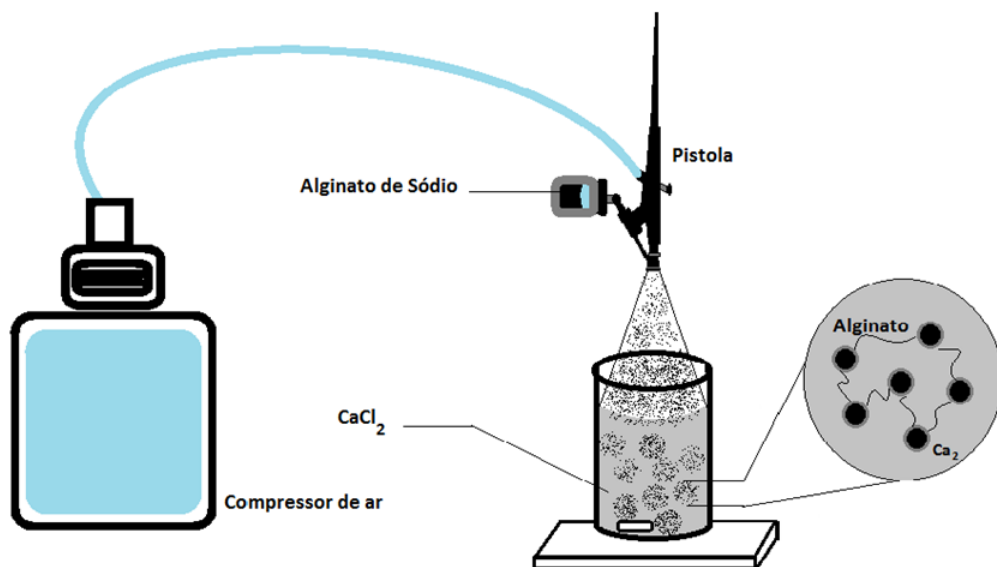


Figura 13 – Esquema do processo de microencapsulação utilizando um aerógrafo acoplado a um compressor de ar.

Para análise das microcápsulas, parte delas foram armazenadas úmidas em potes coletores estéreis contendo água destilada estéril para mantê-las hidratadas e estocadas em diferentes temperaturas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $7^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ) para análise da viabilidade da cultura probiótica. O restante das microcápsulas passou por processo de secagem (liofilização) e também foram armazenadas em diferentes temperaturas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ,  $7^{\circ}\text{C}$  e  $25^{\circ}\text{C}$ ) para análise da viabilidade da cultura probiótica. Após o preparo das microcápsulas úmidas e secas, as mesmas foram analisadas quanto as suas características morfológicas e submetidas a testes de resistência gastrointestinal.

Tabela 5 – Tratamentos empregados na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-14

<b>Tratamento</b>	<b>Sigla</b>
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% úmidas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	ALGU
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% liofilizadas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	ALGL
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% + Hi-maize 1% úmidas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	AHMU
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% + Hi-maize 1% liofilizadas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	AHML
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% + Hi-maize 1% tratadas com quitosana, úmidas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	AHQU
Microcápsulas elaboradas com Alginato 1% + Hi-maize 1% tratadas com quitosana, liofilizadas + <i>Lactobacillus acidophilus</i> 1%	AHQL

### 3.2.4 Secagem das microcápsulas

#### 3.2.4.1 Secagem por liofilização

Parte das microcápsulas produzidas foi congelada ( $-18^{\circ}\text{C}$  por 24 horas) no mesmo dia da produção. A liofilização foi realizada em Liofilizador Liotop L101, onde as microcápsulas foram colocadas congeladas ( $-18^{\circ}\text{C}$ ) e foram retiradas do liofilizador 24 horas após o início do processo (vácuo: 0,200 – 0,300  $\mu\text{Hg}$  e temperatura do condensador de  $-37^{\circ}\text{C}$ ).

### 3.2.5 Caracterização morfológica das microcápsulas

#### 3.2.5.1 Microscopia ótica

A microscopia ótica das micropartículas úmidas foi realizada no Departamento de Microbiologia e Parasitologia da Universidade Federal de Santa Maria, utilizando um microscópio modelo MDL-150-TPI e uma câmera digital modelo Samsung 14.2 para a captura de imagens.

#### 3.2.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A morfologia das micropartículas liofilizadas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV). As microcápsulas foram fixadas com uma fita dupla face em *stubs* de alumínio e recobertas por uma fina camada de ouro. As observações foram realizadas em um Microscópio Eletrônico de Varredura da marca JEOL, modelo JM6360, do Departamento de Engenharia Mecânica da Universidade Federal de Santa Maria.

#### 3.2.5.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

O tamanho médio das micropartículas úmidas e liofilizadas foi medido no equipamento Mastersizer 2000 (Malvern, Alemanha), no Laboratório de Análises Químicas Industriais e Ambientais (LAQUIA) do Departamento de Química da Universidade Federal de Santa Maria.

O equipamento determina o tamanho das partículas por difração de luz laser e o material dispersante usado para fazer a leitura das amostras foi água destilada e deionizada, com pH corrigido para 4.

A leitura foi realizada adicionando amostra dentro da unidade de amostragem, que já estava preenchida de água, com pH ajustado para 4. A quantidade de amostra adicionada



variou de amostra para amostra, sempre atingindo a faixa de obscuração de 3 a 20%, conforme recomendação do fabricante.

### 3.2.6 Umidade das microcápsulas

A umidade das microcápsulas úmidas foi determinada por secagem em estufa a 105° C, de acordo com metodologia da AOAC (2005).

### 3.2.7 Atividade de água das microcápsulas

A análise de atividade de água foi medida diretamente, por meio de um analisador de atividade de água da marca AquaLab, modelo 4TEV, à temperatura constante (25° C). Seu princípio baseia-se na condensação da água em superfície espelhada e fria, e detecção por sensor infravermelho. As amostras são colocadas em cubetas plásticas apropriadas e inseridas no aparelho e a determinação da umidade relativa de equilíbrio é identificada quando transcorrido o tempo necessário para o equilíbrio da mesma, segundo fabricante.

### 3.2.8 Contagem das células viáveis

Para a contagem de *Lactobacillus acidophilus* foram transferidas alíquotas de 1,0 ml de diluições adequadas, em triplicata, para placas de petri esterilizadas. Após foi vertido meio de cultura MRS Ágar. A incubação foi realizada a 37° C por 72 horas em jarras de anaerobiose contendo gerador de anaerobiose.

O procedimento para o preparo de diluição das micropartículas consistiu em pesar 1 g de micropartícula úmida e 0,1g de micropartícula liofilizada e adicionar 9 ml de solução tampão fosfato estéril (pH 7,5), de acordo com metodologia descrita por Sheu, Marshall e Heymann (1993).

Para as micropartículas que possuíam quitosana em sua composição, o processo consistiu em pesar 1 g de amostra úmida e 0,1g de micropartícula liofilizada e adicionar 9 ml de solução tampão citrato estéril (pH 6,0) (RIBEIRO et al., 2009).

Para as micropartículas úmidas, a homogeneização foi feita em *stomacher* por 5 minutos. Para as microcápsulas liofilizadas, a homogeneização foi feita em uma incubadora refrigerada tipo shaker, modelo TE-421 durante 120 minutos, 37° C, 150 RPM. A partir destas primeiras diluições foram realizadas as diluições decimais seriadas em água peptonada 0,1%.

### 3.2.9 Avaliação da resistência de *Lactobacillus acidophilus La-14* microencapsulados nos diferentes tratamentos ao processo de secagem

Visando determinar o efeito da condição de secagem na viabilidade dos microrganismos, foram feitas contagens das células viáveis após encapsulação e pós liofilização, conforme item 3.2.8.

### 3.2.10 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus La-14* microencapsulados nos diferentes tratamentos frente às condições gastrointestinais simuladas

A sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus La-14* microencapsulado, submetido às condições gástricas e entéricas simuladas, foi avaliada de acordo com método descrito por Liserre et al. (2007) com modificações.

Alíquotas de 1 g de micropartículas úmidas e 0,1 g de micropartículas liofilizadas foram adicionadas de HCl 1 M até a obtenção de pH de 1,8 e de soluções de pepsina (pepsin from porcine gastric mucosa P7000, Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) e lipase (lipase from porcine pancreas 62300, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) até a obtenção uma concentração de 3 g L<sup>-1</sup> e de 0,9 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram incubadas a 37° C, sob agitação contínua em uma incubadora refrigerada, tipo *shaker*, modelo TE-421, durante 2 horas (fase gástrica).

Na etapa seguinte, o pH das amostras foi aumentado para 5,0 usando uma solução alcalina (150 mL de NaOH 1 M, 12,38 g de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>.H<sub>2</sub>O e água destilada até 1 L). Bile

(bile bovine B3883-25G, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) e pancreatina (pancreatin from porcine pancreas P3292, Sigma-Aldrich, St. Louis, USA) foram adicionadas até a obtenção de uma concentração de 1 g L<sup>-1</sup> e de 0,1 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. As amostras foram incubadas novamente a 37° C por 2 horas, sob agitação contínua em uma incubadora refrigerada, tipo shaker, modelo TE-421 (fase entérica I).

Na última etapa, o pH foi aumentado para 7,5 usando a mesma solução alcalina, as concentrações de bile e pancreatina foram ajustadas (1 g L<sup>-1</sup> e 0,1 g L<sup>-1</sup>, respectivamente). As amostras foram incubadas novamente a 37° C por 2 horas sob agitação contínua em uma incubadora refrigerada, tipo *shaker*, modelo TE-421 (fase entérica II), atingindo 6 horas de análise.

As contagens foram realizadas em alíquotas coletadas após 5, 30, 120, 125, 150, 240, 245, 270 e 360 minutos de incubação. A partir das alíquotas coletadas, foram efetuadas diluições decimais seriadas, possibilitando a contagem das colônias. De cada diluição, 1 mL foi inoculado em profundidade em ágar MRS e as placas foram incubadas em estufa à 37° C, em anaerobiose, por 72 horas. Os resultados obtidos foram expressos em log UFC/ml.

### 3.2.11 Avaliação da viabilidade das microcápsulas úmidas durante a estocagem em diferentes temperaturas

Com o objetivo de determinar o tempo de viabilidade das micropartículas úmidas, a enumeração de células viáveis (conforme metodologia proposta no item 3.2.8) foi realizada no mesmo dia em que foram produzidas (dia 0), e a cada 15 dias, num período de 135 dias de estocagem.

As microcápsulas úmidas foram estocadas em temperatura ambiente (25°C), de refrigeração (7° C), e de congelamento (-18° C).

### 3.2.12 Avaliação da viabilidade das microcápsulas liofilizadas durante a estocagem em diferentes temperaturas

Com o objetivo de determinar o tempo de viabilidade das micropartículas liofilizadas, a enumeração de células viáveis (conforme metodologia proposta no item 3.2.8) foi realizada no mesmo dia em que foram secas (dia 0) e a cada 30 dias, totalizando 60 dias de análise.

As microcápsulas liofilizadas foram estocadas em temperatura ambiente (25°C), de refrigeração (7°C), e de congelamento (-18°C).

### 3.2.13 Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas

Para comparar o efeito das temperaturas em todos os tratamentos nas formas úmidas e liofilizadas, analisaram-se os dias 0, 30 e 60 das cápsulas úmidas e as comparou com as cápsulas liofilizadas utilizando a metodologia proposta no item 3.2.8.

### 3.2.14 Análises estatísticas

Para avaliar a resistência de *Lactobacillus acidophilus* La-14 frente ao processo de liofilização utilizou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, considerando os efeitos dos 3 tratamentos, antes e após a secagem.

Para a avaliação do tempo de viabilidade das microcápsulas considerou-se o Delineamento Inteiramente Casualizado, com desdobramento dos graus de liberdade dos tratamentos em esquema fatorial (3 x 3 x 10) para as micropartículas úmidas e (3 x 3 x 3) para as micropartículas liofilizadas. Nestas análises o modelo estatístico contemplou os efeitos principais dos tratamentos (ALG, AHM, AHQ), temperatura de estocagem (-18° C, 7° C e 25° C), e dos períodos de monitoramento (0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105, 120 e 135 dias) para as micropartículas úmidas e (0, 30 e 60 dias) para as micropartículas liofilizadas, além da interação entre os efeitos principais.

Em caso de significâncias no teste ANOVA ( $p < 0,05$ ) procedeu-se o teste para diferenças mínimas significativas (DMS), utilizando o Teste de Duncan do programa Statistical Analysis System (SAS).



## 4 RESULTADOS E DISCUSSÕES

### 4.1 Testes preliminares para a produção das microcápsulas

Com base nos resultados obtidos nos testes preliminares entre a distância entre o aerógrafo e a solução iônica, obtiveram-se diâmetros mais reduzidos de micropartículas (175,77  $\mu\text{m}$ ) utilizando a altura de 30 cm. Para as demais alturas testadas 10 e 20 cm, obtiveram-se resultados de 209,34  $\mu\text{m}$  e 190,83  $\mu\text{m}$  respectivamente, conforme se pode observar nos gráficos 14, 15 e 16.

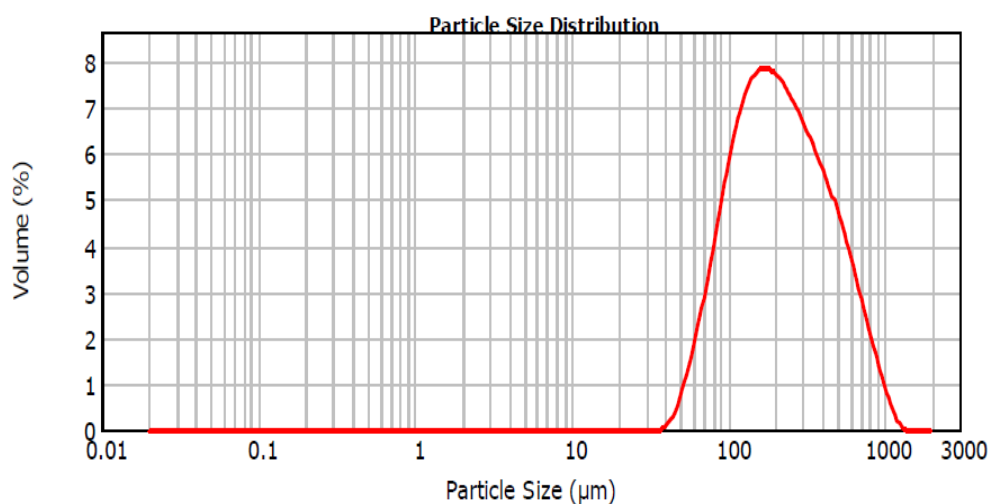


Figura 14 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 10 cm de distância entre o bico do aerógrafo à solução de  $\text{CaCl}_2$ .

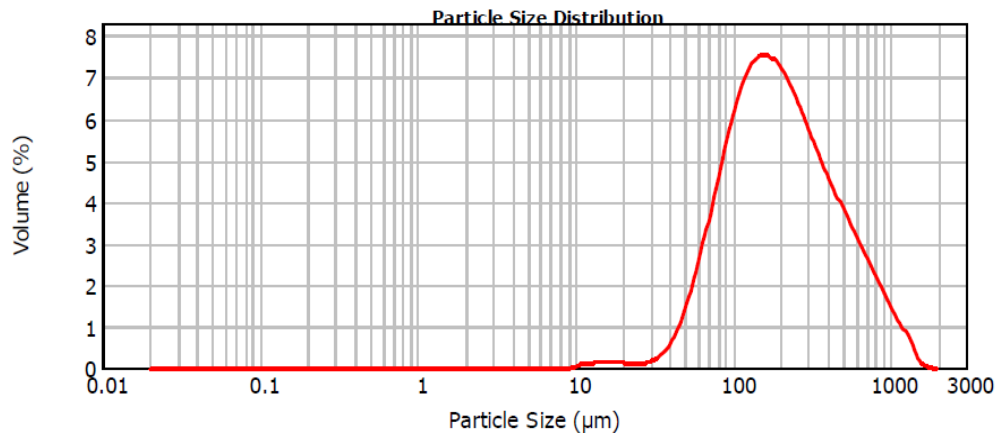


Figura 15 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 20 cm de distância entre o bico do aerógrafo à solução de  $\text{CaCl}_2$ .

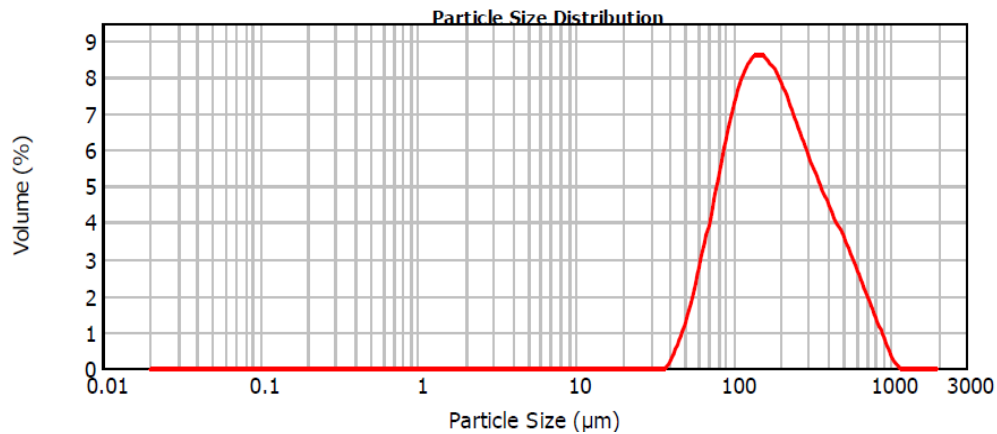


Figura 16 – Distribuição de diâmetro das microcápsulas produzidas em 30 cm de distância entre o bico do aerógrafo à solução de  $\text{CaCl}_2$ .

Para aplicações em alimentos, o diâmetro médio das micropartículas, é uma das características mais importantes, sendo que estas devem ser suficientemente pequenas, para evitar um impacto sensorial negativo, sendo o tamanho desejável de aproximadamente 100  $\mu\text{m}$  (HEIDEBACH, 2009; HANSEN et al., 2002). Por esse fato, definiu-se que a distância entre o aerógrafo e a solução iônica para todos os tratamentos seria de 30 cm.



## 4.2 Caracterizações morfológicas das microcápsulas

### 4.2.1 Microscopia ótica

Através da microscopia ótica foi possível observar a morfologia externa e a estrutura interna das microcápsulas produzidas, o tamanho e a distribuição de recheio (microrganismos) na matriz. Em geral, as microcápsulas úmidas apresentaram forma esférica em sua maioria e distribuição do recheio por toda a matriz.

