

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”
Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial
Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Tese

**PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* ATCC 4356 PRESERVADO EM
MICROCÁPSULA DE XANTANA PRUNI E SILICA PIROGÊNICA E APLICAÇÃO
EM GELADO COMESTÍVEL**

Júlia Borin Fioravante

Nutricionista

Pelotas, 2019

JÚLIA BORIN FIORAVANTE

**PROBIÓTICO *LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS* ATCC 4356 PRESERVADO EM
MICROCÁPSULA DE XANTANA PRUNI E SILICA PIROGÊNICA E APLICAÇÃO
EM GELADO COMESTÍVEL**

Tese apresentada à Universidade Federal de Pelotas, como parte das exigências do programa de pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Faculdade de Agronomia “Eliseu Maciel”, como requisito parcial à obtenção do título de Doutor em Ciências e Tecnologia de Alimentos.

Comitê de orientação: Prof.^a Dr.^a Angelita da Silveira Moreira

Prof.^a Dr.^a Patrícia Diaz de Oliveira

Pelotas, 2019

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

F518p Fioravante, Júlia Borin

Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356
preservado em microcápsula de xantana pruni e sílica
pirogênica e aplicação em gelado comestível / Júlia Borin
Fioravante ; Angelita da Silveira Moreira, orientadora ;
Patrícia Diaz de Oliveira, coorientadora. — Pelotas, 2019.
97 f.

Tese (Doutorado) — Programa de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de
Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas,
2019.

1. Microencapsulação. 2. Alimentos funcionais. 3.
Composto bioativo. 4. Biopolímeros. I. Moreira, Angelita da
Silveira, orient. II. Oliveira, Patrícia Diaz de, coorient. III.
Título.

CDD : 664

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Rosane da Silva Rodrigues

Prof.^a Dr.^a Mirian Galvão Machado

Prof.^a Dr.^a Ângela Fiorentini

Agradecimentos

A CAPES pela bolsa concedida. A minha orientadora Angelita, que me acolheu além de “abraçar a ideia” e pela amizade. A professora Patrícia, pela parceria e motivação para o desenvolvimento deste trabalho. A professora Rosane, pela amizade e paciência; e ajuda na elaboração e execução deste trabalho, muito obrigada. A professora Ângela por gentilmente ceder a cepa da bactéria probiótica, fundamental para o desenvolvimento deste trabalho, pela amizade muito obrigada. A professora Mirian por contribuir na qualificação e pela amizade, muito obrigada.

As colegas do Laboratório de Biopolímeros: Karine, Bruna e Bianca, Mariane, Andiará, Mariza, Vanessa e Carla obrigada pela amizade, pela companhia e pela alegria compartilhada.

As colegas e amigas Victoria e Izadora que foram fundamentais para que este trabalho fosse realizado, principalmente pelo apoio e amizade que com certeza levo para o resto da vida.

Ao CDTec pelo acolhimento e disponibilização de equipamentos.

Aos amigos e colegas do PPGCTA, e aos professores pela experiência compartilhada.

Aos estagiários que passaram ao longo destes anos no Laboratório de Biopolímeros, sem vocês nada acontece! Muito obrigada! Dener, Leonardo, Matheus, Camila, Jackson, Malu, e todos os outros!

Mauricio meu querido, obrigada pela força, amor e compreensão.

Ao meu pai Luiz Fernando e a minha mãe Marinês, pelo apoio diário, mesmo que distante, o amor de vocês fez com que eu chegasse até aqui.

Aos meus irmãos Gabriel e Maria Carolina pela alegria e motivação.

Goiaba, Ísis e Sid alegrias da minha vida!

A Deus, pela vida, pela força que é me concedida nos momentos difíceis, pela paz no meu coração e por me proporcionar viver com os que amo.

“E se tropeçar
Do chão não vai passar
Quem sete vezes cai, levanta oito”
Thiago Iorc.

Resumo

FIORAVANTE, Júlia Borin. Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preservado em microcápsula de xantana e sílica pirogênica. Tese. Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Universidade Federal de Pelotas, Pelotas.

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas afetam positivamente a saúde do hospedeiro. O agente encapsulante influencia nas características físicas da microcápsula e na viabilidade do probiótico. A xantana tem sido utilizada como encapsulante, normalmente em associação com outros polímeros. Na técnica de secagem em spray-drier a viscosidade elevada dos polímeros é um fator negativo, que reduz a qualidade e o rendimento dos pós; assim como a temperatura elevada, que reduz a viabilidade dos micro-organismos no material obtido. A correta seleção e combinação do agente encapsulante com dispersantes e termo e os osmoprotetores aumenta a qualidade e a viabilidade das microcápsulas probióticas para diferentes aplicações. Desenvolver microcápsulas, por secagem em spray-drier, eficientes na proteção de probióticos para posterior aplicação em um gelado comestível. Associações de xantana pruni de baixa viscosidade e sílica pirogênica (aerosil®), adicionadas de glicerol foram utilizadas para obtenção de microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 pelo método de secagem em spray-drier. As concentrações de xantana e aerosil foram definidas por Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fatorial 2², completo, com 3 pontos fatoriais (± 1), triplicata no ponto central e 4 pontos axiais ($\pm 1,41$), totalizando 11 ensaios. As microcápsulas obtidas foram armazenadas em três condições (ambiente, refrigeração e congelamento) e avaliadas por até os 120 dias. Foram realizadas análises morfológicas, físicas e de viabilidade. As concentrações de xantana pruni e de aerosil tiveram menor influência sobre a viabilidade da microcápsulas do que o método e tempo de armazenamento. Combinações de concentrações de xantana pruni de baixa viscosidade de 1,25 a 2,31 % com aerosil de 0,5 a 1,25 resultaram as maiores eficiências de encapsulamento. Obteve-se eficiência de encapsulação média de 75 %, coerente com dados da literatura. As microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente, se mantiveram viáveis até 90 dias de armazenamento, com concentrações de até 5,99 Log UFC.g⁻¹. Já as microcápsulas armazenadas sob refrigeração mantiveram viabilidade (5,78 Log UFC.g⁻¹) até o final da avaliação, em 120 dias; o mesmo ocorreu com as microcápsulas sob congelamento, com concentrações finais de até 6,03 Log UFC.g⁻¹. Verificou-se por microscopia eletrônica de varredura formas esféricas, ligeiramente achatadas e com tamanho médio de 6 a 10 μm . As mesmas foram aplicadas em gelado comestível de mirtilo, o mesmo foi sensorialmente aceitos e preservaram a sua propriedade probiótica durante armazenamento. Portanto, com a metodologia utilizada foi possível obter-se microcápsulas probióticas de *L. acidophilus* ATCC 4356 aptas a serem utilizadas em produtos alimentícios.

Palavras-chave: microencapsulação, alimentos funcionais, composto bioativo, Biopolímeros.

Abstract

FIORAVANTE, Júlia Borin. Probiotic *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preserved in microcapsules of xanthan and pyrogenic silica. Tese. Post graduate Program in Food Science and Technology. Federal University of Pelotas, Pelotas.

Probiotics are defined as living microorganisms that, when administered in adequate amounts, positively affect the health of the host. The encapsulating agent influences the physical characteristics of the microcapsule and the viability of the probiotic. Xanthan has been used as an encapsulant, usually in association with other polymers. In spray-dryer drying the high viscosity of the polymers is a negative factor which reduces the quality and yield of the powders; as well as the elevated temperature, which reduces the viability of microorganisms in the obtained material. Correct selection and combination of encapsulating agent with dispersants and term and osmoprotectants increases the quality and viability of probiotic microcapsules for different applications. Development spray-dryer microcapsules that are effective in protecting probiotics for later application in an edible ice cream. Associations of low viscosity xanthan pruni and pyrogenic silica (aerosil®) added with glycerol were used to obtain *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 microcapsules by spray-dryer drying method. Xanthan and aerosil concentrations defined by a factorial 2² Central Composite Rotational Design (DCCR), complete with 3 factorial points (± 1), triplicate at the central point and 4 axial points (± 1.41), totaling 11 trials. The obtained microcapsules were stored under three conditions (environment, refrigeration and freezing) and evaluated for up to 120 days. Morphological, physical and viability analyzes were performed. Xanthan pruni and aerosil concentrations had less influence on microcapsule viability than the method and storage time. Combinations of low viscosity xanthan pruni concentrations from 1.25 to 2.31% with aerosil from 0.5 to 1.25 resulted in the highest encapsulation efficiencies. An average encapsulation efficiency of 75% was obtained, consistent with literature data. Microcapsules stored at room temperature remained viable for up to 90 days of storage, with concentrations up to 5.99 Log UFC.g⁻¹. Microcapsules stored under refrigeration maintained viability (5.78 Log UFC.g⁻¹) until the end of the evaluation, in 120 days; The same was true for freezing microcapsules with final concentrations up to 6.03 Log UFC.g⁻¹. Scanning electron microscopy showed slightly flattened spherical shapes with an average size of 6 to 10 μm . They were applied in edible blueberry ice cream; it was sensorially accepted and preserved their probiotic property during storage. Therefore, with the methodology used it was possible to obtain probiotic microcapsules of *L. acidophilus* ATCC 4356 suitable for use in food products.

Key words: microencapsulation, functional foods, bioactive compound, biopolymers.

Lista de tabelas

Tabela 1 Delineamento experimental fatorial completo para a formulação de microcápsulas de xantana e aerosil.	51
Tabela 2: Caracterização física e microbiológica das microcápsulas.	51
Tabela 3: Parâmetros de cor das amostras.....	52
Tabela 4: Células viáveis após a secagem em spray-driyer.	55

Lista de figuras

Figura 1: A flora (microbiota) normal e os probióticos interatuam com o hospedeiro em atividades metabólicas e a função imune e impedem a colonização de microorganismos oportunistas e patógenos.....	16
Figura 2: Distribuição dos <i>Lactobacillus</i> spp. nas porções do sistema gastrointestinal humano.....	20
Figura 3: Representação de partículas obtidas na microencapsulação.....	25
Figura 4: Diagrama esquemático de “spray dryer”.	27
Figura 5: Unidade de repetição pentassacarídica da xantana.....	29
Figura 6: Representação esquemática das forças interparticulares que podem afetar o fluxo de pó. À esquerda: sem lubrificação. Direita: com o dióxido de silício coloidal como um deslizante (Representado pelos círculos menores).	35

Sumário

1. INTRODUÇÃO GERAL	12
2. HIPÓTESE	14
3. OBJETIVOS	14
3.1 OBJETIVO GERAL	14
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
4. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
4.1 PROBIÓTICOS E SAÚDE	15
4.2 O GÊNERO <i>LACTOBACILLUS</i>	18
4.3 PROBIÓTICOS EM ALIMENTOS FUNCIONAIS	20
4.5 MICROENCAPSULAÇÃO.....	23
4.5.1 <i>Microencapsulação pela técnica de spray-dryer</i>	26
4.5.2 <i>Xantana pruni</i>	27
4.6 ADITIVOS DE SECAGEM	32
4.6.1 <i>Dispersante Aerosil®, Tixosil®</i>	34
5. MANUSCRITO 1	36
DEVELOPMENT OF PROBIOTIC MICROCAPSULES OF LOW VISCOSITY XANTHAN PRUNI AND PYROGENIC SILICA BY SPRAY DRYING	36
6. ESTUDO 2	59
AVALIAÇÃO DA INFLUÊNCIA DA TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO DE MICROCÁPSULAS DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILLUS</i> ATCC 4356 DE LONGA VIABILIDADE COM USO DE XANTANA PRUNI DE BAIXA VISCOSIDADE E SÍLICA PIROGÊNICA	59
7. MANUSCRITO 2	67
AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE <i>LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS</i> ENCAPSULADO COM XANTANA PRUNI E COMERCIAL SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	67
8. MANUSCRITO 3	75
GELADO COMESTÍVEL DE MIRTILO ADICIONADO DE PROBIÓTICOS LIVRES E MICROENCAPSULADOS EM XANTANA PRUNI	75
9. CONSIDERAÇÕES FINAIS	86
10. REFERÊNCIAS GERAIS	87

1.Introdução geral

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, afetam positivamente a saúde do hospedeiro. Associam-se de modo benéfico à microbiota intestinal humana causando efeitos microbiológicos antagônicos e a competição com micro-organismos indesejáveis, e efeitos imunológicos como prevenção e tratamento da diarreia; sendo assim, há evidências de seu potencial na prevenção de doenças, o que têm incentivado a divulgação e o consumo desses produtos (FAO/WHO, 2006; SAAD, 2006; SANDERS, 2016).

Dentre os probióticos, bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, como *L. acidophilus*, *L. rhamnosus* GG, *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium*, assim como a levedura *Saccharomyces boulardii*, são frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez essas bactérias têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal humano saudável (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010).

Tradicionalmente, probióticos têm sido incorporados em produtos lácteos, entretanto, há uma demanda por outros tipos de produtos probióticos. Contudo, determinados produtos podem constituir-se em autênticos desafios à viabilidade dos micro-organismos probióticos (VINDEROLA et al.,2011). Tem-se buscado maneiras de tornar a ingestão ou a aplicação de probióticos mais efetiva; em sua forma ampla, a microencapsulação é uma das formas mais importantes de liberação controlada de substâncias e permite a melhor utilização de alguns que de outra forma seria inviável (ANAL, SINGH, 2007; ESTEVINO et al., 2013).

Uma técnica que tem sido utilizada com sucesso para elaboração de microcápsulas é a de secagem por spray-drying a qual se baseia no bombeamento da solução até o atomizador (spray-drier), de onde é aspergida, na forma de névoa de gotículas (spray), até a câmara de secagem, compartimento onde ocorre a secagem do solvente para, após, as gotículas serem recolhidas no ciclone ou em outro sistema de coleta de pó (SCOTTITANTAWAT, 2005).

Na microencapsulação, a seleção do material de parede ou revestimento adequado é de importância fundamental para o sucesso da técnica. A seleção de agente encapsulante influencia nas características da microcápsula obtida, sendo este utilizado sozinho ou associado a outro (NAZZARO et al., 2012). As

características desejáveis nas capsulas dependem primariamente do material de revestimento escolhido; no caso de probióticos, a principal característica da microcápsula é manter viabilidade dos mesmos. Os materiais de revestimento ou encapsulantes devem possuir características específicas como a não interação com a molécula ou célula do seu interior, permitir a formação de partículas com o tamanho pretendido e propriedades físicas e químicas do núcleo e da parede adequadas à aplicação no produto final (CAI et al., 2000; AZEREDO,2005).

Diversos agentes, sendo eles encapsulantes ou adjuvantes, são utilizados, como os amidos, amidos modificados, gomas (xantana, guar, carragena), ciclodextrinas e proteínas (NAZZARO, et al.,2012). A xantana, em função da sua cadeia principal do tipo celulósica, possui elevada resistência a ácidos e enzimas. A mesma é utilizada em muitos produtos alimentícios como espessante, estabilizante e encapsulante para os compostos aromáticos, medicamentos e micro-organismos (GARCÍA-OCHOA, et al., 2000). Xantana pruni é a denominação utilizada para as xantanas produzidas pelas *Xanthomonas arboricolas* pv pruni, e que possuem composição química diferenciada pela presença do açúcar ramnose (KLAIC, 2016).

Termoprotetores e osmoptotetores (também genericamente conhecidos como crioprotetores) internos (que penetram na célula), como glicerol, o mais usado, contribuem para aumentar a viabilidade frente aos processos de secagem (PEREIRA; PETROVICK, 2010); e a utilização de adjuvantes antiagregantes ou dessecantes, como sílica melhoram o desempenho físico do processo e o aspecto do pó obtido (TRIBOLI et al,2014).

Em consonância às inovações técnico-científica da indústria de alimentos, a utilização da microencapsulação de probióticos é uma opção viável de preservação dos mesmos frente às condições adversas do processamento e do próprio alimento.

2. Hipótese

A utilização de xantana pruni associada com sílica pirogênica e glicerol possibilita a elaboração de microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 estáveis ao trato gastrointestinal e armazenamento e aplicação em gelado comestível.

3. Objetivos

3.1 Objetivo geral

Desenvolver microcápsulas, por secagem em spray-dryer, eficientes na proteção de probióticos para posterior aplicação em um gelado comestível.

3.2 Objetivos específicos

- Obter microcápsulas contendo probióticos viáveis;
- Caracterizar as microcápsulas com relação as suas propriedades físicas;
- Avaliar a influência do agente encapsulante e adjuvante sobre a viabilidade das culturas probióticas durante o armazenamento por 120 dias em temperatura ambiente, sob refrigeração e congelamento;
- Verificar a sobrevivência das bactérias probióticas microencapsuladas em condições gastrointestinais simuladas.
- Aplicar as microcápsulas em gelado comestível de mirtilo.

4. Revisão Bibliográfica

4.1 Probióticos e saúde

As características essenciais para uma cepa ser considerada probiótica são: ser reconhecida como segura ou GRAS (*Generally Recognized As Safe*), apresentar viabilidade durante processamento e armazenamento, ter efeito antagonista frente a patógenos, ser tolerante à presença e variações de acidez e a sais biliares, possuir capacidade de aderência ao epitélio intestinal do hospedeiro (PAN et al., 2009), assim como apresentar resistência frente às condições do sistema gastrointestinal (amilases da cavidade oral, baixo pH do estômago, secreções biliares, suco pancreático excretado na região duodenal, efeitos antimutagênicos e anticarcinogênicos) para poder colonizar temporariamente o intestino (SAARELA et al, 2000; HERNANDEZ-HERNANDEZ, 2012).

Os probióticos afetam o ecossistema intestinal estimulando os mecanismos imunitários da mucosa e estimulando os mecanismos não imunitários através de um antagonismo/concorrência com os patogênicos potenciais. A modulação da microbiota intestinal, por parte dos micro-organismos probióticos, ocorre através de um mecanismo denominado de exclusão competitiva. Esse mecanismo impede a colonização da mucosa intestinal por micro-organismos potencialmente patogênicos, pela competição por sítios de adesão, por nutrientes e/ou da produção de compostos antimicrobianos (GUARNER; MALAGELADA, 2003; SAAD, 2006). Estima-se que estes fenômenos mediam a maioria dos efeitos benéficos, inclusive a redução da incidência e gravidade da diarreia, que é um dos usos mais amplamente reconhecidos dos probióticos (ALLEN et al; 2004; OMGE, 2012).

Segundo O'Toole e Cooney (2008), algumas das formas em que os probióticos podem impactar sobre a composição da microbiota é pela competição do substrato disponível e pela alteração da dinâmica de utilização dos carboidratos pelos componentes individuais da microbiota. As bactérias probióticas também podem ocasionar a redução do pH luminal, inibindo a competição por nutrientes e prebióticos, exclusão competitiva, redução da inflamação, estimulação do sistema imune (SAARELA et al, 2000).

Os requisitos funcionais para utilização das cepas probióticas devem ser estabelecidos utilizando-se de métodos *in vitro*, e os resultados desses estudos devem ser refletidos nos benefícios *in vivo* (SAARELA et al, 2000).

Outro mecanismo de ação dos probióticos é a ligação bacteriana nas células do epitélio intestinal, embora esta nunca tenha sido observada *in vivo*; assim ocorrendo, os probióticos poderiam competir com bactérias patogênicas por sítios de ligação, prevenindo a colonização do intestino por espécies bacterianas potencialmente patogênicas, como *Bacteroides vulgatus*, *Clostridium difficile*, *Clostridium histolyticum*, *Listeria monocytogenes*, *Salmonella choleraesuis*, *Staphylococcus aureus* e certas cepas de *Escherichia coli* (COLLADO; MERILUOTO; SALMINEN, 2007; LIN et al., 2008). A exclusão competitiva (Figura 1), baseada na ligação dos mesmos sítios receptores glicoconjugados na superfície epitelial, por probióticos e bactérias patogênicas, parece ser um dos mecanismos fundamentais que explicam tais constatações (WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010).

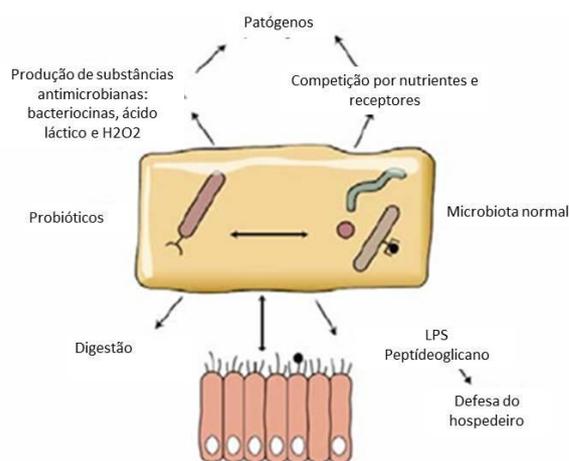


Figura 1: A flora (microbiota) normal e os probióticos interatuam com o hospedeiro em atividades metabólicas e a função imune e impedem a colonização de micro-organismos oportunistas e patógenos

Fonte: OMGE (2008) adaptado.

A adesão a superfícies mucosas por micro-organismos probióticos é uma importante habilidade para a colonização do TGI (Trato Gastrointestinal) humano, que impede sua eliminação por peristaltismo e proporciona vantagem competitiva sobre patógenos (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). A função de

barreira da mucosa intestinal é um importante mecanismo de defesa, para a manutenção da integridade do epitélio e proteção do organismo em relação ao ambiente. Uma vez rompida essa barreira, antígenos de bactérias e alimentos podem atingir a submucosa e induzir uma resposta inflamatória, que pode resultar em desordens intestinais como doenças inflamatórias (HOOPER et al., 2003; SARTOR, 2006; WOHLGEMUTH; LOH; BLAUT, 2010). Acredita-se que esses efeitos sejam mediados por uma ativação dos macrófagos, por um aumento nos níveis de citocina, e da atividade das células destruidoras naturais (NK - *natural killer*) e/ou dos níveis de imunoglobulinas. Importante salientar que os efeitos positivos dos probióticos sobre o sistema imunológico ocorrem sem o desencadeamento de uma resposta inflamatória prejudicial (KOOP-HOOLIHAN, 2001).

A melhoria funcional da mucosa pode ser um importante mecanismo pelo qual bactérias probióticas podem beneficiar a saúde do hospedeiro (MEDDINGS, 2008; NG et al., 2009), pois impacta na eficiência da invasão de patógenos, na severidade dos danos no tecido epitelial e no índice de liberação de nutrientes derivados do hospedeiro. Também regula a resposta imune a partir de uma complexa interação com o sistema imunológico do hospedeiro, além de regular diferentes componentes bacterianos, incluindo o DNA cromossômico, componentes da parede celular e metabólitos solúveis. Esses metabólitos podem alterar a permeabilidade epitelial, inibir a cascata inflamatória ou mediar a ativação/maturação/sobrevivência de células dendríticas (O'TOOLE; COONEY, 2008; SAAD; BEDANI, MAMIZUKA, 2011).

