UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos

Departamento de Engenharia de Alimentos

DANIELA LARA PEDROSO DE OLIVEIRA

**Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo
Lactobacillus acidophilus ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por
*spray chilling***

Pirassununga

2011

DANIELA LARA PEDROSO DE OLIVEIRA

**Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo
Lactobacillus acidophilus ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por
*spray chilling***

Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientador: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

Serviço de Biblioteca e Informação da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo

048p

Oliveira, Daniela Lara Pedroso de
Produção e avaliação de micropartículas lipídicas
contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium*
lactis produzidas por *spraying chilling* / Daniela Lara
Pedroso de Oliveira. -- Pirassununga, 2011.

75 f.

Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e
Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo.

Departamento de Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de
Alimentos.

Orientadora: Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro
Trindade.

1. Probióticos 2. Encapsulação 3. *Spray cooling*
4. Viabilidade. I. Título.

OLIVEIRA, D. L. P. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por spray chilling**. Dissertação apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Engenharia de Alimentos.

Aprovado em:

Banca Examinadora

Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade Instituição: Universidade de São Paulo
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Prof. Dr. Carlos R. Ferreira Grosso Instituição: Universidade Estadual de Campinas
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Profa. Dra. Samantha Cristina Pinho Instituição: Universidade de São Paulo
Julgamento:_____ Assinatura:_____

Aos meus pais, Sérgio e Neuza, meus grandes incentivadores. Por serem meus exemplos de vida, amor, dedicação e fé.

Ao Caê, por seu amor, apoio e companheirismo, durante todos estes anos.

AGRADECIMENTOS

À Prof^a. Dr^a. Carmen Sílvia Fávaro Trindade, pela oportunidade de realização do curso de mestrado como sua orientada. Por toda paciência, dedicação, incentivo e ensinamentos durante estes anos.

À Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, pela oportunidade de realização do curso de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, pela concessão da bolsa de mestrado e pelo apoio financeiro para realização desta pesquisa.

À Prof^a. Dr^a. Rosemary Aparecida de Carvalho, pelo apoio dedicado ainda na fase de seleção do Mestrado.

Ao Prof. Dr. Carlos R. F. Grosso, da FEA/UNICAMP, pelos ensinamentos e por colocar à disposição o Laboratório de Controle de Qualidade, do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição, para os ensaios de encapsulação.

Às empresas Danisco, Agropalma S/A, Vigor/Grupo JBS e Emfal Especialidades Químicas, pela doação dos materiais utilizados neste experimento.

Aos colegas Marcelo e Yara, pelos ensinamentos e apoio na realização dos testes práticos.

À Kelly e à Prof^a. Cris, pelo auxílio no preparo do inóculo.

À Riana, por toda dedicação e auxílio no desenvolvimento desta pesquisa. Quem muito me ensinou, contribuindo para meu crescimento científico e intelectual.

À Mirelle Dogenski, pela ajuda e auxílio na realização dos testes práticos.

Aos amigos, Pati, Guilherme, Eli, Grazi e Noemi, pelos momentos de alegria, amizade, companheirismo e apoio durante o mestrado.

Aos meus pais, Sérgio e Neuza, e marido, Caê, pelo amor dedicado e apoio incondicional para o desenvolvimento desta pesquisa.

Às minhas irmãs, cunhados e amigos, que sempre me apoiaram a seguir o caminho da vida acadêmica.

Aos colegas do SENAI, pelo apoio e amizade.

A Deus, por me permitir concluir mais esta etapa.

“A educação é a arma mais poderosa que
você pode usar para mudar o mundo.”

Nélson Mandela

RESUMO

OLIVEIRA, D.L.P. **Produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *Lactobacillus acidophilus* ou *Bifidobacterium lactis* produzidas por *spray chilling***. 2011. 75 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

Lactobacillus acidophilus e *Bifidobacterium lactis* são microrganismos probióticos frequentemente utilizados em alimentos funcionais. No entanto, estes microrganismos devem resistir ao processamento, à estocagem do alimento, e sobreviver à passagem pelo trato-gastrointestinal, para chegarem ativos ao intestino e exercerem seus efeitos benéficos. Uma vez que os probióticos são sensíveis a uma série de fatores, tais como meio ácido, sais biliares e presença de oxigênio, a microencapsulação tem sido estudada com objetivo de protegê-los aos efeitos adversos do ambiente, além de promover a liberação controlada no local de ação do microrganismo, melhorando sua eficiência. Este trabalho teve como objetivo a produção e avaliação de micropartículas lipídicas contendo *B. lactis* ou *L. acidophilus*, produzidas por *spray chilling*, utilizando gorduras de baixo ponto de fusão, tais como gordura de palma e manteiga de cacau, como agente encapsulante. O diâmetro médio e a morfologia das partículas foram avaliados. Ensaio de sobrevivência foram conduzidos com objetivo de avaliar a resistência dos microrganismos ao processo encapsulação, resistência *in vitro* aos fluidos gástrico e intestinal simulados e estabilidade das células durante 90 dias de armazenamento a -18, 7 e 20 ou 37°C, dependendo da gordura utilizada. As micropartículas apresentaram-se em formato esférico e com diâmetro médio que pode permitir o fácil escoamento no alimento, sem proporcionar impacto tecnológico negativo. A tecnologia de encapsulação por *spray chilling*, utilizando gordura de palma e manteiga de cacau, como agentes encapsulantes, proporcionou a obtenção de micropartículas eficientes na proteção dos probióticos frente ao processo de encapsulação e na manutenção da estabilidade das células quando estocados sob congelamento. Entretanto, a eficiência das micropartículas frente aos fluidos gastrointestinais e a estabilidade das células quando estocadas a 7 e 20 ou 37°C variaram de acordo com a gordura utilizada e com o microrganismo encapsulado. As

micropartículas lipídicas obtidas são, portanto, uma matriz inovadora para a aplicação de probióticos, de baixo custo e com grande possibilidade de obtenção em escala industrial. O desafio futuro para o presente estudo é a seleção de um agente encapsulante que aumente a estabilidade das células, nas temperaturas ambiente e de refrigeração, a fim de aumentar as possibilidades de aplicação destas microcápsulas em produtos alimentícios.

Palavras-chave: probióticos, encapsulação, *spray cooling*, viabilidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, D.L.P. **Production and evaluation of lipid microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* or *Bifidobacterium lactis* produced by spray chilling**. 2011. 75 f. M.Sc. Dissertation - Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2011.

L. acidophilus and *Bifidobacterium lactis* are probiotic microorganisms frequently used in food product. However they must remain viable during processing, entire shelf life of product and passing-through the gastrointestinal tract to provide beneficial effects on human health. Since these microorganisms are sensitive to a series of factors, especially presence of oxygen and acid medium, microencapsulation has been studied as an alternative to increase probiotic cells viability and to provide the controlled release in the site of action, improving their efficiency. The aim of this study was to produce and evaluate lipid microparticles of *L. acidophilus* or *B. lactis* produced by spray chilling technology using low melting point fats, such as palm fat and cocoa butter, as the encapsulant agent. The mean diameter and morphology of the microparticles were evaluated. Survival assays were conducted to evaluate the resistance of the microorganisms to the spray chilling process, viability to the *in vitro* simulated gastric and intestinal fluids and viability during 90 days of storage at -18, 7 and 20/37°C, depending on the fat used. Microparticles presented a spherical shape and mean diameter that allows the flow of material in the food product without conferring technology influence. Spray chilling technology using fat palm or cocoa butter as the encapsulant agent was efficient in protecting the microorganism to the encapsulation process and 90 days of storage at -18°C. However the efficiency of the microparticles on the gastric and intestinal fluids and the cells stability during storage at 7 e 20 or 37°C varied according to the fat and microorganism used. The lipid microparticles seem to be a relatively innovative matrix for the application of probiotics with low costs and possibility of scale up. The future challenge in this study is to choose an encapsulant agent that improves cells resistance and viability at refrigerator and room temperatures to increase the possibility of application of these microcapsules in food products.

Keywords: probiotics; encapsulation, spray cooling; viability.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 - Principais modelos de microcápsulas. (A) matriz; (B) microcápsula simples; (C) simples irregular; (D) duas paredes; (E) vários núcleos; (F) grupamento de micropartículas.....	22
Figura 3.1 - Gorduras submetidas a testes preliminares de encapsulação para seleção do material encapsulante: (A) gordura de palma interesterificada; (B) manteiga de cacau; (C) gordura palma 460 UG.....	36
Figura 3.2 - Fotomicrografias ópticas (A) e eletrônica de varredura (B e C) das micropartículas contendo <i>B. lactis</i> , obtidas por <i>spray chilling</i>	39
Figura 3.3 - Fotomicrografias ópticas (A) e eletrônica de varredura (B e C) das micropartículas contendo <i>L. acidophilus</i> , obtidas por <i>spray chilling</i>	40
Figura 4.1 - Fotomicrografias ópticas das micropartículas contendo <i>B. lactis</i> (A) e <i>L. acidophilus</i> (B), obtidas por <i>spray chilling</i>	56
Figura 4.2 - Fotomicrografias eletrônica de varredura das micropartículas contendo <i>L. acidophilus</i> , obtidas por <i>spray chilling</i>	56

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 2.1 - Número de publicações (cinza) e produtos probióticos (preto) lançados por ano.....	20
Gráfico 3.1 - Ponto de fusão da gordura de palma interesterificada, obtido por DSC.....	37
Gráfico 3.2 - Sobrevivência de <i>B. lactis</i> (—) e <i>L. acidophilus</i> (—) livres (♦) e encapsulados (•) nos fluidos gástrico e intestinal.....	44
Gráfico 4.1 - Ponto de fusão da gordura de palma interesterificada, obtido por DSC.....	54
Gráfico 4.2 - Sobrevivência de <i>B. lactis</i> (—) e <i>L. acidophilus</i> (—) livres (♦) e encapsulados (•) nos fluidos gástrico e intestinal.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 3.1 - Diâmetro médio (μm) das micropartículas obtidas por <i>spray chilling</i>	41
Tabela 3.2 - Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> ao processo de microencapsulação por <i>spray chilling</i>	42
Tabela 3.3 - Estabilidade de <i>B. lactis</i> livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.....	45
Tabela 3.4 - Estabilidade de <i>L. acidophilus</i> livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.....	46
Tabela 4.1 - Diâmetro médio (μm) das micropartículas obtidas por <i>spray chilling</i>	57
Tabela 4.2 – Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> ao processo de microencapsulação por <i>spray chilling</i>	58
Tabela 4.3 - Estabilidade de <i>B. lactis</i> livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.....	61
Tabela 4.4 - Estabilidade de <i>L. acidophilus</i> livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.....	62