De acordo com as micrografias óticas, verificou-se que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus La-14* nos diferentes tratamentos foi eficiente, sendo possível verificar a presença de alginato (encapsulante) e microrganismos (material ativo) em todo interior da micropartícula caracterizando esta como do tipo matricial, ou seja, o material ativo não está somente localizado no centro e sim em todo o interior da partícula (AZEREDO, 2005; JAFARI, 2008; FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008), podendo estar inclusive na superfície, conforme figura 17.

Além disso, também observo-se nas figuras 18a e 19a, o aspecto interno das micropartículas AHM e AHQ com grânulos de amido resistente (Hi-maize) aparente. Estes resultados corroboram com os encontrados por Iyer e Kailasapathy (2005) e Mirzaei (2012).

As imagens da microscopia ótica demonstraram também que as micropartículas não apresentavam uma distribuição uniforme, e sim aglomerada. Formas semelhantes de microcápsulas também foram obtidas por Sheu e Marshall (1993), Sultana et al. (2000), Krasaekoopt et al. (2004) e Homayouni et al. (2007).

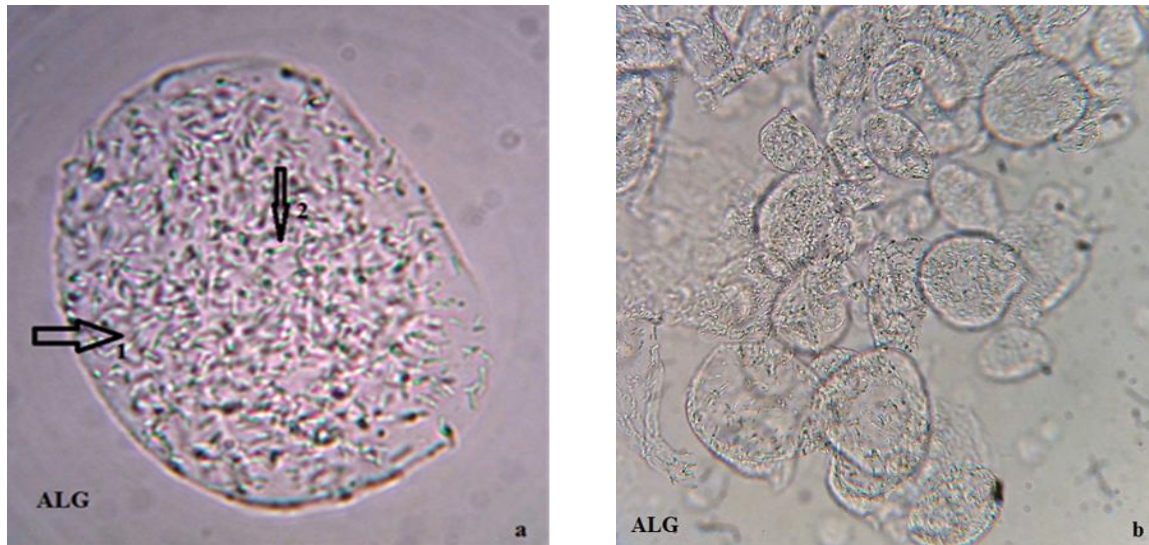


Figura 17 – Microscopia ótica de Micropartículas de Alginato (a) Micropartícula de alginato, onde o número 1 está evidenciando o alginato de sódio no interior da partícula e o número 2 está evidenciando o microrganismo dentro da partícula (100X). (b) Micropartículas de alginato aglomeradas (40X).

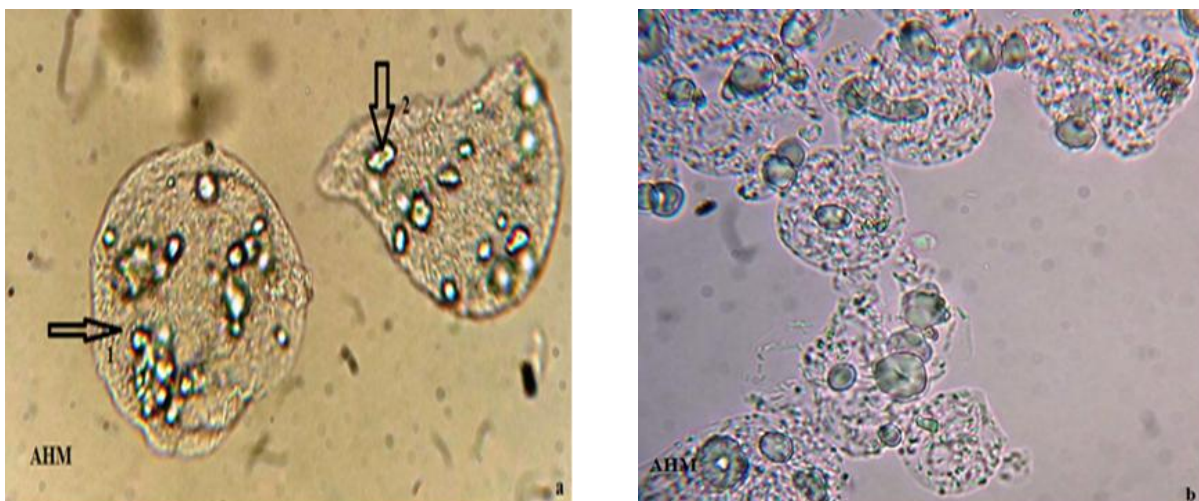


Figura 18 – Microscopia ótica de Micropartículas AHM (a) Micropartículas AHM onde, número 1 evidencia o alginato de sódio no interior da partícula e número 2 evidencia o prebiótico Hi-maize (100X). (b) Micropartículas AHM aglomeradas (40X).

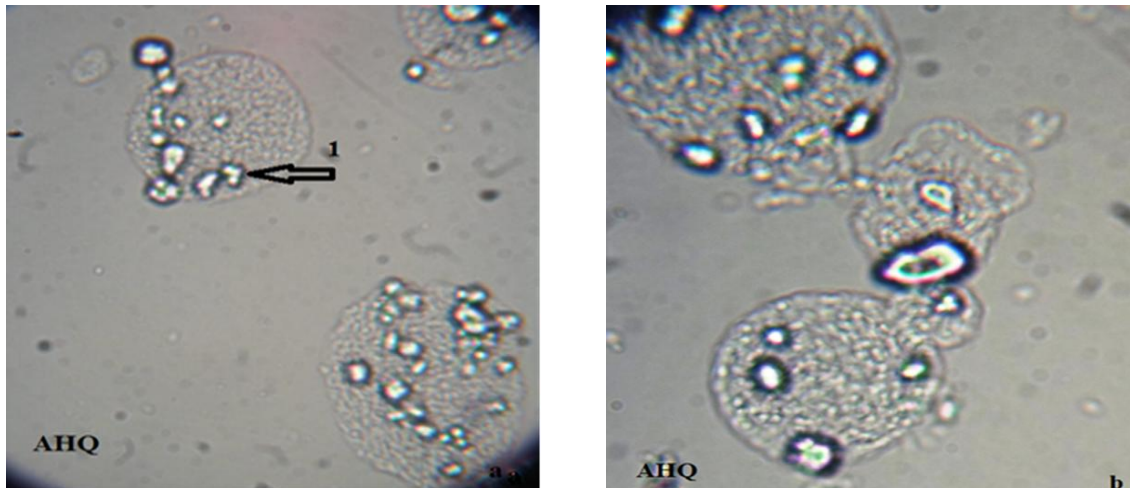


Figura 19 – Microscopia ótica de Micropartículas de AHQ (a) Micropartículas AHQ onde, número 1 evidencia o prebiótico Hi-maize (40X). (b) Micropartículas AHQ aglomeradas (40X).

#### 4.2.2 Microscopia Eletrônica de Varredura

A microestrutura das micropartículas liofilizadas (secas) nos diferentes tratamentos (ALGL, AHML e AHQL) foi observada em microscópio eletrônico de varredura (MEV).

A morfologia das micropartículas liofilizadas por microscopia eletrônica de varredura (Figuras 20, 21 e 22), indicou um alto grau de aglomeração levando a uma perda da forma esférica e de tamanhos variados, independente do tratamento analisado. No entanto, a observação em um aumento maior (750 x e 1000x) mostra que alguns fragmentos mantiveram o contorno um pouco mais esférico (Figura 20b, 22b, respectivamente), e pôde-se observar também a presença dos microrganismos.

Estes resultados assemelham-se com os encontrados por Mukai Correa (2003), que produziu microcápsulas obtidas por polimerização iônica utilizando quatro tipos diferentes de polissacarídeos (alginato, carragena, goma gelana e pectina) como material encapsulante, e após liofilizar observou perda parcial da forma esférica. Lorenz (2009), ao encapsular *Lactobacillus acidophilus* em alginato pelo método de emulsificação, seguido de liofilização obteve cápsulas com formato elíptico e superfície não porosa.

Veelken e Pape (1984) explicam que a desidratação acentuada dos géis de polissacarídeos produzidos por liofilização pode contribuir para a formação de matriz porosa, semelhante a uma esponja. Skjåk Braek et al., (1989) relataram que as micropartículas de

alginato normalmente têm uma estrutura heterogênea, com uma camada de superfície densa e um núcleo solto, devido ao mecanismo de gelificação heterogêneo, o que resulta no centro recolhido durante o processo de secagem.

No caso da secagem por liofilização, as microesferas são submetidas a baixas temperaturas, resultando na formação de cristais de gelo e a sublimação dos cristais de gelo sob pressão reduzida, resulta na formação de produto seco poroso (DOLLY et al., 2011).

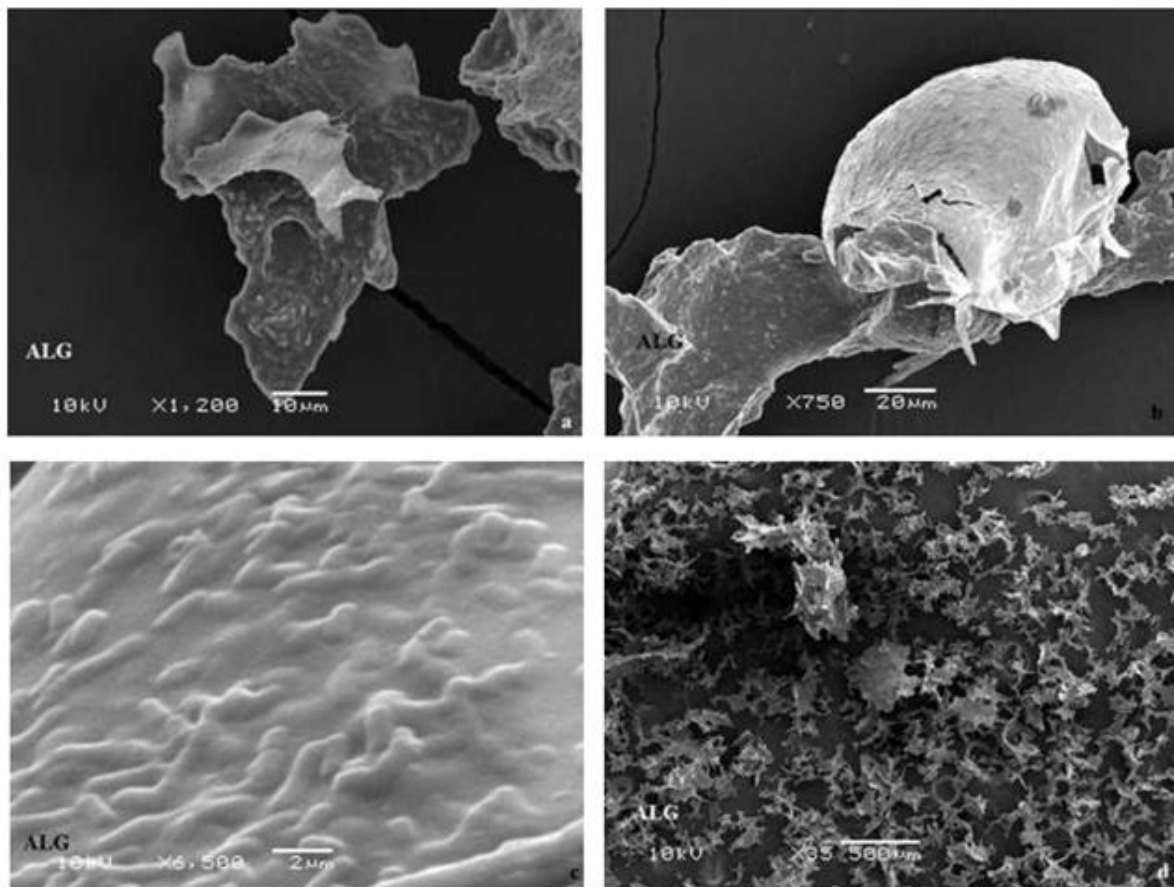


Figura 20 – Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato (ALG), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto da micropartícula (1200X); b. Aspecto da micropartícula (750X); c. Superfície da micropartícula evidenciando os microrganismos (6,500X); d. Aspecto da distribuição das partículas formadas (35x).



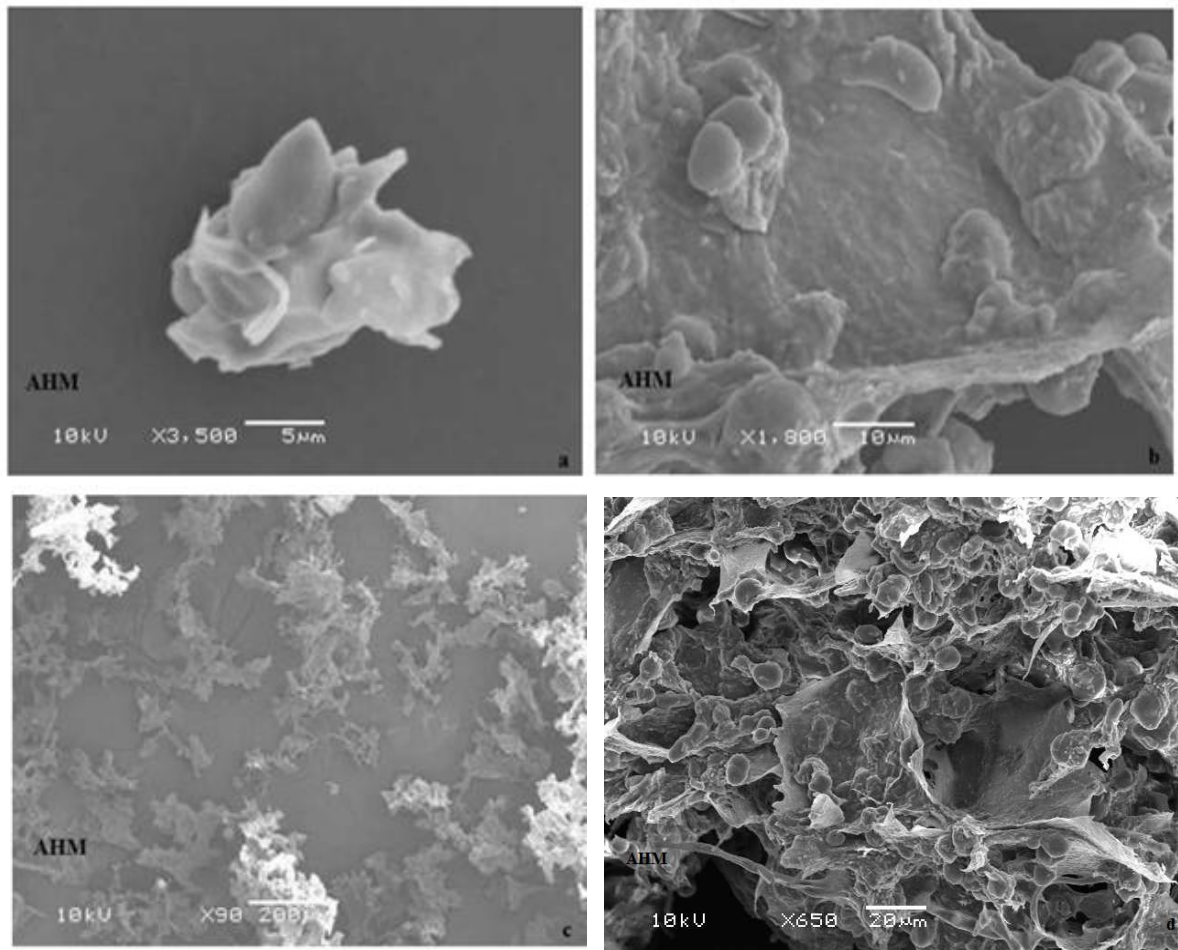


Figura 21 – Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato e Hi-maize (AHM), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto da micropartícula (1,800X); b. Superfície da micropartícula evidenciando o prebiótico Hi-maize e os microrganismos (750X); c. Aspecto da distribuição das partículas formadas (90X); d. Aspecto da distribuição das partículas formadas (650X).