Estudos apresentam a associação entre as alterações na microbiota intestinal e obesidade ou resistência à insulina (PETSCHOW, et al.; 2013). A microbiota intestinal é considerada atualmente um “órgão microbiótico”, uma vez que o intestino abriga de 10 a 100 trilhões de micro-organismos. De acordo com Tsukumo (2009), a composição da microbiota intestinal pode ser diferente em humanos magros e obesos, o que levou à especulação de que essa possa participar na fisiopatologia da obesidade.

Diferentes composições da microbiota, especialmente relacionadas à alimentação, podem aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias, alterando a expressão de genes do hospedeiro e induzindo um estado patogênico capaz de facilitar o desenvolvimento de doenças crônicas não transmissíveis (VIJAY-KUMAR, et al; 2010).

Cani e colaboradores (2007) descreveram estudos sobre os mecanismos subjacentes a essa associação e, especificamente, o conceito de endotoxemia metabólica, ou seja, um aumento nos níveis plasmáticos de lipopolissacarídeos (LPS) como um dos fatores desencadeantes que podem levar ao desenvolvimento de inflamação metabólica e resistência a insulina associada à obesidade.

Uma linha de investigação recente refere-se ao impacto que a microbiota intestinal pode exercer no comportamento alimentar e no sistema nervoso central (SNC), de modo a influenciar a regulação central do apetite e saciedade (MORAES, et al, 2013). O intestino humano é capaz de digerir fibras dietéticas em grande parte devido à síntese de enzimas pela microbiota. Tais enzimas permitem a metabolização de polissacarídeos não digeríveis a monossacarídeos e a ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), principalmente acetato, propionato e butirato. Esses AGCC representam importante fonte de energia, de modo a favorecer a adiposidade corporal. Além disso, difundem-se nas células de forma passiva ou por transportadores da via do ácido monocarboxílico e podem atuar como sinalizadores celulares. Por outro lado, há outros efeitos indiretos que podem influenciar a motilidade intestinal e a produção de hormônios intestinais, apresentando papel na regulação da saciedade (LE POUL, et al., 2003).

4.2 O gênero *Lactobacillus*

As bactérias do gênero *Lactobacillus* se apresentam na forma de bacilos ou cocobacilos e, geralmente, são encontrados em pares ou em cadeias curtas com tamanho típico de 0,6-0,9 μm de largura e 1,5-6,0 μm de comprimento; são anaeróbios facultativos e ácido-tolerantes, com pH ótimo de crescimento entre 5,5 e 6,2 (PRADO, 2007). Esse gênero tem a particularidade de ser pouco tolerante à salinidade do meio e ser microaerofílico, com o crescimento em meio sólido favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio (FOOKS, GIBSON, 2002).

Originalmente, a taxonomia do gênero *Lactobacillus* foi baseada em propriedades fenotípicas, sendo dividido por Orla-Jensen, em 1919, em três subgêneros - *Thermobacterium*, *Streptobacterium* e *Betabacterium* - de acordo com sua temperatura de crescimento e a via metabólica de fermentação das hexoses

(KLEIN et al., 1998; KHALID, 2014). Atualmente os lactobacilos podem ser divididos em três grupos baseados no produto final de sua fermentação: *grupo 1*) obrigatoriamente homofermentativos, incluem aqueles que fermentam a glicose exclusivamente em ácido láctico e não fermentam pentoses ou gliconato; são exemplos *L. acidophilus*, *L. delbrueckii*, *L. helveticus*, *L. crispatus*, *L. gasseri*, etc. *Grupo 2*) facultativamente heterofermentativos, incluem espécies que fermentam hexoses em ácido láctico e podem produzir gás carbônico a partir de gliconato, mas não pela glicose; também fermentam pentoses por meio de uma fosfocetolase induzida para produzir ácidos láctico e acético; exemplos *L. paracasei*, *L. curvatus*, *L. plantarum*, *L. sakei*, etc. *Grupo 3*) obrigatoriamente heterofermentativos, lactobacilos que fermentam hexoses em ácido láctico, ácido acético e/ou etanol e dióxido de carbono, sendo que a produção de gás carbônico a partir da glicose é a característica marcante dessas bactérias; são exemplo: *L. brevis*, *L. fermentum*, *L. buchneri*, *L. reuteri*, etc. (AXELSSON, 2004; BURITI; SAAD, 2007).

Os *Lactobacillus* se apresentam bastante heterogêneos, com o número de espécies sendo continuamente modificado devido à descrição de novas espécies e/ou reclassificação de outras (CAUFIELD et al., 2007). A espécie *L. acidophilus* ATCC 4356 apresenta grande interesse, sendo a mais estudada deste gênero; tem sido descrita como um bacilo circular, Gram-positivo, imóvel e não esporulante, pertencente ao grupo dos homofermentativos obrigatórios com propriedades acidificantes (2,7% de ácido láctico) e termofílicas (40-52°C) (DU PLESSIS et al., 1996; SOUZA OLIVEIRA, 2009).

Nas diferentes porções do trato gastrointestinal (TGI), as bactérias ácido-lácticas de uma maneira geral, especialmente as de *Lactobacillus*, são normalmente encontradas no trato gastrointestinal adulto. Sua distribuição pode ser visualizada na figura 2, seu consumo via alimentação afeta diretamente a colonização no hospedeiro (KLAENHAMMER et al., 2008; MALGANHA, 2010; JAFEREI; EBRAHIMI, 2011; TULUMOGLU et al. 2013).

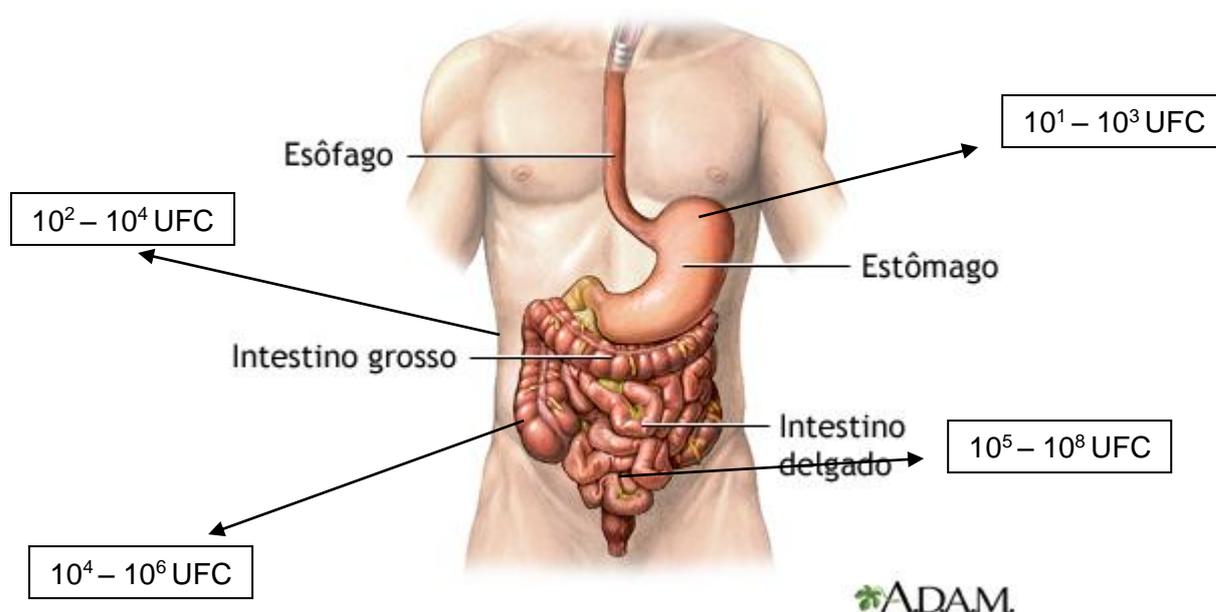


Figura 2: Distribuição dos *Lactobacillus* spp. nas porções do sistema gastrointestinal humano.

Fonte: OZYURT; ÖTLES (2014); A.D.A.M.(2017) Adaptado.

4.3 Probióticos em alimentos funcionais

O uso dos alimentos como veículo de promoção do bem-estar e saúde e, ao mesmo tempo, como redutor dos riscos de algumas doenças, tem incentivado as pesquisas de novos componentes naturais e o desenvolvimento de novos ingredientes, possibilitando a inovação em produtos alimentícios e a criação de novos nichos de mercado (THAMER, PENNA; 2006). O objetivo primário dos alimentos funcionais é melhorar, manter e reforçar a saúde dos consumidores via alimentação (OLIVEIRA; et al.; 2002).

A crescente preocupação por uma alimentação saudável que, além de nutrir, promova a saúde, coloca alguns alimentos e ingredientes funcionais na lista de preferência de um número cada vez maior de consumidores. Os alimentos funcionais são uma parte importante do bem-estar, no qual também se incluem uma dieta equilibrada e atividade física (STRINGHETA; et al., 2007).

Sanders (2016) salienta que o aumento da procura por alimentos funcionais probióticos deve-se pela modificação do estilo de vida da população, maior consciência dos consumidores que optam por prevenir ao invés de curar doenças;

aumentos dos custos médicos; maior ciência dos consumidores sobre a relação entre saúde e nutrição; envelhecimento da população; desejo de combater os males causados pela poluição, por micro-organismos e agentes químicos no ar, na água e nos alimentos e aumento das evidências científicas sobre a sua eficácia. Saad (2006) concluiu que, para garantir benefícios à saúde, os probióticos devem ser ingeridos diariamente. Alterações favoráveis na composição da microbiota intestinal foram observadas com doses de 100 g de produto alimentício contendo 10^9 UFC de micro-organismos probióticos, geralmente com a administração durante o período de 15 dias. Assim sendo, para serem de importância fisiológica ao consumidor, os probióticos devem alcançar populações acima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de produto.

Padrões internacionais, como a *International Dairy Federation*, estabelecem que para o produto possuir função probiótica deve conter 10^7 UFC de bactérias viáveis por grama de produto ou 10^9 por porção (ROBERFROID, 1999; SHAH, RAVULA, 2009). No Brasil, a legislação regulamenta que a quantidade mínima de células viáveis deve estar entre 10^8 – 10^9 UFC por porção diária do produto e que a população de probiótico deve estar informada no rótulo do produto (BRASIL, 2008). Porém, houve uma atualização onde o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico.

Para a incorporação dos probióticos em matrizes alimentares, a composição do alimento, como o teor de gordura, concentração e tipo de proteínas, açúcares e pH são alguns fatores que podem afetar o crescimento e a manutenção do probiótico adicionado. Portanto, a formulação do produto deve ser apropriada para auxiliar a sua eficácia e manutenção. Os produtos lácteos e os alimentos fermentados são considerados como um veículo ideal para a adição de bactérias probióticas (LAVERMICOCCA, 2006; RANADHEERA, BAINES, ADAMS, 2010). Devido a isso, as bactérias probióticas são incorporadas principalmente em produtos lácteos como queijo, iogurte, sorvete e outras sobremesas à base de leite.

Também devemos considerar o processo de fermentação que envolve esses produtos, que geralmente necessitam de culturas mistas, incluindo leveduras,

bactérias ácido-láticas e fungos. Alimentos fermentados geralmente são fonte de micro-organismos e alguns deles apresentam características probióticas (BLANDINO et al., 2003). Porém, há limitações no consumo de produtos lácteos, como a presença de alérgenos, e a necessidade de instalações de armazenamento e transporte a frio (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

Para a incorporação e manutenção da viabilidade dos micro-organismos probióticos nos produtos, temos que considerar o comportamento do mesmo no trato gastrointestinal, resistência à bile, enzimas e propriedades antimicrobianas. A viabilidade do probiótico é, sem dúvida, o fator mais importante e também de como isso pode afetar os demais parâmetros tecnológicos dos produtos (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000). Para isso temos como desafios para a sobrevivência e viabilidade, os critérios de fermentação, seu uso como e sua relação com outros micro-organismos (KEDIA et al., 2007). As informações fornecidas pelos fermentados tradicionais auxiliaram a desenvolver novos probióticos. E o desenvolvimento de alimentos probióticos não lácteos proporcionará seu consumo quando houver a intolerância à lactose ou por pessoas que por razões particulares não consomem lácteos, ou quando os mesmos são inacessíveis (RANADHEERA; BAINES; ADAMS; 2010).

Como mencionado anteriormente, os alimentos probióticos presentes no mercado são basicamente produtos lácteos, o que pode representar inconvenientes não somente pela presença da lactose, mas também pelo conteúdo de colesterol (HEENAN et al., 2004; RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010).

Os avanços tecnológicos possibilitaram alterar determinadas características nas matrizes alimentares à base de frutas e vegetais, modificando os componentes alimentares de forma controlada (BETORET et al., 2003). Essas modificações podem torná-las substratos ideais para a cultura dos probióticos, já que contêm nutrientes benéficos como minerais, vitaminas, fibras dietéticas e antioxidantes (YOON et al., 2004).

Existem estudos que proporcionaram o desenvolvimento de suco de frutas funcionais adicionadas de probióticos. Os sucos de fruta têm apelos sensoriais e de saudabilidade, porém a adição de probióticos a esses produtos alterou sensorialmente as bebidas, produzindo aromas e sabores estranhos (TUORILA, CARDELLO, 2002; YOON et al., 2004; SHEEHAN et al., 2007). Em estudo de Luckow e Delahunty (2004), com a adição de *L. plantarum* em suco de laranja, os

consumidores relataram sabores estranhos no suco, como aumento da acidez, mas quando foi informada do conteúdo funcional (suco contendo probióticos), a preferência aumentou. Os mesmos autores também sugeriram como adição máxima 10 % de concentrado celular (v/v) para aumentar a aceitabilidade.

Os produtos à base de frutas possuem características marcantes quanto ao perfil de acidez, pH e compostos antioxidantes que podem restringir o crescimento de algumas cepas probióticas. Além disso, os próprios micro-organismos podem modificar estas características. No estudo de Sheenan et al. (2007), a adição de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em sucos de laranja, abacaxi e cranberry, as cepas tiveram certa resistência ao ácido, porém sobreviveram por mais tempo as adicionadas no suco de laranja e abacaxi. Apesar da resistência, após os tratamentos térmicos necessários para tornarem os sucos mais estáveis, as cepas não alcançaram concentrações desejáveis, ficando abaixo de 6,0 log UFC. ml⁻¹.

Fica claro que, para a elaboração de produtos probióticos não lácteos, devemos considerar todas as características da matriz alimentar em questão, a cepa que será utilizada e a quantidade de ácidos que os micro-organismos irão produzir (KAILASAPATHY, 2002).

4.5 Microencapsulação

Com o desenvolvimento e aplicação de novas tecnologias de aplicação de probióticos em alimentos, a encapsulação se tornou uma ferramenta importante no quesito de viabilidade desses micro-organismos. Ainda assim, a encapsulação não garante a completa manutenção dos probióticos, sendo necessários mais estudos quanto à composição dos materiais utilizados (PEREDO et al., 2016). O custo para utilização do ingrediente encapsulado também é considerado um fator limitante no emprego da encapsulação na indústria alimentícia. De acordo com Gouin (2004), sugere-se que não seja ultrapassado um custo adicional de € 0,1/kg ao alimento, o que deve estar incluso no planejamento do produto.

O conceito de microencapsulação tem sua origem na idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e, ao mesmo tempo, controla a entrada e a saída de substâncias na célula (RÉ, 2006). Consiste em um processo mecânico ou físico-

químico que imobiliza e protege os micro-organismos em um material encapsulante, gerando partículas com diâmetro pequeno, de micrômetros, frações de micron a poucos milímetros, possuindo diferentes formas, dependendo dos materiais e métodos utilizados em sua preparação. O material externo é denominado agente encapsulante, enquanto o ingrediente interno é o material ativo que é capaz de manter sua estrutura mesmo sob as condições adversas do meio, sendo dissolvidas as cápsulas e liberando o material encapsulado no sítio de ação adequado para exercer a função desejada (SIMEONI et al., 2014; MENEZES et al., 2013). A microcápsula consiste em uma camada de material de cobertura que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada (ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012).

Considera-se como formas ideais de apresentação para os probióticos microencapsulado a de pó seco, de armazenamento fácil e de vida de prateleira longa, ou, então, a de gel úmido, também com estabilidade em longo prazo (BURGAIN et al., 2011).

Vale salientar que nem todas as técnicas se adequam à encapsulação de probióticos, pois algumas utilizam solventes orgânicos ou empregam agentes encapsulantes que afetam as características sensoriais dos alimentos. Outro fator limitante é o tamanho das células (1 a 5 μm), que impede a obtenção de partículas em escala nanométrica (FÁVARO-TRINDADE, 2011). As partículas são classificadas de acordo com o tamanho e são chamadas de nanopartículas quando variam 0,01 a 0,2 μm , de micropartículas de 1 a 100 μm e acima de 100 μm de macropartículas (SUAVE, et al. 2016).

Em matéria de micro-organismos, não há consenso na literatura pertinente quanto à utilização dos termos microcápsula e micropartícula. Para alguns autores as partículas recebem diferentes denominações de acordo com o local em que o composto ativo está alocado, conforme demonstrado na figura 3. O modelo A representa o tipo reservatório, no qual o núcleo ao centro fica envolto por uma parede; são partículas mononucleadas, denominadas microcápsulas. No modelo B, a estrutura é do tipo matriz, onde o material encapsulado fica disperso por todo o material encapsulante e são chamadas de micropartículas ou microesferas. O modelo C é uma combinação dos dois tipos, reservatório e matriz (SUAVE, et al. 2016).

Outros autores consideram pertinente usar o termo microcápsula desde que haja micro-organismos preservados no interior das partículas, e não somente aderidos na superfície das mesmas; (SUAVE, et al. 2016) e por último há aqueles que utilizam o termo microcápsula de modo mais genérico). (FAVARO-TRINDADE et al., 2008)

A estrutura, o tamanho e a forma das partículas são variáveis em função da escolha do material de parede e da técnica de encapsulação. Na escolha do material de parede, deve ser levado em consideração a não reatividade com o material a ser encapsulado, o método de encapsulação e o mecanismo de liberação ideal (FAVARO-TRINDADE et al., 2008).

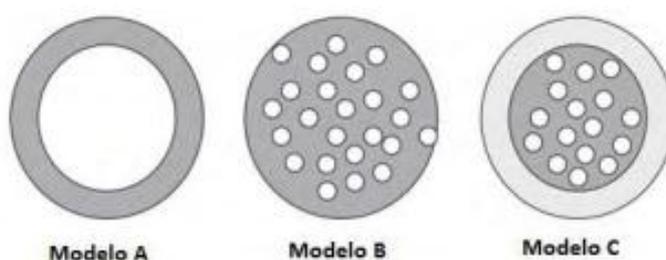


Figura 3: Representação de partículas obtidas na microencapsulação.

Fonte: Zuidan e Nedovic (2010).

Para a microencapsulação dos agentes ativos, geralmente utilizam-se polímeros como goma guar, carragena, quitosana e alginato, carboximetilcelulose, proteínas e ceras, e a xantana também tem sido empregada (KAILASAPATHY, 2002; GUERIN et al., 2003; TSEN et al., 2003; BETORET et al., 2004; KOURKOUTAS et al., 2005; FARREZ et al., 2015). Uma grande diversidade de combinações de polímeros tem sido utilizada para encapsular micro-organismos probióticos, conferindo proteção frente a baixos valores de pH, altas concentrações de sais biliares, além de serem empregados para aumentar a estabilidade física do micro-organismo durante o processamento. Essa camada exterior pode ter a finalidade de melhorar a estética e as propriedades sensoriais do produto, como também conferir funcionalidade, fornecendo assim uma proteção extra para as células. Além disso, a camada de revestimento pode ter propriedades de dissolução controlada, que permitam o controle da libertação dos micro-organismos, como, por exemplo, a liberação das culturas pela mudança de pH. (SUNNYROBERTS, KNORR, 2009; MENEZES et al., 2013).

Existem diversas técnicas que podem ser utilizadas para a encapsulação de probióticos, sendo que a seleção do método é dependente da aplicação que será dada às micropartículas, do tamanho desejado das partículas, do mecanismo de liberação e propriedades biológicas e físico-químicas, tanto da cultura quanto do agente encapsulante (ANAL; SINGH, 2007; COOK et al., 2012; MENEZES et al., 2013).

Entre as técnicas utilizadas para a encapsulação de probióticos, estão as técnicas de secagem como a de *spray-drying* ou atomização, em que geralmente os polímeros são solúveis em água; a *spray-congealing*, que utiliza ceras, ácidos graxos, polímeros solúveis e insolúveis em água, além de outros monômeros como material de revestimento; a *fluidized-bed coating/air-suspension*, que utiliza polímeros solúveis e insolúveis em água, lipídeos e ceras como material de revestimento; a extrusão, que utiliza como revestimento da cápsula polímeros solúveis e insolúveis em água; a coacervação ou técnica de separação de fases, que utiliza como material encapsulante polímeros solúveis em água; e o método eletrostático, que utiliza como material de revestimento polímeros e outros compostos com cargas opostas (ANAL e SINGH, 2007; MENEZES et al., 2013).

4.5.1 Microencapsulação pela técnica de spray-dryer

A secagem por atomização com a utilização de *spray dryer* vem sendo utilizada há décadas, sendo que as primeiras descrições datam de 1860, com oficialização da primeira patente já no ano de 1872. Foi grandemente utilizada durante a Segunda Guerra Mundial, com a necessidade de reduzir o peso do transporte de alimentos e outros materiais. Esta técnica permite a transformação da alimentação de um estado fluido em forma de partículas secas, pulverizando a alimentação para um meio de secagem quente (GIBBS, 2004; MORE, WAGH, 2014). A atomização é uma técnica relativamente barata e um dos métodos de encapsulação mais antigos, tendo sido utilizada já na década de 30 na preparação dos primeiros compostos encapsulados (GIBBS, 2004; MORE, WAGH, 2014). É uma operação contínua de secagem por processamento de partículas, e o alimento pode ser uma solução, suspensão, dispersão ou emulsão. O produto seco resultante pode ser na forma de pós, grânulos ou aglomerados dependendo das propriedades físicas

e químicas da alimentação, do design do secador (GIBBS, 2004; MORE, WAGH, 2014).

O processo de secagem consiste em dispersar o produto a ser seco sobre forma de pequenas gotículas em uma corrente de ar quente de maneira a obter um pó (figura 4). Quando um alimento é colocado em uma corrente de ar com baixa umidade relativa e elevada temperatura, é formada espontaneamente uma diferença de temperatura e pressão parcial de água entre o alimento e o ar, resultando numa transferência de energia na forma de calor do ar para o produto, e uma transferência de água do produto para o ar, sendo que o ar entra em contato com a partícula. A pressão na pequena gotícula formada e a grande área superficial das mesmas resulta em uma rápida evaporação da água a uma temperatura relativamente baixa na partícula, minimizando os danos térmicos ao produto (ROSA; TSUKADA; FREITAS, 2012).