SUMÁRIO

1 - INTRODUÇÃO	15
2 - REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Probióticos.....	17
2.2 Alimentos probióticos	19
2.3 Microencapsulação.....	21
2.3.1 Microencapsulação de probióticos	24
2.3.2 <i>Spray Chilling</i>	27
3 - CAPÍTULO 1 - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE GORDURA DE PALMA CONTENDO <i>B. LACTIS</i> OU <i>L. ACIDOPHILUS</i> POR <i>SPRAY CHILLING</i>	29
3.1 Introdução	30
3.2 Material e Métodos	32
3.2.1 Material.....	32
3.2.2 Seleção do material encapsulante	32
3.2.3 Análise do comportamento térmico dos encapsulantes.....	33
3.2.4 Preparo de inóculo de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i>	33
3.2.5 Enumeração de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i>	33
3.2.6 Microencapsulação por <i>spray chilling</i>	34
3.2.7 Caracterização das partículas lipídicas	34
3.2.7.1 Caracterização morfológica	34
3.2.7.2 Tamanho e distribuição de partículas	34
3.2.8 Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> à microencapsulação	35
3.2.9 Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> nos fluidos gástrico e intestinal.....	35
3.2.10 Avaliação da estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem.....	35
3.3 Resultados e Discussão	36
3.3.1 Seleção do material encapsulante	36
3.3.2 Análise do comportamento térmico do encapsulante	37
3.3.3 Obtenção das micropartículas por <i>spray chilling</i>	38
3.3.4 Caracterização morfológica e diâmetro médio das partículas	38

3.3.5 Resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> ao processo de microencapsulação	41
3.3.6 Resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> aos fluidos gástrico e intestinal simulados	422
3.3.7 Viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem	44
3.4 Conclusão	46
4 - CAPÍTULO 2 - PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE MANTEIGA DE CACAU CONTENDO <i>B. LACTIS</i> OU <i>L. ACIDOPHILUS</i> POR SPRAY CHILLING	47
4.1 Introdução	48
4.2 Material e Métodos	50
4.2.1 Material	50
4.2.2 Análise do comportamento térmico dos encapsulantes	50
4.2.3 Preparo de inóculo de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i>	51
4.2.4 Enumeração de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i>	51
4.2.5 Microencapsulação por spray chilling	51
4.2.6 Caracterização das micropartículas	52
4.2.6.1 Morfologia das micropartículas	52
4.2.6.2 Diâmetro e distribuição de tamanho das micropartículas	52
4.2.7 Avaliação da resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> à microencapsulação	52
4.2.8 Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> nos fluidos gástrico e intestinal	53
4.2.9 Avaliação da estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem	53
4.3 Resultados e Discussão	53
4.3.1 Análise do comportamento térmico do encapsulante	53
4.3.2 Caracterização morfológica e distribuição e tamanho das micropartículas	54
4.3.3 Resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> ao processo de microencapsulação	57
4.3.4 Resistência de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> aos fluidos gástrico e intestinal simulados	58
4.3.5 Viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem	60
4.4 CONCLUSÃO	62
5 - CONCLUSÕES	64
REFERÊNCIAS	65

1 - INTRODUÇÃO

O entendimento da importância de uma alimentação saudável na manutenção da saúde e bem estar da população é crescente nos dias de hoje. Como resultado, o consumo de alimentos funcionais, principalmente daqueles contendo probióticos, intensificou-se consideravelmente nos últimos anos.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro. Dentre estes benefícios encontram-se o controle da microbiota intestinal, melhoria na digestão da lactose, diminuição do risco de câncer e melhoria do valor nutricional dos alimentos.

Lactobacillus acidophilus e *Bifidobacterium lactis* são microrganismos probióticos frequentemente utilizados em alimentos funcionais. No entanto, estes microrganismos devem resistir ao processamento, à estocagem do alimento, e sobreviver à passagem pelo estômago, para chegarem ativos ao intestino e exercerem seus efeitos benéficos.

Porém, para garantir um efeito benéfico contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente, em uma concentração mínima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de produto. Como resultado, pode-se verificar o avanço em pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios contendo probióticos, com objetivo de incorporá-los não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e produtos cárneos.

A aplicação de probióticos, no entanto, esbarra sempre na dificuldade de elaborar produtos com uma boa resistência ao processamento e viabilidade durante toda a vida útil do produto, uma vez que algumas cepas são extremamente sensíveis a fatores como meio ácido e oxigênio. Neste contexto, a microencapsulação tem sido estudada com objetivo de proteger os probióticos aos efeitos adversos do ambiente, além de promover a liberação controlada no local de ação do microrganismo, melhorando sua eficiência.

Diferentes tecnologias (extrusão, *spray drying*, emulsão, coacervação, entre outras) e materiais de paredes (alginato, gelana, κ -carragena e amido) têm sido frequentemente utilizados na encapsulação de probióticos. Embora algumas tecnologias de encapsulação tenham alcançado resultados satisfatórios na proteção

dos probióticos, pesquisas sobre novas tecnologias de encapsulação, bem como novos agentes encapsulantes, são importantes a fim de possibilitar a obtenção de micropartículas de baixo custo e em escala industrial para, finalmente, serem incorporadas pelas indústrias de alimentos.

A tecnologia de encapsulação por *spray chilling* se enquadra nessas novas tecnologias e, devido à possibilidade de utilização de lipídios com baixo de fusão, como material de parede, pode ser uma alternativa para a microencapsulação de probióticos, permitindo baixo custo de operação e liberação controlada do microrganismo. O uso do *spray chilling* pode, portanto, expandir o número de matrizes disponíveis para aplicação de probióticos, além de gerar micropartículas de menor diâmetro, o que é desejável, tecnologicamente. Adicionalmente, a proteção dos probióticos pela incorporação em uma matriz lipídica parece ser uma alternativa interessante, uma vez que esta matriz pode proteger os microrganismos frente à exposição à água e íons H^+ , além da vantagem de ser facilmente digerida no intestino, pelas lipases, possibilitando a liberação do probiótico em seu local de ação.

Até o momento, a encapsulação por *spray chilling* tem sido aplicada para conservar enzimas, *flavors*, minerais e condimentos, para aplicações em sopas secas, produtos de panificação e produtos contendo alta taxa de gordura. No entanto, nenhum estudo científico sobre a utilização desta técnica para microencapsulação de probióticos foi encontrado, o que justifica maiores pesquisas nesta área.

A possibilidade de obtenção de um veículo inovador que confira proteção e liberação dos probióticos no intestino, aliada à crescente demanda por alimentos funcionais, motivaram a realização deste trabalho que teve como objetivos: encapsulação de *L. acidophilus* e *B. lactis* em duas gorduras com ponto de fusão acima da temperatura ambiente; caracterização das micropartículas obtidas quanto à morfologia, distribuição e tamanho; verificação do efeito protetor da micropartícula na manutenção da viabilidade das células quando expostas aos fluidos gástrico e intestinal simulados e estocagem durante 90 dias, a -18, 7 e 20 ou 37°C, dependendo da gordura utilizada. Os experimentos foram subdivididos em dois capítulos (capítulos 3 e 4), de acordo com a gordura utilizada, para facilitar a compreensão e divulgação dos resultados.

2 - REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

O efeito benéfico de determinados tipos de alimentos sobre a saúde do hospedeiro é conhecido há muito tempo. Porém, apesar disso, o estudo desses alimentos, atualmente denominados alimentos funcionais, e de seus componentes responsáveis por esse efeito, tornou-se intenso apenas nos últimos anos.

São considerados alimentos funcionais aqueles que, além de fornecerem a nutrição básica, promovem benefícios à saúde do consumidor (SANDERS, 1998). Dentre os alimentos funcionais, destacam-se os microrganismos probióticos.

O termo probiótico é de origem grega e significa “para a vida”. Tal termo foi inicialmente proposto como descritivo de compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano (LILLY; STILLWELL, 1965). Posteriormente, Parker (1974) definiu probiótico como relativo a organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio microbiano intestinal. No entanto, esta definição era pouco satisfatória, uma vez que a palavra “substância” poderia incluir suplementos tais como antibióticos, cuja função é oposta. Várias modificações da definição do termo probiótico foram propostas, entretanto, a definição mais aceita atualmente considera que probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2002).

Para uma bactéria ser considerada probiótica, deve-se avaliar não apenas suas características benéficas. Aspectos, como segurança e funcionalidade devem ser levados em consideração. O microrganismo probiótico deve ser de origem humana, apresentar ausência de patogenicidade, e resistir a antibióticos. Em relação à funcionalidade, deve apresentar estabilidade frente ao meio ácido e bile, capacidade de aderir à mucosa intestinal e colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano, capacidade de produzir compostos antimicrobianos, além de ser metabolicamente ativos no intestino (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, tais como *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*) e, em menor escala,

Enterococcus faecium, satisfazem estas exigências e são exemplos de microrganismos probióticos frequentemente empregadas em alimentos (ANVISA, 200-?).

As bifidobactérias são bactérias gram-positivas, anaeróbias estritas, que crescem em pH entre 4,5 - 8,5. Os lactobacilos, no entanto, são microaerófilos ou anaeróbios facultativos, gram-positivos, que variam muito no crescimento e características metabólicas (ROKKA; RANTAMAKI, 2010). Estas bactérias têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável, sendo o íleo terminal (lactobacilos) e o cólon (bifidobactérias), o local de preferência para colonização (CHARTERIS et al., 1998; BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002).