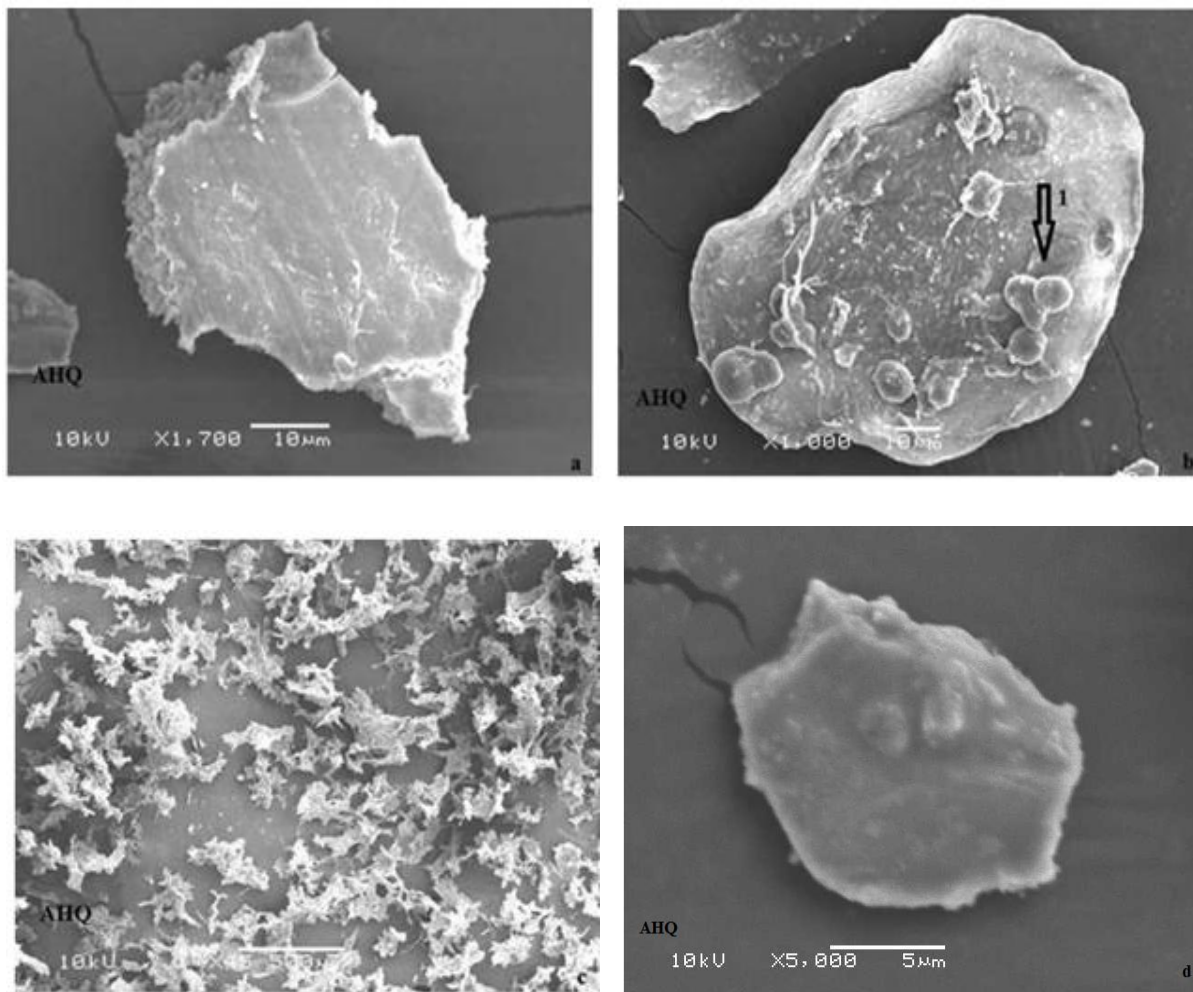


Figura 22 – Morfologia e microestrutura das micropartículas liofilizadas com matriz de alginato, Hi-maize e quitosana (AHQ), obtidas por microscopia eletrônica de varredura. a. Aspecto da micropartícula (1,700X); b. Aspecto da micropartícula onde o número 1 evidencia o prebiótico Hi-maize (1000X); c. Aspecto da distribuição das partículas formadas (45X); . d. Aspecto da micropartícula (5,000X);

#### 4.2.3 Avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho das microcápsulas

A metodologia desenvolvida para a produção de microcápsulas alcançou bons diâmetros de partícula nos diferentes tratamentos, conforme descritos na tabela 6.

Tabela 6 – Diâmetro médio das micropartículas produzidas nos diferentes tratamentos.

TRATAMENTO	D
ALGU	55.13 $\mu\text{m}$
AHMU	55.56 $\mu\text{m}$
AHQU	70.37 $\mu\text{m}$
ALGL	114.51 $\mu\text{m}$
AHML	78.49 $\mu\text{m}$
AHQ L	112.50 $\mu\text{m}$

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas; ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas.

No presente trabalho, as micropartículas úmidas nos tratamentos ALGU, AHMU e AHQU apresentaram diâmetros médios de 55.13  $\mu\text{m}$ , 55.56  $\mu\text{m}$ , 70.37  $\mu\text{m}$  respectivamente. Nota-se que a adição de Hi-maize na cápsula úmida não influenciou no tamanho, porém a adição da quitosana aumentou o diâmetro das micropartículas. Este resultado assemelha-se com o de Iyer e Kailasapathy, (2005) que também apresentaram suas partículas aumentadas com o revestimento de quitosana. Ao contrário, os resultados encontrados por Lee, Cha e Park (2004), mostraram que a incorporação de quitosana não causou quaisquer alterações na forma e tamanho das microcápsulas.

De acordo com Champagne e Fustier (2007), microcápsulas com diâmetros maiores podem afetar a textura do alimento no qual será incorporada. Diâmetros menores que 100  $\mu\text{m}$  são preferidos para a maioria das aplicações (ANNAN et al., 2008).

No presente trabalho, as micropartículas liofilizadas nos tratamentos ALGL, AHML e AHQL apresentaram diâmetros médios de 114.51  $\mu\text{m}$ , 78.49  $\mu\text{m}$ , 112.50  $\mu\text{m}$  respectivamente.

A alteração estrutural provocada pelo processo de liofilização geralmente é citada por provocar um aumento no tamanho dos poros (NAKAGAWA et al., 2004). Acredita-se que por este fato estas apresentaram facilidade de inchamento e intumescimento após imersão em água, adquirindo assim tamanhos maiores que as microcápsulas úmidas e que não foram submetidas ao processo de secagem.

Para o tratamento ALGL que continha somente alginato na composição, esses valores elevados são característicos de micropartículas produzidas com polissacarídeos formadores de géis, devido a sua elevada capacidade de retenção água (MUKAI CORREA, 2005).

Esta diferença de tamanho pode estar relacionada à capacidade de hidratação dos polissacarídeos. Grupos laterais químicos como COO<sup>-</sup> e SO<sub>3</sub><sup>-</sup>, presentes em polissacarídeos

podem interagir com as moléculas de água através de pontes de hidrogênio (CROUZIER; PICART, 2009; CROUZIER; BOUDOU; PICART, 2010).

O tratamento AHQL, pode ser explicado pela alta hidrofiliabilidade da quitosana, devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica (TONHI; PEPLIS, 2002).

Neste caso, nota-se que as micropartículas liofilizadas do tratamento AHML obtiveram seus diâmetros menos alterado quando comparado ao tratamento ALGL e AHQL. Isso pode ter ocorrido pelo fato das moléculas de amilose contidas no amido, em umidade elevada, possuírem a tendência de se orientar paralelamente devido a sua linearidade, aproximando-se o suficiente para a formação de ligações de hidrogênio entre hidroxilas de polímeros adjacentes, por isso a afinidade por água do polímero é reduzida (SHIMAZU, et al., 2007).

Ribeiro (2011), também obteve cápsulas liofilizadas com diâmetros maiores (367,4  $\mu\text{m}$ ) após hidratação quando comparado com as cápsulas úmidas (253,3  $\mu\text{m}$ ) utilizando como material encapsulante pectina e manteiga pelo método de gelificação iônica.

Na técnica de nanoencapsulação também é comum esse aumento do tamanho de partículas liofilizadas após hidratação. Lee, Powers e Baney (2004), obtiveram nanopartículas de quitosana liofilizadas com diâmetro de 157,2 nm e após ressuspensão em água observaram diâmetros de 352,4 nm.

Para preparar partículas com tamanhos uniformes é essencial que a viscosidade da solução, a queda das gotas sob a agitação e a distância entre bico atomizador e o meio de gelificação sejam mantidos constantes, durante o processo de formação das partículas; uma ligeira variação em qualquer um destes parâmetros pode resultar na produção de partículas com tamanho não homogêneo (BAJPAI; TANKHIWALE, 2008). Os gráficos representando a distribuição das partículas se encontram em anexo.

#### **4.3 Umidade das microcápsulas**

O conteúdo de água de partículas probióticas é um fator crítico que influencia a estabilidade da bactéria durante o armazenamento (WANG; YU; CHOU, 2004; SANTIVARANGKNA et al., 2007; MENG et al., 2008; CHAN et al., 2011). Em geral, os



microrganismos sobrevivem melhor com atividade de água baixa. Entretanto, a secagem em excesso pode diminuir a viabilidade e estabilidade dos microrganismos (LI et al., 2011).

No presente trabalho, as microcápsulas úmidas de ALGU, AHMU e AHQU, contendo *Lactobacillus acidophilus La-14*, apresentaram, em média,  $95,74\% \pm 0,23$ ,  $94,36\% \pm 0,18$  e  $94,37\% \pm 0,06$  de umidade, respectivamente (Tabela 7). Resultados semelhantes foram encontrados por Mukai-Corrêa et al., (2005) que obtiveram valores superiores a 90% de umidade em microcápsulas obtidas por gelificação iônica. No mesmo estudo os autores justificam que esses valores elevados são característicos de micropartículas produzidas com polissacarídeos formadores de géis, devido a sua elevada capacidade de retenção água.

Os resultados de umidade (Tabela 7) demonstram que, as microcápsulas produzidas somente com alginato de sódio (ALG), apresentaram teores de umidade significativamente maior ( $p < 0,05$ ) que as produzidas com Hi-maize e quitosana.

Tabela 7 – Umidade (%) das microcápsulas úmidas produzidas nos diferentes tratamentos.

Tratamento	Umidade
ALGU	$95,74 \pm 0,23^A$
AHMU	$94,36 \pm 0,18^B$
AHQU	$94,37 \pm 0,06^B$

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas.

#### 4.4 Atividade de água das microcápsulas (Aa)

Em relação à atividade de água (Tabela 8), as microcápsulas úmidas não diferiram significativamente entre si ( $p < 0,05$ ), apresentando médias iguais a 0,99. Resultados semelhantes foram encontrados por Boscaroli, (2010) que ao produzir três tipos de cápsulas contendo alginato de sódio, como principal material de revestimento, estudou a adição de amido resistente e goma acácia e não encontrou diferença significativa para atividade de água entre os tratamentos. Dessa forma, essas microcápsulas não seriam adequadas para aplicação em alimentos com baixa atividade de água.

Tabela 8 – Atividade de água (Aa) das microcápsulas úmidas e liofilizadas produzidas nos diferentes tratamentos

Tratamento	A <sub>w</sub>
ALGU	0,99±0,00 <sup>A</sup>
ALGL	0,11±0,00 <sup>D</sup>
AHMU	0,99±0,00 <sup>A</sup>
AHML	0,22±0,03 <sup>C</sup>
AHQU	0,99±0,00 <sup>A</sup>
AHQL	0,61±0,01 <sup>B</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas; ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas.

A atividade de água (Aa) das microcápsulas liofilizadas, os tratamentos ALGL e AHML apresentaram valores menores que 0,3 (Tabela 8), o que de acordo com Tonon et al. (2009), é muito positivo para a estabilidade das partículas, visto que há menos água livre disponível para reações bioquímicas, prolongando assim a vida de prateleira. Resultados similares foram obtidos por Fritzen-Freire et al. (2012) para microcápsulas de *Bifidobacterium* com leite desnatado reconstituído obtidas por *spray drying*. No entanto, observa-se que o tratamento AHQL apresentou resultados relativamente mais altos. Isso pode ser explicado pela alta hidrofiliabilidade da quitosana, devido ao grande número de grupos hidroxila e grupos amino presentes na cadeia polimérica (TONHI; PEPLIS, 2002). De acordo com Masters (1985) e Kearney et al. (2009) a atividade de água deve estar abaixo de 0,25 para aumentar a estabilidade das microcápsulas.

Santivarangkna et al. (2008) concluíram que, a fim de manter a viabilidade das partículas probióticas, a atividade de água deveria ser mantida a menor possível, e Yang (2010) mostrou que a viabilidade celular diminui com o aumento da Aa. Uma taxa de Aa alta ocasiona um aumento da mortalidade dos microrganismos probióticos durante o armazenamento, uma vez que propicia o crescimento de outros microrganismos, assim como reações químicas indesejáveis (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007; WANG et al., 2004; YING et al., 2010).

Foi relatado que uma Aa menor que 0,3 é essencial para uma boa sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007). De acordo com Koc

et al. (2010) e KUMAR; MISHRA (2004), a Aw deve estar entre 0,11-0,23 para a maioria das espécies de *Lactobacillus*. Portanto, o valor de Aa observado no presente estudo encontra-se adequado nos tratamentos ALGL e AHML para microcápsulas probióticas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus La-14*.

#### **4.5 Avaliação da resistência de *Lactobacillus acidophilus La-14* microencapsulados nos diferentes tratamentos ao processo de secagem**

A liofilização é uma técnica que vem sendo bastante utilizada para a manutenção de bactérias probióticas microencapsuladas, pois mantém a sobrevivência das células e viabiliza o armazenamento durante um longo período de tempo (COOK et al., 2012; MORGAN et al., 2006), se tornando assim um método adequado para a adição destas microcápsulas em alimentos com baixa atividade de água.

Antes do processo de liofilização, as micropartículas úmidas nos tratamentos ALGU, AHMU e AHQU obtiveram contagens de  $9,11 \pm 0,07$ ,  $9,20 \pm 0,03$ ,  $9,38 \pm 0,08$  log UFC/g, respectivamente (Figura 23). Após a liofilização das micropartículas probióticas úmidas houve uma redução da contagem de *L. acidophilus* de 2,46 log UFC/ml, 1,51 log UFC/ml, e 2,58 log UFC/ml para os tratamentos ALGL, AHML e AHQL respectivamente.

Observa-se na figura 23, que antes do processo de secagem o tratamento AHQ apresentou melhor viabilidade ( $p < 0,05$ ), porém, após o processo de liofilização o tratamento AHM diferiu significativamente ( $p < 0,05$ ) de ambos os tratamentos. Estes resultados são semelhantes aos de Chan et al. (2011), que após adicionar amido a solução de alginato em microcápsulas de *Lactobacillus Casei*, obtidas por extrusão, observou uma redução de 1,5 – 2,0 log UFC/g quando comparadas as que tinham somente alginato, onde houve uma perda de 4 log na viabilidade de microcápsulas liofilizadas.

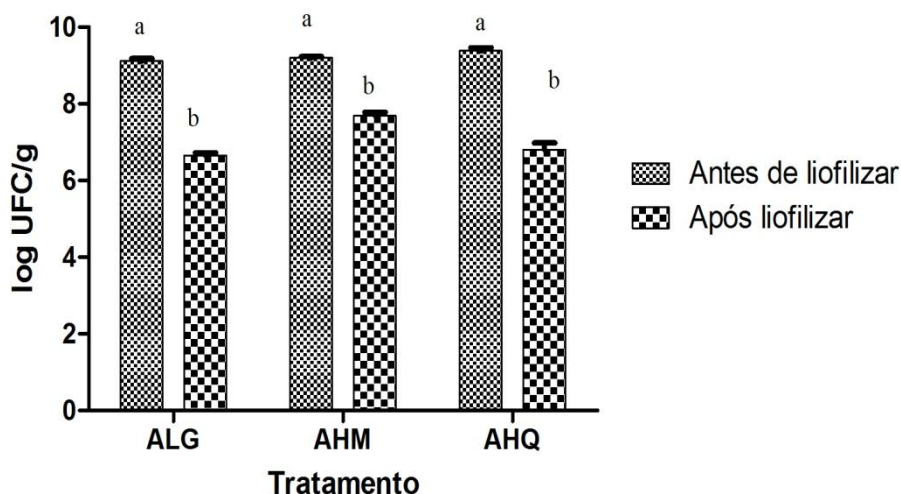


Figura 23 – Viabilidade de microcápsulas probióticas nos diferentes tratamentos antes e após o processo de secagem por liofilização.

Médias seguidas de letras distintas diferem estatisticamente nos tratamentos (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

ALG = Alginato de sódio; AHM = Alginato de sódio + Hi-maize; AHQ = Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana

Estes resultados demonstram que a viabilidade das microcápsulas probióticas em ambos os tratamentos registrou um decréscimo significativo ( $p < 0,05$ ) após a liofilização e acredita-se que este processo de secagem precisa ser otimizado com a utilização de agentes crioprotetores.

O grau de viabilidade celular após liofilização varia de acordo com inúmeros fatores, incluindo a estirpe de microrganismo e também a eficácia do agente protetor utilizado durante o processo de secagem (MORGAN et al., 2006). Alguns exemplos de agentes crioprotetores seriam sólidos de leite sem gordura, soro, trealose, glicerol, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e polímeros, tais como o dextrano e polietileno glicol (HUBALEK, 2003).

Microrganismos probióticos são sensíveis à secagem por congelamento, devido à deterioração do estado fisiológico das células. Um crioprotetor é uma substância que se acumula no interior das células para reduzir a diferença osmótica com o ambiente externo (KETS; TEUNISSEN; DE BONT, 1996) ou uma substância que rodeia as células para melhorar a tolerância ao frio.

Conforme estudos de Sultana et al., (2000), ao utilizar glicerol como agente crioprotetor em diferentes concentrações (15, 20 e 30%) às microcápsulas de 2% de alginato de sódio e 2% de amido obtiveram melhores resultados na viabilidade de *L. casei* durante a liofilização. Da mesma forma, Albertini et al. (2010), ao utilizarem 10% do mesmo agente

crioprotetor também encontrou maior viabilidade em microesferas contendo *L. acidophilus* e *B.lactis*.

Apesar de algumas limitações do processo de liofilização a nível industrial, que incluem os custos operacionais e de capital elevado, devido às baixas temperaturas, alto vácuo e longos tempos de residência exigidos (CHEN, 2007; OLIVEIRA et al., 2007a), a encapsulação de microrganismos probióticos e secagem em liofilizador em conjunto são alternativas viáveis para a adição em alimentos secos com característica probiótica. Como mostra a figura 23, mesmo após a secagem a viabilidade ainda manteve-se de acordo com a legislação que estipula limites de  $10^6$  a  $10^7$  UFC/g (FAO/OMS, 2001).

#### **4.6 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulados nos diferentes tratamentos frente às condições gastrointestinais simuladas**

A principal barreira dos microrganismos probióticos após sua ingestão é o trato gastrointestinal (TGI), onde estes devem resistir ao suco gástrico, à bile e à secreção pancreática mantendo-se viáveis para colonizar o intestino e promover seu efeito benéfico (DEL PIANO et al., 2006a).

As Tabelas 9 e 10 apresentam a viabilidade (log UFC/g) das microcápsulas úmidas e liofilizadas nos diferentes tratamentos contendo *Lactobacillus acidophilus* La-14 durante a incubação sequencial, em condições simuladas do ambiente gástrico em pH 1,8, por 120 minutos. Logo o pH foi alterado para 5,0 para simular as condições do ambiente intestinal, também por 120 minutos e para finalizar a análise, o pH foi novamente alterado para 7,5 ainda simulando condições intestinais, onde as microcápsulas permaneceram por mais 120 minutos totalizando 6 horas de análise.