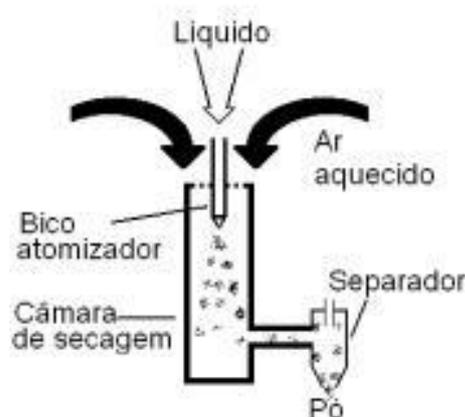


Figura 4: Diagrama esquemático de “spray dryer”.

(Fonte: LABMAQ, 2004)

A técnica de microencapsulação por *spray drying* é a mais empregada para a encapsulação de ingredientes alimentícios (FÁVARO-TRINDADE, 2011). Apresenta a vantagem de ser um processo econômico e flexível, produzir um produto de boa qualidade (GIBBS, 2004), ter grande disponibilidade de equipamentos (SILVA et al., 2002), produzir grande quantidade de produto seco e permitir ainda a utilização de uma grande quantidade de materiais encapsulantes, os chamados materiais de parede (RÉ, 1998).

4.5.2 Xantana pruni

A xantana é um hidrocolóide polissacarídeo, produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas* e é vendida comercialmente pelo nome de goma xantana; foi descoberta nos anos 1950 por cientistas do *Northern Regional Research Laboratory* do Departamento de Agricultura, U.S.A. A primeira produção industrial de xantana foi feita em 1960, utilizando-se *Xanthomonas campestris* NRRL B-1459, e o produto ficou comercialmente disponível em 1964 (SUTHERLAND, 1993). No Brasil, foi permitido seu uso em alimentos em 1965 (ABIA, 1992). Apresenta o código internacional para aditivos INS 415 (*International Numbering System*). De acordo com a Resolução da Diretoria Colegiada - RDC nº 45 de 03 de novembro de 2010, que dispõe sobre o uso de aditivos conforme as Boas Práticas de Fabricação, a xantana pode ser utilizada como agente emulsificante, espessante e estabilizante em quantidade suficiente para obter o efeito desejado (BRASIL, 2010), salvo restrição em legislação específica para a classe de produto em questão.

A utilização da xantana se deve principalmente a suas propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções viscosas a baixas concentrações (0,05 - 1,0 %). Além disso, a xantana é extremamente solúvel, tanto em água quente quanto fria, comportamento relacionado com a natureza polieletrólítica da molécula (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A xantana é um espessante amplamente utilizado na indústria de alimentos por suas propriedades primárias como acentuada pseudoplasticidade (diminuição da viscosidade com o aumento da taxa de cisalhamento), a qual permite gerar elevados valores de viscosidade. Mas xantanas de baixa viscosidade também têm sido utilizadas, especialmente quando se deseja reduzir a atividade de água sem elevar demasiadamente a viscosidade (VENDRUSCOLO et al., 2013). Devido às propriedades funcionais versáteis, a xantana tem se tornado produto de grande interesse na criação de novas texturas e, conseqüentemente, na geração de novos produtos (DRUZIAN; PAGLIARINI, 2007).

Sua fórmula consiste em uma cadeia celulósica principal, constituída por unidades D-glucopiranosil unidas por ligações $\beta(1-4)$ e substituída em O-3, em unidades alternadas de glucose, por uma cadeia lateral de um trissacarídeo (figura 5). A cadeia lateral consiste de um ácido glicurônico entre duas unidades de D-manopiranosil, e a unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e O-6 por um grupamento piruvato. O grupo O-acetila esta frequentemente presente em O-6 da unidade de manose interna (VENDRUSCOLO, 2005).

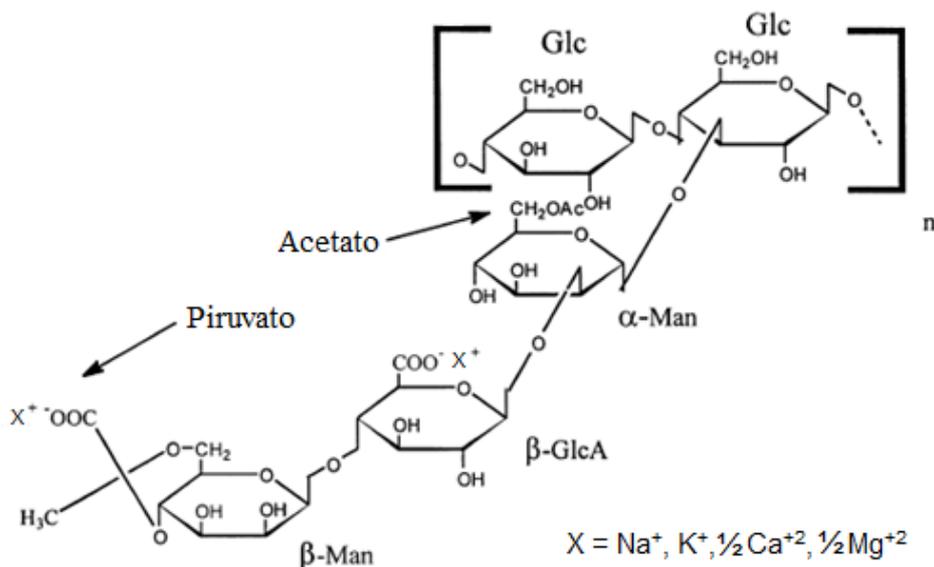


Figura 5: Unidade de repetição pentassacarídica da xantana.

Fonte: Adaptado de Viebke (2004) por Klaic (2012).

Além disso, a pseudoplasticidade da xantana realça o sabor e diminui a sensação de gomosidade do alimento na boca, em virtude da baixa viscosidade da xantana durante a mastigação, melhorando assim, suas características sensoriais, propriedade que a torna atraente em bebidas de frutas (KATZBAUER, 1998; GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Outras características importantes que devem ser conhecidas para a aplicação em alimentos é sua estabilidade em variações de pH, temperatura e força iônica, estabilização de emulsões, estabilidade térmica e a compatibilidade com diversos ingredientes. Por exemplo, em processos que envolvem bombeamento, ocorre uma diminuição da viscosidade do produto, tornando-o mais fluido, porém, imediatamente depois de cessada qualquer tensão de cisalhamento a viscosidade do produto é recuperada (YALPANI, 1968; GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MAUGERI FILHO, 2001).

A viscosidade da xantana é influenciada por diversos fatores, como a cepa microbiana produtora, o meio de cultivo e as condições utilizadas no processo fermentativo. Alterações quantitativas em sua composição química, especialmente em relação aos substituintes acetila e piruvato, são mais frequentes. Entretanto, alterações qualitativas podem ocorrer, como a presença de outros açúcares, causada principalmente por influência da cepa produtora (MOREIRA et al., 2000).

A xantana pruni é pesquisada e produzida desde 1995 no Laboratório de Biopolímeros do CDTec/UFPel. Ela é produzida por cepas da espécie *Xanthomonas*

arboricola pv *pruni*, a partir de cepas isoladas pela Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul e Santa Catarina, principalmente. Não possui atividade genotóxica. Os estudos incluem produção, em incubador agitador orbital (*shaker*) e em biorreator, caracterização, modificação química e aplicações em diversos setores. As aplicações da xantana *pruni* em produtos alimentícios, pesquisadas em nosso grupo de pesquisa, buscaram utilizar as propriedades características desse aditivo como espessante, estabilizante e auxiliar de emulsificação. Também têm sido desenvolvidos estudos visando sua combinação com outros polissacarídeos, o que permite a obtenção de novos e diferentes tipos de textura para produtos convencionais, como balas de goma e mousse (VENDRUSCOLO e MOREIRA, 2013).

A utilização da xantana como agente encapsulante vem demonstrando elevado potencial de aplicação, em estudos recentes. Lim e colaboradores (2013) estudaram o efeito da concentração de xantana no processo de secagem em spray-dryer do extrato de folhas de *Piper betle* L., avaliando a higroscopicidade dos pós resultantes. Os resultados mostraram que é necessária uma quantidade adequada de xantana para encapsular completamente o extrato concentrado e para evitar a absorção de umidade. No entanto, as soluções com mais de 1 % m/v são geralmente difíceis de preparar, portanto, devem ser evitadas.

Em outro estudo, no desenvolvimento de microcápsulas por extrusão em associação de xantana e alginato na microencapsulação de *L. plantarum* LAB12, houve sobrevivência em condições simuladas do trato gastrointestinal, resistência a altas temperaturas (90 °C) e prolongamento da viabilidade em armazenamento de *L. plantarum* LAB12 a 4 °C para 4 semanas (FARREZ, et al, 2015).

4.5.3 Crioprotetores e osmoprotetores

O sucesso no processo de criopreservação de micro-organismos é a seleção adequada de crioprotetores. Os crioprotetores são essenciais para desidratação da água intracelular, além de baixar o ponto de congelamento, dando assim mais tempo para a desidratação. Uma seleção criteriosa deve ser feita levando em consideração a não toxicidade e a permeabilidade. Os crioprotetores têm por função proteger células e tecidos e podem ser divididos em dois grupos, os intracelulares, que

penetram a membrana celular, e os extracelulares, que não penetram a membrana celular (MCGANN, 1978).

As características fundamentais para um eficiente crioprotetor são a baixa massa molecular, alta capacidade de atravessar a membrana celular e ser de baixa toxicidade. Em geral, agentes com rápida capacidade de penetração na membrana são mais favoráveis, por que o tempo de exposição ao crioprotetor pode causar algum tipo de injúria osmótica. A velocidade de permeação está diretamente ligada à espécie, estágio de desenvolvimento, relação superfície/volume da célula, natureza e tempo de exposição ao crioprotetor e à temperatura de exposição (KASAI, 1996).

Os crioprotetores também oferecem proteção nos processos de desidratação e secagem sem congelamento como a técnica de spray-driyer; nesse caso, a denominação termoprotetores pode ser usada. Na secagem que utiliza congelamento, evitam a formação de gelo intracelular. O mais utilizado é o glicerol que, semelhante aos agentes não penetrantes, proporciona a desidratação celular através do seu efeito osmótico, criando um meio hipertônico o qual induz a saída de água das células (AGUIAR, et al., 2012).

O glicerol ($\text{CH}_3\text{H}_8\text{O}_3$) é um álcool poli hídrico altamente permeável com peso molecular $92,10 \text{ g.mol}^{-1}$ (AGUIAR, et al., 2012). O glicerol é o crioprotetor mais utilizado na preservação por congelamento. Sua atividade de crioproteção foi inicialmente aplicada em 1913, quando Keith observou que a sua adição em variadas concentrações (5-42 %) em suspensão de *Escherichia coli* permitiu mantê-la viável por seis meses à temperatura de $-20 \text{ }^\circ\text{C}$. O glicerol penetra à membrana celular através da difusão passiva, permanecendo tanto na membrana quanto no citoplasma. Sua difusão é de 30 a 60 vezes mais lenta que a da água (PARKS; GRAHAM, 1992).

Os crioprotetores não penetrantes ou externos são capazes de induzir o aumento da osmolaridade do meio externo, gerando a passagem da água do interior da célula para o meio extracelular, prevenindo a formação de cristais de gelo durante o congelamento. São particularmente apropriados à preservação de microorganismos por se fixarem à superfície microbiana formando uma camada viscosa capaz de proteger mais efetivamente suas paredes celulares e membranas (MERYMAN, 1974; HUBÁLEK, 2003).

Como crioprotetor externo, a xantana também pode ser citada. Em estudo de Gastal (2015), que avaliou a xantana como crioprotetor espermático, a mesma

apresentou atividade preservante, reduzindo processos oxidativos na célula, e também contribuiu para redução da motilidade espermática, sendo assim atribuída uma característica de proteção extracelular.

4.6 Aditivos de secagem

A microencapsulação por atomização é uma solução econômica e um método muito utilizado para a preservação de corantes naturais, micro-organismos, aromas e compostos bioativos por aprisionamento dos ingredientes em um material de revestimento (SAAD, 2009; AZEREDO, 2005; PITALUA et al., 2010). É de grande importância para a indústria aperfeiçoar esse processo de secagem, a fim de obter produtos com melhores características sensoriais e nutricionais, bem como aumentar o rendimento. Uma alternativa para evitar os problemas de manipulação e processamento é adicionar agentes carreadores, que melhoram a estabilidade do material durante a secagem e o armazenamento, desempenhando ainda a função de agentes encapsulantes (PEREIRA; PETROVICK, 2010).

A desidratação por spray dryer sem aditivos exige a instalação de dispositivos especiais na câmara de secagem, tais como paredes resfriadas, resfriadores e dispersadores de ar secundário, reciclagem do produto seco, indução de cristalização no alimentador. Para evitar a instalação de tais dispositivos é possível a adição de aditivos ou adjuvantes (suportes) no líquido de alimentação, algumas vezes em quantidades superiores a 75 %, calculado sobre teor de sólidos totais (CASTELO-BRANCO, 2010).

Em materiais que contém carboidratos, durante o processo de secagem rápida, ocorre o fenômeno de vitrificação, no qual se formam massas de material que funcionam como pontes líquidas ou mesmo sólidas entre partículas. A aderência de material à parede da câmara é umas das principais causas de perda de produto durante o processo de secagem (WOO et al., 2007). A presença de gotículas maiores no secador por atomização pode fazer com que estas gotas ou aglomerados de partículas cheguem à parede da câmara antes que o processo de secagem esteja completo, resultando na aderência e formação de depósitos. A aglomeração do produto, além de formar torrões (*caking*) e diminuir a fluidez do pó durante seu escoamento, pode reduzir a capacidade de reidratação e dispersibilidade, favorecer a oxidação de lipídios, gerar perdas sensoriais e de

validade do produto e, por fim, reduzir o rendimento do processo. É senso comum que um produto com aglomerados é considerado de baixa qualidade, não sendo atrativo aos consumidores (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

No Brasil, no que diz respeito a alimentos, a legislação de aditivos ainda é muito restritiva se comparada a outros países, como a Espanha. A legislação base dos aditivos - Portaria nº 540 de 1997, da SVS, define coadjuvante de tecnologia de fabricação como “toda substância, excluindo os equipamentos e os utensílios utilizados na elaboração e/ou conservação de um produto, que não se consome por si só como ingrediente alimentar e que se emprega intencionalmente na elaboração de matérias-primas, alimentos ou seus ingredientes, para obter uma finalidade tecnológica durante o tratamento ou fabricação. Deverá ser eliminada do alimento ou inativada, podendo admitir-se no produto final a presença de traços de substância, ou seus derivados” (BRASIL, 1997). Assim, os produtos utilizados que permanecem de forma funcional no produto final são considerados aditivos; portanto, agentes de secagem, antiagregantes ou antiulectantes são considerados aditivos.

Em alimentos, o uso de aditivos ou adjuvantes aumenta a sobrevivência dos micro-organismos, favorece a retenção do acetaldeído e ainda permite uma melhor solubilidade, o que pode ser visualizado para obtenção de iogurte em pó (KEARNEY et al., 2009). Há uma ampla diversidade de aditivos que podem ser utilizados para melhorar o rendimento na secagem, diminuindo perdas por adesão às paredes do equipamento. Alguns destes aditivos ainda são responsáveis pela modificação de propriedades do pó seco como estabilidade, liberação controlada de ativos e etc. (LABMAQ, 2004).

No Brasil, as maltodextrinas são muito utilizadas para a desidratação de produtos, tais como sucos de frutas, achocolatados em pó, produtos farmacêuticos, etc. As maltodextrinas enzimáticas verdadeiras têm quase 10% de açúcares redutores como glicose e maltose; contudo este não é o caso das encontradas no mercado brasileiro (DAÍUTO; CEREDA, 2003).

Segundo a RDC nº 45 de 03 de novembro 2010, a sílica é classificada como um aditivo Antiulectante, que pode ser utilizada segundo as BPF (BRASIL, 2010). A sílica pirogênica (Aerosil®; Tixosil®) é obtida por pirólise da sílica, (> 99% em massa de SiO₂). É um material hidrofílico que absorve a película de água existente sobre a superfície dessas massas, quebrando as pontes de líquido e evitando o crescimento de pontes sólidas. Além disso, atua como barreira física de material inerte,

umentando a distância entre as partículas e reduzindo as forças de atração entre elas, favorecendo a fluidez do pó. A sílica pirogênica tem grande aplicação na área farmacêutica, sendo o aditivo mais utilizado com extratos vegetais na secagem por atomização (PEREIRA E PETROVICK, 2010).

4.6.1 Dispersante Aerosil®, Tixosil®

O Aerosil®, ou Tixosil® (dióxido de silício pirogênico, dióxido de silício coloidal ou sílica pirogênica) é uma modificação de SiO_2 altamente puro, amorfo e não poroso. Possui tamanho de partículas de 3 a 40 nm. Possui grupos silanol, e fragmentos de siloxano ($\equiv\text{Si-O-Si}\equiv$) são geralmente localizados dentro das partículas de SiO_2 , devido a que, na ausência de moléculas de água, a ação dos átomos de silício é compensada pela adição de grupos hidroxila. Os centros ativos gerados na superfície podem adsorver água, resultando na formação de uma camada peculiar que consiste em grupos hidroxila e água (STARCH; FIORI; LIN, 2003).

São muito utilizados como excipiente farmacêutico na indústria farmacêutica, onde ajuda na obtenção de pós-ideais, características exigidas pelas prensas de comprimidos de alta velocidade na fabricação de medicamentos. Além disso, possui diversas funções como a incorporação de princípios ativos, incorporação de ingredientes duros para cristalizar, incorporação de ingredientes em uma forma de dosagem sólida, melhorar a dissolução de produtos farmacêuticos ativos de baixa solubilidade, auxiliar processos de granulação de forma eficiente e econômica (EVONIK, 2015). Sua capacidade de formação de pó é esquematizada na ilustração abaixo (Figura 6).

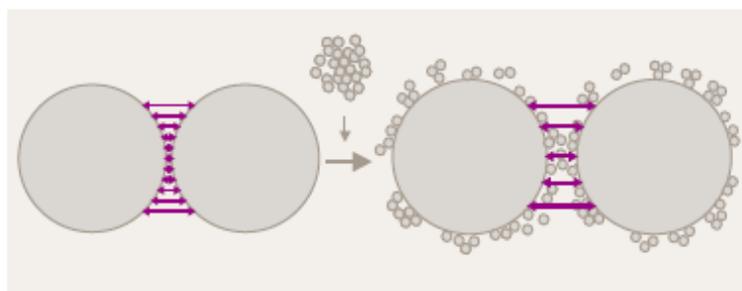


Figura 6: Representação esquemática das forças interparticulares que podem afetar o fluxo de pó. À esquerda: sem lubrificação. Direita: com o dióxido de silício coloidal como um deslizador (Representado pelos círculos menores).

Fonte: Evonik (2015).

O sílica pirogênica também pode ser usada para encapsular agentes ativos, com formação de capsulas do tipo concha, em associações com quitosana (EVONIK, 2015). O dióxido de silício coloidal também ajudar a reduzir o tempo em processos de secagem e elevam a qualidade do pó pulverizado, deixando o mesmo com maior fluidez. Mas é sabido que o dióxido de silício não é uma fonte de nutrição microbiana, e não possui ação bactericida ou bacteriostática em bactérias gram-negativas e gram-positivas (KIENHOLZ, 1970).

Até o momento não foram encontrados estudos da adição do Aerosil® em microcápsulas contendo probióticos. No estudo de Vasconcelos, Medeiros e Moura (2005), para o desenvolvimento de extrato seco em spray-driyer de *Schinus terebinthifolius* Raddi (aroeira da praia), verificaram que o Aerosil® 200 foi o adjuvante que apresentou maior adequabilidade quanto à estabilidade dos extratos secos. As melhores condições de secagem foram obtidas a 140 °C de temperatura na concentração de 30 % de Aerosil® 200. Essas condições proporcionaram ao produto obtido uma melhor estabilidade física.

Em estudo para secagem em spray driyer de solução de curcumina, os autores encontraram resultados que mostram que, no processo de secagem, os adjuvantes, como o dióxido de silício coloidal, podem ser utilizados para aperfeiçoar propriedades na dispersão sólida (ARAÚJO; TEIXEIRA; FREITAS, 2010).

5. Manuscrito 1

Development of probiotic microcapsules of low viscosity xanthan pruni and pyrogenic silica by spray drying

Júlia Borin Fioravante¹, Victória de Moraes Gonçalves¹, Izadora Almeida Perez², Rosane da Silva Rodrigues², Ligia Furlan², Patrícia Diaz de Oliveira^{1,3}, Claire Tondo Vendruscolo⁴, Angelita da Silveira Moreira^{1,2,3}.

¹Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário Capão do Leão, P.O. Box 354, CEP 96010-900, Pelotas – RS, Brasil

²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário Capão do Leão, P.O. Box 354, CEP 96010-900, Pelotas – RS, Brasil

³Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário Capão do Leão, P.O. Box 354, CEP 96010-900, Pelotas – RS, Brasil

⁴ Retired professor from ²Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas. Campus Universitário Capão do Leão, P.O. Box 354, CEP 96010-900, Pelotas – RS, Brasil

Corresponding Author: [Angelita da Silveira Moreira. E-mail
angelitadasilveiramoreira@gmail.com](mailto:Angelita_da_Silveira_Moreira.angelitadasilveiramoreira@gmail.com)

Resume: Xanthan is a biopolymer with wide application, but to date it has not been used as an unique encapsulating agent in microencapsulation by spray dryer, because its high viscosity is a problem for the technique. This work aimed to evaluate the influence of different concentrations of a low viscosity xanthan and pyrogenic silica in the formation and viability of probiotic microcapsules of *Lactobacillus acidophillus* ATCC 4356. Microcapsules

were developed by spray-drying method by central rotational compound design (CRCD) 2^2 , totaling 11 treatments. The independent variables were xanthan pruni and pyrogenic silica. The obtained microcapsules were characterized as to the physical characteristics and maintenance of the viability of the microorganisms. All treatments presented encapsulation efficiency higher than 70%, with water and moisture activity compatible with maintaining viability. Morphologically, the microcapsules had a size of 6 to 10 μm , irregular surface and rounded shaped, and the coloration yellowish with good lightness. The addition of xanthan and pyrogenic silica positively influenced the viability within the studied range.

Keywords: microencapsulation, *Lactobacillus acidophilus*, central rotational compound design, viability, physical characterization.

Introduction

The use of food as a vehicle for promoting well-being and health and, at the same time, reducing the risks of some diseases, has encouraged the research of new natural components and the development of ingredients, enabling innovation in food products and the creation of new market niches (KECHAGIA, et al., 2013). The growing concern about healthy eating, that promotes health as well as nutrition, add some foods and functional ingredients on the preference list of an increasing number of consumers (SYNGAI, et al., 2016).