No interior do intestino humano, as bactérias probióticas podem inibir o desenvolvimento de microrganismos patogênicos por excluir ou reduzir a aderência destes às células do intestino (REID, 1999), pela produção de ácido e bacteriocinas e pela competição por nutrientes (KRASAEKOOP et al., 2003). Desta forma, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (PUUPPONEN-PIMIÄ et al., 2002).

A atividade antimicrobiana dos lactobacilos difere das bifidobactérias em alguns aspectos: os lactobacilos atuam através da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas; já bifidobactérias produzem ácido láctico e acético. A produção desses ácidos provoca a redução do pH intestinal, o que restringe ou inibe o crescimento de muitos patógenos em potencial e bactérias putrefativas (MODLER, et al., 1990).

Além do controle da microbiota intestinal, as bactérias probióticas também estão associadas a uma melhoria na digestão da lactose e redução dos sintomas de intolerância a este carboidrato, devido à produção da enzima β -galactosidase (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997). Os probióticos podem ainda melhorar o valor nutricional dos alimentos, uma vez que eles são aptos a produzir altos níveis de vitamina B e certos aminoácidos livres, tais como metionina, lisina e triptofano (JONKERS; STOCKBRÜGGER, 2007). Também estão associados à produção de ácidos orgânicos, que inibem a síntese de colesterol, tendo, portanto, efeito hipocolesterolêmico (PEREIRA; GIBSON, 2002). Outros efeitos atribuídos a essas

culturas são a diminuição do risco de câncer, devido a sua habilidade em converter pré-carcinógenos potenciais em compostos menos prejudiciais (JONKERS; STOCKBRÜGGER, 2007), prevenção de alergias, doenças de pele e urogenitais, pela modulação da microbiota intestinal (LANNITTI; PALMIERI, 2010), além do efeito terapêutico e preventivo à constipação, diarreia associada a antibióticos e por rotavírus, síndrome do intestino irritado e retocolite ulcerativa (JONKERS; STOCKBRÜGGER, 2007).

Porém, para garantir um efeito benéfico contínuo, os microrganismos probióticos devem ser ingeridos diariamente, em uma concentração mínima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de produto (ANVISA, 200-?). Como resultado, pode-se verificar o avanço em pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios contendo probióticos, com objetivo de incorpora-los não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e, também, produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM, 2002), a fim de proporcionar diferentes opções de consumo destes microrganismos.

É importante ressaltar que a utilização de culturas probióticas na fabricação de produtos alimentícios fundamenta-se no desempenho tecnológico do microrganismo, tais como boa multiplicação no alimento, promoção de propriedades sensoriais adequadas e estabilidade/viabilidade durante armazenamento (OLIVEIRA et al., 2002). Além disso, é desejável que as cepas sejam apropriadas para a produção industrial em larga escala, resistindo às condições de processamento como a liofilização ou secagem por *spray drying* (STANTON et al., 2003).

2.2 Alimentos probióticos

O uso de bactérias probióticas em alimentos, com objetivo de proporcionar efeitos benéficos à saúde, é hoje um assunto de interesse tanto para indústria de alimentos como comunidade científica, o que pode ser traduzido pelo aumento de publicações e produtos contendo probióticos (Gráfico 2.1). Isto é resultado de um maior conhecimento, por parte dos consumidores, sobre os benefícios que o consumo regular de probióticos traz para a manutenção do seu bem-estar, especialmente para a boa função intestinal (ROKKA; RANTAMAKI, 2010; FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Nos países desenvolvidos é crescente a popularidade dos alimentos funcionais contendo os probióticos *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei*, *Bifidobacterium bifidum* e *B. lactis*. Como resultado, as vendas de produtos contendo estes probióticos têm aumentado. Na Europa, por exemplo, onde o mercado de iogurtes probióticos já está bem estabelecido, o setor de bebidas fermentadas representa o de maior crescimento - 64% do mercado de produtos funcionais, assim como no Japão (SIUTA-CRUCÉ; GOULET, 2001, MELLENTIN, 2007). Como consequência do aumento do interesse em alimentos probióticos, seu mercado global passou de US\$ 14,9 bilhões dólares, em 2007, para os estimados US\$ 15,9 bilhões, até o final de 2008 (AGHEYISI, 2008).

Gráfico 2.1 - Número de publicações (cinza) e produtos probióticos (preto) lançados por ano (Fonte: JANKOVIC et al., 2010).

As aplicações de probióticos encontram-se voltadas, principalmente, para produtos como leites fermentados e iogurtes, sendo estes os principais produtos contendo culturas probióticas comercializados no mundo. Outros produtos comerciais contendo essas culturas incluem sobremesas à base de leite, leite em pó destinado a recém-nascidos, sorvetes, sorvetes de iogurte e diversos tipos de queijo, além de produtos na fórmula de partículas ou produtos em pó para serem dissolvidos em bebidas frias, alimentos de origem vegetal fermentados e maionese (STANTON et al., 1998; GARDINER et al., 1999; DAVIDSON et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2002; STANTON et al., 2003). Isto se deve aos avanços nas pesquisas em

desenvolvimento de novos produtos, que resultaram na incorporação de probióticos não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM, 2002). No Brasil, microrganismos probióticos podem ser encontrados principalmente em iogurtes, leites fermentados e sobremesas lácteas.

Porém, para garantir que o produto com alegação de propriedades funcionais proverá uma quantidade adequada de probióticos, a quantidade mínima viável do microrganismo, até o final do prazo de validade do produto, deve estar situada na faixa de 10^7 a 10^9 UFC, em sua recomendação diária. Além disso, deve ser comprovada a resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 200-?), para que os probióticos cheguem viáveis ao intestino para colonizarem e, enfim, exercerem os efeitos benéficos à saúde.

A aplicação de probióticos esbarra, no entanto, na dificuldade de elaborar produtos que ofereçam viabilidade, durante toda a vida útil do produto, uma vez que algumas cepas desses microrganismos são extremamente sensíveis a fatores como meio ácido e oxigênio (KAILASAPATHY; CHIN, 2000). Outro desafio é a elaboração de produtos com boa aceitação sensorial, uma vez que algumas cepas de probióticos podem produzir “*off-flavors*” se crescerem no alimento (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Neste contexto, a microencapsulação tem sido frequentemente estudada com objetivo de proteger os microrganismos probióticos contra a degradação fisiológica (meio ácido e sais biliares) e do meio ambiente (presença de oxigênio) (KWOK; GROVES; BURGESS, 1992; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; OLIVEIRA et al. 2007 a,b), além de evitar sua multiplicação no alimento, com consequente alterações nas propriedades sensoriais (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

2.3 Microencapsulação

Microencapsulação é a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas (TODD, 1970).

O material encapsulado é denominado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS, 1999). As cápsulas podem ser classificadas por tamanho em três categorias: macro- ($>5.000\ \mu\text{m}$), micro- ($0,2 - 5.000\ \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($<0,2\ \mu\text{m}$). Em termos de arquitetura, as cápsulas podem ser divididas em dois grupos: aquelas nas quais o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, e aquelas nas quais o núcleo é, uniformemente, disperso em uma matriz. O primeiro grupo pode ser classificado como sistema do tipo reservatório, e caracteriza as “verdadeiras” microcápsulas; e o segundo, classificado como sistema matricial, resulta nas chamadas microesferas, na qual uma pequena fração do material “encapsulado” permanece exposta na superfície (KING, 1995; RÉ, 1998). As microcápsulas podem ter ainda mais de um núcleo, ou várias paredes para um mesmo núcleo (Figura 2.1) (CONSTANT; STRINGHETA, 2002).

Figura 2.1 - Principais modelos de microcápsulas. (A) matriz; (B) microcápsula simples; (C) simples irregular; (D) duas paredes; (E) vários núcleos; (F) grupamento de micropartículas (Fonte: AZEREDO, 2005).

Alguns dos objetivos da encapsulação de componentes de alimentos são: reduzir as interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que possam resultar em perda de aroma, valor nutricional ou viabilidade, como no caso de microrganismos; alteração de cor; separar componentes reativos ou incompatíveis; reduzir a taxa de migração do material do núcleo para o ambiente externo; evitar reações prematuras de um substrato; mascarar compostos de sabor

indesejável; promover melhor solubilidade do núcleo e melhor incorporação em sistemas secos (REINECCIUS, 1991; PSZCZOLA, 1998; DEPYPERE et al., 2003).

A encapsulação permite que o núcleo seja isolado do ambiente externo até que a liberação seja desejada. Outro importante objetivo é permitir que a liberação do material do núcleo ocorra lentamente com o tempo, ou a partir da ocorrência de um certo evento. Esse conceito é denominado de liberação controlada, podendo, portanto, referir-se ao controle do início da liberação ou da taxa de liberação (RISCH, 1995). A liberação no local e no momento adequado é uma propriedade de extrema importância nos processos de encapsulação, melhorando a efetividade e reduzindo as doses requeridas de aditivos, além de ampliar o espectro de aplicações de compostos de interesse (GOUIN, 2004).

Os principais fatores que afetam as taxas de liberação do núcleo estão relacionados a interações entre o material encapsulante e o núcleo (GANDER, 1996). Além disso, outras variáveis influenciam a liberação, tais como: volatilidade do núcleo (ROSS et al., 2000), proporção entre núcleo e encapsulante, tamanho das partículas (SEVGI, 1994) e grau de viscosidade do polímero encapsulante (DASHEVSKY; ZEISSIN, 1997). Em geral, o tipo e geometria das partículas do núcleo e, principalmente, do material encapsulante determinam o mecanismo de liberação do núcleo.

Muitos materiais podem ser utilizados como encapsulantes na confecção de micropartículas, dentre eles: goma arábica, ágar, alginato e carragena; os carboidratos amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose; as celuloses carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina e albumina (JACKSON; LEE, 1991).