Comparando as três formulações de microcápsulas úmidas dos tratamentos ALGU, AHMU e AHQU (Tabela 9) após aumento do pH 1,8 para 5,0 e , em seguida, 5,0 para 7,5 , o número de células viáveis para todos os tratamentos foi  $10^6$  log UFC/g, estando dentro dos padrões exigidos para que ocorram os benefícios exercidos pelos probióticos (FAO/OMS, 2001).

Tabela 9 – Viabilidade de microcápsulas úmidas ALGU, AHMU e AHQU frente a condições gastrointestinais simuladas, utilizando diferentes pHs, por um período de 360 minutos.

Tratamento/ Tempo (minutos)	pH	ALGU	AHMU	AHQU
0	-	9,78 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	9,88 ± 0,03 <sup>aA</sup>	9,87 ± 0,08 <sup>aA</sup>
5	1,8	4,87 ± 0,04 <sup>bF</sup>	5,50 ± 0,15 <sup>aE</sup>	4,58 ± 0,04 <sup>cF</sup>
30	1,8	4,42 ± 0,03 <sup>aG</sup>	4,30 ± 0,05 <sup>bG</sup>	4,17 ± 0,03 <sup>cH</sup>
120	1,8	4,14 ± 0,04 <sup>bH</sup>	3,92 ± 0,06 <sup>cI</sup>	4,25 ± 0,03 <sup>aG</sup>
125	5,0	4,18 ± 0,05 <sup>bH</sup>	4,06 ± 0,03 <sup>cH</sup>	4,93 ± 0,06 <sup>aE</sup>
150	5,0	4,61 ± 0,08 <sup>bG</sup>	4,40 ± 0,07 <sup>cG</sup>	5,18 ± 0,06 <sup>aD</sup>
240	5,0	5,51 ± 0,07 <sup>aE</sup>	4,81 ± 0,02 <sup>cF</sup>	5,21 ± 0,02 <sup>bD</sup>
245	7,5	6,10 ± 0,09 <sup>aD</sup>	6,07 ± 0,03 <sup>aD</sup>	6,17 ± 0,03 <sup>aC</sup>
270	7,5	6,17 ± 0,33 <sup>bB</sup>	6,29 ± 0,06 <sup>aC</sup>	6,29 ± 0,02 <sup>aB</sup>
360	7,5	6,11 ± 0,03 <sup>cC</sup>	6,87 ± 0,03 <sup>aB</sup>	6,35 ± 0,03 <sup>bB</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas

No final de 360 minutos de análise obtiveram-se reduções de log de 3,67, 3,01 e 3,52 para as microcápsulas ALGU, AHMU e AHQU, respectivamente, quando comparadas à contagem do tempo zero, demonstrando que os três tratamentos apresentaram diferenças significativas entre si. O tratamento AHMU se destacou apresentando a menor perda de viabilidade no decorrer da simulação do trato gastrointestinal.

Estes resultados indicam que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-14 em microcápsulas, utilizando alginato de sódio como principal material encapsulante, pode aumentar a sobrevivência celular mesmo quando submetido a condições adversas, como o pH extremamente ácido do estômago, tornando esta técnica potencialmente adequada para a liberação de bactérias viáveis no trato gastrointestinal humano. No entanto, observa-se que a proteção pode ser significativamente melhorada se houver a adição de um prebiótico e/ou prebiótico + quitosana na formulação da cápsula.

A adição de 1% de amido resistente em microcápsulas de alginato de sódio com *Lactobacillus spp* com revestimento adicional de quitosana, significativamente aumentou a

sobrevivência destas bactérias quando submetidas a condições ácidas e sais biliares em comparação com microcápsulas somente de alginato (IYER; KAILASAPATHY, 2005).

Koo et al. (2001) e Yu et al. (2001), relataram que os microrganismos *Lactobacillus casei* e bifidobactérias em cápsulas de alginato contendo quitosana apresentaram maior viabilidade do que cápsulas somente de alginato corroborando com os resultados do presente estudo.

Lee, Cha e Park (2004), investigaram o efeito de micropartículas de alginato revestidas com quitosana na sobrevivência de *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 em suco gástrico simulado, sucos intestinais e concluíram que a microencapsulação com alginato e quitosana confere um melhor revestimento e uma maneira mais eficaz de entrega bacteriana viável para o cólon.

Liserre et al., (2007), encapsularam *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* em quatro formulações diferentes: alginato, alginato-quitosana, alginato-quitosana-alginato-Sureteric e quitosana-Acryl-Ezee e analisaram a sobrevivência após simulação das condições gastrointestinais. Concluíram que, todas as microcápsulas foram eficiente promovendo a liberação controlada de bifidobactérias e que a microencapsulação com polímeros entéricos melhorou o taxa de sobrevivência desses microrganismos.

Em contraste, Sun e Griffiths (2000) e Sultana et al. (2000) encapsularam bifidobactérias em cápsulas de alginato + xantana e alginato + amido, respectivamente, mas ambos os estudos falharam em produzir um decréscimo significativo na sobrevivência quando as culturas foram submetidas a condições *in vitro*, em pH ácido. Além disso, Favaro - Trindade e Grosso (2000) analisaram que a imobilização em alginato não demonstrou eficácia no aumento da tolerância de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* em condições gastrointestinais.

Quanto a viabilidade das microcápsulas na forma liofilizada, observou-se (Tabela 10) que após duas horas de exposição a condições gástricas simuladas em pH 1,8, a população de *Lactobacillus acidophilus* La-14 apresentou contagens reduzidas, demonstrando assim que, provavelmente não houve liberação da cápsula. Todos os tratamentos foram resistentes ao pH ácido, pois, conforme aumentou o pH observou-se um aumento da viabilidade dos microrganismos. O tratamento AHML apresentou a melhor estabilidade frente as condições gastrointestinais simuladas ( $p < 0,05$ ) entre os tratamentos.

Tabela 10 – Viabilidade de microcápsulas liofilizadas ALGL, AHML e AHQL frente a condições gastrointestinais simuladas, utilizando diferentes pHs, por um período de 360 minutos.

Tratamento / Tempo (minutos)	pH	ALGL	AHML	AHQL
0	-	6,65 ± 0,07 <sup>bA</sup>	7,69 ± 0,09 <sup>Aa</sup>	6,80 ± 0,18 <sup>bA</sup>
5	1,8	4,23 ± 0,05 <sup>bG</sup>	4,61 ± 0,04 <sup>aE</sup>	4,13 ± 0,03 <sup>cF</sup>
30	1,8	4,08 ± 0,04 <sup>cH</sup>	4,48 ± 0,07 <sup>aEF</sup>	4,27 ± 0,04 <sup>bE</sup>
120	1,8	3,92 ± 0,06 <sup>bI</sup>	4,36 ± 0,03 <sup>aF</sup>	4,51 ± 0,12 <sup>aD</sup>
125	5,0	4,23 ± 0,03 <sup>aG</sup>	4,17 ± 0,10 <sup>aG</sup>	3,40 ± 0,08 <sup>bI</sup>
150	5,0	4,47 ± 0,04 <sup>aF</sup>	4,22 ± 0,15 <sup>bG</sup>	3,58 ± 0,04 <sup>cH</sup>
240	5,0	4,66 ± 0,04 <sup>aE</sup>	4,51 ± 0,07 <sup>bE</sup>	3,92 ± 0,05 <sup>cG</sup>
245	7,5	4,87 ± 0,04 <sup>bD</sup>	4,96 ± 0,04 <sup>aD</sup>	4,23 ± 0,05 <sup>cEF</sup>
270	7,5	5,11 ± 0,04 <sup>bC</sup>	5,37 ± 0,05 <sup>aC</sup>	4,84 ± 0,03 <sup>cC</sup>
360	7,5	5,41 ± 0,07 <sup>bB</sup>	5,81 ± 0,04 <sup>aB</sup>	5,10 ± 0,02 <sup>cB</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas

Sabe-se que a microencapsulação em alginato é eficiente no aumento da resistência de bactérias probióticas em baixos pHs (CHANDRAMOULI et al., 2004; IYER et al., 2005; DING; SHAH, 2009). Entretanto, o aumento da sobrevivência de bactérias probióticas microencapsuladas depende não só do material usado no revestimento, mas também do tipo de revestimento, da concentração do gel, do tamanho das microcápsulas (LEE; HEO, 2000; OLIVEIRA, 2006) e da espécie microencapsulada (SOHAIL, 2011).

No presente estudo, para todos os tratamentos foi utilizado alginato de sódio na concentração de 1%. Estudos indicam que a viabilidade de *Lactobacillus* encapsulado em alginato de sódio, submetido a condições gástricas simuladas, aumenta conforme a concentração do polímero devido ao aumento dos sítios de ligação para o cálcio, favorecendo assim maior reticulação (CHANDRAMOULI et al., 2004).

Mandal et al. (2006) relataram que a sobrevivência à bile de *Lactobacillus casei* microencapsulado em alginato foi dependente da concentração do agente encapsulante. O aumento da concentração de 2 para 4% de alginato conferiu maior proteção às células.



Chandramouli et al. (2004) relataram redução de 1 log na contagem de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado em alginato, após 3 h de incubação em pH 3,0. A exposição da bactéria microencapsulada pelo mesmo período de tempo ao pH 2,0 resultou em um decréscimo de 3 log na contagem de células. Trindade e Grosso (2000) reportaram que microcápsulas de *B. bifidum* e *L. acidophilus* obtidas somente com alginato não protegeram as células em 2 e 4% de bile.

Além do alginato de sódio, neste trabalho testou-se a eficiência do prebiótico e da quitosana adicionados à cápsula e observou-se que independente da cápsula ser úmida ou liofilizada (Tabela 11) as cápsulas que continham prebiótico na composição foram mais resistentes ao longo da simulação do trato gastrointestinal. Estes resultados corroboram com os de Sultana et al. (2000).

O tratamento que continha o prebiótico associado a quitosana em sua composição (AHQ) na forma liofilizada não apresentou maior viabilidade ao final de 360 minutos de análise pois segundo Murata (1999), cápsulas de alginato com quitosana desenvolvem uma complexação que reduz a porosidade das cápsulas de alginato e diminui a liberação do encapsulado.

Quando alginato é gotejado sobre uma solução somente de quitosana, a interação eletrostática dos grupos carboxil do alginato com os grupos amina da quitosana, resultam na formação de uma membrana. Existem muitas vantagens do revestimento com quitosana, como melhoria das propriedades de encapsulamento de drogas e bioadesividade, bem como prolongar as propriedades de liberação das drogas (SHU, 2001).

O presente estudo demonstrou que a técnica adaptada com adição de quitosana à solução de  $\text{CaCl}_2$  aumentou a estabilidade das microcápsulas contra as condições agressivas do pH ácido. YOO et al. (1996), utilizaram três fórmulas contendo alginato para microencapsular *Lactobacillus casei*. Na primeira formulação, utilizaram alginato de cálcio, na segunda alginato de bário e na terceira alginato na presença de quitosana e obtiveram um melhor resultado com as cápsulas formadas com alginato de bário e com alginato na presença de quitosana, pelo fato destas cápsulas não terem sido destruídas no meio ácido.

A microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-14 nos tratamentos ALGU, AHMU e AHQU (Tabela 9) na forma úmida oferece um meio eficaz de entrega de células bacterianas viáveis a nível intestinal, em condições apropriadas e ajuda a manter a sua sobrevivência durante a passagem simulada pelo trânsito gastrointestinal. Entretanto, na forma liofilizada (Tabela 10) apesar da recuperação das células, essa não foi o suficiente para o número ideal e estabelecido de células viáveis, ressaltando que o número inicial de sua

contagem antes de ser submetido ao teste *in vitro* já era reduzido em função do método de secagem. Desse modo, sugere-se a necessidade da adição de um agente crioprotetor e/ou demais adjuvantes no material de revestimento. As figuras 24 a 32 demonstram o processo de liberação das micropartículas úmidas e liofilizadas nos diferentes tratamentos quando expostas a pHs de 1,8, 5,0 e 7,5.

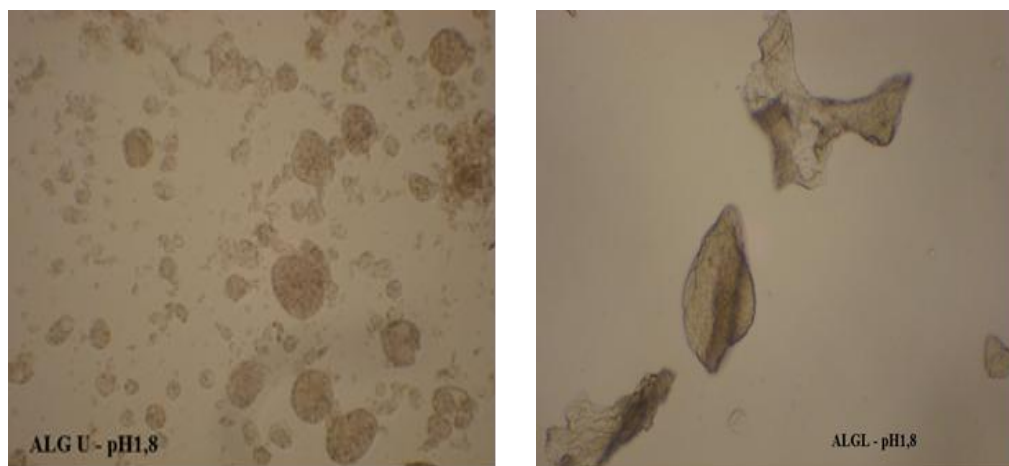


Figura 24 – Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 1,8.

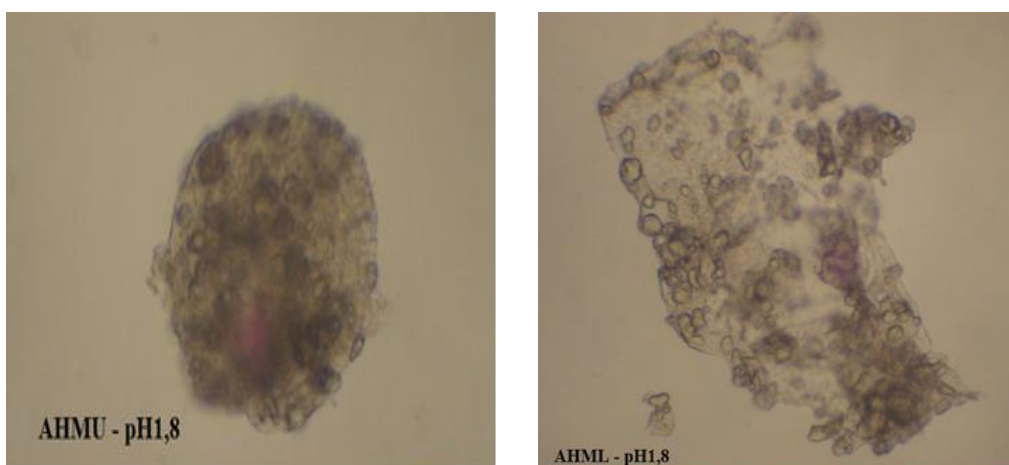


Figura 25 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 1,8.

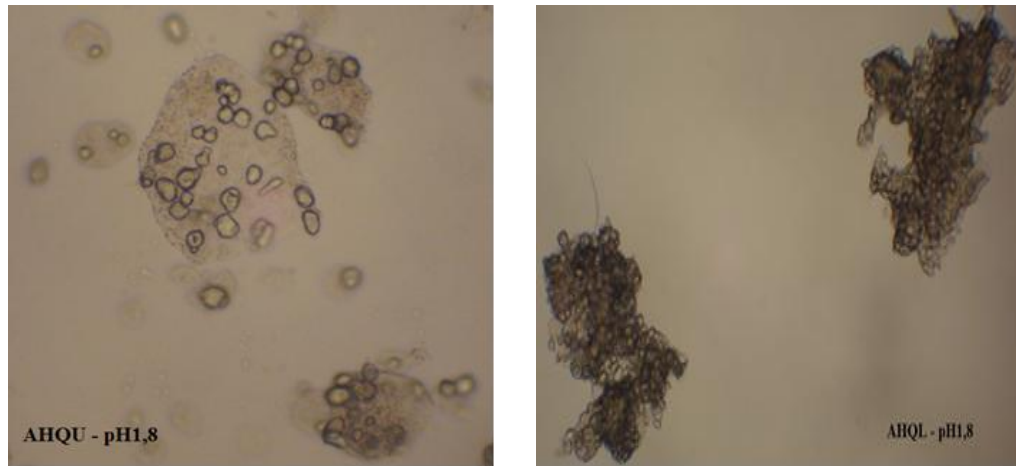


Figura 26 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 1,8.

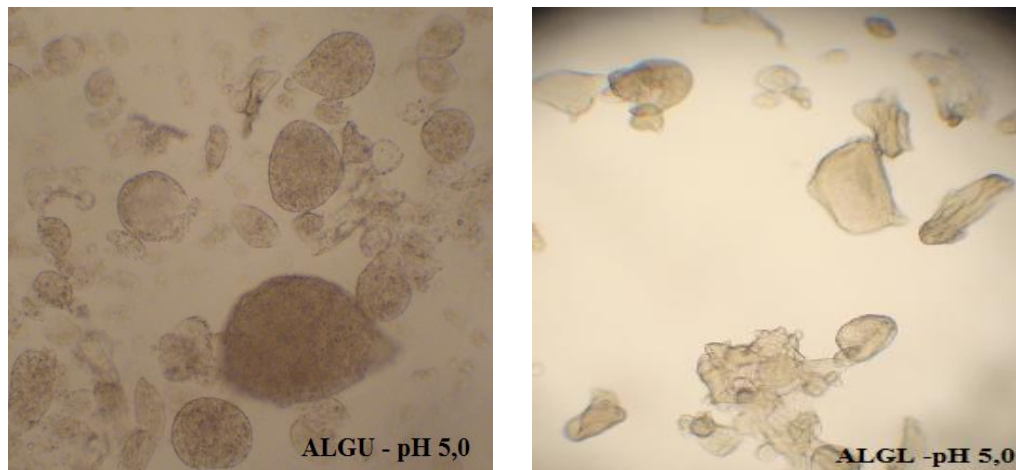


Figura 27 – Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 5,0.