In this sense, there is a trend in the development of non-dairy probiotic products. Therefore, the principal challenge the maintenance of high viability of microorganism in this environmental. Some factors related to the food matrices composition, in which the probiotic will be incorporated, may influence the maintenance of probiotic viability, such as fat content, protein concentration and type, sugar concentration and pH. Thus, the formulation of the product should be appropriate to support the effectiveness and maintenance of probiotic or to

invest in technological solutions, such as microencapsulation (LAVERMICOCCA, 2006; RANADHEERA, BAINES, ADAMS, 2010).

Microencapsulation has become an important tool in the viability of microorganisms in the development and application of technologies for the application of probiotics in foods. However, encapsulation does not ensure the complete maintenance of microorganisms, so further studies the composition of the materials used are required (PEREDO et al., 2016).

Xanthan gum, heteropolysaccharide, is promising in the encapsulation process because it has several desirable characteristics in encapsulating agents such as its stability in variations of pH, temperature and ionic strength, thermal stability and compatibility with various ingredients (GARCÍA-OCHOA et al., 2000; MAUGERI FILHO, 2001; BECKER et al., 1998). Its association with pyrogenic silica, which can be used to encapsulate active agents, also helps to reduce drying time and increase the quality of the formed powder with greater fluidity (EVONIK, 2015). The objective of this work was to evaluate the influence of different concentrations of xanthan pruni and pyrogenic silica in the formation of probiotic microcapsules, as well as their viability and physical characteristics.

Material and methods

Xanthomonas arboricola pv pruni strain 101, isolated by researchers from Embrapa Clima Temperado - and assigned to the Laboratory of Biopolymers, CDTec - UFPel, Brazil, was used in this study.

The cell multiplication stage was performed on an orbital shaker (B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) for 24 h. The production of xanthan pruni was performed by submerged fermentation in a 5 L bioreactor (Biostat B, B. Braun Biotech International, Melsungen, Germany) with a useful volume of 3 L using 10% (v/v) inoculum. The fermentation time was 72 h and the pH of the culture medium was adjusted to 7 by adding 2M NaOH. Operating conditions and culture medium were used as described in WO 2006/047845

(FEDERAL UNIVERSITY OF PELOTAS, 2006). The pyrogenic silica (Tixosil®) was purchased commercially, manufactured by Rodia Solvay Group®, distributed by Delquimica comercial in Brazil.

For the elaboration of the encapsulant solutions, the concentrations of xanthan pruni LV and pyrogenic silica were defined by a factorial design 2^2 (complete), with 3 factorial points (± 1), triplicate at the point (Table 1), totaling 11 assay. The independent variables were the concentration of xanthan pruni LV and pyrogenic silica, the addition ranges were determined in a previous study, and the dependent variables were the cell viability, water activity, moisture, particle diameter, color, and yield. Glycerol (20% w / w) was also added to the formulations in relation to the total polymer mass.

For rheological characterization of the encapsulating solution, viscosity curves were performed on a thermally controlled temperature (HAAKE DC 50, USA) rheometer (HAAKE, RS150, USA). The shear rate from 0.01 to 500 s^{-1} was applied in 300 seconds at a temperature of 25 °C, using a concentric cylinder sensor (DG41 rotor). For the analysis of the rheological behavior, the Ostwald-de-Waele model was applied.

HERE TABLE 1

The probiotic inoculum was produced through pure cultures of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, grown in Petri dishes on MRS agar (De Man, Rogosa and Sharp), 37° C for 72 h. The cells were suspended in MRS liquid medium and incubated in an orbital shaker under the following conditions, 150 rpm and 37 °C for about 16 h, until it reaches OD₆₀₀ (optical density) of 1, with a microbial count in 12 Log UFC ml⁻¹. The inoculum was centrifuged at 10,000 g at 4 °C for 10 min and the cell pellet was add them to the encapsulating solution.

The working solution (table 1), containing the cells suspended in the encapsulating solution, was dehydrated using a drier spray (LabMaq, model MSD 1.0, Ribeirão Preto,

Brazil) under the following conditions: air inlet temperature 120 °C, outlet temperature 60 ± 5 °C, inlet flow equivalent to 0.4 l.h^{-1} , pressure conditions of the drying air compressor ($2\text{-}4 \text{ kgf.cm}^{-2}$) and the compressed air flow rate (40 kgf.cm^{-2}). The powders produced were stored in sealed glass bottles and stored in a desiccator at room temperature (25 ± 2 °C) until analysis, which occurred one day after the elaboration of the same.

To evaluate the viability of the microorganism in the material obtained after the drying process, dilution and counting of viable cells were performed according to the method proposed by Antunes et al. (2013) with changes. Samples of 0.01 g of each treatment were suspended with 1 ml of potassium phosphate buffer (0.2 Mol.L^{-1} , pH 7.5) in test tube and incubated at a orbital shaker at 150 rpm and 37°C for 3 h; after that, decimal dilutions and plating on MRS agar medium were performed. The plates were incubated at 37 ° C for 72 h in anaerobic jars and viable cells concentration was expressed as $\text{UFC g}^{-1} \log$.

The efficiency of encapsulation was calculated in relation to the survival concentration of probiotic cells after the atomization process, according to equation 1; and the results were expressed as a percentage (ANNAN, et al., 2008).

Equation 1: $EE = \log(fc) / \log(ic * CF) * 100$

Were: EE= Encapsulation Efficiency; fc = final cell concentration after atomization; ic = Initial cell concentration; CF = correction factor

The yield of the microcapsules was calculated based on the total ingredients mass of encapsulant solution on the solution volume (w/v) and expressed as a percentage (%). The moisture content was determined by oven drying at 105 °C, until constant weight, according to AOAC methodology n°. 968.11 (2000). The water activity was measured using the Labtouch-aW equipment (Novasina, Neuheimstrasse, Switzerland) after previous stabilization of the samples at 25 °C for 15 min.

The morphology of the microcapsules was observed in a scanning electron microscope model JSM - 6610LV (Jeol, Tokyo, Japan) at a voltage of 15 kV. The samples were coated with a thin carbon layer and placed on aluminum support using EM SCD 500 model equipment (Leica, Wetzlar, Germany) as described by Lian, Hsiao and Chou (2002). The different microcapsules produced were also evaluated for particle size, so 50 particles were measured to calculate the average diameter using the ImageJ® software. (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

The color analysis was determined by a Minolta (Chroma Meter CR-300, Osaka, Japan) colorimeter with a CIE 'L * a * b *' reading system, proposed by the International Commission of l'Eclairage (CIE), where L (a * = red and -a * = green, + b * = yellow and -b *), and a * and b * are responsible for the chromaticity (L * = 0-black and L * = 100- = blue). With these parameters, the cylindrical coordinates Chromaticity (C *) purity or intensity of the color (equation 2), hue (h°) - color itself (equation 3) (converted to degrees) were evaluated.

Equation 2: $Chroma = \sqrt{(a^{*2} + b^{*2})}$

Equation 3: Hue = $\arccot(a^*/b^*)$

The results obtained in the experimental design were evaluated by means of the response surfaces and Anova, performed in the software *Statistica* version 7.0.

Results and discussion

Table 2 presents the cell viability results of the experiment generated by the application of the second order Rotational Central Compound statistical design based on the Response Surface Methodology (RSM).

HERE TABLE 2

For the viability variable of *L. acidophilus*, xanthan and pyrogenic silica had a positive influence on the viability after the drying process providing an increase in the concentration of viable cells. Within the range studied, the mathematical model ($Y = 9.45 + 0.07X + 0.13A^2$) was not significant, but predictive, thus generating a quadratic response surface (figure 1).

HERE FIGURE 1

The highest viability values are located from the intermediate range and extend to the highest concentration of xanthan added. The use of intermediate concentrations of xanthan is interesting, as it already presents high values of viability. This result should be considered, since higher concentrations make the encapsulant solution with high viscosity, making the drying process difficult and reducing the quality of the particles, characteristics that are dependent on the viscosity of the solution (LABMAQ, 2004).

The additives used have different physical properties and consequently exerted different degrees of protective effect on the probiotic cells trapped in the microcapsules. In relation to the independent variable pyrogenic silica concentration, within the studied range, the highest viability was found in the highest addition range. The pyrogenic silica is a dispersing and anti-binder agent, these characteristics improving the drying efficiency and stability of the obtained powder, thus increasing the number of viable cells. The positive influence of xanthan may be linked to the same imparting good thermal protection to the microorganism that is sensitive to high temperatures proved by this polysaccharide (BECKER et al., 1998), which is also involved in the formation of the particle. The addition of glycerol to the formulations may also have contributed to the viability of the microorganisms, since unlike xanthan and pyrogenic silica; it acts as an intracellular osmoprotector (PARKS; GRAHAM, 1992).

According to Ananta et al. (2005), since the efficacy of probiotic consumption in human health is related to its viability, it is of utmost importance not only to minimize cell death during the spray-drying process, but also to ensure a minimum loss of viability of microencapsulated bacteria during storage.

HERE TABLE 3

For the encapsulation efficiency response variable, the use of xanthan resulted positive effect and the pyrogenic silica negative effect, within the studied range. The mathematical model was significant and predictive, generating a quadratic surface for response (figure 2) ($y = 75.10 + 1.90X^2 - 1.62A$). The efficiency of the spray-drying is a determinant factor for the evaluation of the survival of the microorganisms after the process, if the result is low, it demonstrates that the method is not effective.

The values for encapsulation efficiency found in this study were above 70%. The spray-drying process leads to an expected loss of viability as probiotic cells are submitted to high temperature, mechanical shear, dehydration and osmotic pressure. In addition, the viability after encapsulation is also strongly linked to the output temperature of the equipment (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Gardiner et al. (2002) achieved a survival rate of more than 80% during spray drier drying of a resistant variant of *Lactobacillus Paracasei* NFBC 338 in reconstituted powdered milk at 85-90°C outlet temperatures. By the other side, Ananta and Knorr (2003) reported a survival rate of over 60% for *L. rhamnosus* GG under similar exit temperature conditions to this study.

HERE FIGURE 2

The dry powder yield is usually low because there are low solid concentration in the encapsulation solution and many losses in the equipment, by cyclone aggregation, clogging and exhaustion (KESHANI et al., 2015). How expected, increase of the xanthan and the

pyrogenic silica concentration increased the volume of powder generated. Adhesiveness causes considerable material losses on the walls of the equipment reducing drying performance (LANGRISH, 2007).

For the other variables responses - water activity, moisture and average particle size - no parameter within the range studied had a distinctive effect on them. The water activity is a fundamental physicochemical parameter for the maintenance of the viability of the microorganisms, since high water activity values are related to a lower viability during the storage period (SANTIVARANGKNA et al., 2008). All treatments had values lower than 0.3, demonstrating the efficiency of the drying method. Water activity values lower than 0.3 are very positive, since the low water activity represents less available free space for the growth of microorganisms and biochemical reactions and, therefore, provides greater durability of the powder (TONON et al., 2009). Kumar and Mishra (2004) report that A_w should be between 0.11-0.23 for most species of *Lactobacillus*, whereas those in this study are between 0.14-0.20.

Moisture (w%), as well as water activity (A_w), is strongly linked to the efficiency of the drying process. In the study by Ying et al. (2010) in microcapsules of starch blends obtained by spray drier drying were found similar values to that of this study, varying from 3% to 6%. Zayed and Roos (2004) report that the moisture content of up to 3.5% is indicated to obtain stable microcapsules during the shelf-life.

The average particle size ranged from 6 to 9 micrometers. According to Champagne and Fustier (2007), microcapsules with larger diameters can affect the texture of the food in which it will be incorporated. Diameters smaller than 100 μm are preferred for most applications (ANNAN et al., 2008). In a study by Caddeo et al. (2014), which obtained quercetin microcapsules with xanthan and chitosan wall material by spray drier drying, the mean particle size was $5.3 \pm 2 \mu\text{m}$.

The microcapsules size obtained carry the probiotic microorganism loading, because the size of the micro-organism is micrometric order; *L. acidophilus* presents typical size of 0.6-0.9 μm wide and 1.5-6,0 μm in length (GOMES; MACALTA, 1998). Thus, considering the size of the microcapsules and the microorganism, it was possible to conclude that the microorganisms are trapped in the obtained microcapsules.

The morphological evaluation of the microcapsules can be visualized in the scanning micrographs (figure 3). The particles had a spherical shape and several sizes, with typical concavities of the materials produced by spray-drying. Saénz et al. (2009) reported that the formation of concavities on the surface of atomized particles can be attributed to shrinkage of the particles during the drying process due to the rapid evaporation of the solvent into liquid droplets. Lian et al. (2002) called such concavities as "empty ball effect" and stated that the occurrence of this effect also depends on the type of encapsulating material used in the process. The external surface walls of capsules produced in this study did'nt have cracks or ruptures, what in accordance to Fritzen-Freire et al (2012) is fundamental to guarantee greater protection and lower gas permeability.

Long et al. (2013) reported in their study that the sizes of xanthan particles are relatively constant regardless of the xanthan concentration used. The larger particles are associated with pyrogenic silica used, for the same to have hydrophilic capacity and to produce this type of agglomerate after drying. As reported by Cortéz-Rojas (2012) spherical particles are commonly observed in formulations containing pyrogenic silica.

HERE FIGURE 3

Table 4 shows the color results of the experiment, generated by the application of the second order Rotational Central Compound statistical design based on the Response Surface Methodology (RSM).

HERE TABLE 4

The L * values obtained for the microcapsules produced indicate the absence of non-enzymatic darkening during the production of the microcapsules, since the values were found to be quite high (see table 3); these values corroborate the suitability of parameters used in the spray drier process. Ibarz, Pagan and Garza (1999) proposed that the variation of the luminosity of dry samples can be considered as a measure of non-enzymatic browning. Quek, Chok and Swedlund (2007) also observed a decrease in luminosity with increasing temperature, in the drying of watermelon juice in dryer spray and attributed this decrease to possible browning caused by the sugar present in the product.

In the HUE variable, the yellow color of the samples was confirmed, since all the values were close to 90 ° (reference value for the yellow color), except for pyrogenic silica, which tends to blue (270 °). When we evaluated chroma, indicating the purity of the coloration, the positive influence of xanthan caused the treatments to present a greater intensity to the yellow.

In Table 5 presents the results the applying of the Ostwald-de-Waele mathematical model in the viscosity curves, and the adjustment to the model ($R^2 > 0.95$) was verified.

HERE TABLE 5

As for the variable k, which evaluates the viscosity of the solution, xanthan and pyrogenic silica exerted effects within the studied range and observed interaction of the variables on the viscosity and, consequently, on the variable K; ($k = 7.53 + 15.33X + 3.81X^2 - 4.43A + 9.94A^2 + 3.71X.A$), but the model was neither significant nor predictive. Increasing the concentration of pruni LV xanthan generally provided the ability to produce low viscosity solutions at higher concentrations (GARCIA-OCHOA, 2000). Lim and collaborators (2013), when evaluating the encapsulation capacity of xanthan in the plant extract, concluded that very low concentrations of xanthan do not totally encapsulate the active agent; but there is a limitation as to viscosity, where very high and therefore more viscous concentrations adhere

to the vessel wall and hamper the handling of the solution. Thus, we can infer that the use of low viscosity xanthan pruni was positive. As for pyrogenic silica, it may function as a viscosity adjuvant, but may form agglomerates because of its hydrophilic property, which may hinder rheometric measurement.

For the variable η (flow behavior indexes), within the range studied. The generated mathematical model ($\eta = 0.20 - 0.14X + 0.09X^2 + 0.04X.A$) was significant and predictive, shown on the response surface generated in Figure 4.

HERE FIGURE 4

The values of η , which indicates the pseudoplasticity, were smaller than the unit (1), which characterizes the non-Newtonian fluids with pseudoplastic behavior. It is understood that the further away from the unit, the greater the pseudoplasticity of the product (DIAZ et al. 2004). According to Foresti (2003), xanthan is the most stable polysaccharide in the market, to form aqueous solutions of high viscosity and extremely pseudoplastic. The high pseudoplasticity favors the pumping and spraying processes and is very desirable when drying by the drier spray technique of viscous solutions (BECKER, 1998).

Conclusion

The association of low viscosity xanthan pruni (xantana pruni 101LV) and pyrogenic silica to obtain probiotic microcapsules of *L. acidophilus* ATCC 4356 is feasible within the studied ranges. The variables xanthan and pyrogenic silica influenced the response variables differently. The xanthan and pyrogenic silica concentration had a positive influence from the viability of the probiotic microorganisms after the process, resulting microcapsules with viability greater than 74% after the drying process. Adequate water and moisture activity were obtained to maintain viability. As for the physical characteristics, the morphology and the size of the particles produced are in the micrometric range, they showed yellow tint and high luminosity. The treatments with intermediate additions and higher ranges of xanthan addition

(central point, T2, T4, T6) are the most indicated because they have intermediate viscosity, which does not detract from the process, good physical characteristics and adequate maintenance of viability.

References

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v.15, p.399–409, 2005.

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

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

BECKER, Á F A.; KATZEN, PUÈ HLER, Á L. ; IELP,I. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective. **Applied Microbiology and Biotechnology**. v.50, p. 145-152, 1998.

CHAMPGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados. Pelotas, 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2003.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties, **Biotechnology Advances**, n. 7, v. 18, p. 549- 579, 2000.

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.

KEDIA, G.; WANG, R.; PATEL, H.; PANDIELLA, S . S. Used of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. **Procedia Biochemistry**. v.42, p. 65–70, 2007.

KHOURYIEH, H.; GOUTHAM, P.; KEVIN, W.; FADI A. Effects of xanthan–locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**. v.167 ,p. 340–348, 2015.

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, B. V.; NAGA S. V.; OBULAM, V.; REDDY, V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal Food Science e Technology**. v.52, p. 6112–6124, 2015.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray drying. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, p. 79–86, 2002.

MAUGERI FILHO, F. **Produção de Polissacarídeos**. In: U.A. LIMA; E. AQUARONE; W. BORZANI; W. SCHMIDELL. *Biotechnologia Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda. ,v. 3, p.125-153, 2001.

MUKKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por geleificação iônica. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.8, p.73-80, 2005.

PEREDO A.G., BERISTAIN C.I.; PASCUAL, L.A; AZUARA, E.; JIMENEZ, M. , The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria **LWT – Food Science and Technology**. v. 73, p. 191-196, 2016.

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

RANADHEERA R.D.C.S., BAINES, S.K., ADAMS M.C, Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**. v.43, p. 1–7, 2010.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 616–622, 2009.

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.

SHEU, T. Y., MARSHALL, R. T., & HEYMANN, H. Improving survival of culture bactéria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of Dairy Science**, v. 76, p. 1902–1907, 1993.

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, p. 589-595, 2006.

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

XU, L.; XU, G.; LIU T.; CHEN, Y.; GONG, H. The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 92, p. 516– 522, 2013.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79–86, 2002.

ZAYED, G.; ROOS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.

Table 1: Complete experimental design for the formulation of xanthan and pyrogenic silica microcapsules.

Treatments	Encoded Levels		Real Levels	
	X	S	X	S
1	-1	-1	0.5	0.5
2	+1	-1	2.0	0.5
3	-1	+1	0.5	2.0
4	+1	+1	2.0	2.0
5	-1.41	0	0.19	1.25
6	+1.41	0	2.31	1.25
7	0	-1.41	1.25	0.19
8	0	+1.41	1.25	2.31
9(C)	0	0	1.25	1.25
10 (C)	0	0	1.25	1.25
11 (C)	0	0	1.25	1.25

X: xanthan pruni %; S: Pyrogenic silica %; (C): central point.

Table 2: Physical characterization of microcapsules.

Treatments	Efficiency of encapsulation (%)	Yield (m/v) %	aW	W(%)	PS (μm)
T1	76.65	18.75	0.14 \pm 0.01	3.93 \pm 0.07	6.72 \pm 2.40
T2	76.66	23.33	0.13 \pm 0.01	3.64 \pm 0.01	7.21 \pm 3.36
T3	76.49	14.84	0.20 \pm 0.01	2.00 \pm 0.01	8.38 \pm 3.34
T4	74.10	43.40	0.14 \pm 0.01	2.28 \pm 0.06	5.70 \pm 3.46
T5	77.25	15.22	0.12 \pm 0.01	6.51 \pm 0.07	8.65 \pm 2.63
T6	76.89	50.64	0.16 \pm 0.01	2.32 \pm 0.06	6.36 \pm 4.10
T7	77.24	15.51	0.17 \pm 0.01	2.67 \pm 0.01	8.97 \pm 3.78
T8	74.58	27.50	0.16 \pm 0.01	2.47 \pm 0.02	9.00 \pm 3.86
T9	75.03	25.00	0.17 \pm 0.01	2.69 \pm 0.02	7.63 \pm 2.06
T10	74.40	25.00	0.15 \pm 0.01	2.59 \pm 0.01	7.33 \pm 5.03
T11	74.40	25.00	0.14 \pm 0.01	3.85 \pm 0.01	8.78 \pm 3.59

Where: aW (Water activity in units of aW), W (moisture in percentage) and PS (mean particle size $n = 50$ in micrometers), $n = 3$; $P \leq 0.05$.

Table 3: Viable cells (Log UFC.ml⁻¹) after drying in spray-dryer.

Treatments	Initial Log UFC.ml⁻¹
T1	9.65±0.013
T2	9.55±0.064
T3	9.58±0.004
T4	9.62±0.013
T5	9.24±0.039
T6	9.70±0.016
T7	9.67±0.013
T8	9.66±0.672
T9	9.39±0.020
T10	9.43±0.012
T11	9.38±0.012

n = 2. P ≤ 0.05.

Table 4: Color parameters of the microcapsules.

Treatments	L*	HUE (h°)	Croma (C*)
T1	95.52±0.30	90.95±0.97	6.67±0.47
T2	95.60±0.29	94.16±0.14	9.04±0.55
T3	96.75±0.84	99.30±0.86	3.67±0.12
T4	95.28±0.58	95.45±0.54	7.21±0.26
T5	95.01±0.76	93.76±0.52	10.05±0.89
T6	95.19±0.27	94.07±0.89	9.99±0.94
T7	96.43±1.71	99.92±3.13	3.77±0.27
T8	96.51±0.32	96.67±1.41	5.78±0.25
T9	96.01±0.37	94.15±1.69	6.99±0.26
T10	95.85±0.82	96.47±0.47	6.72±0.15
T11	95.44±1.06	95.55±0.56	6.66±0.06
Xanthan¹	88.72±0.02	93.74±0.01	27.01±0.25
Pirogenic silica¹	97.71±0.23	327.36±3.89	1.12±0.10

Table 5: Rheological parameters K and n of the encapsulant solutions obtained by fitting with mathematical model of Ostwald de Waele.