Os mecanismos de liberação dos materiais ativos microencapsulados variam de acordo com a natureza do agente encapsulante, sendo que normalmente ocorrem devido a mecanismos como: variação de temperatura e de pH, solubilidade ao meio, biodegradação, difusão, ruptura mecânica, permeabilidade seletiva e gradiente de concentração existente em relação ao meio de liberação (BAKAN, 1973; BRANNON-PEPPAS, 1993). Os processos que utilizam encapsulantes hidrofílicos resultam geralmente em liberação mais rápida do núcleo, enquanto o uso de gorduras ou ceras como encapsulantes tende a retardar a liberação.

Varias técnicas têm sido empregadas na elaboração de microcápsulas, tais como: *spray drying*, *spray cooling*, coacervação, extrusão, extrusão centrífuga, recobrimento em leito fluidizado, lipossomas e complexação por inclusão (FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). A seleção do método é dependente da aplicação que será dada à microcápsula, do tamanho desejado, do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON; LEE, 1991).

Nem todas as técnicas existentes, no entanto, se adequam à microencapsulação de probióticos, pois algumas fazem uso de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos para estes microrganismos. Outros fatores limitantes são o tamanho das células (1 a 5 μm), que impede a obtenção de partículas na escala nano, e o custo, que representa um obstáculo para utilização do ingrediente encapsulado pelas indústrias alimentícias (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

2.3.1 Microencapsulação de probióticos

A microencapsulação de probióticos tem sido amplamente empregada nos últimos anos, com objetivo de promover proteção (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; SHIMA et al., 2009), manutenção da viabilidade da bactéria, durante toda vida útil do produto, liberação controlada no site de ação do microrganismo e diminuição da multiplicação no alimento, prevenindo alterações sensoriais (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas. Podemos citar ainda a atomização, emulsão, coacervação e imobilização em gorduras e grânulos de amido (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). As aplicações encontram-se, principalmente, em derivados do leite, tais como iogurtes, queijos, sobremesas e, mais recentemente, em bebidas, barras de cereais, biscoitos e chocolates (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

Polissacarídeos tais como alginato, gelana, κ -carragena e amido são os materiais mais comumente empregados na microencapsulação de bifidobactérias e lactobacilos (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

Devido à natureza delicada de muitas bactérias probióticas, a sobrevivência em números suficientemente altos durante a estocagem e passagem pelo trato gastrointestinal permanece sendo um dos maiores desafios para entrega efetiva dessas bactérias benéficas (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008). Frente a isto, vários estudos têm sido realizados, com objetivo de verificar o efeito benéfico da microencapsulação sobre a viabilidade da cultura probiótica, durante a estocagem do produto e passagem pelo trato gastrointestinal.

A microencapsulação de probióticos, em alginato, por extrusão, tem mostrado bons resultados sobre a sobrevivência das células, durante estocagem (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Da mesma forma, a encapsulação de *L. acidophilus*, em β -ciclodextrina e goma arábica, por *spray drying*, também proporcionou maior vida de prateleira da cultura (ZHAO, 2008). No entanto, após algumas semanas de estocagem, sob temperatura ambiente, as células desidratadas podem apresentar perda da atividade, associado ao estresse provocado pela exposição às altas temperaturas (ANAL; SINGH, 2007).

Oliveira et al. (2007a) encapsularam *L. acidophilus* e *B. lactis*, em uma combinação de pectina e caseína, através de coacervação complexa. Com objetivo de assegurar alta estabilidade, o material coacervado foi, posteriormente, atomizado. *L. acidophilus* mantiveram-se viáveis durante estocagem a 7 e 37°C, por 120 dias. *B. lactis*, no entanto, perderam viabilidade rapidamente, principalmente quando armazenados a 37°C. Ambos os microrganismos encapsulados mostraram-se mais resistentes em meio ácido, comparado às células livres.

Albertini et al. (2010) produziram um sistema para liberação intestinal de *L. acidophilus* LA14 e *B. lactis* BI07 resistente ao suco gástrico, pela técnica de extrusão. Os resultados obtidos indicaram que a incorporação de 0.5% (w/v) de goma xantana ou 1% de acetato ftalato de celulose na solução de alginato 3% aumentou resistência da bactéria probiótica frente ao meio ácido (91% de sobrevivência) e à exposição ao fluido gástrico simulado (viabilidade > 95%). O microrganismo encapsulado apresentou ainda viabilidade de 82% e 70%, após 6 (10^8 UFC/g) e 9 (10^6 UFC/g) meses, respectivamente.

Bifidobactérias encapsuladas em alginato e em mistura de alginato com outros polímeros mostraram-se mais resistentes em meio ácido, comparado às células livres (KHALIL; MANSOUR, 1998; CUI et al., 2000; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; KIM et al., 2008). Resultados semelhantes foram observados por Favaro-Trindade e Grosso (2002), que avaliaram a tolerância dos *L. acidophilus* e *B. lactis* microencapsulados em acetato ftalato de celulose, pela técnica de *spray drying*, em soluções de pH e bile, similares às encontradas no estômago e intestino. A microencapsulação mostrou-se bastante eficiente, enquanto que, na forma livre, a viabilidade das células tenha sido eliminada após uma hora de exposição às soluções. Em outro estudo, *L. acidophilus*, na forma encapsulada, sobreviveram melhor em condições gástricas simuladas, frente às células livres, principalmente sob alta concentração de alginato de sódio (1.8%) e maiores tamanhos de cápsula (450 μ m). (CHANDRAMOULI et al., 2004).

Liserre et al. (2007) observaram que micropartículas de alginato contendo quitosana e polímeros entéricos na formulação, especialmente Acryl-Eze, promoveram o controle da liberação no meio similar ao trato gastrointestinal. A microencapsulação com polímeros entéricos melhorou a taxa de sobrevivência dos microrganismos.

Outros estudos, no entanto, mostraram que a microencapsulação em alginato de cálcio (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000), assim como em um mistura de alginato e amido (SULTANA; GODWARD; REYNOLDS, 2000), não aumentou a resistência de *L. acidophilus* e *B. lactis* frente à acidez do estômago e presença de sais biliares. De acordo com Rokka e Rantamaki (2010), o revestimento das partículas pode contribuir para o alcance da estabilidade das células.

Lahtinen et al. (2007) imobilizaram bifidobactérias em uma matriz lipídica, a base de manteiga de cacau, o que resultou em um aumento da viabilidade da bactéria, durante estocagem, em modelos simulando bebidas fermentadas e não fermentadas. Este resultado sugere que a matriz lipídica pode proteger os microrganismos frente à exposição à água e íons H^+ . Além disso, a incorporação de probióticos em micropartículas lipídicas parece ser extremamente interessante, uma vez que os lipídios têm a vantagem de serem facilmente digeridos no intestino pelas lipases, possibilitando a liberação do microrganismo probiótico em seu site de ação (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Adicionalmente, são vantagens dos lipídios a biocompatibilidade, baixa toxicidade, fácil processamento,

alta reprodutibilidade, serem inertes quimicamente, além do baixo custo de produção (GIFANI et al., 2009).

A tecnologia de *spray chilling* utiliza lipídios como agente encapsulante e, pelo fato de não utilizar solventes orgânicos (GIUNCHEDI; CONTE, 1995), pode ser uma alternativa para a microencapsulação de probióticos.

2.3.2 *Spray Chilling*

A microencapsulação por *spray chilling*, também conhecido por *spray cooling* ou *spray congealing*, é uma técnica similar ao *spray drying*. No entanto, fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. A microencapsulação ocorre quando uma mistura contendo o ingrediente ativo (ou recheio) e o agente encapsulante é atomizada, na forma de gotículas, que rapidamente solidificam na presença do ar frio (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Partículas do tipo “matriz” são formadas, em que uma porção significativa do recheio fica aderida à superfície da micropartícula, tendo direto acesso ao ambiente externo. Desta forma, as micropartículas produzidas podem apresentar algumas desvantagens, incluindo baixa capacidade de encapsulação, além da expulsão do ingrediente ativo durante estocagem, devido à estrutura cristalina e polimorfismo, característicos de muitos lipídios (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997; SATO; UENO, 2005). A microencapsulação por *spray chilling*, no entanto, é considerada a tecnologia de encapsulação mais barata, pelo emprego de temperaturas amenas, e com grande possibilidade de *scale-up* (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997; GOUIN, 2004; SATO; UENO, 2005).

Micropartículas lipídicas são, geralmente, mais adequadas a alimentos sólidos ou com baixo conteúdo de água, uma vez que a aplicação em alimentos aquosos necessitaria de uma etapa adicional de emulsão, para evitar a separação de fases (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Até o momento, a encapsulação por *spray chilling* tem sido aplicada para conservar, enzimas, sabores, minerais e condimentos (DE VOS et al., 2010). Aplicações encontram-se em sopas secas, produtos de panificação e produtos contendo alta taxa de gordura (GIBBS et al., 1999). Schrooyen et al. (2001), por exemplo, encapsularam vitamina C para aplicação em alimentos sólidos, tais como barras de cereais, biscoitos e pães.

Devido à possibilidade de utilização de lipídios com baixo de fusão, como material de parede, o *spray chilling* pode ser uma alternativa para a microencapsulação de probióticos, permitindo baixo custo de operação e liberação controlada do microrganismo. De acordo com Champagne e Fustier (2007), a encapsulação de microrganismos probióticos, por *spray chilling*, pode expandir o número de matrizes disponíveis para sua aplicação, além de gerar micropartículas de menor diâmetro, o que é desejável, sensorialmente. No entanto, nenhum estudo científico sobre a utilização desta técnica foi encontrado.