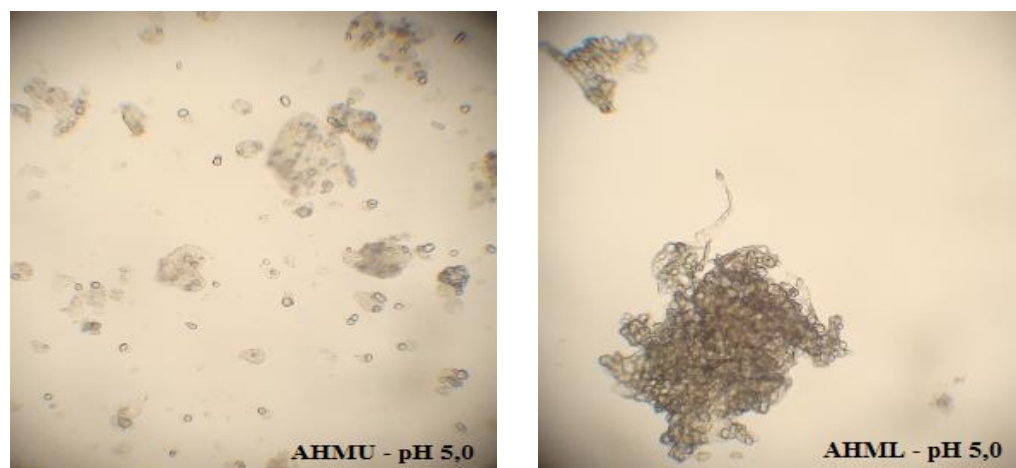


Figura 28 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 5,0.

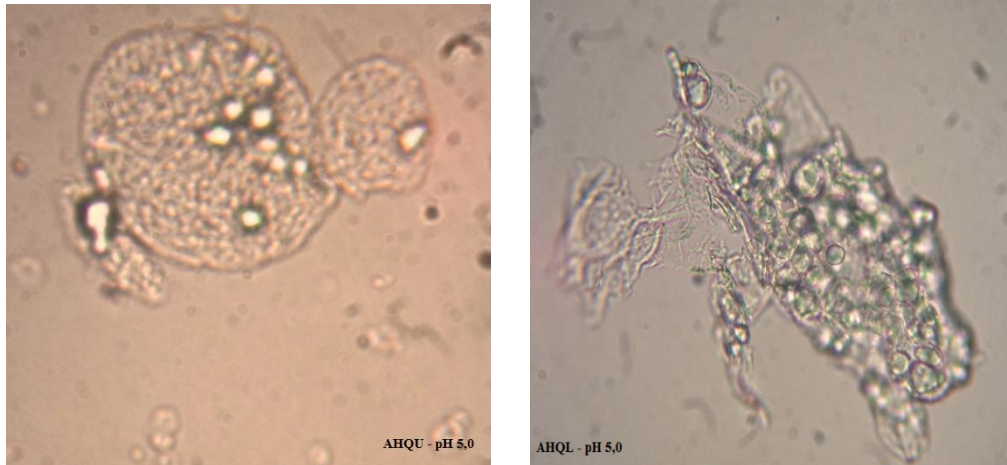


Figura 29 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 5,0.

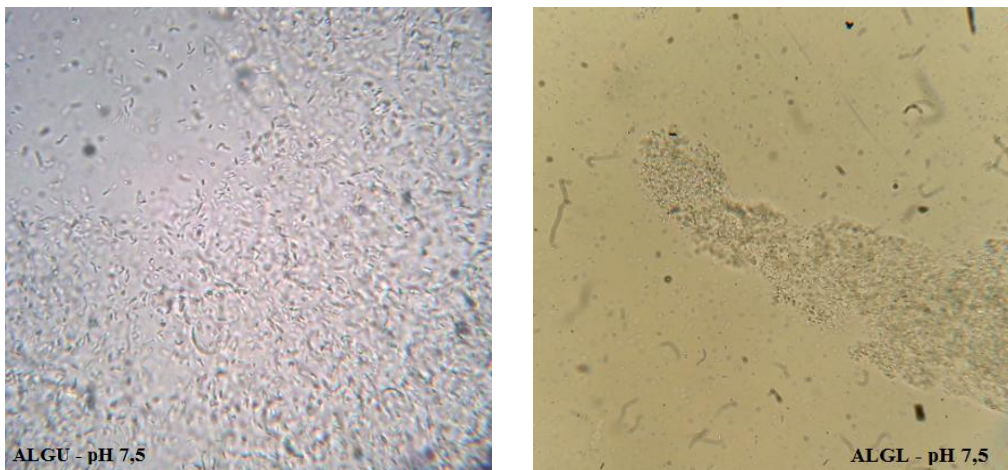


Figura 30 – Microcápsulas de alginato de sódio úmidas (ALGU) e liofilizadas (ALGL) em pH 7,5.

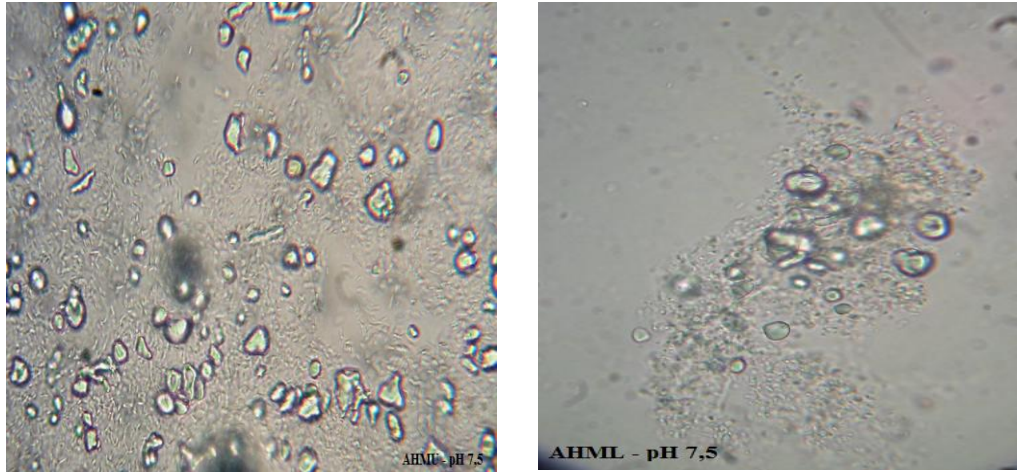


Figura 31 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize úmidas (AHMU) e liofilizadas (AHML) em pH 7,5.

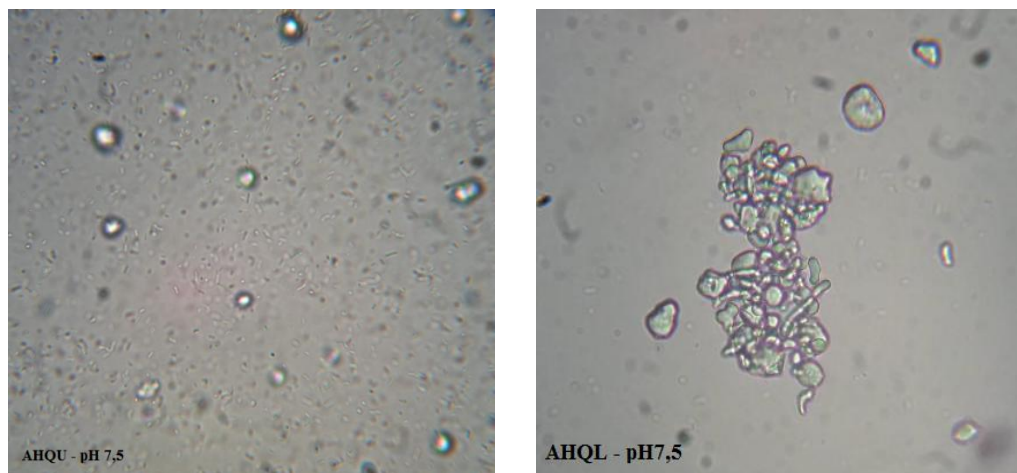


Figura 32 – Microcápsulas de alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas (AHQU) e liofilizadas (AHQL) em pH 7,5.



Tabela 11 – Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulados em diferentes tratamentos na forma úmida e liofilizada frente a condições gastrointestinais simuladas.

Tratamento / Tempo (minutos)	pH	ALGU	ALGL	AHMU	AHML	AHQU	AHQL
0		9,78 ± 0,05 <sup>Aa</sup>	6,65 ± 0,07 <sup>Ac</sup>	9,88 ± 0,03 <sup>Aa</sup>	7,69 ± 0,09 <sup>Ab</sup>	9,87 ± 0,08 <sup>Aa</sup>	6,80 ± 0,18 <sup>Ac</sup>
5	1,8	4,87 ± 0,04 <sup>Fb</sup>	4,23 ± 0,05 <sup>Gd</sup>	5,50 ± 0,15 <sup>Ea</sup>	4,61 ± 0,04 <sup>Ec</sup>	4,58 ± 0,04 <sup>Fc</sup>	4,13 ± 0,03 <sup>Fd</sup>
30	1,8	4,42 ± 0,03 <sup>Ga</sup>	4,08 ± 0,04 <sup>Hd</sup>	4,30 ± 0,05 <sup>Gb</sup>	4,48 ± 0,07 <sup>EFa</sup>	4,17 ± 0,03 <sup>Hc</sup>	4,27 ± 0,04 <sup>Eb</sup>
120	1,8	4,14 ± 0,04 <sup>Hd</sup>	3,92 ± 0,06 <sup>Ie</sup>	3,92 ± 0,06 <sup>Ie</sup>	4,36 ± 0,03 <sup>Fb</sup>	4,25 ± 0,03 <sup>Gc</sup>	4,51 ± 0,12 <sup>Da</sup>
125	5,0	4,18 ± 0,05 <sup>Hb</sup>	4,23 ± 0,03 <sup>Gb</sup>	4,06 ± 0,03 <sup>Hc</sup>	4,17 ± 0,10 <sup>Gb</sup>	4,93 ± 0,06 <sup>Ea</sup>	3,40 ± 0,08 <sup>Id</sup>
150	5,0	4,61 ± 0,08 <sup>Gb</sup>	4,47 ± 0,04 <sup>Fbc</sup>	4,40 ± 0,07 <sup>Gc</sup>	4,22 ± 0,15 <sup>Gd</sup>	5,18 ± 0,06 <sup>Da</sup>	3,58 ± 0,04 <sup>He</sup>
240	5,0	5,51 ± 0,07 <sup>Ea</sup>	4,66 ± 0,04 <sup>Ed</sup>	4,81 ± 0,02 <sup>Fc</sup>	4,51 ± 0,07 <sup>Ee</sup>	5,21 ± 0,02 <sup>Db</sup>	3,92 ± 0,05 <sup>Gf</sup>
245	7,5	6,10 ± 0,09 <sup>Dab</sup>	4,87 ± 0,04 <sup>Dd</sup>	6,07 ± 0,03 <sup>Db</sup>	4,96 ± 0,04 <sup>Dc</sup>	6,17 ± 0,03 <sup>Ca</sup>	4,23 ± 0,05 <sup>EFe</sup>
270	7,5	6,57 ± 0,33 <sup>Ba</sup>	5,11 ± 0,04 <sup>Cd</sup>	6,29 ± 0,06 <sup>Cb</sup>	5,37 ± 0,05 <sup>Cc</sup>	6,29 ± 0,02 <sup>Bb</sup>	4,84 ± 0,03 <sup>Ce</sup>
360	7,5	6,41 ± 0,03 <sup>Cb</sup>	5,41 ± 0,07 <sup>Bd</sup>	6,87 ± 0,03 <sup>Ba</sup>	5,81 ± 0,04 <sup>Bc</sup>	6,35 ± 0,03 <sup>Bb</sup>	5,10 ± 0,02 <sup>Be</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALG = Microcápsulas de Alginato de sódio; AHM = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize; AHQ = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana; U= úmidas; L=lioofilizadas

#### 4.7 Viabilidade das microcápsulas úmidas durante estocagem em diferentes temperaturas

Um dos parâmetros para que um determinado microrganismo seja considerado probiótico, é a sua capacidade de sobreviver durante o tempo de estocagem do produto no qual está adicionado (KOSIN; RAKSHIT, 2006).

As Tabelas 12, 13 e 14 apresentam o efeito das temperaturas ambiente (25° C), de congelamento (-18° C) e de refrigeração (7° C) e do tempo de armazenamento na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 nas microcápsulas úmidas.

Para a temperatura ambiente (Tabela 12), o número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* para todos os tratamentos foi acima de 10<sup>6</sup> log UFC/g, estando dentro dos padrões exigidos para que ocorram os benefícios exercidos pelos probióticos (FAO/OMS, 2001).

Tabela 12 – Efeito da temperatura ambiente (25° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias.

Temperatura Tratamentos / Tempo (dias)	AMBIENTE (25° C)		
	ALGU Log 10 UFC/g	AHMU Log 10 UFC/g	AHQU Log 10 UFC/g
0	9,78±0,05 <sup>aA</sup>	9,88 ±0,03 <sup>aA</sup>	9,87±0,08 <sup>aA</sup>
15	9,24±0,17 <sup>bBC</sup>	9,61±0,01 <sup>aB</sup>	9,07±0,01 <sup>bC</sup>
30	9,60±0,13 <sup>aA</sup>	9,74±0,19 <sup>aAB</sup>	9,53±0,06 <sup>aB</sup>
45	9,07±0,06 <sup>bC</sup>	9,76±0,03 <sup>aAB</sup>	8,28±0,03 <sup>cE</sup>
60	9,37±0,04 <sup>bB</sup>	9,92±0,03 <sup>aA</sup>	8,12±0,02 <sup>cF</sup>
75	7,63±0,27 <sup>cD</sup>	8,81±0,14 <sup>aC</sup>	8,33±0,03 <sup>bDE</sup>
90	7,28±0,08 <sup>bE</sup>	8,59±0,06 <sup>aD</sup>	8,42±0,16 <sup>aD</sup>
105	6,95±0,05 <sup>bF</sup>	8,35±0,08 <sup>aE</sup>	8,29±0,05 <sup>aDE</sup>
120	6,72±0,07 <sup>cG</sup>	8,41±0,03 <sup>aDE</sup>	8,15±0,09 <sup>bF</sup>
135	6,53±0,12 <sup>cG</sup>	7,03±0,25 <sup>bF</sup>	8,00±0,02 <sup>aG</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan, p < 0,05). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan p < 0,05).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas

No entanto, o tratamento AHMU ao longo de 120 dias em temperatura ambiente manteve-se estável com melhor viabilidade apresentando diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) entre os demais tratamentos sendo que após 135 dias, apresentou uma pequena redução fazendo com que o tratamento AHQU se destacasse com melhor viabilidade ao nível de  $p < 0,05$ . Estes resultados sugerem que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-14 em microcápsulas utilizando alginato de sódio como principal material de revestimento, pode aumentar a sobrevivência celular durante a estocagem em temperatura ambiente e que a proteção pode ser significativamente melhorada se houver a adição de um prebiótico e/ou prebiótico + quitosana na formulação da cápsula. Outros estudos mostraram que a encapsulação de diferentes bactérias probióticas utilizando amido resistente como prebiótico e mais revestimento com quitosana aumentaram significativamente a sobrevivência dos microrganismos em até seis meses em temperatura ambiente (IYER; KAILASAPATHY, 2005).

Em relação ao efeito da temperatura de congelamento (Tabela 13) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* observou-se que as microcápsulas revestidas somente com alginato de sódio (ALGU) perderam sua viabilidade aproximadamente em 60 dias e que as microcápsulas de AHMU mantiveram-se estáveis com a melhor viabilidade ao longo de 90 dias com diferenças significativas ( $p < 0,05$ ) comparadas aos outros tratamentos. No entanto, o tratamento AHQU no final de 135 dias de estocagem foi o único que manteve estabilidade acima dos valores recomendados para a vida de prateleira de um produto probióticos ( $p < 0,05$ ), mostrando assim que a adição de prebiótico e quitosana conferiu maior proteção aos microrganismos até os 135 dias. Conrad et al., (2000), afirmam que a morte dos microrganismos após o congelamento está relacionado a formação de cristais de gelo que levam a danos estruturais nas membranas como rupturas, por exemplo, levando à deterioração do estado fisiológico das células. Essa deterioração ocasionada pelo congelamento pode ser amenizada com o uso de agentes crioprotetores, que tem como principal objetivo a redução de injúrias aos materiais biológicos durante o processo de congelamento e estocagem a frio (WOLFE; BRYANT, 2001; COSTA et al., 2009). Homayouni et al. (2008) produziram cápsulas probióticas com 2% de alginato de sódio, 2% de amido e 5% de glicerol pela técnica de emulsão e alcançaram 180 dias de viabilidade a -20°C com valores de  $10^8$  e  $10^9$  UFC/g.



Tabela 13 – Efeito da temperatura de congelamento (18° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias.

Temperatura Tratamento/ Tempo (dias)	CONGELAMENTO (-18 °)		
	ALGU Log 10 UFC/g	AHMU Log 10 UFC/g	AHQU Log 10 UFC/g
0	9,78±0,05 <sup>aA</sup>	9,88±0,03 <sup>aA</sup>	9,87±0,08 <sup>aA</sup>
15	7,63±0,05 <sup>bB</sup>	8,89 ±0,03 <sup>aB</sup>	7,72±0,06 <sup>bB</sup>
30	6,33±0,44 <sup>bD</sup>	7,77±0,08 <sup>aC</sup>	7,75±0,07 <sup>bD</sup>
45	6,84±0,10 <sup>bC</sup>	7,39±0,05 <sup>aD</sup>	6,74±0,16 <sup>bD</sup>
60	5,93±0,04 <sup>cE</sup>	6,88±0,04 <sup>aE</sup>	6,30±0,06 <sup>bE</sup>
75	5,75±0,14 <sup>bEF</sup>	6,97±0,03 <sup>aE</sup>	7,06±0,10 <sup>aC</sup>
90	5,90±0,05 <sup>cE</sup>	6,91±0,07 <sup>aE</sup>	6,35±0,08 <sup>bE</sup>
105	5,77±0,03 <sup>bE</sup>	6,20±0,13 <sup>aG</sup>	6,33±0,02 <sup>aE</sup>
120	5,48±0,05 <sup>cFG</sup>	6,33±0,07 <sup>bF</sup>	6,74±0,05 <sup>aD</sup>
135	5,35±0,07 <sup>cG</sup>	5,81±0,04 <sup>bH</sup>	6,35±0,22 <sup>aE</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas

Na tabela 14, estão expressos os resultados do efeito da temperatura de refrigeração e tempo de armazenamento sobre a viabilidade dos tratamentos utilizados. Observa-se que no dia 15, houve uma redução significativa (3,08 log) nas microcápsulas de alginato de sódio (ALGU). Essa redução também apresentou significância nos tratamentos com adição de prebiótico e quitosana (AHM e AHQ), porém em menor valor (1,65 log e 1,63 respectivamente). A partir do dia 75, o tratamento ALG já havia perdido sua estabilidade com contagens de 5,89±0,05 log UFC/ml. Os demais tratamentos, AHMU e AHQU, apresentaram viabilidade até o dia 105 de armazenamento, quando não apresentaram diferenças significativas entre si ( $p < 0,05$ ). Diversos estudos trazem resultados variados para a estabilidade das microcápsulas mantidas sob refrigeração. Ribeiro (2011) obteve número médio de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* após os 35 dias de armazenamento refrigerado em microcápsulas úmidas em torno de  $10^7$  log UFC/g. Mirzaei, Pourjafar e Homayouni (2012) avaliaram o número de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* durante 182 dias de armazenamento em condições de refrigeração e os resultados mostraram

que a microencapsulação destes microrganismos em 2% de alginato e 2 % de amido resistente foi capaz de manter a taxa de sobrevivência durante todo período de armazenamento. Nualkaekul et al. (2012), analisaram a viabilidade de microcápsulas de alginato e quitosana na sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* durante estocagem por 42 dias a 4° C e verificaram que a concentração de células viáveis permaneceu superior a 5,5 log UFC/ml.