Treatments	K (adm)	η (mPa.sⁿ)	R^2
T1	0.77±0.09	0.50±0.12	0.96±0.06
T2	32.57±0.65	0.14±0.02	0.99±0.00
T3	1.36±0.73	0.35±0.14	0.91±0.13
T4	48.015±4.75	0.16±0.01	0.99±0.00
T5	0.15±0.00	0.60±0.03	0.97±0.05
T6	31.27±1.17	0.16±0.04	0.99±0.00
T7	46.13±1.51	0.15±0.03	0.99±0.00
T8	9.68±0.78	0.21±0.10	0.99±0.00
T9	8.27±0.64	0.21±0.04	0.99±0.00
T10	6.43±0.40	0.20±0.09	0.99±0.00
T11	7.89±1.04	0.22±0.13	0.99±0.00

K : dimensionless viscosity; η : pseudoplasticity. n (number of replicates) = 3. $p \leq 0.05$

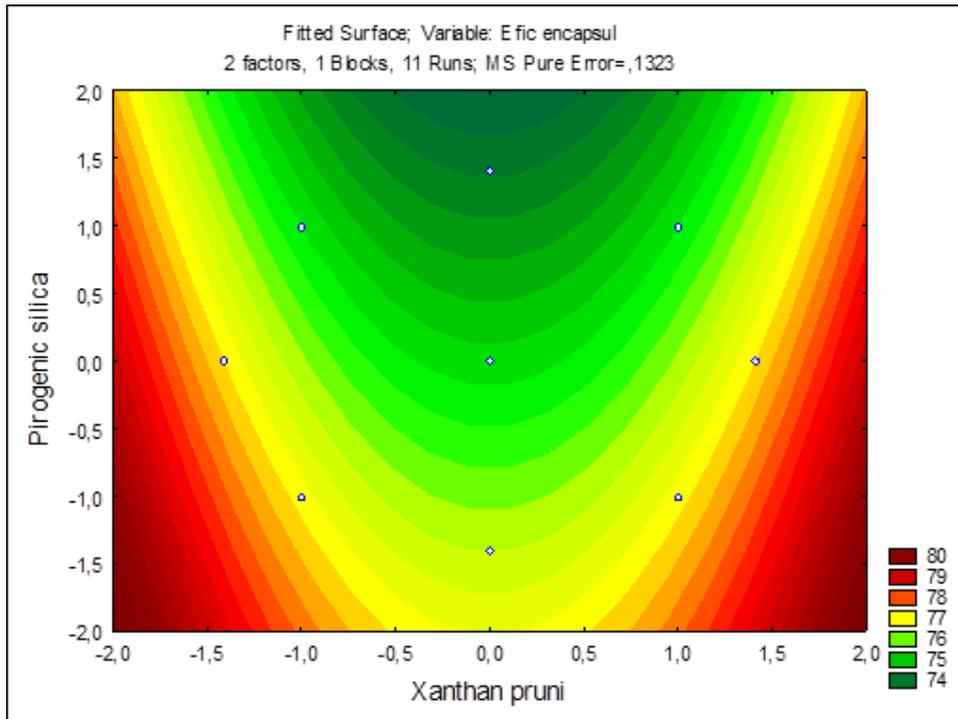


Figure 1: Response surface for variable encapsulation efficiency (%).

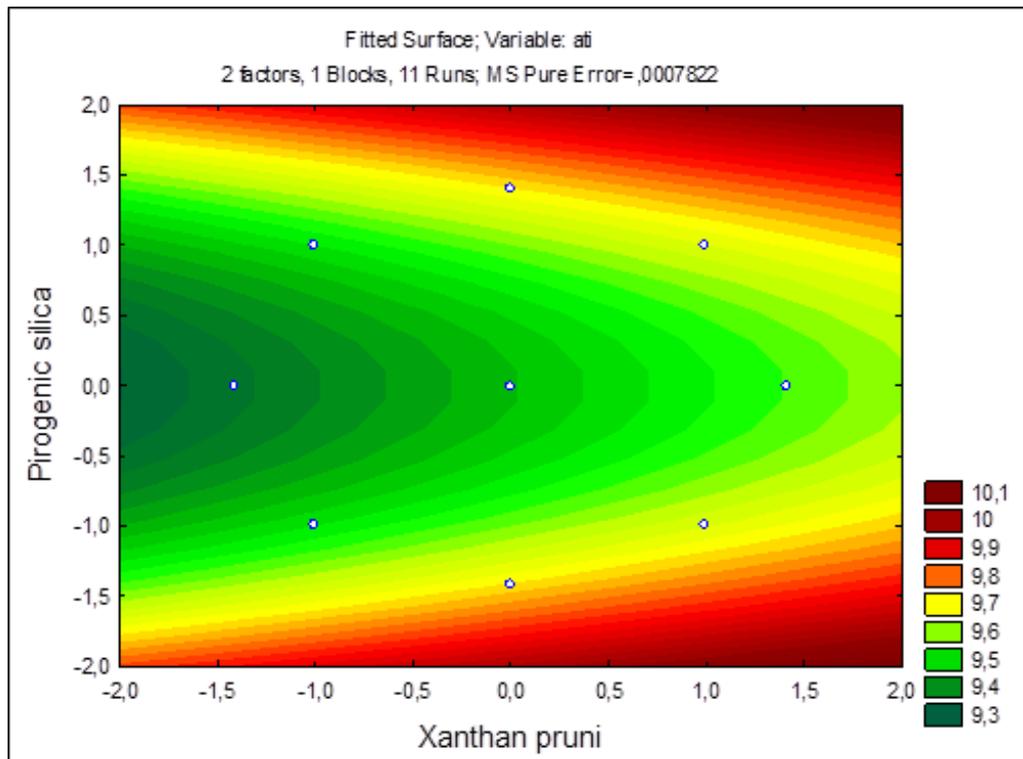


Figure 2: Response surface of viability (Log UFC.ml⁻¹) after drying by spray-dryer.

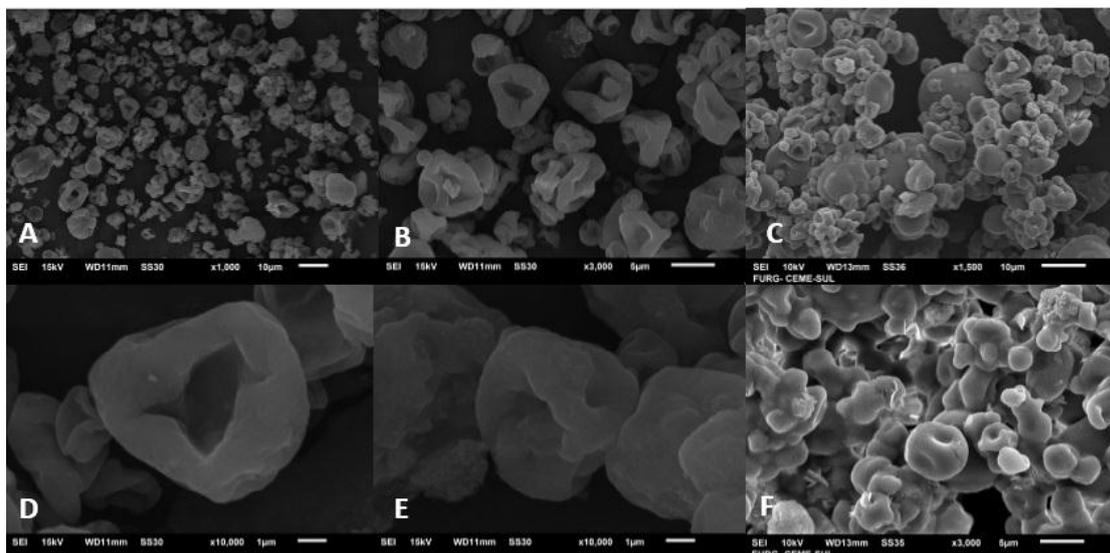


Figure 3: Micrographies by Scanning Electron Microscopy.

Where: A corresponds to T2 with magnification of 1000x. B corresponds to T2 with magnification of 3000x. C corresponds to Xanthan pruni with magnification 1500x. D corresponds to T2 with magnification of 10000x. E corresponds to T5 with magnification of 10000x. F corresponds to pyrogenic silica with magnification of 3000x. n = 50.

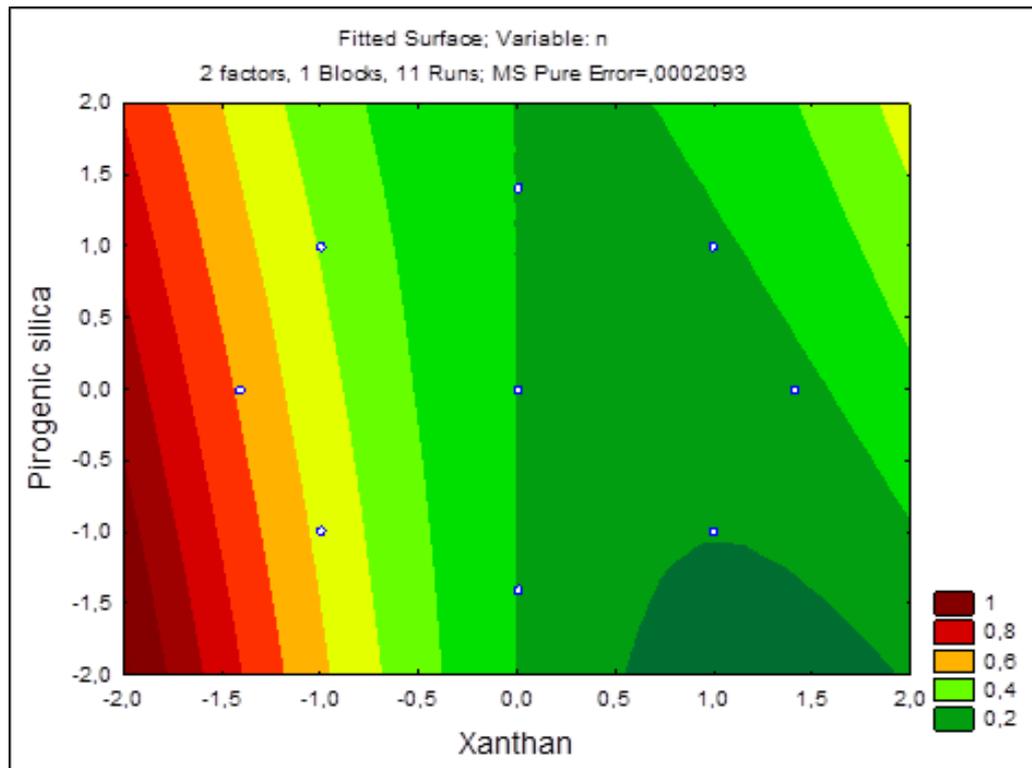


Figure 4 - Response surface of the variable η (flow behavior indexes).

6. ESTUDO 1

Avaliação da influência da temperatura de armazenamento de microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 de longa viabilidade com uso de xantana pruni de baixa viscosidade e sílica pirogênica

Este trabalho tem por objetivo avaliar a influência da temperatura de armazenamento sobre a viabilidade dos micro-organismos probióticos microencapsulados em diferentes concentrações de xantana e sílica pirogênica.

Material e Métodos

Xantana arboricola pv pruni cepa 101, isolada por pesquisadores da Embrapa Clima Temperado - e cedida ao Laboratório de Biopolímeros, CDTec - UFPel, Brasil, foi utilizada neste estudo. A cepa bacteriana foi mantida em ágar SPA (Hayward, 1964), armazenada a 4 °C e repicada mensalmente em placas de Petri. Cultura estoque foi preservada por liofilização. O estágio de multiplicação celular (produção de inóculo ou trofofase) foi realizado em um agitador orbital (B. Braun Biotech International®) por 24 h. A produção de xantana pruni foi realizada por fermentação submersa num biorreator de 5 litros com um volume útil de 3 L (Biostat B, B. Braun Biotech International®) utilizando 10 % (v/v) de inóculo. Foram utilizadas condições operacionais como descrito no pedido de patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006), com componentes do meio de cultura e suas concentrações selecionados para obtenção de xantana de baixa viscosidade, com pH fixado em 7 por adição de NaOH 2 M, durante 72 h. O caldo fermentado resultante foi tratado termicamente a 121 °C durante 15 minutos e a xantana pruni foi recuperada por precipitação com adição de etanol a 96 % numa proporção de 4:1 (v/v). Após a recuperação, o polímero foi seco a 56 °C até peso constante e moído para tamanho de partícula de 60-150 mesh. A xantana utilizada no experimento resultou de uma mistura de duas fermentações; o polímero resultante de cada fermentação foi analisado através da produção e da viscosidade e não foi observada diferença significativa ao nível de 5 % entre eles. O produto final foi designado como xantana pruni LV (do inglês *low viscosity* - baixa viscosidade).

Para a elaboração das soluções encapsulantes, as concentrações de xantana pruni e Aerosil® foram definidas através de Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) fatorial 2^2 , completo, com 3 pontos fatoriais (± 1), triplicata no ponto central e 4 pontos axiais ($\pm 1,41$), sendo dois para cada variável independente, totalizando 11 ensaios. As variáveis independentes foram concentração de xantana pruni e de Aerosil®, e as variáveis dependentes foram viabilidade celular durante o armazenamento, atividade de água, umidade e diâmetro de partículas. Também foram adicionadas às formulações glicerol (20% m/m) em relação à massa polimérica total.

Tabela 1 Delineamento experimental fatorial completo para a formulação de microcápsulas de xantana e aerosil.

Formulação	Níveis Codificados		Níveis Reais	
	X	A	X	A
1	-1	-1	0,5	0,5
2	+1	-1	2,0	0,5
3	-1	+1	0,5	2,0
4	+1	+1	2,0	2,0
5	$-\alpha$	0	0,19	1,25
6	$+\alpha$	0	2,31	1,25
7	0	$-\alpha$	1,25	0,19
8	0	$+\alpha$	1,25	2,31
9(C)	0	0	1,25	1,25
10 (C)	0	0	1,25	1,25
11 (C)	0	0	1,25	1,25

X: % de xantana; A: % de aerosil; (C): ponto central; $-\alpha$: pontos axiais.

O inóculo foi produzido através de culturas puras de *L. acidophilus* ATCC 4356, seu crescimento foi em placas de Petri com meio sólido MRS (De Man, Rogosa e Sharp), 37 °C por 72 horas, após as células foram ressuspensas em meio líquido MRS e incubadas em agitador orbital (Shaker) nas seguintes condições: 150 rpm, 37°C por cerca de 16h, até que fosse atingida a DO_{600} (densidade ótica) igual a 1. Para utilização da suspensão na solução encapsulante, o inóculo foi centrifugado a 10000 x g, a 4°C por 10 min até formação de *pellet*.

A solução de trabalho, contendo o agente encapsulante mais o material ativo, foi desidratada utilizando um *spray dryer* LabMaq modelo MSD 1.0 sob as seguintes condições: temperatura de entrada do ar 120 °C, temperatura de saída 60±10 °C, vazão de entrada equivalente a 0,4 L.h⁻¹. As condições de pressão do compressor do ar de secagem (2 - 4 kgf.cm⁻²) e a vazão de ar comprimido (40 kgf.cm⁻²). Os pós produzidos foram armazenados em frascos de vidro e acondicionados em dessecador a temperatura ambiente (25 ± 10 °C), sob refrigeração (4 ± 5 °C) e congelados (-18 ± 2 °C).

Resultados e discussão

Na figura 4, estão dispostos os resultados do delineamento estatístico Composto Central Rotacional de segunda ordem com base na Metodologia de Superfície de Resposta (MSR) da avaliação da viabilidade dos micro-organismos probióticos nas microcápsulas, sob as diferentes condições de armazenamento. Os resultados foram agrupados nos diferentes tempos de avaliação.

Os efeitos das concentrações de xantana e Aerosil[®], bem como da interação entre estas sobre a viabilidade do micro-organismo probiótico após o processamento (um dia após o processamento) estão descritas no capítulo anterior

Para os tratamentos armazenados sob congelamento, aos 7 dias não houve interação ou efeito das variáveis concentração de xantana e de Aerosil[®] dentro da faixa estudada. Aos 15 dias, as variáveis concentração de xantana e Aerosil[®] exerceram efeito positivo (concentração de xantana e de Aerosil[®] linear) e negativo (concentração de xantana e de Aerosil[®] quadrático) e interação sobre a viabilidade. O modelo matemático gerado ($Y = 8,75 + 0,32X - 0,60X^2 + 0,33A - 0,28A^2 - 0,73XA$) foi significativo, porém não foi preditivo ($r = 0,82$). Aos 30 dias de armazenamento não verificou-se efeito ou interação das variáveis xantana e aerosil, dentro da faixa estudada. Nos 45 dias, houve interação e efeito positivo das variáveis quadráticas independentes concentração de xantana e concentração de Aerosil[®], com obtenção de modelo matemático ($Y = 0,25X^2 + 0,44A^2$), preditivo e significativo ($r = 0,39$) e gerando superfície de resposta (figura 1). A maior viabilidade encontra-se nos extremos de adição de xantana e Aerosil[®], e esse comportamento pode ser justificado pela interação positiva das variáveis quadráticas dentro da faixa estudada.

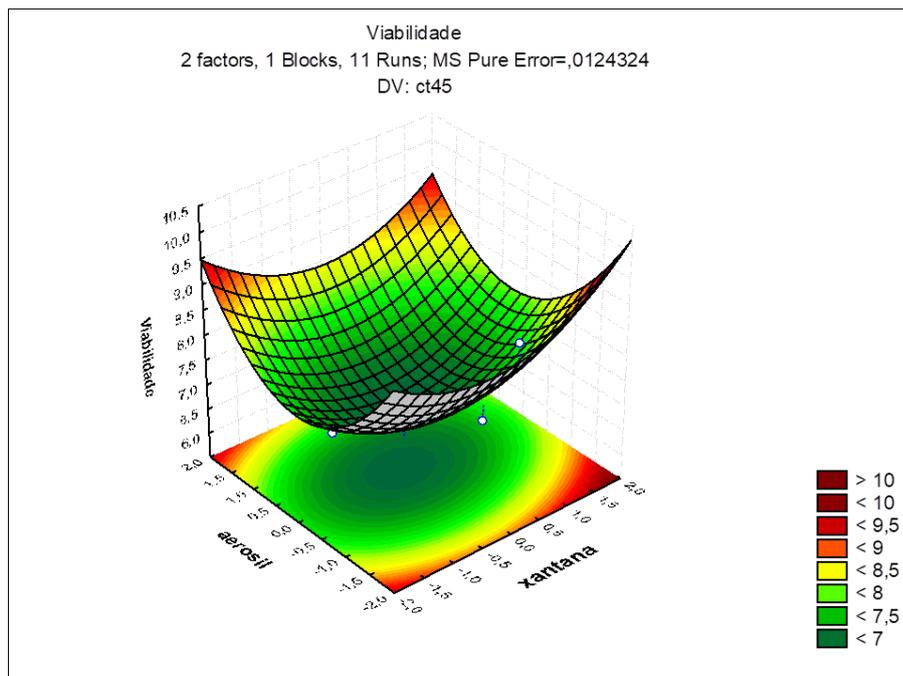


Figura 1: Superfície de resposta da variável viabilidade aos 60 dias de armazenamento sob congelamento

Aos 60 dias de armazenamento, dentro da faixa estudada, houve interação e efeitos das variáveis independentes xantana e Aerosil®, o modelo matemático gerado ($y=5,96+0,2x+0,38X^2-0,75A+1,82A^2$). As concentrações de xantana e de Aerosil® (linear e quadrático) tiveram influencia positiva sobre a variável dependente viabilidade, e o modelo matemático gerado não foi significativo ($F_{cal} \leq F_{tab}$ na regressão) nem preditivo ($F_{cal} \geq F_{tab}$ na falta de ajuste). Nos 90 dias, não houve interação ou influencia de nenhuma das variáveis independentes dentro da faixa estudada. Aos 120 dias, houve interação e influencia negativa das variáveis concentrações de xantana e de Aerosil®. O modelo matemático gerado ($y=5,6-0,37X^2-0,35A$) foi significativo ($F_{cal} \geq F_{tab}$ na regressão), porém não preditivo ($F_{cal} \geq F_{tab}$ na falta de ajuste) dentro da faixa estudada, não gerando superfície de resposta.

Nos tratamentos armazenados sob refrigeração, aos 7 dias de armazenamento houve influência e interação negativa das variáveis concentrações de xantana e de Aerosil®, o modelo matemático ($y = 8,5-0,53X^2 - 0,5XA$) foi preditivo (figura 2) e não significativo ($F_{cal} \geq F_{tab}$ na regressão). Na figura 12 podemos visualizar que a faixa de maior viabilidade localiza-se na faixa central, mostrando que os efeitos, mesmo negativos, quando combinados elevam o valor da viabilidade.

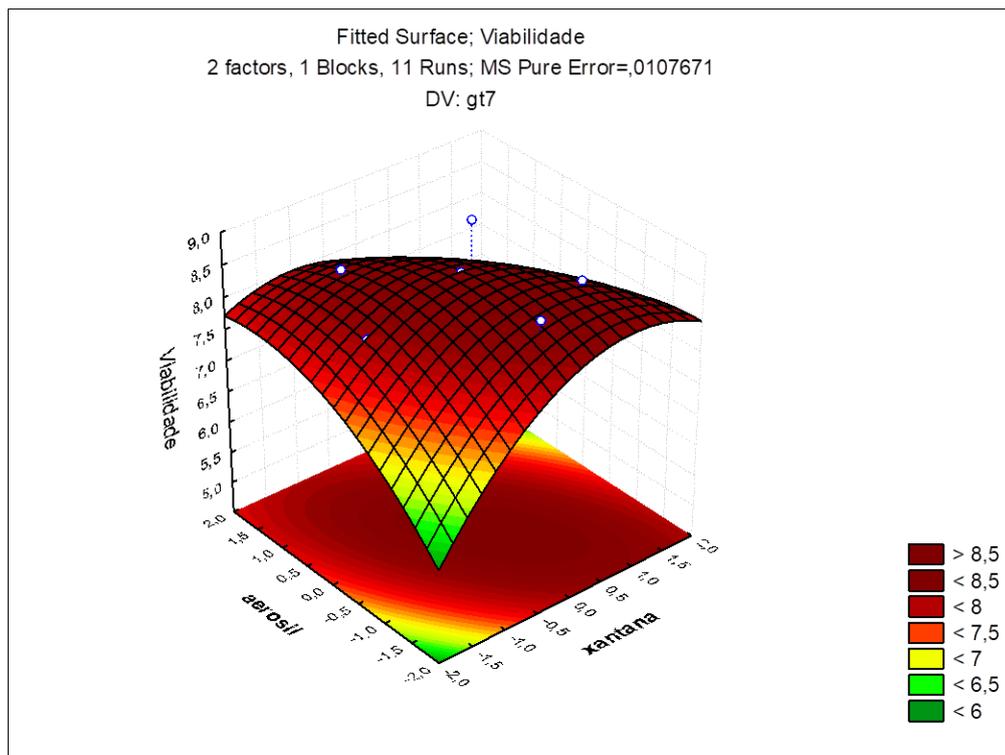


Figura 2: Superfície de resposta da variável viabilidade aos 7 dias de armazenamento sob refrigeração.