3 - CAPÍTULO 1

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE GORDURA DE PALMA CONTENDO *B. LACTIS* OU *L. ACIDOPHILUS* POR *SPRAY CHILLING*

RESUMO

Este estudo teve como objetivo a produção e avaliação de micropartículas lipídicas de *Bifidobacterium lactis* ou *Lactobacillus acidophilus*, produzidas por *spray chilling*, utilizando uma gordura de baixo ponto de fusão como agente encapsulante. O diâmetro médio e a morfologia das micropartículas foram avaliados. Ensaio de sobrevivência foram conduzidos com objetivo de avaliar a resistência dos microrganismos ao processo encapsulação, resistência *in vitro* aos fluidos gástricos e intestinais simulados (FGS e FIS) e estabilidade durante 90 dias de armazenamento a -18, 7 e 37°C. Os resultados obtidos indicam que a viabilidade das células não foi afetada pelo processo de microencapsulação. Além disso, microrganismos encapsulados, em gordura de palma, mostraram-se mais resistentes às condições gástrica e intestinal, mantendo 90,7% (*B. lactis*) e 91,8% (*L. acidophilus*) de células viáveis, após exposição aos FGS e FIS. Microrganismos livres e encapsulados mantiveram-se estáveis em estocagem à temperatura ambiente. Resultados promissores, no entanto, foram observados quando menores temperaturas de estocagem foram empregadas, em que as micropartículas lipídicas garantiram entre 60 e 90 dias de estocagem (*B. lactis*), sob 7 e -18°C e valores superiores a 90 dias (*L. acidophilus*), sob -18°C. Uma vez que a tecnologia de encapsulação por *spray chilling* utilizando a gordura de palma, como agente encapsulante, proporcionaram a obtenção de partículas lipídicas eficientes na manutenção da estabilidade e viabilidade das células, esse método parece ser uma matriz relativamente inovadora para a aplicação de probióticos.

Palavras chaves: probióticos, encapsulação, *spray cooling*, viabilidade.

3.1 Introdução

O consumo de alimentos contendo probióticos intensificou-se consideravelmente nos últimos anos, devido aos efeitos benéficos à saúde conferidos por estes microrganismos. *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* são microrganismos probióticos freqüentemente utilizados em alimentos. No entanto, estes microrganismos devem permanecer viáveis durante a vida útil do alimento e sobreviver à passagem pelo estômago, para chegarem ativos ao intestino e exercerem seus efeitos benéficos (LAROIA; MARTIN, 1990).

Dentre os benefícios associados aos probióticos, destacam-se o controle da microbiota intestinal, melhoria na digestão da lactose (KAILASAPATHY; RYBKA, 1997), efeito hipocolesterolêmico (PEREIRA; GIBSON, 2002), diminuição do risco de câncer e melhoria no valor nutricional dos alimentos, uma vez que estes microrganismos são aptos a produzir altos níveis de vitamina B e certos aminoácidos livres, tais como metionina, lisina e triptofano (JONKERS; STOCKBRÜGGER, 2007).

Porém, para garantir um efeito benéfico contínuo, os probióticos devem ser ingeridos diariamente, em uma concentração mínima de 10^6 a 10^7 UFC/g ou mL de produto (ANVISA, 200-?). Como resultado, pode-se verificar o avanço em pesquisas para o desenvolvimento de novos produtos alimentícios contendo probióticos, com objetivo de incorporá-los não só em produtos lácteos, mas também em bebidas, cereais e produtos cárneos (MATTILA-SANDHOLM, 2002).

A aplicação de probióticos, no entanto, esbarra sempre na dificuldade de elaborar produtos com uma boa resistência ao processamento e viabilidade durante toda a vida útil do produto, uma vez que algumas cepas são extremamente sensíveis a fatores como pH ácido e oxigênio (KAILASAPATHY; CHIN, 2000). Neste contexto, a microencapsulação tem sido estudada com objetivo de proteger os microrganismos probióticos contra degradação fisiológica (meio ácido e sais biliares) e do meio ambiente (presença de oxigênio) (KWOK; GROVES; BURGESS, 1992; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000).

A proteção de probióticos pela incorporação em uma matriz lipídica parece ser uma alternativa interessante, uma vez que esta matriz pode proteger os microrganismos frente à exposição à água e íons H^+ (LAHTINEN et al., 2007), além da vantagem de ser facilmente digerida no intestino, pelas lipases, possibilitando a

liberação do probiótico em seu site de ação (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011), aumentando sua eficiência.

A tecnologia de encapsulação por *spray chilling* utiliza lipídios como agente encapsulante. Esta técnica é similar ao *spray drying*, no entanto, fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. A microencapsulação ocorre quando uma mistura contendo o ingrediente ativo (ou recheio) e o agente encapsulante é atomizada, na forma de gotículas, que rapidamente solidificam na presença do ar frio (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Partículas do tipo “matriz” são formadas, em que uma porção significativa do recheio fica aderida à superfície da micropartícula, tendo direto acesso ao ambiente externo. Desta forma, as micropartículas produzidas podem apresentar algumas desvantagens, incluindo baixa capacidade de encapsulação, além da expulsão do ingrediente ativo durante estocagem, devido à estrutura cristalina e polimorfismo característicos de muitos lipídios (SATO; UENO, 2005; WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997). A microencapsulação por *spray chilling*, no entanto, é considerada a tecnologia de encapsulação mais barata, pelo emprego de temperaturas amenas, com grande possibilidade de *scale-up* (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997; GOUIN, 2004; SATO; UENO, 2005).

Até o momento, a encapsulação por *spray chilling* tem sido aplicada para conservar enzimas, *flavors*, minerais e condimentos (DE VOS et al. 2010). Aplicações encontram-se em sopas secas, produtos de panificação e produtos contendo alta taxa de gordura (GIBBS et al., 1999). Schrooyen et al. (2001), por exemplo, encapsularam vitamina C para aplicação em alimentos sólidos, tais como barras de cereais, biscoitos e pães.

Devido à possibilidade de utilização de lipídios com baixo de fusão, como material de parede, o *spray chilling* pode ser uma alternativa para a microencapsulação de probióticos, permitindo baixo custo de operação e liberação controlada do microrganismo. De acordo com Champagne e Fustier (2007), o uso do *spray chilling*, pode expandir o número de matrizes disponíveis para aplicação de probióticos, além de gerar micropartículas de menor diâmetro, o que é desejável, sensorialmente. No entanto, nenhum estudo científico sobre a utilização desta técnica para microencapsulação de probióticos foi encontrado.

Este estudo teve como objetivo a produção e avaliação de partículas lipídicas de *B. lactis* e *L. acidophilus*, produzidas por *spray chilling*, utilizando uma gordura de baixo ponto de fusão como agente encapsulante.

3.2 Material e Métodos

3.2.1 Material

Como agentes encapsulantes foram avaliadas a gordura de palma 460 UG, da Agropalma (Brasil), gordura de palma interesterificada (interesterificação com as gorduras de palma e palmiste) da Vigor (Brasil), manteiga de cacau da Emfal (Brasil) e manteiga de coco (Softisan 100[®]), da Sasol (Alemanha).

Como núcleo ou material ativo foram utilizadas as culturas *B. lactis* (BI-01) e *L. acidophilus* (LAC-04) na forma liofilizada, gentilmente doadas pela Danisco (Brasil).

Lecitina de soja em pó, da Gerbrás (Brasil), foi utilizada como emulsificante no preparo da emulsão A/O para a produção das micropartículas.

3.2.2 Seleção do material encapsulante

Com o objetivo de selecionar o material encapsulante com o menor ponto de fusão possível, mas que ainda resultasse em partículas lipídicas na forma de um pó fino à temperatura ambiente, sem ou com pouca presença de grumos, testes preliminares de encapsulação foram realizados com gorduras de ponto de fusão entre 34 e 46°C, tais como gordura de palma 460 UG (Agropalma), gordura de palma interesterificada (Vigor), manteiga de cacau (Emfal) e Softisan 100[®] (Sasol). As gorduras, previamente derretidas, foram atomizadas em câmara fria, a 10°C, utilizando bico injetor duplo fluido de 0.7 mm e pressão do ar de 1.0 kgf/cm², de acordo com o método descrito em Chambi et al. (2008).

3.2.3 Análise do comportamento térmico dos encapsulantes

A fim de caracterizar as gorduras, especialmente em relação ao ponto de fusão, a análise térmica foi realizada, utilizando-se calorimetria diferencial de varredura (DSC TA Instruments, Newcastle, USA). Para isto, cerca de 10 mg da amostra de gordura foi acondicionada em cápsula de alumínio e aquecida a 10°C/min, entre 0 e 100°C, sob atmosfera inerte (45 mL/min de N₂). Uma cápsula vazia foi utilizada como referência. Nitrogênio líquido foi usado para a refrigeração de amostra antes de cada corrida.

3.2.4 Preparo de inóculo de *B. lactis* e *L. acidophilus*

B. lactis (BI-01) e *L. acidophilus* (LAC-04), foram reativados de acordo com o método descrito por Liserre et al. (2007), com algumas modificações. As culturas liofilizadas (0,15%) foram ativadas em leite desnatado reconstituído, suplementado com extrato de levedura (1%), glicose (1%), citrato de sódio (1%) e L-cisteína (0,05%), durante 20 horas, à 37°C. O caldo fermentado foi centrifugado a 2360 x g, por 8 minutos, e lavado em solução de NaCl (0,85%), por duas vezes. As células foram então suspensas na solução salina, para obtenção de uma suspensão com aproximadamente 10⁹ - 10¹⁰ UFC/mL.

3.2.5 Enumeração de *B. lactis* e *L. acidophilus*

A enumeração das células viáveis de *B. lactis* e *L. acidophilus* foi realizada através de plaqueamento em profundidade, em Ágar MRS, de acordo com o método descrito por Grosso e Fávaro-Trindade (2004), com algumas modificações. Para *B. lactis*, o Ágar MRS foi suplementado com cloreto de lítio (0,1%), L-cisteína e azul de anilina (0,01%). Diluições seriadas foram preparadas em solução de citrato de sódio 2% aquecidas a 50°C. As placas foram incubadas em jarras contendo anaerobac (Probac, Brasil), o qual gera ambiente de anaerobiose, a 37°C por 72h. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

3.2.6 Microencapsulação por *spray chilling*

Os ensaios de microencapsulação foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade, do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA/UNICAMP. As micropartículas foram produzidas por *spray chilling*, de acordo com o método descrito por Chambi et al. (2008), com algumas modificações. Uma solução contendo gordura de palma fundida a 48°C, inóculo e lecitina (1%), como emulsificante, foi homogeneizada em Ultraturrax (IKA-T10) a 9.500 rpm, por 60 segundos. Foram avaliadas as proporções de inóculo: gordura de 1:10 e 1:4, com o objetivo de atingir ao menos a contagem de 10^7 UFC/g nas micropartículas. As partículas lipídicas foram formadas pela atomização da emulsão em câmara fria, a 10°C, utilizando atomizador duplo fluido ($\varnothing = 0,7$ mm), com pressão do ar de 1,0 kgf/cm². As micropartículas foram mantidas congeladas para futuros ensaios de resistência e caracterização. Para os testes de viabilidade durante estocagem, as cápsulas foram armazenadas a -18, 7 e 37°C.