Tabela 14 – Efeito da temperatura de refrigeração (7° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma úmida estocados por 135 dias.

Temperatura	REFRIGERAÇÃO (7° C)		
	ALGU	AHMU	AHQU
Tratamentos/ Tempo (dias)	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g
0	9,78±0,05 <sup>aA</sup>	9,88±0,03 <sup>Aa</sup>	9,87±0,08 <sup>aA</sup>
15	6,70±0,14 <sup>bB</sup>	8,23±0,19 <sup>aB</sup>	8,24±0,02 <sup>aB</sup>
30	6,48±0,08 <sup>cC</sup>	6,73±0,11 <sup>bC</sup>	7,45±0,02 <sup>aC</sup>
45	6,10±0,05 <sup>cd</sup>	6,72±0,06 <sup>aC</sup>	6,25±0,09 <sup>bEF</sup>
60	6,33±0,16 <sup>bC</sup>	6,29±0,05 <sup>bDE</sup>	6,79±0,04 <sup>aD</sup>
75	5,89±0,05 <sup>ce</sup>	6,05±0,03 <sup>bFG</sup>	6,38±0,12 <sup>aE</sup>
90	5,87±0,02 <sup>bE</sup>	6,40±0,16 <sup>aD</sup>	6,03±0,03 <sup>bG</sup>
105	5,37±0,17 <sup>bF</sup>	6,17±0,15 <sup>aEF</sup>	6,13±0,13 <sup>aFG</sup>
120	5,27±0,18 <sup>bFG</sup>	5,50±0,06 <sup>abH</sup>	5,77±0,16 <sup>aH</sup>
135	5,15±0,11 <sup>bG</sup>	5,88±0,05 <sup>aG</sup>	5,75±0,20 <sup>aH</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGU = Microcápsulas de Alginato de sódio úmidas; AHMU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize úmidas; AHQU = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana úmidas

Pode-se observar que o efeito das temperaturas analisadas sobre os tratamentos demonstrou que a temperatura ambiente apresentou melhores resultados de viabilidade para ambos os tratamentos na forma úmida, mantendo a viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado estável ao longo de 135 dias.

Esses resultados indicam que é possível armazenar essas microcápsulas em temperatura ambiente, tornando assim o armazenamento viável em locais onde as instalações de refrigeração são limitadas, considerando também a redução dos custos.

Em relação aos tratamentos, observou-se que a adição do prebiótico e da quitosana, melhorou significativamente a sobrevivência dos microrganismos independente da temperatura analisada. Estudos conduzidos por IYER & KAILASAPATHY (2005); SULTANA et al. (2000) demonstraram que bactérias ácido lácticas encapsuladas com amidos modificados podem sobreviver por mais de 6 meses em temperatura ambiente em condições normais de atmosfera e umidade e de pelo menos 18 meses quando em armazenamento congelado. O amido e o alginato tendem a possuir um sinergismo durante a gelificação, fornecendo assim uma proteção adicional às células microencapsuladas em determinadas concentrações, sendo que o aumento do número de bactérias viáveis pode também ser atribuído à ação prebiótica do amido modificado (SULTANA et al., 2000).

#### **4.8 Viabilidade das microcápsulas liofilizadas durante estocagem em diferentes temperaturas**

As Tabelas 15, 16 e 17 apresentam o efeito das temperaturas ambiente (25° C), de refrigeração (7° C) e de congelamento (-18° C) e do tempo de armazenamento relacionados à viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 nas microcápsulas liofilizadas.

Avaliando as temperaturas de estocagem das microcápsulas liofilizadas nos diferentes tratamentos ao longo de 60 dias, observou-se que a temperatura ambiente (Tabela 15) manteve a estabilidade das microcápsulas nos tratamentos, mantendo a viabilidade apenas por 30 dias nos tratamentos ALGL e AHML. Pedroso et al. (2012) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados por *spray chilling* em matrizes lipídicas que apresentaram contagens maiores que  $10^6$  log UFC/g, por 60 dias a 22° C. Lee, Cha e Park (2004) avaliaram a estabilidade de *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 em micropartículas de alginato revestidas com quitosana de alto peso molecular armazenadas a 22° C e obtiveram valores de  $10^6$  log UFC/g por 30 dias. Sunny-Roberts e Knorr (2009), avaliaram a secagem em *spray dryer* de células de *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 com a adição de trealose, bem como a estabilidade destas partículas durante 42 dias de armazenamento a 25° C. Segundo estes pesquisadores, as populações de lactobacilos permaneceram constantes a um nível de  $10^8$  UFC/g durante todo o período de armazenamento. Em contraste, Teanpaisan et al. (2012) e Santos (2013), não conseguiram manter a viabilidade de suas microcápsulas probióticas quando armazenados a temperatura de

estocagem de 25° C e alegam que na temperatura ambiente há uma maior atividade metabólica dos microrganismos que pode levar a produção de ácidos metabólicos e bacteriocinas e/ou a perda de substratos levando a inativação das células viáveis.

Tabela 15 – Efeito da temperatura ambiente (25° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias.

Temperatura	AMBIENTE (25° C)		
	ALGL	AHML	AHQL
Tratamentos/ Tempo (dias)	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g
0	6,65±0,07 <sup>Ab</sup>	7,69±0,09 <sup>Aa</sup>	6,80±0,18 <sup>Ab</sup>
30	6,05±0,12 <sup>Ba</sup>	6,21±0,12 <sup>Ba</sup>	5,78±0,04 <sup>Bb</sup>
60	5,92±0,03 <sup>Ba</sup>	5,96±0,03 <sup>Ca</sup>	5,63±0,06 <sup>Bb</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas

Na temperatura de refrigeração (Tabela 16), as microcápsulas de ALGL, não apresentaram diferenças significativas no decorrer de 30 dias de estocagem, porém após este período houve uma redução de 0,63 log, fazendo com que esse tratamento perdesse a viabilidade probiótica. Os demais tratamentos AHML e AHQL apresentaram reduções significativas no período de 60 dias, no entanto, continuaram mantendo a viabilidade. Ribeiro (2011), obteve número médio de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* após 35 dias de armazenamento refrigerado em microcápsulas liofilizadas em torno de  $10^5$  log UFC/g. Simpson et al. (2005) avaliaram a viabilidade de 12 espécies de *Bifidobacterium* microencapsuladas por *spray drying*, com leite desnatado reconstituído, com e sem adição de goma arábica, e relataram que todas apresentaram contagens de células viáveis maior que 6 log UFC/g após 90 dias, a 4° C. Chávarri et al. (2010) produziram cápsulas liofilizadas de alginato e quitosana com adição de crioprotetor e armazenaram em recipientes fechados, a 4° C, por 28 dias mantendo a viabilidade em torno de  $10^7$  UFC/g. Pedroso et al. (2012) estudaram a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados por *spray chilling* em matrizes lipídicas que apresentaram contagens maiores que  $10^6$  log UFC/g, por 30 dias a 7° C.

Tabela 16 – Efeito da temperatura de refrigeração (7° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias.

Temperatura	REFRIGERAÇÃO (7° C)		
	ALGL	AHML	AHQL
Tratamentos/ Tempo (dias)	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g
0	6,65±0,07 <sup>Ab</sup>	7,69±0,09 <sup>Aa</sup>	6,80±0,18 <sup>Ab</sup>
30	6,56±0,02 <sup>Ab</sup>	6,76±0,04 <sup>Ba</sup>	6,39±0,03 <sup>Bc</sup>
60	5,80±0,06 <sup>Bc</sup>	6,59±0,08 <sup>Ca</sup>	6,34±0,07 <sup>Bb</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas

A temperatura de congelamento (Tabela 17) manteve a viabilidade das microcápsulas de ALG por 30 dias (6,61±0,02) e assegurou estabilidade nos demais tratamentos AHML e AHQL ao longo 60 dias de estocagem com contagens de 6,05±0,06 e 6,08±0,02 log UFC/g, respectivamente. Pinto (2012), manteve a viabilidade de bifidobactérias microencapsuladas em leite desnatado e inulina pela técnica de *spray drying* acima de 6 log UFC/g por 90 dias durante todo período de armazenamento congelado. Resultados semelhantes foram encontrados por Lorenz (2009), onde a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulado por *spray drying* com alginato de sódio foi maior que 10<sup>6</sup> log UFC/g após 90 dias a -18° C.

Tabela 17 – Efeito da temperatura de congelamento (-18° C) na viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La-14 microencapsulado em diferentes tratamentos na forma liofilizada estocados por 60 dias.

Temperatura	CONGELAMENTO (-18° C)		
	ALGL	AHML	AHQL
Tratamentos/ Tempo (dias)	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g	Log 10 UFC/g
0	6,65±0,07 <sup>Ab</sup>	7,69±0,09 <sup>Aa</sup>	6,80±0,18 <sup>Ab</sup>
30	6,61±0,01 <sup>Aa</sup>	6,54±0,10 <sup>Ba</sup>	6,10±0,03 <sup>Bb</sup>
60	5,98±0,04 <sup>Bb</sup>	6,05±0,06 <sup>Cab</sup>	6,08±0,02 <sup>Ba</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ). Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALGL = Microcápsulas de Alginato de sódio liofilizadas; AHML = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize liofilizadas; AHQL = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana liofilizadas

Para as micropartículas liofilizadas nos tratamentos AHML e AHQL tanto na temperatura de refrigeração como de congelamento, obteve-se valores acima de  $10^6$  log/ UFC estando dentro dos valores estipulados para produtos probióticos (FAO/OMS, 2001) durante 60 dias de armazenamento.

#### **4.9 Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas**

Para comparar o efeito das temperaturas em todos os tratamentos nas formas úmidas e liofilizadas, analisaram-se os dias 0, 30 e 60 das cápsulas úmidas e as comparou com as cápsulas liofilizadas.

Observou-se que em função do processo de secagem, o dia 0 das cápsulas úmidas se mostrou sempre superior e com diferenças significativas quando comparado às cápsulas liofilizadas (Tabela 18) independente da temperatura analisada. Na temperatura ambiente e de congelamento entre todos os tratamentos as microcápsulas AHMU apresentaram resultados superiores e diferiram significativamente dos demais tratamentos. Já na temperatura de refrigeração, as microcápsulas AHQU se destacaram com as melhores viabilidades ao contrário do mesmo tratamento na forma liofilizada que obteve seu valor de log significativamente reduzido ao longo dos 60 dias de estocagem. Nesta mesma temperatura (refrigeração), outro tratamento que merece destaque ao longo de 60 dias é o AHML que diferiu significativamente dos tratamentos na forma úmida (ALGU e AHMU).

Tabela 18 – Comparação da viabilidade de microcápsulas úmidas e liofilizadas estocadas em diferentes temperaturas.

Temperatura	AMBIENTE (25° C)		
Tempo (dias) / Tratamentos	0	30	60
ALGU	9,78 ±0,05 <sup>Aa</sup>	9,60 ±0,13 <sup>Ab</sup>	9,37 ±0,04 <sup>Bc</sup>
ALGL	6,65 ±0,07 <sup>Ca</sup>	6,05 ±0,12 <sup>Bb</sup>	5,92 ±0,03 <sup>Db</sup>
AHMU	9,88 ±0,03 <sup>Aa</sup>	9,74 ±0,19 <sup>Aa</sup>	9,91 ±0,03 <sup>Aa</sup>
AHML	7,69 ±0,09 <sup>Ba</sup>	6,21 ±0,12 <sup>Bb</sup>	5,96 ±0,03 <sup>Dc</sup>
AHQU	9,87 ±0,08 <sup>Aa</sup>	9,53 ±0,06 <sup>Ab</sup>	8,12 ±0,02 <sup>Cc</sup>
AHQL	6,80 ±0,18 <sup>Ca</sup>	5,78 ±0,04 <sup>Cb</sup>	5,63 ±0,06 <sup>Eb</sup>

Temperatura	REFRIGERAÇÃO (7° C)		
Tempo (dias) / Tratamentos	0	30	60
ALGU	9,78 ±0,05 <sup>Aa</sup>	6,48 ±0,08 <sup>CDb</sup>	6,33 ±0,16 <sup>Cb</sup>
ALGL	6,65 ±0,07 <sup>Ca</sup>	6,56 ±0,01 <sup>Ca</sup>	5,80 ±0,06 <sup>Db</sup>
AHMU	9,88 ±0,03 <sup>Aa</sup>	6,73 ±0,11 <sup>Bb</sup>	6,29 ±0,05 <sup>Cc</sup>
AHML	7,69 ±0,09 <sup>Ba</sup>	6,76 ±0,04 <sup>Bb</sup>	6,59 ±0,08 <sup>Bc</sup>
AHQU	9,87 ±0,08 <sup>Aa</sup>	7,45 ±0,02 <sup>Ab</sup>	6,79 ±0,04 <sup>Ac</sup>
AHQL	6,80 ±0,18 <sup>Ca</sup>	6,39 ±0,13 <sup>Db</sup>	6,34 ±0,07 <sup>Cb</sup>

Temperatura	CONGELAMENTO (-18° C)		
Tempo (dias) / Tratamentos	0	30	60
ALGU	9,78 ±0,05 <sup>Aa</sup>	6,33 ±0,44 <sup>CDb</sup>	5,93 ±0,04 <sup>Eb</sup>
ALGL	6,65 ±0,07 <sup>Ca</sup>	6,61 ±0,01 <sup>BCa</sup>	5,98 ±0,04 <sup>DEb</sup>
AHMU	9,88 ±0,03 <sup>Aa</sup>	7,77 ±0,08 <sup>Ab</sup>	6,88 ±0,04 <sup>Ac</sup>
AHML	7,69 ±0,09 <sup>Ba</sup>	6,54 ±0,10 <sup>BCb</sup>	6,05 ±0,06 <sup>CDc</sup>
AHQU	9,87 ±0,08 <sup>Aa</sup>	6,75 ±0,07 <sup>Bb</sup>	6,30 ±0,06 <sup>Bc</sup>
AHQL	6,80 ±0,18 <sup>Ca</sup>	6,10 ±0,03 <sup>Db</sup>	6,08 ±0,02 <sup>Cb</sup>

Médias seguidas de letras maiúsculas distintas diferem estatisticamente na coluna (Teste de Duncan,  $p < 0,05$ ).

Médias seguidas de letras minúsculas distintas diferem estatisticamente na linha (Teste de Duncan  $p < 0,05$ ).

ALG = Microcápsulas de Alginato de sódio; AHM = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize; AHQ = Microcápsulas de Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana; U= úmidas; L= Liofilizadas.

A adição de prebióticos na formulação da cápsula resultou em uma melhor proteção dos probióticos encapsulados durante o armazenamento. Isto pode ser explicado pelo fato dos probióticos formarem redes de microcristais tridimensionais que interagem uns com os outros formando pequenos agregados que podem contribuir para a melhor proteção das células bacterianas (VILLEGAS; COSTELLI, 2007; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; TÁRREGA; ROCAFULL; COSTELLI, 2010) além do que, a combinação de alginato com prebióticos oferecem uma melhor proteção aos probióticos em sistemas alimentares devido à relação de simbiose, conforme afirmam diversos autores (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; CHEN et al., 2005).

Em relação à proteção conferida pela quitosana, esta é explicada pelo fato de ocorrer interações eletrostáticas em que há formação de membranas sob a superfície dos grânulos diminuindo a probabilidade de fuga do material encapsulado (GASEROD; SMIDSROD; SKJAK-BRAEKE, 1998).

É importante ressaltar que no presente trabalho a etapa de secagem fez com que houvesse reduções significativas em ambos os tratamentos e provavelmente por esse motivo tenham ocorrido o decréscimo da viabilidade no período armazenado.

Neste trabalho, observou-se que é de fundamental importância a adição de agentes crioprotetores na formulação das microcápsulas para a sobrevivência dos microrganismos frente aos processos de liofilização bem como sua viabilidade nos períodos de estocagem a frio. Os resultados do presente trabalho corroboram com o de Ribeiro (2011), ao produzir cápsulas de pectina com manteiga pelo método de gelificação iônica combinado com coacervação complexa que também comparou a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado na forma úmida e liofilizada sob armazenamento refrigerado e obteve valores de 7,05 e 5,47 log UFC/g respectivamente. Para Semyonov et al., (2010), a alta viabilidade de *Lactobacillus paracasei* microencapsulados e posteriormente liofilizados pode estar relacionada com a adequada proteção da combinação de aditivos de maltodextrina – trealose durante as fases de congelamento e secagem. A inclusão de glicerol (crioprotetor) com uma mistura de alginato aumentou a sobrevivência de bactérias quando congeladas e após foram submetidas a métodos de secagem (SULTANA, 2000). Estes resultados demonstram que tanto para as microcápsulas úmidas que foram armazenadas em temperatura de congelamento, como para as microcápsulas liofilizadas, há uma grande necessidade de se otimizar o processo de secagem, bem como reformular a composição da cápsula com a adição de agentes crioprotetores.