Aos 15, 30 e 45 dias de armazenamento, não houve interação ou influência das variáveis independentes concentrações de xantana e de Aerosil® dentro da faixa estudada. Nos 60 dias, houve interação e efeito negativo (quadrático) e positivo da concentração do Aerosil® (linear); o modelo matemático ($Y = 5,91 - 0,83A + 1,27A^2$) gerado foi preditivo (figura 3) e significativo dentro da faixa estudada ($F_{cal} \geq F_{tab}$ na regressão) ($r = 0,94$). Na figura 3, podemos visualizar que, independente da faixa de adição de xantana, há a maior viabilidade, levando em consideração que a viscosidade elevada nas maiores concentrações de adição diminui o rendimento de secagem; sendo assim, podemos utilizar concentrações menores de xantana e ainda assim obtermos valores consideráveis de viabilidade.

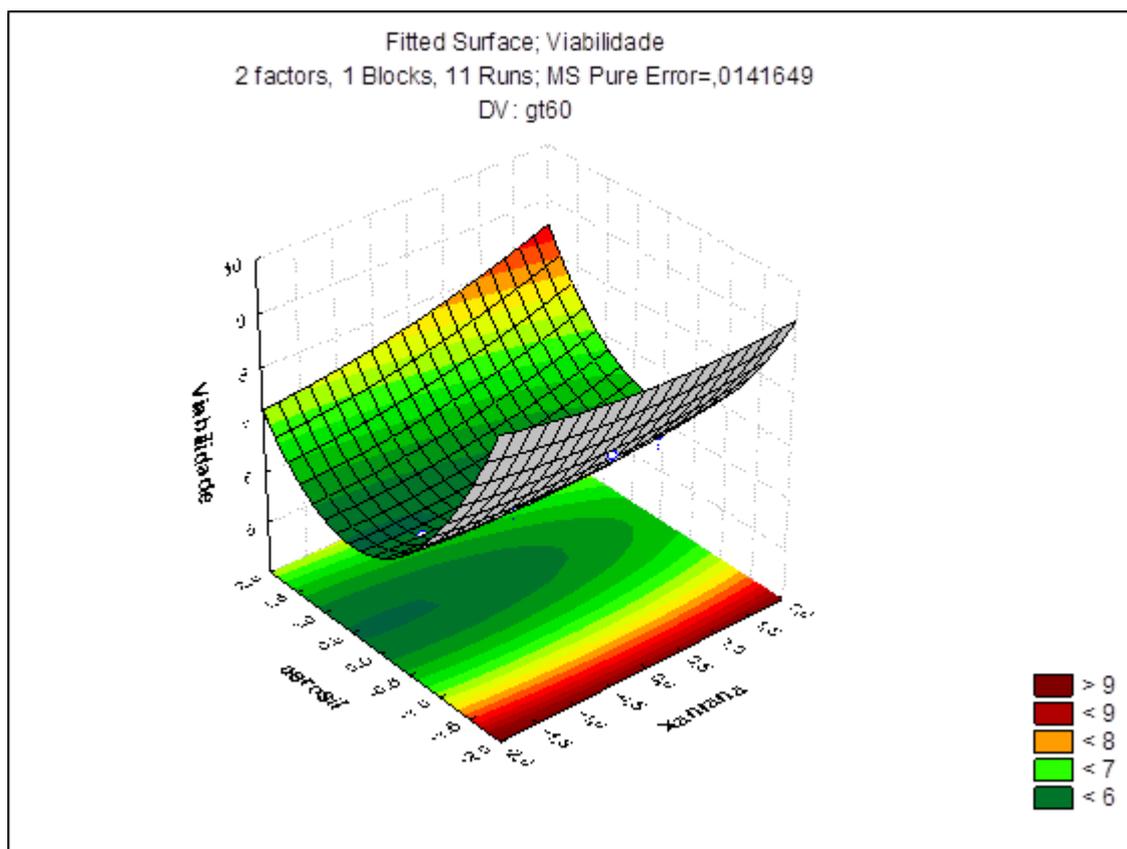


Figura 3 Superfície de resposta da variável viabilidade aos 60 dias de armazenamento sob refrigeração.

Aos 90 e 120 dias de armazenamento, não houve interação ou influência das variáveis xantana e Aerosil® dentro da faixa estudada.

Para as microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente, nos tempos de avaliação, em todos os tempos de armazenamento não houve efeito ou interação das variáveis independentes concentrações de xantana e de Aerosil®, dentro da faixa estudada.

Na figura 4, estão dispostas as concentrações de micro-organismos viáveis dos tratamentos nas diferentes temperaturas de armazenamento e tempos de análise. O armazenamento em temperatura ambiente não assegurou a viabilidade dos micro-organismos até o final do tempo de avaliação, onde somente até os 60 dias de armazenamento obteve-se células viáveis com concentração dentro da recomendação da FAO/OMS (2009), que é 6 Log UFC g⁻¹. Santos (2013) justifica que com estocagem em temperatura ambiente há uma maior atividade metabólica dos micro-organismos que pode levar à produção de ácidos metabólicos e à perda de substratos, e assim reduzindo ou inativando as células viáveis.

Sob refrigeração (7 °C), a manutenção da viabilidade dos micro-organismos foi garantida até o final do armazenamento, alcançando concentrações de até 5, 57 Log UFC g⁻¹. Ribeiro (2011) obteve em microcápsulas liofilizadas de *L. acidophilus*, sob armazenamento refrigerado, concentrações em torno de 5 Log UFC g⁻¹ em 45 dias de armazenamento. A viabilidade das bactérias probióticas durante o armazenamento é inversamente relacionada à temperatura de armazenamento (GARDINER et al., 2000). Os produtos contendo probióticos devem, de preferência, ser armazenados a uma temperatura de 4-5 °C (MORTAZAVIAN; et al., 2007).

As microcápsulas sob congelamento (- 18°C) mantiveram a sua viabilidade até o final do período de avaliação, alcançando concentrações de até 6 Log UFC g⁻¹. A adição de glicerol às formulações pode ter auxiliado na manutenção dos micro-organismos em temperaturas menores, reduzindo a diferença osmótica entre o meio interno e externo da micropartícula (TRIPATI; GIRI, 2014). Micro-organismos probióticos usualmente são armazenados por períodos consideráveis, para então serem requeridos para a produção de alimentos e ingestão. Estabilidade ou manutenção da viabilidade durante o armazenamento é uma resposta importante, visto que, durante o processamento como, também no armazenamento do produto, os micro-organismos probióticos podem perder a viabilidade, comprometendo a sua utilização (DE GIULIO et al., 2005). Variáveis ambientais, como a temperatura de estocagem e presença de oxigênio, comprometem a viabilidade celular durante o armazenamento prolongado, tornando um desafio a aplicação dos probióticos numa variedade de produtos alimentícios (ANAL; SINGH, 2007).

CONCLUSÃO

A avaliação do armazenamento das microcápsulas, seja na avaliação nas condições de temperatura ou do tempo de viabilidade torna-se fundamental do ponto de vista de aplicabilidade da microcápsula. As interações entre xantana pruni e aerosil demonstram o potencial destes polímeros no desenvolvimento do produto. O armazenamento em refrigeração e congelamento se mostraram mais efetivos na sobrevivência dos microrganismos probióticos. Já a avaliação da interação entre xantana pruni e aerosil, os tratamentos que se destacam são os tratamentos de concentrações intermediárias de xantana pruni, como o t7 e os pontos centrais.

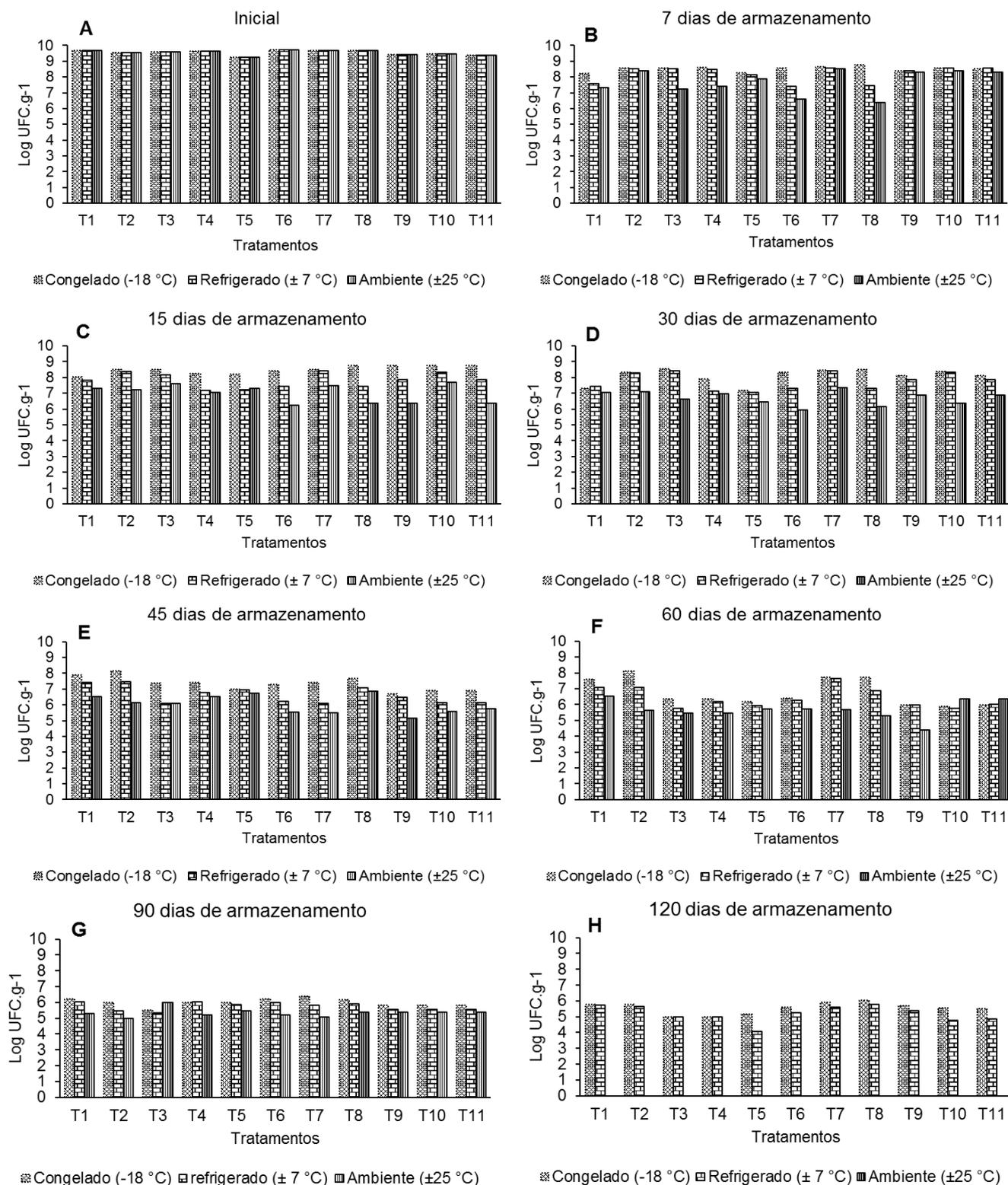


Figura 4 Viabilidade de *Lactobacillus acidophillus* sob diferentes condições de armazenamento.

7. Manuscrito 2

AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS ENCAPSULADO COM XANTANA PRUNI E COMERCIAL SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

Julia Borin Fioravante, Izadora Almeida Perez, Victoria de Moraes Gonçalves, Patricia Diaz de Oliveira, Angelita da Silveira Moreira.

Laboratório de Biopolímeros, Centro de Desenvolvimento Tecnológico, Universidade Federal de Pelotas

RESUMO – A busca por alimentos que fornecem benefícios ao consumidor é crescente, fator que gera avanços nas pesquisas para incorporação de probióticos em uma ampla diversidade de alimentos e bebidas. Entretanto, para que tais produtos gerem benefícios é necessário que os microrganismos probióticos permaneçam viáveis durante o processamento e condições de armazenamento. Como determinados alimentos possuem características que podem ser prejudiciais à essa viabilidade, diversas tecnologias são empregadas para assegurar a sobrevivência dos probióticos, dentre estas pode-se citar a encapsulação por spray dryer. Esse processo protege os microrganismos frente a diversos fatores, intrínsecos ao alimento e seu armazenamento e ao processo digestivo. Os agentes encapsulantes devem promover a viabilidade do microrganismo tanto no alimento como na parte superior do trato gastrointestinal; entre esses, destaca-se a xantana. Realizou-se dois tratamentos (T1 e T2); o microrganismo probiótico utilizado foi o *Lactobacillus acidophilus*, o agente encapsulante usado foi xantana, comercial (T1) e xantana pruni (T2), e o antiagregante/antiumectante Aerosil®,. Para a encapsulação, o inóculo foi ressuspensão nas soluções encapsulantes, a secagem foi realizada em spray dryer, posteriormente, realizou-se a avaliação da resistência do microrganismo à digestão simulada. Com os resultados pôde-se observar que o microrganismo foi encapsulado e resistiu às condições simuladas, sendo que o período de maior liberação de microrganismos viáveis foi em 4 horas, a menor concentração de microrganismos foi em 2 horas, devido a liberação parcial, em ambos tratamentos. A xantana pode ser eficientemente utilizada como agente

encapsulante de microrganismos probióticos, sendo que a xantana pruni apresentou melhores resultados.

Palavras-chave: probiótico, preservação de microrganismo, xantana, digestão simulada.

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (BRASIL, 2002). Inúmeros benefícios à saúde têm sido atribuídos à ingestão de probióticos, entretanto, tais benefícios somente ocorrem se os mesmos permanecerem viáveis durante o processamento e condições de armazenamento. No Brasil, a legislação preconiza que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (MORTAZAVIAN; SOHRABVANDI, 2007; BRASIL, 2008).

É crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo probióticos, e os avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos têm resultando na incorporação de probióticos não somente em produtos lácteos, como também em uma ampla diversidade de alimentos e bebidas (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012). É importante ressaltar que as diferentes características intrínsecas e extrínsecas dos alimentos podem ser prejudiciais à viabilidade dos microrganismos nesses produtos, assim diversas tecnologias são empregadas para assegurar a sobrevivência dos probióticos dentro de novas matrizes alimentares, dentre essas pode-se citar a técnica que utiliza secagem de soluções encapsulantes por spray dryer, uma das metodologias mais empregadas, uma vez que apresenta baixo custo do processo e possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes com estabilidade do produto final (IBARRA et al., 2012; SANTOS, 2013).

Este processo é utilizado para proteger os microrganismos durante o armazenamento e também frente a meio ácidos, sais biliares, oxigênio e enzimas, fornecendo proteção às células frente a digestão (OLIVEIRA et al., 2007; FAREEZ et al. 2015). Utiliza-se uma matriz de baixa solubilidade e reconhecida como segura para garantir a integridade do microrganismo, tanto no alimento como na parte superior do trato gastrointestinal, sendo os biopolímeros ideais para este tipo de

processo, destacando-se a xantana (KRASAEKOOPT et al., 2003; NAZZARO et al., 2012).

A xantana apresenta uma grande importância na indústria de alimentos devido às suas propriedades reológicas, as quais proporcionam a formação de soluções viscosas até mesmo em baixas concentrações e é estável em ampla faixa de pH e temperatura. Além disso, a goma xantana não é digerível (LUVIELMO; SCAMPARINI, 2009). Denomina-se xantana pruni a xantana produzida por *X. arboricola* pv *pruni*, que possui propriedades químicas e físicas que a distinguem das xantanas comerciais (VENDRUSCOLO et al., 2013).

Objetivou-se com o presente estudo preservar o probiótico *Lactobacillus acidophilus* através da técnica de secagem por spray dryer, utilizando xantana pruni e xantana comercial como agente encapsulante, bem como avaliar a resistência do microrganismo às condições de digestão simulada.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Tratamentos

O microrganismo probiótico utilizado foi o *L. acidophilus* ATCC 4356, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPEL. Nas soluções encapsulantes utilizou-se como agente encapsulante a xantana e o antiemectante/antiagregante Aerosil®, nas proporções 1,25% e 0,19%, respectivamente. No primeiro tratamento (T1) utilizou-se a xantana pruni da cepa 101, produzida no Laboratório de Biopolímeros, do CDTec/UFPEL; no segundo tratamento (T2) substituiu-se a xantana pruni por uma comercial (Farmaquímica ®). Após, as soluções foram esterilizadas.

2.2 Encapsulação

O inóculo foi produzido através de culturas puras de *L. acidophilus* ATCC 4356; seu crescimento foi em placas de Petri com meio sólido MRS (De Man, Rogosa e Sharp), 37 °C por 72 h; após, as células foram ressuspensas em 30 mL de meio líquido MRS e incubadas em agitador orbital (Shaker) a 150 rpm, e 37 °C por cerca de 16 h, até que fosse atingida a DO600 (densidade óptica) igual a 1. Para separação das células e adição das mesmas na solução encapsulante, o inóculo foi centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 10 min para formação de pellet celular, que foi ressuspenso em mesmo volume da solução encapsulante. A secagem foi realizada

em spray dryer LabMaq (MSD 1.0), com temperatura de entrada de 120°C e de saída 60°C, fluxo de ar de 3L. h⁻¹ e velocidade de entrada de 0.4 L.h⁻¹. Os pós produzidos foram envasado em frascos tipo penicilina.

2.3 Resistência do microrganismo à digestão simulada

Para avaliar a resistência do *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 encapsulado às condições de digestão simulada, amostras dos pós foram incubados para simular a peristalse; as condições foram 37°C a 150 rpm. Para a fase gástrica, em Erlenmeyer de 125 mL contendo 10 mL de solução (6,2 g.L⁻¹ de NaCl, 2,2 g.L⁻¹ de KCl, 0,22 g.L⁻¹ de CaCl₂ e 1,2 g.L⁻¹ de NaHCO₃) acidificada a pH 2 com HCl 0,1 M e suplementada com 1 mg.mL⁻¹ de pepsina. Uma alíquota dessa solução foi retirada após 0,5, 1 e 2 horas para determinar os microrganismos presentes através de diluição seriadas seguidas de plaqueamento. Para avaliar a resistência às condições intestinais simuladas na fase entérica, na mesma solução, de forma subsequente, foi suplementada com 1mg.mL⁻¹ de pancreatina, 0,2% de sais biliares e teve o ajustado em pH 8 com NaOH 0,1 M, e uma alíquota dessa solução foi retirada após 3, 4, 5 e 6 horas para determinar os microrganismos presentes através de diluição seriadas seguidas de plaqueamento (CASTELLI, 2011).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Os resultados obtidos na avaliação da resistência do probiótico *L. acidophilus* ATCC 4356 encapsulado com os diferentes agentes encapsulantes, sob condições de digestão simulada, estão demonstrados na Figura 1.

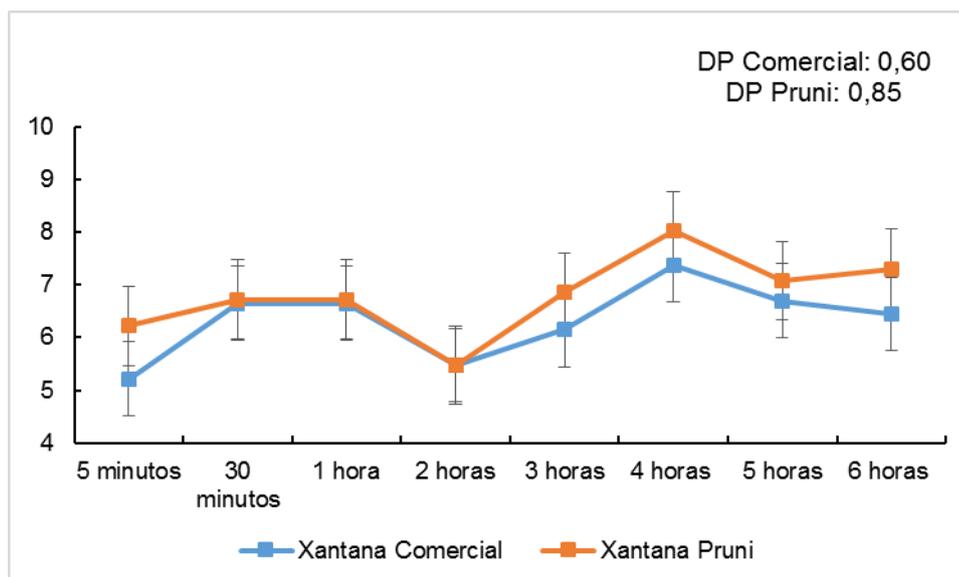


Figura 1 – Concentração de células viáveis nas microcápsulas submetidas a condições de digestão simulada (n=2), concentração das células viáveis foi expressa em log₁₀ UFC g⁻¹. (DP= desvio padrão).

Segundo Brasileiro (2011), a liberação do conteúdo das microcápsulas elaboradas com goma xantana se dá através de mecanismos térmicos e mecânicos, desta forma, ao longo da avaliação provavelmente ocorreu um aumento da dissolução das cápsulas, liberando os microrganismos de maneira lenta sob as condições de digestão simuladas. No presente trabalho obteve-se contagens em todos os tempos analisados; a menor concentração ocorreu às 2h, ao final da fase gástrica e o pico de liberação das cápsulas ocorreu no período de 4 h com concentrações de células viáveis de *L. acidophilus* de 10⁸ UFC no T2, com xantana pruni, e concentração de 10⁷ UFC no T1, com xantana comercial.

De acordo com Laurenti e Garcia (2013), assim que as cápsulas são submetidas à pH ácido com a presença de enzimas, as células do interior da matriz de encapsulação são gradualmente liberadas para o meio externo por este motivo, a liberação é menor no início do processo da simulação gastrointestinal e aumenta até atingir estabilidade.

Ao avaliarmos as diferenças estruturais dos polímeros utilizados como agentes encapsulantes, verifica-se que além de glicose, manose e ácido glicurônico, têm-se relatado a ocorrência de outros monossacarídeos na estrutura química de algumas xantanas não comerciais. Moreira et al. (2001) identificaram ramnose na xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni, indicando que a espécie influencia na

estrutura química. Além dessa diferença, as xantanas do patovar pruni, costumam apresentar maior pseudoplasticidade que as comerciais, o que é desejável para aplicações como a do presente estudo. Apesar da xantana comercial apresentar ótima qualidade tecnológica, a xantana pruni demonstrou um melhor resultado, com uma maior viabilidade das células em praticamente todos os períodos de contagem.

A sobrevivência das culturas probióticas quando se utiliza a técnica de secagem por spray dryer não está somente relacionada com o agente encapsulante, mas também com o tipo de cepa utilizada, com as temperaturas de entrada e saída no equipamento, sendo que no processo as células são significativamente protegidas.