3.2.7 Caracterização das micropartículas

3.2.7.1 Caracterização morfológica

A morfologia das micropartículas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), de acordo com o método descrito em Oliveira et al. (2007b) e microscopia óptica, utilizando uma câmara digital e o programa Global Lab Image.

3.2.7.2 Tamanho e distribuição de partículas

O diâmetro médio, $D(4,3)$, das partículas lipídicas foi determinado por difração de raio laser, através do analisador Shimadzu Sald-201V (Japão), utilizando álcool etílico (Synth, Brasil), para dispersar as partículas. Também foram determinados os valores de diâmetro da partícula correspondente a 10%, $D(0,1)$, e 75%, $D(0,75)$, da distribuição acumulada.

3.2.8 Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* à microencapsulação

Com objetivo de determinar os efeitos do processo de microencapsulação na viabilidade dos microrganismos, *B. lactis* e *L. acidophilus* foram enumerados antes do processo de encapsulação (na emulsão) e nas micropartículas, previamente fundidas em solução aquecida de citrato de sódio (2%).

A técnica utilizada para a enumeração foi a descrita no item 2.2.5

3.2.9 Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *B. lactis* e *L. acidophilus* nos fluidos gástrico e intestinal

A resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* nas formas livre, em inóculo, e encapsulados, em sistemas similares ao fluido gástrico (FGS) e intestinal (FIS), foram avaliadas, de acordo com os procedimentos descritos por Gbassi et al. (2009). As partículas foram inicialmente submetidas ao FGS, composto por cloreto de sódio (9 g/L), pepsina da mucosa estomacal de suínos (Sigma-Aldrich) (3 g/L), e pH ajustado para 1,8, com ácido clorídrico, durante 120 minutos. Neste pH, é atingida a atividade máxima da enzima pepsina (TOBEY et al., 2001).

Posteriormente, as partículas foram submetidas ao FIS, composto de cloreto de sódio (9 g/L), pancreatina e tripsina de pâncreas de bovinos (10 g/L) (Sigma-Aldrich) e sais biliares (3 g/L) (Oxgall, Difco), e pH ajustado para 6,5, com hidróxido de sódio, durante 180 minutos, a 37°C, totalizando 5 horas de ensaio. Alíquotas foram removidas nos tempos 0, 60 e 120 (FGS), e 0, 90 e 180 minutos de incubação (FIS), para avaliação da sobrevivência das células.

3.2.10 Avaliação da estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

Com objetivo de determinar a vida de prateleira das micropartículas, contagens foram realizadas após 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem, com o material

estocado em frascos de vidro a -18, 7 e 37°C na presença de oxigênio, seguindo a técnica descrita por Oliveira et al. (2007a).

3.3 Resultados e Discussão

3.3.1 Seleção do material encapsulante

Com objetivo de selecionar gorduras com ponto de fusão que possibilitasse a obtenção do material encapsulado na forma de pó e que, por outro lado, não tivessem ponto de fusão muito alto, para não conferir estresse térmico às culturas probióticas, gorduras com ponto de fusão que variavam de 36 a 48°C foram submetidas aos ensaios de encapsulação.

Dentre as gorduras analisadas, a gordura de palma interesterificada (Vigor) e a manteiga de cacau (Emfal) apresentaram-se sob a forma de pó fino, com pouca presença de grumos, após encapsulação (Figura 3.1A e 3.1B). A gordura palma 460 UG, da Agropalma, apresentou-se sob a forma granulada (Figura 3.1C), o que é indesejável tecnologicamente, pois dificulta a dispersão do material no alimento. Embora tendo se apresentado sob a forma de pó fino, a gordura Softisan 100[®], da Sasol, não pode ser selecionada como material encapsulante, devido à impossibilidade de receber a doação de mais amostras desta gordura, no momento das realizações deste experimento, uma vez que esta gordura não é comercializada no país. Dentre as gorduras avaliadas, a gordura de palma interesterificada (Vigor) foi selecionada como agente encapsulante para este trabalho.

Figura 3.1 - Gorduras submetidas a testes preliminares de encapsulação para seleção do material encapsulante: (A) gordura de palma interesterificada; (B) manteiga de cacau; (C) gordura palma 460 UG.

3.3.2 Análise do comportamento térmico do encapsulante

Através da análise de DSC, determinou-se o ponto de fusão da gordura de palma interesterificada - 47,5°C - informação importante, uma vez que permite a aplicação da menor temperatura necessária para a fusão da gordura, no processo de microencapsulação e, portanto, minimiza as chances de danos térmicos aos microrganismos probióticos. Pela análise do Gráfico 3.1, verifica-se que gordura de palma interesterificada apresentou uma área de fusão com base relativamente larga, o que é indicativo de presença de triacilgliceróis, com distintos pontos de fusão. Isto pode ocasionar uma menor estabilidade térmica durante a estocagem e manipulação das micropartículas. Por outro lado, há possibilidade de formação de cristais com morfologias e tamanhos distintos, após o processo de *spray chilling*, o que pode contribuir para uma melhor acomodação destes cristais durante a formação da parede da cápsula, e, portanto, para uma cápsula com estrutura mais compactada, onde se espera menor permeabilidade ao oxigênio, íons H^+ e demais fatores deletérios às culturas probióticas.

Gráfico 3.1 – Ponto de fusão da gordura de palma interesterificada, obtido por DSC.

3.3.3 Obtenção das micropartículas por *spray chilling*

Para o preparo das partículas lipídicas, por *spray chilling*, variou-se a concentração de inóculo e gordura de palma na emulsão, com o objetivo de atingir ao menos uma concentração de células viáveis de probióticos de 10^7 UFC/g nas partículas. Para *B. lactis*, esta população foi atingida com a proporção de 1:10 (inóculo : gordura). Já para o *L. acidophilus*, para atingir a mesma população, foi necessário aumentar a proporção de inóculo em relação à gordura (1:4).

3.3.4 Caracterização morfológica e diâmetro médio das partículas

De acordo com as micrografias ópticas (Figura 3.2A e 3.3A), verificou-se que a microencapsulação de *B. lactis* e *L. acidophilus*, por *spray chilling*, originou partículas esféricas, o que é interessante, uma vez que este formato favorece o escoamento do material. Embora não tenha sido possível verificar a presença de microrganismos nas partículas, em função do método de produção, emulsão seguida de atomização, e porque as partículas não foram coradas apropriadamente para este fim, é possível afirmar que estas são do tipo matricial, onde o material ativo não está localizado somente no centro e perfeitamente recoberto pelo encapsulante, mas disperso por toda a partícula, podendo estar inclusive na superfície. Em função desta constituição, muitos autores denominam este tipo de partícula de micropartículas (AZEREDO, 2005; JAFARI et al. 2008; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

As células dos microrganismos não foram visíveis na superfície das micropartículas nem mesmo pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (Figura 3.2B e 3.2C; 3.3B e 3.3C). Todavia, esta técnica confirmou que as micropartículas obtidas não estavam aglomeradas e que apresentavam formato esférico. Este formato também foi observado por Rodriguez et al. (1999) quando estes autores encapsularam drogas por *spray-congealing* utilizando ácido esteárico como encapsulante e por Savolainen et al. (2002) e Chambi et al. (2008) quando estes autores encapsularam drogas e compostos solúveis em água de diferentes massas moleculares por *spray chilling* utilizando ácido esteárico e misturas de ácido

esteárico, láurico, oléico e *sorbitan tristearate* como encapsulantes, respectivamente.

A técnica ainda revelou que as superfícies das micropartículas produzidas neste estudo eram imperfeitas e apresentavam rugosidades e que, as micropartículas contendo *L. acidophilus*, ou seja, aquelas com maior concentração de inóculo ou de material hidrossolúvel foram ainda mais rugosas. As imperfeições na superfície das micropartículas obtidas neste estudo podem ser creditadas ao fato do material atomizado ser heterogêneo, ou seja, uma emulsão A/O composta por inúmeros constituintes, inclusive com uma fração lipídica bastante heterogênea e principalmente à fase aquosa da emulsão, já que quanto maior sua concentração, maior foi à irregularidade observada nas superfícies das micropartículas. Rodriguez et al. (1999) e Chambi et al. (2008) também observaram imperfeições e/ou rugosidades, na superfície das micropartículas que produziram e as atribuíram à presença de ácido esteárico na formulação das micropartículas.

(A)

(B)

(C)

Figura 3.2 – Fotomicrografias ópticas (A) e eletrônica de varredura (B e C) das micropartículas contendo *B. lactis*, obtidas por *spray chilling*.

Figura 3.3 – Fotomicrografias ópticas (A) e eletrônica de varredura (B e C) das micropartículas contendo *L. acidophilus*, obtidas por *spray chilling*.

Segundo Heidebach (2009), para aplicações em alimentos, o diâmetro médio das micropartículas é uma das características mais importantes, sendo que estas devem ser suficientemente pequenas para evitar um impacto sensorial negativo. Hansen et al. (2002), sugerem um tamanho em torno de 100 μm como desejável. As micropartículas obtidas por *spray chilling* apresentaram diâmetros bastante variados (Tabela 3.1). Porém, diâmetro médio inferior a 100 μm . As partículas obtiveram diâmetro médio de 40,3 μm , dentro de uma faixa granulométrica de 0,9 a 126,9 μm , para *B. lactis*, e 24,0 μm , dentro de uma faixa granulométrica de 0,6 a 126,9 μm , para *L. acidophilus*. As partículas de *L. acidophilus*, portanto, apresentaram menor diâmetro, provavelmente porque continham maior concentração de inóculo ou fase aquosa em sua constituição, logo geraram emulsões menos viscosas o que possibilitou a atomização de gotículas menores e logo a obtenção de partículas menores.