## 5 CONCLUSÕES

De acordo com os resultados obtidos neste estudo pode-se concluir que a tecnologia desenvolvida é adequada para a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando a distância de 30 cm entre o bico do pulverizador e a solução iônica, empregando alginato de sódio como principal material de revestimento na concentração de 1%, assim como a adição de prebiótico e quitosana nas concentrações de 1% e 0,4%, respectivamente, permitindo assim a formação de micropartículas com diâmetros entre 55,13µm a 114,51µm.

A utilização de prebiótico e quitosana influenciaram positivamente na sobrevivência do microrganismo microencapsulado tanto nos testes de resistência gastrointestinal quanto no armazenamento na forma úmida e liofilizada. No entanto, não foi extremamente eficiente para assegurar a viabilidade dos microrganismos no processo de secagem;

A secagem das microcápsulas por liofilização é um método adequado, desde que se utilizem outros adjuvantes no material de revestimento, como por exemplo, a adição de agentes crioprotetores.

As microcápsulas protegeram os microrganismos frente aos testes gastrointestinais simulados sendo mais eficientes as microcápsulas na forma úmida do que as liofilizadas, porém, ambas permitiram melhor liberação em pH intestinal, local onde os probióticos devem atuar.

A gelificação iônica para este processo foi eficaz visto que através da microscopia ótica e a microscopia eletrônica de varredura apresentaram características típicas de micropartículas bem como apresentaram bons diâmetros para a aplicação em alimentos.

Em relação à viabilidade da cultura probiótica durante os períodos e temperaturas de armazenamento analisados, todos os tratamentos avaliados nas formas úmidas e liofilizadas foram viáveis demonstrando valores adequados para a ocorrência de efeitos probióticos, apresentando no mínimo 30 dias de estabilidade quando estocados na forma liofilizada em temperatura ambiente (25° C) e 135 dias de viabilidade na forma úmida também em temperatura ambiente (25° C).

A viabilidade das microcápsulas úmidas é significativamente maior que as liofilizadas em função do estresse causado pelo congelamento e vácuo que é empregado no processo de liofilização.

A temperatura de refrigeração (7° C) foi a melhor temperatura para armazenamento das cápsulas liofilizadas mantendo a viabilidade acima de  $10^6$  log UFC/g, sendo que a adição de prebiótico e quitosana assegurou a estabilidade nas microcápsulas liofilizadas em refrigeração (7° C) e congelamento (-18° C) por 60 dias de estocagem. Assim, torna-se extremamente necessário à adição de agentes crioprotetores para a otimização do processo de secagem de forma a permitir sua aplicação em alimentos com baixa umidade e baixa atividade de água.

As microcápsulas úmidas na temperatura ambiente foram estáveis durante os 135 dias de armazenamento em ambos os tratamentos podendo assim ser adicionadas em alimentos que permaneçam nesta temperatura por este período.

Para as microcápsulas úmidas mantidas em refrigeração e congelamento, obteve-se viabilidade durante 105 e 120 dias respectivamente para os tratamentos contendo prebiótico e quitosana na composição.

Com estes resultados, acredita-se que as micropartículas de alginato combinadas de prebiótico e quitosana analisadas na forma úmida armazenadas em temperatura ambiente, desenvolvidas neste estudo, podem ser um meio alternativo e viável para a obtenção de um produto probiótico a ser incorporado em alimentos, de modo a permitir uma maior sobrevivência das bactérias.

## REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGNIHOTRI, S. A.; MALLIKARJUNA, N. N.; AMINABHAVI, T. M. Recent advances on chitosan-based micro- and nanoparticles in drug delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 100, n. 1, p. 5-28, 2004.

AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 227–246, 2005.

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

ALBERTINI, B.; VITALI, B.; PASSERINIA, N.; CRUCIANIB, F.; DI SABATINO, M.; RODRIGUEZA, L.; BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, n. 40, p. 359–366, 2010.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 240-251, 2007.

ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184-193, 2008.

ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's Observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology** A. Méndez-Vilas (Ed.), 2007. Disponível em: <http://www.formatex.org/microbio/pdf/Pages466-474.pdf> Acesso em: Março, 2013.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of the association analytical chemists**. 18. ed. Gaithersburg, MD, 1526p, 2005.

AUGUSTIN, M. A. Functional foods: an adventure in food formulation. **Food Australia**, v. 53, p. 428–432, 2001.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.

BAJPAI, S. K.; TANKHIWALE, R. Investigation of water uptake behavior and stability of calcium alginate/chitosan bi-polymeric beads. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 645–658, 2006.

BASTOS, D. S.; ARAÚJO, K. G. L.; LEÃO, M. H. M. Caracterização morfológica de sucos de caju comercial e in natura em pó obtidos por encapsulamento utilizando quitosana e isolado de proteínas do soro do leite comercial. **Seminário em inovação e tecnologia na área de alimentos**, 2010.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9. ed. **Lippincott Williams & Wilkins**, 1994.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOUWSKA, A. Selection of probiotics and prebiotics for symbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness. **Food Research International**, v. 35, n. 2/3, p. 125-131, 2002.

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. Dissertação de Mestrado da Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2010.

BRASIL. **Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**. Brasília, 2008. Disponível em: <[http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno\\_lista\\_alega.htm](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm)>. Acesso em 06 junho de 2013.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 de janeiro de 2013.

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GIDLEY, M. J. Hydrocolloid Gel Particles: Formation, Characterization, and Application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

BURGESS, D. J.; HICKEY, A. J. Microsphere technology and applications. **Encyclopedia of Pharmaceutical technology**, v. 10, p. 1-29, 1994.

BURITI, F. C. A.; ROCHA, J. S.; ASSIS, E. G.; SAAD, S. M. I. Probiotic potential of Minas fresh cheese prepared with the addition of *Lactobacillus paracasei*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 38, p. 173-180, 2005.

BURITI, F. C.; CASTRO, I.; SAAD, S. M. I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in symbiotic guava mousse and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, n. 2/3, p. 121-129, 2010.

CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M. I.; DE VICENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; DE MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: a randomized clinical trial of five different preparations. **British Medical Journal**, v. 335, p. 340– 342, 2007.

CANDIDO, L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da SBCTA**. v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-yoghurt. **Food Research International**, v. 39, n. 2, p. 203-211, 2006.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184-190, 2007.

CHAN, E. S.; WONG, S. L.; LEE, P. P.; LEE, J. S.; TI, T. B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S. H.; YIM, Z. H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 225–232, 2011.

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

CHARALAMPOPOULOS, D. Evaluation of the effect of malt, wheat and barley extracts on the viability of potentially probiotic lactic acid bacteria under acidic conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 82, n. 2, p. 133-41, 2003.

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

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7–8, p. 1193– 1201, 2007.

CHEN, J. Surface texture of foods: Perception and characterization. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 47, n. 6, p. 583-598, 2007.

CHEN, L.; REMONDETTO, G. E.; SUBIRADE, M. Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. **Trends in Food Science & Technology**, v. 17, n. 5, p. 272-283, 2006.

CHEN, K. W.; CHEN, M. J.; LIN, C. W.; CHIU, H. Y. Optimization of incorporated prebiotic as coating materials for probiotics microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 70, p. 260-266, 2005.

CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). **Journal of Food Engineering**, v. 76, n. 3, p. 313-320, 2006.

CLARK, A. H.; ROSS-MURPHY, S. B. Structural and mechanical properties of biopolymer gels. **Advances in Polymer Science**, v. 83, p. 57-192, 1987.

CONRAD, P. B.; MILLER, D. P.; CIENLENSKI, P. R.; PABLO, J. J. Stabilizations and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. **Cryobiology**, v. 41, p. 17-24, 2000.

CONWAY, P. L. Prebiotics and human health: the state of the art and future perspectives. **Scandinavian journal of nutrition**, v. 45, n. 13, p. 13-21, 2001.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56-67, 2012.

CORREA, M. R. **Preparo e caracterização de microcapsulas obtidas por polimerização ionica para alimentação de larvas de peixe**. Dissertação de mestrado do Programa de Pós-Graduação em Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2003.

COSTA, E. C.; TEIXEIRA, M. F. S.; DANTAS, T. V. M.; MELO, V. S. P.; ARAUJO, S. A. C.; ROLIM, B. N. Princípios da estocagem e preservação de amostras microbiológicas. **Ciência Animal**, v. 19, n. 2, p.111-122, 2009.

CRAVEIRO, A. A.; CRAVEIRO, A. C.; QUEIROZ, D. C. **Quitosana – A Fibra do futuro**. Parque de Desenvolvimento Tecnológico – UFC, 122p., 1999.

CROUZIER, T.; PICART, C. Ion pairing and hydration in polyelectrolyte multilayer films containing polysaccharides. **Biomacromolecules**, v. 10, p. 433–442, 2009.

CROUZIER, T.; BOUDOU, T.; PICART, C. Multiple Functionalities of Polyelectrolyte Multilayer Films: New Biomedical Applications. **Advanced Materials**, v. 22, n. 4, p. 441-467, 2010.

DEL PIANO, M.; MORELLIC, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINIB, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, n. 2, p. 48–55, 2006.

DEPYPERE, F. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science and Policy**, v. 1, n. 2, p. 75-94, 2003.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, 2009.

DODANE, V.; VILIVALAM, D. V. Pharmaceutical applications of chitosan. **PSTT**. v. 1, n. 6, 1998.

DOLLY, P.; ANISHAPARVIN, A.; JOSEPH, G. S.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) by spray-freezedrying method and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 28, n. 6, p. 568–574, 2011.

DOUGLAS, L. C.; SANDERS, M. E. Probiotics and prebiotics in dietetics practice. **Journal of the American dietetic association**, v. 108, p. 510-521, 2008.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report**. Canadá, 2001. Disponível em: [http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm). Acesso em 26 de março de 2013.

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

FAVARO-TRINDADE, C. S. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

FOOD AND DRUG ADMINISTRATION. 2004. **Probiotics. Available**. Disponível em: [http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92\\_adap1099.cfm](http://www.webdietitians.org/Public/GovernmentAffairs/92_adap1099.cfm)  
Acesso em: Maio, 2012.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science & Technology**, v. 13, n. 5, p. 151-159, 2007.

FOOKS, L. J; FULLER, R; GIBSON, G. R. Prebiotic, probiotic and human gut microbiology. **International dairy journal**, v. 9, p. 53-61, 1999.

FRANCHETTI, S. M. M.; MARCONATO, J. C. Polímeros biodegradáveis: Uma solução parcial para diminuir a quantidade dos resíduos plásticos. **Química Nova**, v. 29, n. 4, p. 811–816, 2006.

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, p. 306–312, 2012.



FUNAMI, T.; FANG, Y.; NODA, S.; ISHIHARA, S.; NAKAUMA, M. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca<sup>2+</sup> binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1746-1756, 2009.

GACESA, P. Alginates. **Carbohydrate Polymers**, v. 8, p. 161-182, 1988.

GARCIA-CRUZ, C.; FOGGETTI, U.; SILVA, A. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Química Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800-1806, 2008.

GASEROD, O.; SMIDSROD, O.; SKJAKBRAEK, G. Microcapsules of alginate-chitosan – I – a quantitative study of the interaction between alginate and chitosan. **Biomaterials**, v. 19, p. 1815-1825, 1998.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103–105, 2009.

GEORGE, M.; ABRAHAM, E. T. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs: alginate and chitosan – a review. **Journal of controlled release**, v. 114, p. 1-14, 2006.

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

GIBBS, S. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, 125:1401–12, 1995.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M.B. Handbook of prebiotics. **CRC Press**, p. 471-473, 2008.

GOMBOTZ, W. R.; WE, S. F. Protein release from alginate. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 67-285, 1998.

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

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

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **The Lancet**, v. 361, p. 512–519, 2003.

HAMILTON-MILLER, J. M.; SHAH, S.; WINKLER, J. T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic Microorganisms. **Public Health Nutrition**, v. 2, p. 223-229, 1999.

HANSEN, L. T.; ALLAN-WOJTAS, P. M.; JIN, L. A.; PAULSON, A. T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium spp.* in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.

HEIDEBACH, T. Microencapsulation of probiotics cells by means of rennet- gelation of milk proteins. **Food hidrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

HELLER, J. K. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 374–379, 2001.

HI-MAIZE NATIONAL STARCH. Disponível em: <<<http://www.hi-maize.com.br>>>  
Acesso em: 21 de novembro de 2012.

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M. R.; AZIZI, A.; YARMAND, M. S.; RAZAVI, S. H. Effect of lecithin and calcium chloride solution on the microencapsulation process yield of calcium alginate beads. **Iranian Polymer Journal**, v. 16, n. 9, p. 597-606, 2007.

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

HUBALEK, Z. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, v. 46, p. 205–229, 2003.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. **Journal of food science**, v. 70, n. 1, 2005.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JAFARI, S. M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816–835, 2008.

JANKOVIC, T.; ZIELINSKA, M.; WYSAKOWSKA, A. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Department of Biotechnology and Food Microbiology**, v. 1, n. 1, p. 31-34, 2010.

JONES, O. G.; MCCLEMENTS, D. J. Functional Biopolymer Particles: Design, Fabrication, and Applications. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 4, p. 374-397, 2010.

KAILASAPATHY, K.; SUPRIADI, D. Effect of whey protein concentrate on the survival of *Lactobacillus acidophilus* in lactose hydrolysed yoghurt during refrigerated storage. **Milchwissenschaft**, v. 51, p. 565-569, 1996.

KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L.acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* – their therapeutic potential and survival in yoghurt. **Australian Journal Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. C. Survival and therapeutic potential of probiotics organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium spp.* **Immunology e Cell Biology**, v. 78, p. 80–88, 2000.

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

KAUR, I, P.; CHOPRA, K.; SAINI, A. Probiotics: Potential pharmaceutical applications. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 15, p. 1-9, 2002.

KEARNEY, N.; MENG, X. C.; STANTON, C.; KELLY, J.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 684-689, 2009.

KEKKONEN, R. A.; VASANKARI, T. J.; VUORIMAA, T.; HAAHTELA, T.; JULKUNEN, I.; KORPELA, R. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 17, p. 352–363, 2007.

KETS, E. P. W; TEUNISSEN, P. J. M; DE BONT, J. A. M. Effect of compatible solutes on survival of lactic acid bacteria subjected to drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 62, p. 259–291, 1996.

KIM, S. C.; OLSON, N. F. Production of methanethiol in milk fat-coated microcapsules containing *Brevibacterium linens* and methionine. **Journal of Dairy Research**, v. 56, n. 5, p. 799-811, 1989.

KIM, S. J.; CHOB, S. Y.; KIM, S. H.; SONGD, O. J.; SHIND, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **Food Science and Technology**, v. 41, p. 493–500, 2008.

KING, A. H. Evaluation of the mechanism associated with the release of encapsulated flavor materials. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**, p. 1-160, 1995.

KO, J. A.; KOO, S. Y.; PARK, H. J. Effects of alginate microencapsulation on the fibrinolytic activity of fermented soybean paste (Cheonggukjang) extract. **Journal Food Chemistry**, v. 111, n. 4, p. 921-924, 2008.

KOC, B.; YILMAZER, M. S.; BALKIR, P.; ERTEKIN, F. K; Spray drying of yogurt: Optimization of process conditions for improving viability and other quality attributes. **Drying Technology**, v. 28, p. 495-507, 2010.

KOO, S. M.; CHO, Y. H.; HUH, C. S.; BACK, Y. J.; PARK, J. Y. Improvement of the stability of *Lactobacillus casei* YIT 9018 by microencapsulation using alginate and chitosan. **Journal of microbiology and biotechnology**, v. 11, p. 376-383, 2001.

KOSIN, B.; RAKSHIRT, S. K. Microbial and processing criteria for production of prebiotics: a Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 44, n. 3, p. 371-379, 2006.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.

KUMAR, P.; MISHRA, H. N. Yoghurt powder - A review of process technology, storage and utilization. **Food and Bioproducts Processing**, v. 82, p. 133-142, 2004.

LAMBERT, J. M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. In vitro analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein – gum Arabic microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8360- 8364, 2008.

LEE, D. W.; POWERS, K.; BANEY, R. Physicochemical properties and blood compatibility of acylated chitosan nanoparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, p. 371- 377, 2004.

LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 869–873, 2000.

LEE, S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Survival of Freeze-Dried *Lactobacillus bulgaricus* KFRI 673 in Chitosan-Coated Calcium Alginate Microparticles. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n. 24, p. 7300-7305, 2004.

LI, X. Y.; CHEN, X. G.; SUNA, Z. H.; PARK, H. J.; CHAC, 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.

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

LIU, X. D. Characterization of structure and diffusion behaviour of ca-alginate beads prepared with external or internal calcium sources. **Journal of microencapsulation**, v.19, n. 6, p. 775–782, 2002.

LORENZ, J. G. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

LUYER, M. D.; BUURMAN, W. A.; HADFOUNE, M.; SPEELMANS, G.; KNOL, J.; JACOBS, J. A.; DEJONG, C. H. C.; VRIESEMA, A. J. M.; GREVE, J. W. M. Strain specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3689–3692, 2005.

MADENE, A. Flavour encapsulation and controlled release – A review. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 1–21, 2006.

MAESTRELLI, F.; CIRRI, M.; CORTI, G.; MENNINI, N.; MURA, P. Development of enteric-coated calcium pectinate microspheres intended for colonic drug delivery. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 2, p. 508-518, 2008.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. (4th ed.). London: Halsted Press, 1985.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 173-182, 2002.

MENEZES, C. R.; DURRANT, L. R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v. 38, p. 587-592, 2008.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. *Ciência Rural*, v. 43, n. 7, 2013. Disponível em: [http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782013000700026&script=sci\\_arttext](http://www.scielo.br/scielo.php?pid=S0103-84782013000700026&script=sci_arttext) Acesso em: Julho, 2013.

MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, p. 1406–1416, 2008.

MIRZAEI, H.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A. Effect of calcium alginate and resistant starch microencapsulation on the survival rate of *Lactobacillus acidophilus* La5 and sensory properties in Iranian white brined cheese. **Food Chemistry**, v. 132, p. 1966-1970, 2012.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G. Preservation of microorganisms by drying – a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n. 2, p. 183-193, 2006.

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. Probiotics and Food Probiotic Products. **Eta Publication**, p. 131-169, 2006.

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. **Probiotics and Food Probiotic Products: based on Dairy Probiotic Products** (Ed. A.M. MORTAZAVIAN). Eta Publication, Iran, 2007.

MORTAZAVIAN, A. M.; RAZAVI, S. H.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1-18, 2008.