Para que os probióticos exerçam sua ação benéfica ao hospedeiro os mesmos devem chegar em concentrações adequadas ao intestino humano que é o seu ponto de ação. Silva et al. (2014) citam em seu estudo que um dos principais obstáculos para ação dos probióticos é a sua baixa taxa de sobrevivência em pH gástrico e altas concentrações de sais biliares no intestino. Os autores constataram que as células livres de *B. animalis* e *L. acidophilus* não resistiram as condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), onde em 2 horas de análise os mesmos não apresentaram crescimento. Entretanto, com a encapsulação, os mesmos apresentaram maior resistência a passagem pelo TGI, mantendo a concentração celular em torno de 10^9 UFC.g⁻¹ após 6 horas de análise.

4 CONCLUSÃO

O processo de encapsulamento em xantana com secagem por spray dryer, nas condições utilizadas, proporciona a resistência em concentrações adequadas do probiótico *L. acidophilus* ATCC 4356, ao processo de digestão gástrica e entérica simulada. A xantana é, portanto, um biopolímero com potencial de utilização como agente encapsulante de microrganismos probióticos, especialmente a xantana pruni utilizada, que proporcionou os melhores resultados em toda a fase entérica.

5 REFERÊNCIAS

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSSEL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloide**, vol. 29, p. 166–74, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos

alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 17 mar. 2018.

BRASILEIRO, J. S. L. Microencapsulação de componentes bioativos: inovação em diferentes áreas. 2011. 71f. Dissertação (Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade de Fernando Pessoa, Porto, 2011.

CASTELLI, R. M. Sinergismo dos probióticos *Saccharomyces boulardii* e *Bacillus cereus* var. *Toyo* sobre a imunomodulação em camundongos. 2011. 59f. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial. Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel. Universidade Federal de Pelotas, 2011.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**. p. 1419–1428, 2015.

IBARRA, A.; ACHA, R.; CALLEJA, M. T.; CHIRALT-BOIX, A.; WITTIG, E. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Journal Dairy Science**, p. 3536–3548, 2012.

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**, p. 737-743, 2003.

LAURENTI, E.; GARCIA, S. Eficiência de materiais encapsulantes naturais e comerciais na liberação controlada de probiótico encapsulado. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v.16, n.2, p. 107-115, 2013.

LUVIELMO, M. M.; SCAMPARINI, A.R.P. Goma xantana: produção, recuperação, propriedades e aplicações. **Estudos tecnológicos**, v.5, nº 1, p. 50-67, 2009.

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. Probiotics and Food Probiotic Products. **Eta Publication**, p. 131-169, 2007.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv *pruni*. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 469-474, 2001.

NUNES, G. L.; SILVA, T. M.; HOLKEM, A. T.; SCHLEY, V.; MENEZES, C. R. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. *Ciência e Natura [da] Universidade Federal de Santa Maria*. v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 132 – 141, dez. 2015.

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**, p. 685-693, 2007.

SANTOS, R. C. S. dos. Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013

VENDRUSCOLO, C. T. ; MOREIRA, A. da S. . Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo;Deise Maria Passos da Silva;José de Paula Oliveira;José Nildo Tabosa;Fernando Gomes da Silva;José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 04ed.Recife: CCS- Gráfica e Editora, v. 1, p. 31-58, 2013.

8. Manuscrito 3

GELADO COMESTÍVEL DE MIRTILO ADICIONADO DE PROBIÓTICOS LIVRES E MICROENCAPSULADOS EM XANTANA PRUNI

Júlia Borin Fioravante¹, Victoria de Moraes Gonçalves¹, Izadora de Almeida Perez³, Patrícia Diaz de Oliveira^{1,2}, Angelita da Silveira Moreira*^{1,2,3}.

victoriahgoncalves@hotmail.com, juliabfioravante@gmail.com,

izadora_perez@hotmail.com, bilicadiaz@yahoo.com.br,

angelitadasilveiramoreira@gmail.com

Fioravante, JB; Gonçalves VM Perez, IA; Oliveira, PD; Moreira, AS.

¹ Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA); ² Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec); ³ Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos (CCQFA) – Universidade Federal de Pelotas (UFPel), Phone + 55 53 3275 75585, 96010-900, Pelotas, RS, Brazil. * Corresponding author.

RESUMO: Probióticos são definidos como microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo. Tem-se buscado maneiras de tornar a ingestão de probióticos mais efetiva. Em sua forma ampla, a microencapsulação é uma opção viável de aumento da preservação dos probióticos frente às condições adversas da composição, condições de processamento e armazenamento dos alimentos probióticos. Xantana tem surgido como opção de encapsulante. Objetivou-se comparar duas formulações de gelado comestível de mirtilo adicionado do probiótico *Lactobacillus. acidophilus* ATCC 4356 (12 log. UFC.g⁻¹), sendo uma com os microrganismo na forma livre e outra com os mesmos encapsulados em xantana pruni. Os gelado comestíveis foram analisados quanto à sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento e sensorialmente. Observou-se diferenças significativas na sobrevivência dos microrganismos, sendo que a microencapsulação proporcionou maior viabilidade dos mesmos durante o armazenamento, não permitindo ocorrência de fermentação ou desenvolvimento de sabores estranhos. Não foram relatados pelos provadores sabores estranhos ou sensação de areiosidade, ponto comum em produtos adicionados de microcápsulas. Com isso verifica-se grande potencialidade da adição, em produtos congelados, das microcápsulas probióticas desenvolvidas, haja visto a preservação celular e a aceitação sensorial verificadas, mesmo num produto desafiador.

Aplicação prática: Desenvolvimento de alimentos funcionais de grande aceitabilidade pelo consumidor, como o gelado comestível. Proporcionar o consumo de alimentos probióticos pela a população opta por não ou não pode consumir produtos lácteos. Ampliar a ingestão de probióticos mediante a diversificação da aplicação em produtos alimentícios. Utilização de microcápsulas de composição inovadora que proporcionam elevada sobrevivência de

probiótico em alimento inusual ou não propício a utilização de probióticos, permitindo a utilização eficiente em produtos que de outra forma seria inviável.

Palavras-chave: gelado comestível; *Lactobacillus acidophilus*; produto funcional; sensorial.

INTRODUÇÃO

Os probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem algum benefício para a saúde (FAO/OMS, 2002; HILL et al, 2014). Esses micro-organismos pertencem a diferentes gêneros e espécies, tanto de bactérias como leveduras, e têm sido associados a diversos efeitos benéficos (BRASIL, 2019). Quando os microrganismos probióticos são consumidos adequadamente, ou seja, quando permanecem viáveis após as condições de processamento, armazenamento e digestão, têm-se diversos benefícios à saúde, tais como o fortalecimento da imunidade, redução nos sintomas de alergias alimentares, controle da síndrome do intestino irritado e inflamado e aumento na tolerância à lactose. No Brasil, a legislação preconizava que a quantidade mínima viável para os probióticos estivesse situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante (MORTAZAVIAN; BRASIL, 2008). Agora a legislação trata o uso de probióticos em alimentos requer prévia avaliação da Anvisa, segundo requisitos da Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018. A avaliação efetuada contempla três elementos principais: comprovação inequívoca da identidade da linhagem do micro-organismo, de sua segurança e de seu efeito benéfico.

A ampla maioria dos alimentos probióticos possui base láctea, Os produtos lácteos e os alimentos fermentados são considerados como um veículo ideal para a adição de bactérias probióticas (LAVERMICOCCA, 2006; RANADHEERA, BAINES, ADAMS, 2010). Devido a isso, as bactérias probióticas são incorporadas principalmente em produtos lácteos como queijo, iogurte, sorvete e outras sobremesas à base de leite.

Produtos à base de vegetais ricos em polifenóis e outros componentes com atividade antimicrobiana constituem ambientes particularmente desfavoráveis aos probióticos. Entretanto, os avanços nas pesquisas em desenvolvimento de novos produtos possibilitam incorporação destes em uma ampla diversidade de matrizes alimentares (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012; IBARRA et al., 2012; SANTOS, 2013). A microencapsulação é uma opção viável de aumento da preservação dos probióticos frente às condições adversas da composição do alimento e do estômago (MENEZES et al., 2013).

A microencapsulação destaca-se por apresentar grande disponibilidade de equipamentos, baixo custo do processo e possibilidade de emprego de uma ampla variedade de agentes encapsulantes, o mesmo possibilita a proteção das células frente às condições que seriam prejudiciais à sua viabilidade, como diante à composição do produto a ser aplicado e também a meios ácidos, sais biliares, oxigênio e enzimas, fornecendo proteção às células frente a digestão (OLIVEIRA et al., 2007; FAREEZ et al. 2015). É realizada a utilização de um agente encapsulante que permita a integridade do microrganismo, podendo-se utilizar diversos tipos de biopolímeros, destacando-se a xantana (SANTOS, 2013; KRASAEKOOPT et al., 2003).

A goma xantana é um polissacarídeo sintetizado por espécies de bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Possui propriedades que a torna capaz de formar soluções viscosas até mesmo em baixas concentrações e possuir estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, podendo ser utilizada em diferentes matrizes alimentares. Denomina-se xantana pruni a xantana produzida por *X. arboricola* pv pruni, que possui propriedades químicas e físicas que a distinguem das xantanas comerciais (VENDRUSCOLO et al., 2013).

Devido ao clima quente e como forma de amenizar as altas temperaturas, há o interesse pelo consumo de alimentos refrescantes e gelados, como os sorvetes e gelado comestíveis. (CARVALHO et al., 2012). O crescimento da produção e consumo de gelado

comestível pode ser reflexo também da fácil fabricação e da imensa variedade de tipos, formas, sabores e texturas desenvolvidos para esta sobremesa. Além dessas características sensoriais, o gelado comestível pode apresentar um bom valor nutricional conforme os seus ingredientes e pode ser considerada uma boa fonte de energia (GRANGER et al., 2005; RENHE et al., 2015). O desenvolvimento de gelado comestível de mirtilo, que é uma das frutas mais ricas em antioxidantes já estudadas, possui um conteúdo particularmente elevado de polifenóis, constitui matéria-prima potencial ao desenvolvimento de novos produtos de modo em geral (HOFFMANN; FACHINELLO; SANTOS, 1995), mas não de produtos probióticos.

Objetivou-se desenvolver um gelado comestível, usando matéria-prima vegetal teoricamente desfavorável à sobrevivência de probióticos. Assim, gelado comestíveis probióticos de mirtilo com microrganismos encapsulados e livres foram produzidos para avaliar a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 durante o armazenamento; e gelado comestíveis com probiótico encapsulado foram analisados sensorialmente, por escala hedônica.

MATERIAIS E MÉTODOS

Utilizou-se o probiótico *L. acidophilus* ATCC 4356, fornecido pelo Laboratório de Microbiologia de Alimentos do DCTA/FAEM/UFPel. Xantana pruni da cepa 101, de baixa viscosidade, foi produzida no Laboratório de Biopolímeros, do CDTEC/UFPel, segundo a patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006).

Para a encapsulação e para os micro-organismos na forma livre, o inóculo foi produzido através de culturas puras de *L. acidophilus* ATCC 4356; seu crescimento foi em placas de Petri com meio sólido MRS (De Man, Rogosa e Sharp), 37 °C por 72 h; após, as células foram ressuspensas em 30 mL de meio líquido MRS e incubadas em agitador orbital

(*Shaker*) a 37 °C e 150 rpm por cerca de 16 h, até que fosse atingida a DO₆₀₀ (densidade óptica) igual a 1 (12 log. UFC.g⁻¹). Para separação das células e adição das mesmas na solução encapsulante, o inóculo foi centrifugado a 10000 x g a 4 °C por 10 min para formação de *pellet* celular e ressuspensão em mesmo volume da solução encapsulante para formar a solução de trabalho. A solução encapsulante utilizou com agente encapsulante xantana pruni (1,25% m/m) e foi adicionada do dessecante sílica pirogênica (Aerosil®) (0,19% m/m) e crioprotetor glicerol (20% m/m em relação à massa polimérica total). Foi preparada a solução de trabalho contendo os polímeros e o micro-organismo. A secagem da solução de trabalho foi realizada em spray dryer *LabMaq* (MSD 1.0), com temperatura de entrada de 120°C e de saída 60°C, fluxo de ar de 3L. h⁻¹ e velocidade de entrada de 0.4 L.h⁻¹. As microcápsulas tiveram tamanho médio de 6µm. Os pós produzidos foram envasados em frascos tipo penicilina. Na forma livre, o caldo fermentado, produzido de igual modo, foi centrifugado para formação do *pellet* celular.

Foram utilizadas duas formulações de gelado comestível, contendo os probióticos na forma livre e outra com os mesmos encapsulados. Na forma livre, o *pellet* foi adicionado ao gelado comestível na proporção de 10⁹ UFC/g micro-organismos probióticos no gelado comestível. Na forma encapsulada utilizou-se solução encapsulante na proporção de pó que alcançasse 10⁹ UFC/g de micro-organismos probióticos no gelado comestível. Os probióticos e as microcápsulas foram adicionados somente na porção onde estava a polpa de mirtilo

Para a elaboração dos gelados comestíveis, a polpa foi adicionada a forminhas de gelado comestível e congeladas por 24h na temperatura de -20°C em freezer doméstico. Após, foi adicionado leite condensado como recheio, perfazendo 20% do peso do gelado comestível, para que se assemelhassem ao gelado comestível do tipo “paleta mexicana”. As porções continham aproximadamente 25 g. Os gelados comestíveis foram armazenados, e as

contagens das células viáveis se deram nos tempos 0,3,7,14, 21 dias. Para a análise sensorial, os gelados comestíveis foram armazenados por 24 horas, até o seu completo congelamento.

A análise sensorial foi realizada no campus Capão do Leão, para usufruir do número de estudantes que frequentam o local diariamente, contando com 114 provadores. Utilizou-se escala hedônica de nove pontos, na qual o provador expressa o grau de gostar ou desgostar do produto. A escala varia entre “desgostei muitíssimo” e “gostei muitíssimo” e traz atributos para o produto como sabor, aroma, doçura, textura, cor e aparência e impressão global (DUTCOSKY, 2013). Os julgadores foram convidados de ambos os sexos, com faixa etária de 18 a 55 anos. Os mesmos assinaram o termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE), conforme parecer do comitê de ética em pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas, sob registro 901.768, e na Plataforma Brasil (CAEE: 38484814.0.0000.5317). Os gelados comestíveis foram servidos em porções individuais de aproximadamente 25g, sob temperatura de -8°C.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

Em todos os dias de avaliação, a concentração de células viáveis probióticas foi maior estatisticamente no gelado comestível com os probióticos microencapsulados, mostrando a efetividade da proteção da microcápsula frente as condições intrínsecas do gelado comestível (Tabela 1). No 21º dia de armazenamento verificou-se a redução mais acentuada da concentração de microrganismos viáveis no gelado comestível com os probióticos livres; a concentração final, observada nesse dia, estava abaixo da recomendada pela OMS, cerca 5,38 Log na porção, já no gelado comestível com microcápsulas atingiu 7,03 Log.

Tabela 1 – Avaliação da sobrevivência dos microrganismos probióticos (log. UFC.g⁻¹) adicionados em gelado comestível de mirtilo sob congelamento (-20° C)

Tratamentos	Dias de armazenamento (dias)				
	1	3	7	14	21
Gelado comestível com microcápsulas	8,13 Aa	8,06 Aa	8,03 Aa	7,30 Ba	7,03 Ca
Gelado comestível com células livres	7,99 Ab	7,88 Bb	7,80 Bb	7,74 Cb	5,38 Db

Teste de Tukey, diferenças entre os dias letras maiúsculas, entre tratamentos letra minúscula.

As condições de congelamento durante a fabricação e armazenamento de sobremesas agregam um severo estresse aos microrganismos presentes no produto, causando prejuízos às células em diferentes graus, incluindo a morte dos mesmos, a inibição à multiplicação e a redução ou interrupção da sua atividade metabólica (MARSHALL, 2001).

Os fatores que afetam a sobrevivência dos microrganismos durante o armazenamento congelamento incluem as condições fisiológicas das células, a composição do alimento e a sua manipulação, a proporção adicionada, bem como o método de congelamento do produto. Os cristais de gelo que se formam no exterior da célula reduzem a quantidade de água livre na qual os solutos estariam dissolvidos, enquanto aqueles que se formam no interior da célula apresentam potencial de romper a membrana celular, resultando na morte de muitas células microbianas (PAPADEMAS; BINTSIS, 2002). Entretanto, alguns microrganismos se preservam bem na forma livre em situação de congelamento. Em nosso estudo, onde houve redução significativa da população de probióticos na forma livre nos gelado comestíveis.

A correta seleção e combinação do agente encapsulante com dispersantes e osmoprotetores aumenta a qualidade e a viabilidade das microcápsulas probióticas para as diferentes aplicações. Associação de xantana pruni de baixa viscosidade, sílica pirogênica (aerosil®) e glicerol foi utilizada para obtenção de microcápsulas, e consistiu em importante

fator de proteção para a manutenção dos microrganismos probióticos viáveis sob as condições adversas da composição do gelado comestível durante o armazenamento.

Buriti et. al (2008) veicularam *L. acidophilus* La-5 na forma livre em gelado comestível adicionado de fibras (oligofrutose e inulina) e observaram decréscimo significativo na população de microrganismos nos tratamentos com menores percentuais de adição de fibras. Os autores afirmaram que as fibras alimentares agem como uma barreira na formação de cristais de gelo, responsáveis pelo rompimento das membranas celulares. A xantana, que é componente das microcápsulas, também atua com esta mesma propriedade, sendo fundamental na proteção dos microrganismos encapsulados. A análise sensorial é capaz de constituir um elo entre o consumidor e o produto final. Assim, com a participação do mesmo a aceitação é melhor avaliada, sendo que as informações fornecidas são capazes de refletir a posição do produto no mercado e algumas melhoras que possam ser realizadas, tendo em vista que apenas características químicas, físicas e microbiológicas satisfatórias não são o bastante quando o produto não é sensorialmente aceito (MINIM, 2010).

Ao total, 114 provadores, 84 do sexo feminino e 30 do sexo masculino. A faixa etária predominante foi de 14 a 45 anos, cerca de 86% dos participantes. Na figura 1 visualiza-se as médias das notas atribuídas a cada uma das variáveis avaliadas, sendo que todas foram superiores a 6.

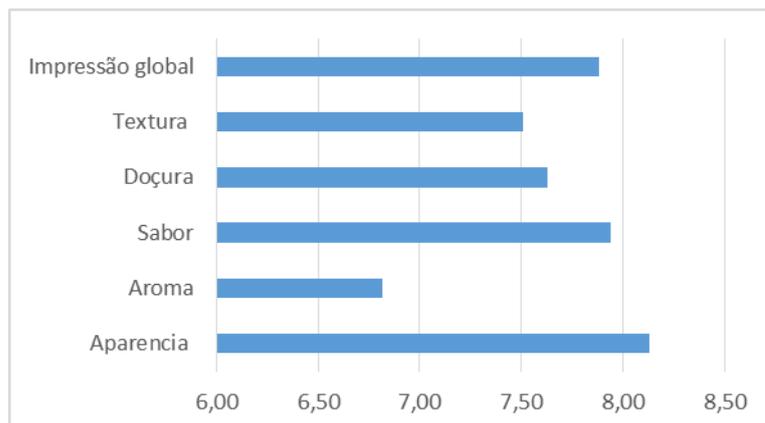


Figura 1 - Médias das notas atribuídas na análise sensorial, através da escala hedônica, realizada em gelado comestível de mirtilo com adição de probióticos microencapsulados.

O método afetivo utilizado demonstra o grau de aceitação da amostra, mediante o que foi avaliado através da escala em cada um dos atributos (DRAKE, 2007). A variável aroma foi a que recebeu as menores notas na avaliação, o que credita-se ao estado de congelamento do produto, que inibe a liberação dos compostos aromáticos, prejudicando a sua avaliação.

A variável textura recebeu a segunda menor nota 7, provavelmente por não haver adição de poliol, mas somente a xantana como viscosificante. Nos comentários adicionais foi relatado a sensação de “cristais”, o que pode ser resultado da polpa não ser refinada, possuindo algumas granulações, a exemplo as próprias sementes do mirtilo, que possuem diâmetro médio maiores que as microcápsulas.

A variável doçura também foi positivamente avaliada pelos provadores, com média de 7,63 (gostei moderadamente-gostei muito). A concentração de sólidos solúveis mínima para gelado comestíveis de fruta é 10° Brix (BRASIL, 2005), portanto a adição de leite condensado como recheio teve por objetivo melhorar sensorialmente o gelado comestível. A variável sabor obteve média de 7,69, provavelmente devido à adição do leite condensado ao recheio e à alta palatabilidade dos produtos à base de mirtilo quando acidificados. A polpa de mirtilo foi adicionada de ácido cítrico, fundamental não apenas para conservação do produto, mas também sensorialmente, já que o mirtilo é rico em compostos fenólicos, dentre eles os

taninos que têm a capacidade de interagir com as proteínas salivares, uma vez que está na origem da sensação da adstringência e amargor nos alimentos (SOARES, 2012). É importante salientar que não foi relatado pelos provadores nos comentários adicionais, sabores estranhos ou de fermentação, o que assegura que os microrganismos probióticos mantiveram-se inativos dentro das microcápsulas. Tal situação muitas vezes não acontece, podendo os mesmos gerarem sabores estranhos. Fávoro-Trindade et al. (2006) relatou que sorvetes probióticos sensorialmente aceitos pelos consumidores apresentam ausência de “flavour probiótico”, possuindo boa qualidade sensorial.

Para impressão global, o gelado comestível foi sensorialmente aceito, pois a média de aceitabilidade ficou acima de 8 (gostei muito), indicando que a microencapsulação da bactéria não interferiu na aceitabilidade

CONCLUSÃO

A microencapsulação manteve os probióticos em concentrações adequadas ($7,3 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) até o final das análises, evidenciando o potencial das microcápsulas de xantana pruni de baixa viscosidade para adição de probióticos em matrizes alimentares diferenciadas. O produto teve boa aceitação através dos consumidores em relação a todos os atributos analisados, assim mostrando um potencial de adição das microcápsulas em uma base de frutas. Para os consumidores que não podem ou desejam consumir com adição do leite condensado, o mesmo pode ser retirado em futuras formulações.

REFERENCIAS

ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSSEL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, vol. 29, p. 166–74, 2012.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Resolução RDC no 266 de 22 de setembro de 2005.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas.

Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 05 ago. 2019.

BURITI, Flávia Carolina Alonso; HARAMI, Juliana Bolfarini; SOUZA, Cínthia Hoch Batista de; SAAD, Susana Marta Isay. Lactobacillus acidophilus survival in symbiotic guava mousses under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas*[S.l: s.n.], 2008.

DRAKE, M. A. Invited Review: Sensory Analysis of Dairy Foods. *Journal Dairy Science*, v.90, p.4925–4937, 2007.

DUTCOSKY, S. D. **Análise sensorial de alimentos**. 4. ed. Curitiba: Champagnat, 531 p., 2013.

FAREEZ, I. M.; LIM, S. M.; MISHRA, R. K.; RAMASAMY, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of Lactobacillus plantarum LAB12. *International Journal of Biological Macromolecules*. p. 1419–1428, 2015.