O tamanho da cápsula parece influenciar também na proteção dos microrganismos frente aos fluidos gástricos. Estudos realizados por Chandramoulia et al. (2004) indicaram que, quanto maior o tamanho da cápsula, maior a viabilidade de *Lactobacillus* em condições gástricas simuladas. No presente trabalho, no entanto, a encapsulação aumentou a resistência dos probióticos independente do tamanho da cápsula.

Tabela 3.1 - Diâmetro médio (μm) das micropartículas obtidas por *spray chilling*.

Microrganismo	D(4,3)*	D(0,1)**	D(0,75)***
<i>B. lactis</i>	40,3	61,4	72,0
<i>L. acidophilus</i>	24,0	34,9	47,1

* diâmetro médio das partículas em volume.

** diâmetro da partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada.

*** diâmetro da partícula correspondente a 75% da distribuição acumulada.

3.3.5 Resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* ao processo de microencapsulação

Uma vez que a microencapsulação de microrganismos probióticos é aplicada com objetivo de aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura, a escolha do método de encapsulação é muito importante (OLIVEIRA et al., 2007a; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002). As técnicas mais comumente utilizadas na microencapsulação de probióticos são extrusão, emulsão, *spray drying*, entre outros (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). A microencapsulação por *spray chilling* representa um método alternativo, que pode proporcionar a utilização de diferentes tipos de agentes encapsulantes. No entanto, nada se sabe sobre os efeitos deste método sobre a viabilidade das células e a proteção proporcionada contra os agentes externos. Os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 3.2) indicam que microencapsulação por *spray chilling* não foi agressiva aos microrganismos, uma vez que a viabilidade das células não foi afetada. Além disso, pode-se prever que as condições empregadas neste processo, tais como, homogeneização, atomização e

resfriamento foram suficientemente brandas, garantindo a integridade celular da maioria da população.

Tabela 3.2 – Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* ao processo de microencapsulação por *spray chilling*.

	Células viáveis (Log 10 UFC/g)	
	Emulsão	Cápsula
<i>B. lactis</i>	8,2 ± 0,1	8,3 ± 0,1
<i>L. acidophilus</i>	6,5 ± 0,3	7,0 ± 0,3

3.3.6 Resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* aos fluidos gástrico e intestinal simulados

Para que os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ocorram *B. lactis* e *L. acidophilus* devem sobreviver à passagem pelo estômago e colonizar o intestino (KIM et al., 2008). No entanto, um dos maiores problemas para a eficácia de alimentos contendo probióticos é a baixa sobrevivência dos microrganismos ao pH gástrico e alta concentração de bile do intestino (SABIKHI et al., 2010). No presente estudo, a microencapsulação, por *spray chilling*, utilizando gordura de palma, proporcionou proteção a ambos *B. lactis* e *L. acidophilus*, frente aos fluidos gástricos e intestinais simulados. Uma maior proteção, no entanto, foi conferida às células de *L. acidophilus* que, na forma livre alcançaram o limite de detecção do método (10^2 UFC/g), em 210 minutos (Gráfico 3.2). Porém, quando encapsuladas, 91,8% das células permaneceram viáveis, sofrendo apenas 0,5 reduções decimais, durante as cinco horas de incubação. As células livres de *B. lactis*, no entanto, mostraram-se mais resistentes aos FGS e FGI, tendo uma queda de 0,1 log UFC/g, nos primeiros 120 minutos e 1,3 log UFC/g, após 5 horas de ensaio. A encapsulação aumentou a viabilidade deste microrganismo frente aos fluidos gástrico e intestinais de 87,1, nas células livres, para 90,7%, nas encapsuladas em gordura de palma, que sofreram redução decimal de 0,7 log UFC/g, sendo 0,5 log UFC/g nos 120 primeiros minutos. Os resultados obtidos sugerem que a micropartícula lipídica chega ao intestino com

alta viabilidade dos microrganismos e, sendo digerida por lipases, proporciona liberação controlada no site de ação do microrganismo probiótico.

A proteção necessária para a sobrevivência do microrganismo encapsulado, quando submetido a altas concentrações de íons H^+ , está associada a fatores tais como tamanho da partícula, além da concentração e características do agente encapsulante utilizado (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; DESMOND et al., 2002). No presente trabalho a gordura de palma conferiu proteção aos probióticos, independente do tamanho da cápsula e proporção do agente encapsulante. Sendo a gordura de palma composta de triacilgliceróis, com distintos pontos de fusão, há possibilidade de formação de cristais com morfologias e tamanhos distintos, após o processo de *spray chilling*, o que pode ter contribuído para uma melhor acomodação destes cristais durante a formação da parede da cápsula e, portanto, para uma cápsula com estrutura mais compactada, e menor permeabilidade aos íons H^+ , por exemplo.

Outros estudos confirmam a aumento da resistência de probióticos microencapsulados quando expostos ao FGS e FIS, comparado às células livre. *L. acidophilus* encapsulados em alginato de sódio mostraram-se mais resistentes que as células livres, quando submetidos a testes *in vitro* simulando condições gástricas e intestinais (MOKARRAM et al., 2009; KIM et al., 2008; SABIKHI et al., 2010). Resultados semelhantes foram observados por Favaro-Trindade e Grosso (2002), que avaliaram a tolerância dos *L. acidophilus* e *B. lactis* microencapsulados em acetato ftalato de celulose, pela técnica de *spray drying*, em soluções de pH e bile, similares às encontradas no estômago e intestino. A microencapsulação mostrou-se bastante eficiente, enquanto que, na forma livre, a viabilidade das células tenha sido eliminada após uma hora de exposição às soluções.

De acordo com Gbassi et al. (2009), a encapsulação de *L. plantarum* 299v, *L. plantarum* 800 e *L. plantarum* CIP A159, em uma matriz de alginato coberta por proteínas do soro de leite, aumentou a sobrevivência destes microrganismos quando submetidos aos fluidos gastrointestinais simulados, com redução decimal de 2,2, 3,4 e 4,2 UFC/g, respectivamente. Liserre et al. (2007) reportaram que micropartículas de alginato contendo quitosana e polímeros entéricos na formulação, especialmente Acryl-Eze, alcançaram melhor sobrevivência no meio similar ao trato gastrointestinal.

Outros estudos, no entanto, mostraram que a microencapsulação em alginato de cálcio (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000), assim como em um mistura de

alginato e amido (SULTANA et al., 2000), não aumentou a resistência de *L. acidophilus* e *B. lactis* frente à acidez do estômago e presença de sais biliares.

Gráfico 3.2 - Sobrevivência de *B. lactis* (—) e *L. acidophilus* (—) livres (♦) e encapsulados (●) nos fluidos gástrico e intestinal.

3.3.7 Viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

Danos às células e perda de viabilidade podem ocorrer não somente durante o processamento, mas também durante o armazenamento do produto. Portanto, um bom sistema de encapsulamento deve assegurar que os microrganismos probióticos permaneçam viáveis nas partículas, durante todo o período de estocagem.

No presente estudo, a população de *B. lactis* livres mostrou-se instável durante o armazenamento, perdendo viabilidade ao longo dos 90 dias de estocagem, com redução decimal de 7,80 (37°C), 7,46 (7°C) e 4,53 log UFC/g (-18°C) (Tabela 3.3). A perda da viabilidade, durante estocagem, pode estar relacionada a uma série de fatores, incluindo formação de radicais livres, na presença de oxigênio, oxidação de ácidos graxos e danos no DNA das células (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1997). A encapsulação de *B. lactis*, no entanto, melhorou a estabilidade das células, que sofreram reduções de 4,83 (37°C), 4,82 (7°C) e 1,85 log UFC/g (-18°C), durante o mesmo período de estocagem. Porém,

considerando a concentração mínima de probióticos nas micropartículas de 10^6 UFC/g, a vida útil das micropartículas de *B. lactis* foi inferior a 30 dias, quando armazenadas sob 37°C e entre 60 e 90 dias, sob 7 e -18°C. Estes resultados condizem com Desmond et al. (2002), que obtiveram maior viabilidade de *L. paracasei* NFBC 338, microencapsulado por *spray drying*, em goma arábica, quando menor temperatura de estocagem foi utilizada.

Tabela 3.3 - Estabilidade de *B. lactis* livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.

	Livre			Encapsulado		
	37°C	7°C	-18°C	37°C	7°C	-18°C
0	9,89 ± 0,16	9,89 ± 0,16	9,89 ± 0,16	7,36 ± 0,11	7,36 ± 0,11	7,36 ± 0,11
30	7,35 ± 0,14	10,73 ± 0,36	9,65 ± 0,11	5,89 ± 0,16	6,31 ± 0,01	5,17 ± 0,18
60	6,06 ± 0,36	6,13 ± 0,16	5,06 ± 0,05	5,30 ± 0,26	8,08 ± 0,15	7,59 ± 0,02
90	2,09 ± 0,19	2,42 ± 0,06	5,36 ± 0,26	2,53 ± 0,12	2,54 ± 0,26	5,51 ± 0,36

As micropartículas lipídicas também melhoraram a estabilidade de *L. acidophilus*, durante a estocagem, principalmente a 37 e 7°C, onde as células livres perderam viabilidade antes dos 30 e 60 dias de estocagem, respectivamente (Tabela 3.4). Os microrganismos encapsulados, no entanto, permaneceram viáveis em concentrações acima 10^6 UFC/g, entre 30 e 60 dias de estocagem somente. Resultados promissores, no entanto, foram alcançados com as partículas armazenadas sob congelamento, que asseguraram 90 dias de vida de prateleira, onde a microencapsulação aumentou a viabilidade das células de 36,6% (células livres) para 80,5% (células encapsuladas).

Os resultados obtidos indicam que, assim como encontrado por Desmond et al. (2002), quanto menor a temperatura de estocagem utilizada, mais eficaz é o efeito da microcápsula na manutenção da viabilidade dos probióticos, proporcionando maior vida de prateleira. Menores temperaturas empregadas podem retardar o rearranjo dos cristais, característicos de muitos lipídios, que pode proporcionar a expulsão do recheio e consequente exposição aos fatores ambientais e perda de viabilidade microbiana.