MURATA, Y. S.; TONIWA, E.; MIYAMOTO, K. Preparation of alginate gel beads containing chitosan salt and their function. **International Journal Pharm.** v. 176, p. 265-268, 1999.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginatemicroencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, v. 111, n. 2, p. 164-169, 2006.

MUTHUKUMARASAMY, P.; WOJTAS, P. A.; HOLLEY, R. A. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 1, p. 20-24, 2006.

NAGPAL, R.; YADAV, H.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K.; JAIN, S.; MAROTTA, F. Potential of probiotic and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p. 75-84, 2007.

NAKAGAWA, K.; IWAMOTO, S.; NAKAJIMA, M.; SHONOB, A.; SATOHB, K. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 278, p. 198–205, 2004.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1–5, 2011.

NINESS, K. R. Inulin and Oligofructose: What are they?. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1402-1406, 1999.

NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 15, p. 90- 93, 2012.

OELSCHLAEGER, T. A. Mechanisms of probiotic actions – a review. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 57–62, 2010.

OLIVEIRA, A. C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro**. 2006. 75f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto.

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

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, L. A. P.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. **Drying Technology**, v. 25, n. 10, p. 1687-1693, 2007b.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE GASTROENTEROLOGIA, Probióticos e Prebióticos. **Guias práticas da OMGE**, p. 1-22, 2008.

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

O’SULLIVAN, D. J. Primary Sources of Probiotic Cultures. **Probiotics in food safety and human health**. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

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

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación con alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.

PASPARAKIS, G.; N. BOUROPOULOS, N. Swelling studies and in vitro release of verapamil from calcium alginate and calcium alginate-chitosan beads. **International Journal Pharmaceutics**, v. 323, p. 34–42, 2006.



- PATEL, K. R.; PATEL, M. R.; MEHTA, T. J.; PATEL, A. D.; PATEL, N. M. Microencapsulation: Review on novel approaches. **International Journal of Pharmacy and Technology**, v. 3, n. 1, p. 894-911, 2011.
- PATIL, J. S.; KAMALAPUR, M. V.; MARAPUR, S. C.; KADAM, D. V. Iontropic gelation and polyelectrolyte complexation: The novel techniques to design hydrogel particulate sustained, modulated drug delivery system: A review. **Digest Journal of Nanomaterials and Biostructures**, v. 5, n. 1, p. 241-248, 2010.
- PEDROSO, D. D. L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R. J. B.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Protection of Bifidobacterium lactis and Lactobacillus acidophilus by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–132, 2012.
- PEREIRA, K. D. Amido resistente: a última geração no controle de energia e digestão saudável. **Ciência e Tecnologia de alimentos**, v. 27, p. 88-92, 2007.
- PINTO, S. S. **Efeito da adição de *bifidobacterium* bb-12 microencapsulada sobre as propriedades de frozen iogurte**. (Dissertação) Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, do Centro de Ciências Agrárias, da Universidade Federal de Santa Catarina, 2012.
- PSZCZOLA, D. Encapsulated ingredients: providing the right fit. **Food Technology**, v. 52, n. 12, p. 70-77, 1998.
- RÉ, M. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v. 16, n. 6, p. 195-236, 1998.
- REINECCIUS, G. A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology**, v. 51, n. 3, p. 144-146, 149, 1991.
- RIBEIRO, A. J.; NEUFELD, R. J.; ARNAUD, P.; CHAUMEIL, J. C. Microencapsulation of lipophilic drugs in chitosan-coated alginate microspheres. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 187, p. 115-123, 1999.
- RIBEIRO, M. C. E. **Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado**. Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos, 2011.
- ROSS, R.P.; DESMOND, C.; STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal Applied Microbiology**, v.98, p.1410-1417, 2005.

ROWE, R. C.; SHESKEY, P. J.; QUINN, M. E. Handbook of pharmaceutical Excipients. 6th. ed. London: **Pharmaceutical Press**, 2009.

SAAD, S. M. I. Probióticos e Prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1-16, 2006.

SAIER, M. H.; MANSOUR, N. M. Probiotics and prebiotics in human. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 22–25, 2005.

SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, K. H.; DRAGET, K. I.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, p. 31-54, 1989.

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

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v. 105, p. 1-13, 2008.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-315, 2007.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying**. Dissertação apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial da Universidade Federal de Pernambuco, 2013.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and symbiotics to approaching a definition. **American Journal clinical nutrition**, v. 73, p. 3615-3645, 2001.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, p.193–202, 2010.

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

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHIMAZU, A. A.; MALI, S.; GROSSMANN, M. V. E. Efeitos plastificante e antiplastificante do glicerol e do sorbitol em filmes biodegradáveis de amido de mandioca. **Ciências Agrárias**, v. 28, n. 1, p. 79-88, 2007.

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

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 557-561, 1993.

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

SHIMONO, N.; TAKATORI, T.; UEDA, M.; MORI, M.; HIGASHI, Y. Chitosan dispersed system for colon-specific drug delivery. **International Journal Pharmaceutics**, v. 245, p. 45-54, 2002.

SHU, X. Z. Chitosan/gelatin microspheres prepared by modified emulsification and ionotropic gelation. **Journal of Microencapsulation**, v. 18, p. 237-45, 2001.

SILVA, N.; JUNQUEIRA, V. C. A.; SILVEIRA, N. F. A. **Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos**. 3. ed. Varela, 2007.

SIMPSON, P. J. Intrinsic tolerance of Bifidobacterium species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 493-501, 2005.

SIROÓ, I.; KÁPOLINA, R.; KAPOLINA, B.; LUGASI, A. Functional food, product development marketing and consumer acceptance – a review. **Appetite**, p. 456-467, 2008.

SMIDSROD, O.; SKJAK-BREAEK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. **Tibtech Innovations**, v. 8, n. 3, p. 71-78, 1990.

SOCCOL, C. R.; DE SOUZA VANDENBERGHE, L. P.; RIGON SPIER, M.; PEDRONI MEDEIROS, A. B.; YAMAGUSHI, C. T.; DE DEA LINDNER, J.; PANDEY, A.; THOMAZ-SOCCOL, V. The Potential of Probiotics: A Review. **Food Technology and Biotechnology**, v. 48, p. 413-434, 2010.

SOHAIL, A.; TURNER, M.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 162-168, 2011.

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

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-strach and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 47-55, 2000.

SUN, W.; GRIFFITHS, M. W. Survival of bifidobacteria in yoghurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **Journal of food microbiology**, v. 61, p. 17-25, 2000.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 209-214, 2009.

SUSKOVIC, J.; KOS, B.; GORETA, J.; MATOSIC, S. Role of latic acid bacteria and bifidobacteria in symbiotic effect. **Departament of biochemical engineering faculty of food technology and biotechnology**, v. 39, p. 227-235, 2001.

TAMINE, A. Microbiological and Technological aspects of milks fermented by bifidobacteria. **Journal dairy research**, v. 62, p. 151-187, 1995.

TARREGA, A.; ROCAFULL, A.; COSTELL, E. Effects of blends of short and long-chain inulin on the rheological and sensory properties of prebiotic low-fat custards. **LWT- Food Science and Technology**, v. 43, n. 3, p. 556-562, 2010.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, n. 3, p. 589-595, 2006.

TONHI, E.; PEPLIS, A. M. G. **Química Nova**, v. 25, p. 943- 950, 2002.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of acai (*Euterpe oleracea* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1950–1958, 2009.

TUOMOLA, E.; CRITTENDEN, R.; PLAYNE, M.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S. Quality assurance criteria for probiotic bacteria. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 393–398, 2001.

TYOPONEN, S.; PETAJA, E.; MATTILA-SANDHOLM, T. Bioprotectives and probiotics for dry sausages. **International Journal Food Microbiology**, v. 83, 2003.

VALENGA, F. **Estudos de interação entre galactomanana e alginato e possíveis aplicações**. 90 f. Dissertação (Mestrado em Bioquímica) – Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Paraná, 2007.

VAN DEN BERG, L.; VAN VLIET, T.; VAN DER LINDEN, E.; VAN BOEKEL, M.; VAN DE VELDE, F. Physical Properties Giving the Sensory Perception of Whey Proteins/Polysaccharide Gels. **Food Biophysics**, v. 3, n. 2, p. 198-206, 2008.

VEELKEN, M.; PAPE, H. Production of nekkomycin by immobilized *Streptomyces* cells physiological properties. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 19, n. 3, p. 146-152, 1984.

VILLEGAS, B.; COSTELL, E. Flow behavior of inulin-milk beverages. Influence of inulin average chain length and of milk fat content. **International Dairy Journal**, v. 17, n. 7, p. 776-781, 2007.

VOS, P. de; BUCKO, M.; GEMEINER, P.; NAVRÁTIL, M.; STIVEL, J.; FAAS, M.; STRAND, B. L.; SKJAK-BRAEK, G.; MORCH, Y. A.; VIKARTOVSKÁ, A.; LACIK, I.; KOLLÁRIKOVÁ, G.; ORIVE, g.; PONCELET, D.; PEDRAZ, J. L.; ANSORGE-SCHUMACHER, M. B. Multiscale requirements for biencapsulation in medicine and biotechnology, **Biomaterials**, v. 30, p. 2559-2570, 2009.

WANG, Y.; YU, R.; CHOU, C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 209-217, 2004.

WOLFE, J.; BRYANT, G. Cellular cryobiology: thermodynamic and mechanical effects. **International Journal of Refrigeration**, v. 24, p. 438-450, 2001.

YANG, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, 2010.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, 2010.

YOO, I. K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of *Lactobacillus casei* cells in liquid-core alginates capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 19, n. 6, p. 428-33, 1996.

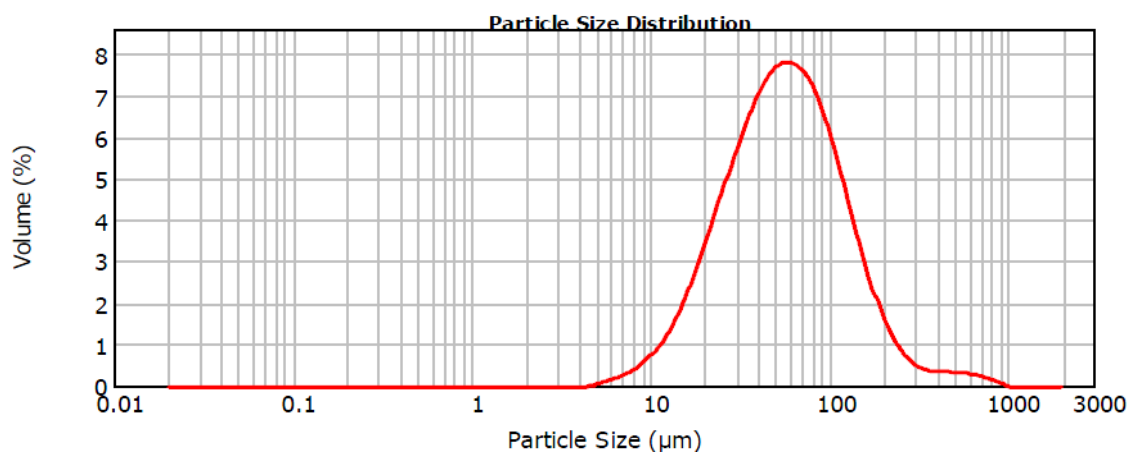
YU, W.; YIM, T.; LEE, K.; HEO, T. Effect of skim milk-alginate beads on survival rate of *Bifidobacteria*. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 6, p. 133–138, 2001.

## **ANEXOS**

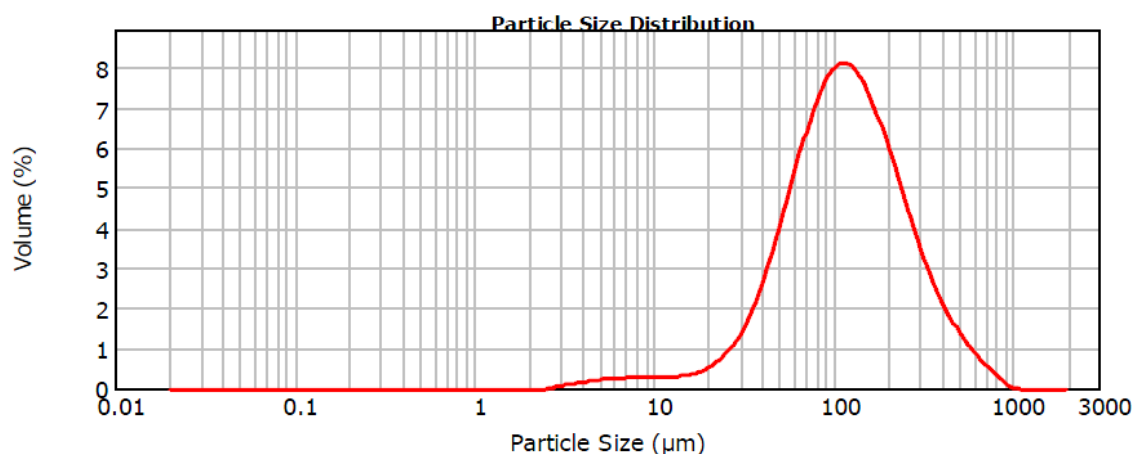




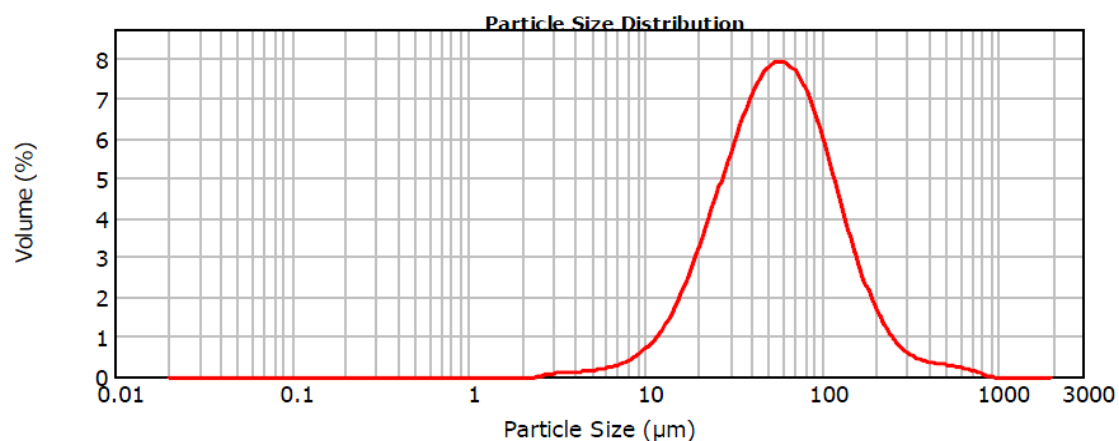
Anexo A – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio (ALGU) analisadas na forma úmida



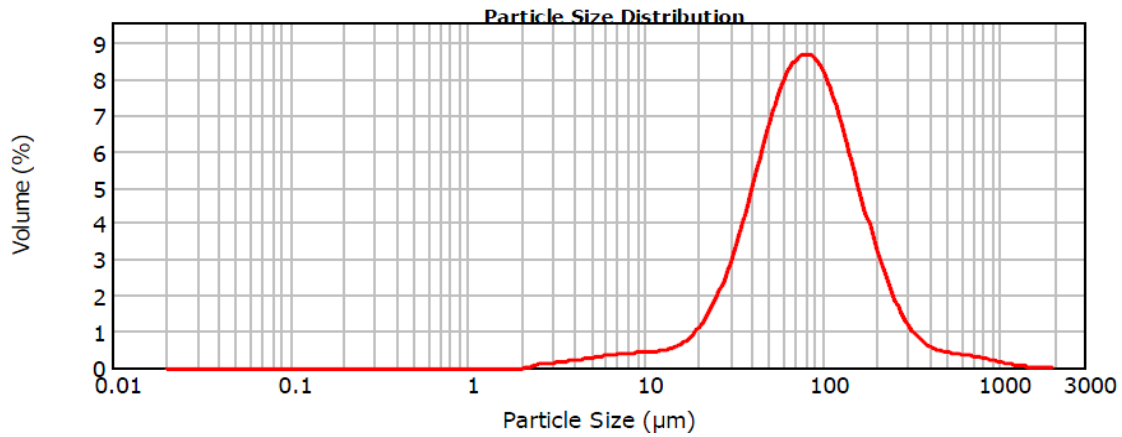
Anexo B – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio (ALGL) analisadas na forma liofilizada



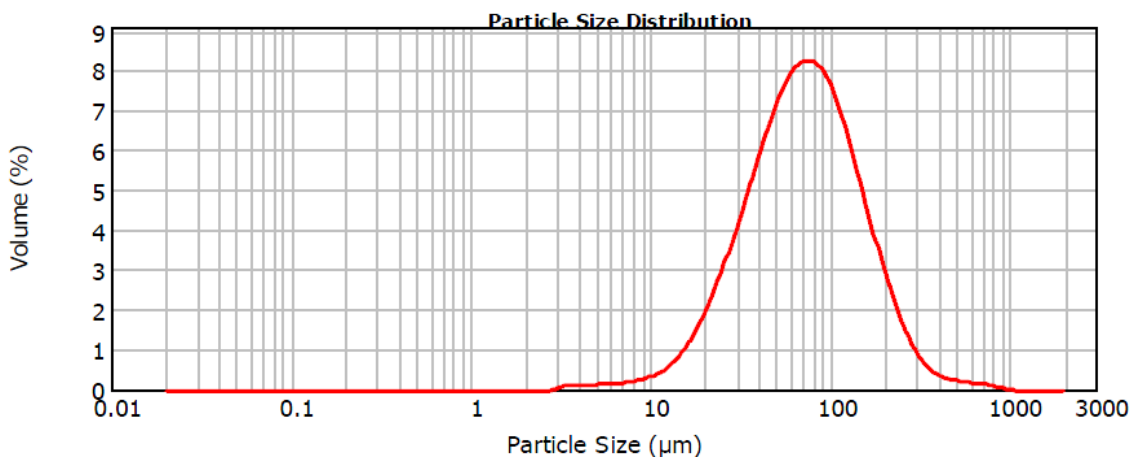
Anexo C – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Hi-maize (AHMU) analisadas na forma úmida.



Anexo D – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Hi-maize (AHML) analisadas na forma liofilizada.



Anexo E – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana (AHQU) analisadas na forma úmida.



Anexo F – Distribuição das microcápsulas elaboradas com Alginato de sódio + Hi-maize + Quitosana (AHQL) analisadas na forma liofilizadas.