FAVARO-TRINDADE C.S., BERNARDI, S., BODINI R.B., BALIEIRO J.C.C., ALMEIDA E. Sensory acceptability and stability of probiotic microorganisms and vitamin C in fermented acerola (*Malpighia emarginata* DC.) ice cream. *Journal of Food Science*, v. 71, p. 492–495, 2006.

IBARRA, A.; ACHA, R.; CALLEJA, M. T.; CHIRALT-BOIX, A.; WITTIG, E. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. *Journal Dairy Science*, p. 3536–3548, 2012.

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*, p. 737-743, 2003.

MINIM, V.P.R. **Análise Sensorial: estudo com consumidores**. 2 ed. Viçosa: UFV, 2010. 308p

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. Probiotics and Food Probiotic Products. *Eta Publication*, p. 131-169, 2007.

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*, p. 685-693, 2007.

SANTOS, R. C. S. dos. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying**. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) – Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia Industrial, Universidade Federal de Pernambuco, Pernambuco, 2013.

VENDRUSCOLO, C. T. ; MOREIRA, A. da S. . Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; Deise Maria Passos da Silva; José de Paula Oliveira; José Nildo Tabosa; Fernando Gomes da Silva; José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 04ed. Recife: CCS- Gráfica e Editora, v. 1, p. 31-58, 2013.

9. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os tratamentos e formulações propostos para obtenção de microcápsulas probióticas se mostraram eficientes na proteção dos micro-organismos probióticos e em parâmetros tecnológicos esperados nas microcápsulas. A temperatura de armazenamento destas microcápsulas foi determinante na viabilidade dos probióticos; o armazenamento refrigerado, assim como o congelado manteve a viabilidade até o fim do período de avaliação. O armazenamento por congelamento, foi considerado a melhor aplicação em matriz alimentícia.

O processo de encapsulamento em xantana com secagem por spray dryer, nas condições utilizadas, proporciona a resistência em concentrações adequadas do probiótico *L. acidophilus* ATCC 4356, ao processo de digestão gástrica e entérica simulada. A xantana é, portanto, um biopolímero com potencial de utilização como agente encapsulante de microrganismos probióticos, especialmente a xantana pruni utilizada, que proporcionou os melhores resultados em toda a fase entérica.

A aplicação em gelado comestível de mirtilo, evidenciou o potencial das microcápsulas de xantana pruni para adição de probióticos em matrizes alimentares diferenciadas. O produto teve boa aceitação através dos consumidores em relação a todos os atributos analisados, assim mostrando um potencial de adição das microcápsulas.

10. REFERÊNCIAS GERAIS

ALVARENGA, M. A.; GRAHAM, J.K.; KEITH, S.L. et al. Alternatives cryoprotectors for freezing stallion spermatozoa. **International congress on animal reproduction**. Stockolm, p. 1729, 2000.

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

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v.15, p.399–409, 2005.

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

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

Association of Official Analytical Chemists - A.O.A.C. **Official Methods of Analysis**. 16 ed. Washington DC, EUA, 2000.

AXELSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: Salminen S, Von Wright A (eds) Lactic acid bacteria: microbiology and functional aspects. Marcel Dekker, New York, 1998, p. 1-71.

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

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. *Food Powders*: physical properties, processing and functionality. New York: Kluwer, 2005. Cap. 12.

BECKER, Á F A.; KATZEN, PUÈHLER, Á L. ; IELP, I. Xanthan gum biosynthesis and application: a biochemical /genetic perspective. **Applied Microbiology Biotechnology**. v.50,p. 145-152, 1998.

BETORET, E.; BETORET, N., VIDAL, D.; FITO, P. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science e Tecnology**, v. 22, p. 498-508, 2011.

BHANDARI, B. R. et al. Flavor encapsulation by spray drying: application to citric acid and linalyl acetate. **Jornal of Food Science**. v.57, n. 1, p. 217-221, jan., 1992.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada nº45, de 3 de novembro de 2010, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova regulamento técnico sobre aditivos

alimentares autorizados segundo as boas práticas de fabricação. **Diário Oficial (da República Federativa do Brasil), Brasília, DF**, 3 de novembro de 2010.

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

BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para saúde humana. **Archivos Latinoamericanos de Nutrición. Órgano Oficial de la Sociedad Latinoamericana de Nutrición**. v.57 n.4 2007.

CADDEO, C., NA'CHER A., DIEZ-SALES, O; MERINO-SANJUAN M.; FADDA, A. M; MANCONI, M. Chitosan-xanthan gum microparticle-based oral tablet for colon-targeted and sustained delivery of quercetin. **Journal of Microencapsulation**. v.31, p.694-699, 2014.

CAI, Y.Z.; CORKE, H. Production and properties of spray-dried *Amaranthus betacyanin* pigments. **Journal of Food Science**, v.65, n.7, p.1248-1252, 2000.

CALLAHAN, J. C.; CLERARY, G. W.; ELEFANT, M.; KAPLAB, G.; KENSLER, T.; NASH, R. A. Equilibrium moisture content of pharmaceutical excipients. **Drug Development Industrial Pharmacy**. V.8, n.3, p. 355-369, 1982.

CANI PD, DELZONNE NM. Gut microflora as a target for energy and metabolic homeostasis. **Current Opinion Nutricional Metabolic Care**. v.10(6). p.729-342, 2007.

CASTELO BRANCO, LEISE SOARES. Estudo da ampliação de escala na produção de biomassa de *Rhodotorula* sp. CNPAT02 em processo batelada para obtenção de carotenoides Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Centro de Tecnologia, Depto. de Engenharia Química, Fortaleza, 2010.

CAUFIELD, P.W.; LI, Y.; DASANAYAKE, A.; SAXENA, D. Diversity of lactobacilli in the oral cavities of young women with dental caries. **Caries Research**, v.41, p.2-8, 2007.

CHAMPAGNE, C. P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotics. In: GARTI, N. **Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals**. CRC Press, Woodhead Publishing Limited: Cambridge, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; ROSS, R.P.; SAARELA, M.; HANSEN, K.F.; CHARALAMPOPOULOS, D. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v.149, p.185-193, 2011.

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

CORTE´S-ROJAS, D. F.; OLIVEIRA, W. P. Physicochemical Properties of Phytopharmaceutical Preparations as Affected by Drying Methods and Carriers. **Drying Technology**, v.30, p. 921–934, 2012.

DAIÚTO, E. R.; CEREDA, M. P. Amido como suporte na desidratação por atomização e em microencapsulamento. In: CEREDA, M. P. (Coord.). Tecnologia, usos e potencialidades de tuberosas amiláceas Latino Americanas. São Paulo: Fundação Cargill, v.3, cap. 16, p. 449-454, 2003.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, n. 1, p. 130-135, 1960.

DENIPOTE, F G.; TRINDADE, E. B. S. M.;BURINI, R. C. Probióticos e prebióticos na atenção primaria ao câncer de colón. **Arquivos de Gastroenterologia**. v. 47, n.1, jan.-mar. 2010.

DIAZ, P. S.; VENDRUSCOLO, C. T.; VENDRUSCOLO, J. L. S. Reologia de xantana: uma revisão sobre a influência de eletrólitos na viscosidade de soluções aquosas de gomas xantana. **Semina: Ciências Exatas e Tecnológicas**, v. 25, n. 1, p. 15-28, 2004.

EASTMAN, J. E.; MOORE, C. O. Cold water solution granular starch for gelled food compositions. U.S. patent 4,465,702.1984.

ESTEVINO, B. N.; ROCHA, F.; SANTOS, L.; ALVES, A. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications. A review. **Trends in Food Science & Technology**. v. 31 p.138-155, 2013.

EVONIK DEGUSSA, HANAU. AEROSIL® and AEROPERL® Colloidal Silicon Dioxide for Pharmaceuticals. **Technical Information TI 1281 Aerosil 200**. Germany, 2015.

FAO/WHO. **Probiotics in food: health and nutritional properties and guideline for evaluation**. Córdoba, 54p, 2006.

FAREEZ, M.; LIMA, S. M.; MISHRAA, R. K.; RAMASAMYA, K. Chitosan coated alginate–xanthan gum bead enhanced pH and thermotolerance of *Lactobacillus plantarum* LAB12. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 72 p. 1419–1428, 2015.

FÁVARO-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, n. 4, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilization of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 09, p. 496-499, 2000.

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

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; TRINDADE, M. A.; NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 336-340, 2010.

FORESTI, A. P. Produção e qualidade reológica da xantana sintetizada por diferentes cepas de *Xanthomonas campestris* em meios modificados. Pelotas, 2003. 61f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) – Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, UFPel, 2003.

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.

GARCÍA-OCHOA, F.; SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GÓMEZ, E. Xanthan gum: production, recovery and properties, **Biotechnology Advances**, n. 7, v. 18, p. 549-579, 2000.

GASTAL, GUSTAVO DESIRE ANTUNES. Xantana como aditivo crioprotetor externo para congelamento de sêmen ovino. Dissertação (Mestrado) 36f. Programa de Pós-Graduação em Veterinária. Universidade Federal de Pelotas. Faculdade de Veterinária, Pelotas, 2012 Pelotas, 2012.

GIBBS, B. F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, 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**, v.125, p.1401–1412, 1995.

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. **Trends in Food Science & Technology**. v.15, p. 330–347, 2004.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J. R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, v.360, p.512-518, 2003.

HASLER, C.M. Functional Foods: their role in disease prevention and health promotion. **Food Technology**, v.52, n.11, p.63-70, 1998.

HOOPER, L.V.; STAPPENBECK T.S.; HONG, C.V.; GORDON, J.I. Angiogenins: a new class of microbiocidal proteins involved in innate immunity. **Nature Immunology**, v.4, p.269- 273, 2003.

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

IBARZ, A.; PAGAN, J.; GARZA, S. Kinetics models for colour changes in pear puree during heating at relatively high temperatures. **Journal of Food Engineering**, v.39, p.415-422, 1999.

IBARZ, G., I. DÄHNE, E. DONATH, AND H. MÖHWALD. Smart micro- and nanocontainers for storage, transport, and release. **Advance Materials**. v.13, p.1324–1327, 2001.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. Métodos físico-químicos para análise de alimentos. 4° ed. 1° ed. digital. São Paulo. **Instituto Adolfo Lutz**, 2008. 1020p.

IYER, C.; KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Journal of Food Science**, v. 70, p.18-23, 2005.

KALAISAPATHY, K. Protecting probiotic by microencapsulation. **Microbiology Australia**, v. 24, p. 30-31, 2003.

KALAISAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotics bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **Food Science and Technology**, v. 39, p. 1221-1227, 2006.

KLAIC, P. M. A.; VENDRUSCOLO, C. T.; FURLAN, L. ; MOREIRA, A. S . Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 118-126, 2016.

KASAI, M. Simple and efficient methods for vitrification of mammalian embryos. **Animal Reproduction Science**, v. 42, p. 67-75, 1996.

KATZBAUER, B. Properties and applications of xanthan gum. **Polymer Degradation and Stability**, n. 59, p.81-84, 1998.

KEARNEY, N. et al. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal**., v. 19, p. 684-9, 2009.

KEDIA, G.; WANG, R.; PATEL, H.;PANDIELLA, S. S. Used of mixed cultures for the fermentation of cereal-based substrates with potential probiotic properties. **Procedia Bio- chemistry**, v.42, p. 65–70, 2007.

KESHANI S.; DAUD, W. R. W.; NOUROUZI, M.M.; NAMVAR, F.; GHASEMI M. Spray drying: An overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p.152–162, 2015.

KHOURYIEH, H.; GOUTHAM, P.; KEVIN, W.; FADI A. Effects of xanthan–locust bean gum mixtures on the physicochemical properties and oxidative stability of whey protein stabilised oil-in-water emulsions. **Food Chemistry**, v.167, p. 340–348, 2015.

KLAIC, P. M. A. Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de *Xanthomonas arboricola* pv pruni por troca iônica. 2010. 111f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia Agroindustrial), Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

KOOP-HOOLIHAN, L. Prophylactic and therapeutic use of probiotics: a review. **Journal of American Dietetic Association**, v.101, p.229-214, 2001.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal, Barking**, v.13, n. 1, 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, B. V.; NAGA S. V.; OBULAM, V.; REDDY, V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science Technology**, v.52, p. 6112–6124, 2015.

KUMAR, P.; MISHRA, H.N. Yoghurt powder - a review of process technology, storage and utilization. **Food Bio producer Processing**, v.82, p.133-42, 2004.

LANGRISH, T. New engineered particles from spray dryers: research needs in spray drying. **Drying Technology**. v. 25, p. 971–983, 2007.

LABMAQ, Informe Técnico Do Modelo MSD 1.0. Ribeirão Preto. nº 9, de 21 de maio de 2004.

LE POUL, E.; LOISON, C.; STRUYF, S.; SPRINGAEL, J.Y.; LANNOY, V.; DECOBECQ, M.E.; et al. Functional characterization of human receptors for short chain fatty acids and their role in polymorphonuclear cell activation. **Journal of Biological Chemistry**, v.278, 2003.

LEE, Y.K.; SALMINEM, S. The coming of age of probiotics. **Trends in Food Science Technology**, v. 6, p. 241-241, 1995.

LEY, R.E.; BACKHED F., TURNBAUGH, P.; LOZUPONE, C.A.; KNIGHT, R.D.; GORDON, J.I. Obesity alters gut microbial ecology. **Proctorologist an National Academic Science USA**. v.102, 2005.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray drying. *International Journal of Food Microbiology*, v.74, p. 79–86, 2002.

MALGANHA, L.C. Efeito da inclusão de leite em pó e açúcar sobre a viabilidade de bactérias probióticas em leite fermentado desnatado. 62 f. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2010.

MAUGERI FILHO, F. **Produção de Polissacarídeos**. In: U.A. LIMA; E. AQUARONE; W. BORZANI; W. SCHMIDELL. *Biotechnology Industrial: processos fermentativos e enzimáticos*. São Paulo: Edgard Blücher Ltda., v. 3, p.125-153, 2001.

MCGANN, L.E. Differing actions of penetrating and non penetrating cryoprotecture agentes. *Cryobiology*, v. 15, p. 382-390, 1978.

MEDDINGS, J. The significance of the gut barrier in disease. *Gut*, v. 57, p.438-440, 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*, 2013.

MERYMAN, H. T. Freezing injury and its prevention in living cells. *Annual Review of Biophysics and Bioengineering*, v. 3, p. 341-363, 1974.

MOHAMADZADEH, M. T.; DUONG, T.; HOOVER; T.R., KLAENHAMMER. Targeting mucosal dendritic cells with microbial antigens from probiotic lactic acid bacteria. *Expert Revision. Vaccines*, v. 7, p. 163–174, 2008.

MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. S.; GIL-TUNES, C.; VENDRUSCOLO, C. T. Screening among 18 novel strains of *Xanthomonas campestris* pv pruni. *Food Hydrocolloids*, v. 15, n. 4-6, p. 469-474, 2001.

MUKKAI-CORRÊA R.; PRATA, A.S.; ALVIM, I.D.; GROSSO, C.R.F. Caracterização de microcápsulas contendo caseína e gordura vegetal hidrogenada obtidas por geleificação iônica. *Brazilian Journal of Food Technology*, v. 8, p. 73-80, 2005.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 23, n. 2, p.182–186, 2012.

NG, S.C.; HART, A.L.; KAMM, M.A; STAGG, A.J.; KNIGHT, S.C Mechanims of action of probiotics: recent advances. *Inflammatory Bowel Diseases*, v. 15, p.300-310, 2009.

OLIVEIRA, M. N.; SODINI, I.; REMEUF, F.; TISSIER, J.P.; CORRIEU, G. Manufacture of fermented lactic beverages containing probiotic cultures. *Journal of Food Science*, v. 67, n. 6, p. 2336 -3241 2002.

OLIVEIRA, O. W.; PETROVICK, P. R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 20, p. 641-650, 2010.

OMGE, **Organização Mundial de Gastroenterologia**. Guias práticas Probióticos e Prebióticos, 2008.

OZYURT, V. H.; ÖTLES, S. Properties of probiotics and encapsulated probiotics in food. **Acta Science Polymer., Technologia Alimentar**. v.13 (4),p. 413-424, 2014.

PAN, Y. K.; LI, J. G.; ZHAO, J.; YE, W. H.; MUJUMDAR, A. S.; KUDRA, T. Performance characteristics of vibrated fluid bed of inert particles for drying of liquid

PARKS, J. E.; GRAHAM, J. K. Effects of cryopreservation procedures on sperm membranes **Theriogenology**, v. 38, p. 209-222, 1992.

PEREDO A.G., BERISTAIN C.I., PASCUAL, L.A; AZUARA ,E.; JIMENEZ, M. , The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria **LWT – Food Science and Technology**, v. 73, p. 191-196, 2016.

PEREIRA, O.W.; PETROVICK, P.R. Secagem por aspersão (spray drying) de extratos vegetais: bases e aplicações. **Brazilian Journal Pharmacognosia.**, v.20, n.4, p.641-50, 2010.

PICOUT, D. R., ROSS-MURPHY, S. B., ERRINGTON, N., HARDING, S. E. Pressure Cell Assisted Solution Characterization of Polysaccharides. 1. Guar Gum. **Biomacromolecules**, v. 2, p. 1301-1309, 2001.

PITALUA, E.; JIMENEZ, M.; VERNON-CARTER, E.J.; BERISTAIN, C.I. Antioxidative activity of microcapsules with beetroot juice using gum Arabic as wall material. **Food and Bioproducts Processing**, v.88, n.2-3, p.253-258, 2010.

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

QUEK, S. Y.; CHOK, N. K.; SWEDLUND, P. The physicochemical properties of spray-dried watermelon powder. **Chemical Engineering and Processing**, v. 46, n. 5, p. 386-392, 2007.

RANADHEERA R.D.C.S., BAINES, S.K., ADAMS M.C, Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1–7, 2010.

RIVERA-ESPINOZA Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, p. 1–11, 2010.

ROBERFROID, M. B. Inulin-type fructans: Functional food ingredients. **The Journal of Nutrition**, v. 137, p. 2493–2502, 2007.

SAAD, N.; DELATTRE, C.; URDACI, M.; SCHMITTER, J. M.; BRESSOLIER, P. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 1–16, 2013.

SAAD, S. M. I. Próbiticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 38, n. 1, jan-mar. 2006.

SAAD, S.M.I.; BEDANI, R.; MAMIZUKA, E.M. Benefícios à saúde dos probióticos e prebióticos. In: SAAD, S.M.I.; DA CRUZ, A.G.; FARIA, J. de A. F. **Probióticos e Prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas**. 1. ed. São Paulo: Varela, 2011.

SAARELA, M. A.; MOGENSEN A. B.; FONDE´N A. C.; MATTO J. A.; SANDHOLM, T. M. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197–215, 2000.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**, v. 114, p. 616–622, 2009.

SALMINEM, S. Probiotics: how should they be defined? **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 107-110, 1999.

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.

SARTOR, R.B. Mechanisms of disease: pathogenesis of Crohn’s disease and ulcerative colitis. **Nature Clinical Practice Gastroenterology & Hepatology**, v. 3, p. 390-407, 2006.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55(3), p. 139–144, 2000.

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

SIMEONI, C. P.; ETCHEPARE, M. A.; MENEZES, C. R.; FRIES, L. M.; MENEZES, M. F. C.; STEFANELLO, F. S. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. **Revista Eletronica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental – REGET**, v. 18, p. 66-75, 2014.

SINHA, V. R.; SINGLA, A. K.; WADHAWAN, S.; KAUSHIK, R.; KUMRIA, R. Review - Chitosan microspheres as a potential carrier for drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 274, n. 1-2, p.1-33, 2004.

SOOTTITANTAWAT, A.; BIGEARD, F.; YOSHII, H.; FURUTA, T.; OHKAWARA, M.; LINKO, P. Influence of emulsion and powder size on the stability of encapsulated D-limonene by spray drying. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 6, p. 107–114. 2005.

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**, v. 7, n. 2, 2006.

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. 2009-214, 2009.

SUTHERLAND, I. W. Biosynthesis of microbial exopolysaccharides. In: **Advances Microbial Physiology**, v. 23, p. 80-142, 1982.

SUTHERLAND, I. W. Xanthan. In: SWINGS, J. G.; CIVEROLO, E. L. *Xanthomonas*. London: **Chapman & Hall**, p. 363-388, 1993.

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, p. 589-595, 2006.

TONHI, E.; PLEPIS, 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 açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 44, p. 1950–1958, 2009.

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

TRIBOLI, E.P.D.R.; MAURIC G.; ABBAS, S.I.; BRANCO, M. de L.; GUT, J.A.W. Efeitos de aditivos na obtenção de iogurte em pó por meio de secagem por atomização em escala piloto. **XX Congresso Brasileiro de Engenharia Química, COBEQ**. 2014.

TSUKUMO, M.D.; CARVALHO, M.B.; CARVALHO-FILHO, M.A.; SAAD, M.J.A. Translational research into gut microbiota: new horizons in obesity treatment. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, v. 53, 2009.

TULUMOGLU S.; YUKSEKDAG Z.N.; BEYATLI Y.; SIMSEK O.; CINAR, B.; YAŞAR E. Probiotic properties of lactobacilli species isolated from children's feces. **Anaerobe**, v. 24, p. 36-42, 2013.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. S.; VENDRUSCOLO, J. L. UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS; Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária Embrapa

Clima. **Process for preparing a xanthan biopolymer. International Patent WO/2006/047845, 2006.**

VENDRUSCOLO, C. W. ; ANDREAZZ, I. F. ; GANTER, J. L. M. S. ; FERRERO, C. ; BRESOLIN, T. M. B. . Xanthan and Galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v.296, p.1-11, 2005.

VIJAY-KUMAR M, AITKEN JD, CARVALHO FA, CULLENDER TC, MWANGI S, SRINIVASAN S, et al. Metabolic syndrome and altered gut microbiota in mice lacking Toll-like receptor 5. **Science**, v.328. p. 228-312, 2010.

VINDEROLA G, CÉSPEDES M, MATEOLLI D, CÁRDENAS P, LESCANO M, AIMARETTI N, REINHEIMER J. Changes in gastric resistance of *Lactobacillus casei* in flavored commercial fermented milks during refrigerated storage. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 269–275, 2011.

VINDEROLA, C. G., & REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497–505, 1999.

WOHLGEMUTH, S.; LOH, G. BLAUT M. Recent development and perspectives in the investigation of probiotic effects. **International Journal of Medical Microbiology**, v. 300, p. 3–10, 2010.

WOO, M. W. et al. Optimization of spray drying operating parameters - a quick trial-and-error method. **Drying Technology**., v. 25, p. 1741-47, 2007.

XU, L.; XU, G.; LIU T.; CHEN, Y.; GONG, H. The comparison of rheological properties of aqueous welan gum and xanthan gum solutions. **Carbohydrate Polymers**, v.92, p. 516 – 522, 2013.

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. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79–86, 2002.

ZAYED, G.; ROOS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081-1086, 2004.