Tabela 3.4 - Estabilidade de *L. acidophilus* livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.

	Livre			Encapsulado		
	37°C	7°C	-18°C	37°C	7°C	-18°C
0	9,53 ± 0,06	9,53 ± 0,06	9,53 ± 0,06	8,16 ± 0,11	8,16 ± 0,11	8,16 ± 0,11
30	Sc	4,98 ± 0,13	8,41 ± 0,09	6,99 ± 0,13	9,08 ± 0,16	8,00 ± 0,21
60	Sc	Sc	2,00 ± 0,00	4,77 ± 0,10	4,35 ± 0,10	4,53 ± 0,02
90	Sc	Sc	3,45 ± 0,15	5,11 ± 0,03	4,25 ± 0,26	6,56 ± 0,16

Sc = Sem crescimento.

3.4 Conclusão

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir que a tecnologia de encapsulação por *spray chilling*, utilizando gordura de palma, como agente encapsulante, proporcionou a obtenção micropartículas eficientes na proteção dos probióticos na passagem pelos fluidos gástrico e intestinal simulados, e na manutenção da estabilidade das células, quando estocados sob baixas temperaturas. Além disso, a morfologia e o tamanho das micropartículas obtidas permitem fácil escoamento do material e incorporação em alimentos sem prejuízo de suas características sensoriais.

As micropartículas lipídicas obtidas são, portanto, uma matriz inovadora para a aplicação de probióticos, de baixo custo e com grande possibilidade de obtenção em escala industrial.

O desafio futuro para o presente estudo é a seleção de um agente encapsulante que aumente a estabilidade das células, em temperaturas ambiente de refrigeração, a fim de facilitar sua estocagem e a aplicação destas micropartículas em produtos alimentícios.

4 - CAPÍTULO 2

PRODUÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS DE MANTEIGA DE CACAU CONTENDO *B. LACTIS* OU *L. ACIDOPHILUS* POR *SPRAY CHILLING*

RESUMO

Células de *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* foram encapsuladas em manteiga de cacau, utilizando a tecnologia de *spray chilling*. O diâmetro médio e a morfologia das micropartículas foram avaliados. Ensaio de sobrevivência foram conduzidos com objetivo de avaliar a resistência dos microrganismos ao processo de encapsulação, resistência *in vitro* aos fluidos gástrico e intestinal simulados (FGS e FIS) e estabilidade durante 90 dias de armazenamento a -18, 7 e 20°C. O processo de microencapsulação não afetou a viabilidade das células. Células livres e encapsuladas de *B. lactis* mostraram-se resistentes aos fluidos gástrico e intestinal, apresentando redução decimal de 1,3 log UFC/g. A microencapsulação, no entanto, garantiu a sobrevivência de 67% das células de *L. acidophilus* aos FGS e FIS que, quando livres, atingiram o limite de detecção do método em 210 minutos. Micropartículas armazenadas sob 20°C não foram eficientes na proteção dos probióticos aos efeitos do ambiente. Quando armazenadas a 7°C, a população de *L. acidophilus* encapsulados decresceu drasticamente: 20% das células, somente, mantiveram-se viáveis ao fim dos 90 dias de estocagem. Esta temperatura de estocagem foi mais favorável aos *B. lactis* encapsulados, que apresentaram redução decimal de 2 ciclos log e 72,1% de células viáveis, durante o mesmo período de estocagem. Resultados promissores, no entanto, foram alcançados com as micropartículas armazenadas sob congelamento, que asseguraram 90 dias de vida de prateleira. Portanto, as micropartículas de manteiga de cacau foram efetivas na proteção dos probióticos somente quando armazenadas sob congelamento, o que limita a aplicação destas partículas em produtos alimentícios.

Palavras-chave: probióticos, encapsulação, *spray cooling*, viabilidade.

4.1 Introdução

O uso de bactérias probióticas em alimentos, com objetivo de proporcionar efeitos benéficos à saúde, é hoje um interesse crescente para ambas as indústrias de alimentos e comunidade científica. Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2002). Dentre os probióticos com alegações de propriedade funcional aprovadas, encontram-se as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e, em menor escala, *Enterococcus faecium* (ANVISA, 200-?).

Para garantir que um produto com alegação de propriedades funcionais proverá uma quantidade adequada de probióticos, a quantidade mínima viável do microrganismo, até o final do prazo de validade do produto, deve estar situada na faixa de 10^7 a 10^9 UFC, em sua recomendação diária. Além disso, deve ser comprovada a resistência da cultura à acidez gástrica e aos sais biliares (ANVISA, 200-?), para que os probióticos cheguem viáveis ao intestino para colonizarem e, enfim, exercerem os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro.

A aplicação de probióticos esbarra, no entanto, na dificuldade de elaborar produtos que ofereçam viabilidade, durante toda a vida útil do produto, uma vez que algumas cepas desses microrganismos são extremamente sensíveis a fatores como meio ácido e oxigênio (KAILASAPATHY; CHIN, 2000). Neste contexto, a microencapsulação tem sido frequentemente estudada com objetivo de promover proteção (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; LISERRE; RÉ; FRANCO, 2007; SHIMA et al., 2009), manutenção da viabilidade da bactéria, durante toda vida útil do produto, liberação controlada no site de ação do microrganismo e diminuição da multiplicação no alimento, prevenindo alterações sensoriais (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

As técnicas de microencapsulação aplicadas em probióticos são atomização, *spray drying*, emulsão, coacervação, imobilização em gorduras e grânulos de amido e extrusão, sendo esta a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). As aplicações encontram-se, principalmente, em derivados do leite, tais como iogurtes, queijos, sobremesas e, mais recentemente, em bebidas, barras de cereais, biscoitos e chocolates (ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

Polissacarídeos tais como alginato, gelana, κ -carragena e amido são os materiais mais comumente empregados na microencapsulação de bifidobactérias e lactobacilos (ROKKA; RANTAMAKI, 2010). Lahtinen et al. (2007), no entanto, imobilizaram bifidobactérias em uma matriz lipídica, a base de manteiga de cacau, o que resultou em um aumento da viabilidade da bactéria, durante estocagem, em modelos simulando bebidas fermentadas e não-fermentadas. Este resultado sugere que a matriz lipídica pode proteger os microrganismos frente à exposição à água e íons H^+ . Além disso, a incorporação de probióticos em micropartículas lipídicas parece ser extremamente interessante, uma vez que os lipídios têm a vantagem de serem facilmente digeridos no intestino pelas lipases, possibilitando a liberação do microrganismo probiótico em seu local de ação (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

A tecnologia de encapsulação por *spray chilling* utiliza lipídios como agente encapsulante. Esta técnica é similar ao *spray drying*, no entanto, fundamenta-se na injeção de ar frio para permitir a solidificação da partícula. A microencapsulação ocorre quando uma mistura contendo o ingrediente ativo (ou recheio) e o agente encapsulante é atomizada, na forma de gotículas, que rapidamente solidificam na presença do ar frio (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007). Partículas do tipo “matriz” são formadas, em que uma porção significativa do recheio fica aderida à superfície da micropartícula, tendo direto acesso ao ambiente externo. Desta forma, as micropartículas produzidas podem apresentar algumas desvantagens, incluindo baixa capacidade de encapsulação, além da expulsão do ingrediente ativo durante estocagem, devido à estrutura cristalina e polimorfismo característicos de muitos lipídios (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997; SATO; UENO, 2005). A microencapsulação por *spray chilling*, no entanto, é considerada a tecnologia de encapsulação mais barata, pelo emprego de temperaturas amenas, com grande possibilidade de *scale-up* (WESTESEN; BUNJES; KOCH, 1997; GOUIN, 2004; SATO; UENO, 2005).

Até o momento, a encapsulação por *spray chilling* tem sido aplicada para conservar enzimas, *flavors*, minerais e condimentos (DE VOS et al. 2010). Aplicações encontram-se em sopas secas, produtos de panificação e produtos contendo alta taxa de gordura (GIBBS et al., 1999). Schrooyen et al. (2001), por exemplo, encapsularam vitamina C para aplicação em alimentos sólidos, tais como barras de cereais, biscoitos e pães.

Devido à possibilidade de utilização de lipídios com baixo ponto de fusão, como material de parede, o *spray chilling* pode ser uma alternativa para a microencapsulação de probióticos, permitindo baixo custo de operação e liberação controlada do microrganismo. De acordo com Champagne e Fustier (2007), o uso do *spray chilling*, pode expandir o número de matrizes disponíveis para aplicação de probióticos, além de gerar micropartículas de menor diâmetro, o que é desejável, sensorialmente. No entanto, nenhum estudo científico sobre a utilização desta técnica para microencapsulação de probióticos foi encontrado.

Este estudo teve como objetivo a produção e avaliação de micropartículas lipídicas de *B. lactis* e *L. acidophilus*, produzidas por *spray chilling*, utilizando manteiga de cacau como agente encapsulante.

4.2 Material e Métodos

4.2.1. Material

Como núcleo ou material ativo foram utilizadas as culturas *B. lactis* (BI-01) e *L. acidophilus* (LAC-04) na forma liofilizada, gentilmente doadas pela Danisco (Brasil).

Como agente encapsulante foi utilizada manteiga de cacau da Emfal (Brasil).

Lecitina de soja em pó, da Gerbrás (Brasil), foi utilizada como emulsificante no preparo da emulsão A/O para a produção das micropartículas.

4.2.2 Análise do comportamento térmico dos encapsulantes

Com objetivo de caracterizar as gorduras, especialmente em relação ao ponto de fusão, análise térmica foi realizada, utilizando-se calorimetria diferencial de varredura (DSC TA Instruments, Newcastle, USA). Para isto, cerca de 10 mg da amostra de gordura foi acondicionada em cápsula de alumínio e aquecida a 10°C/min, entre 0 e 100°C, sob atmosfera inerte (45 mL/min de N₂). Uma cápsula

vazia foi utilizada como referência. Nitrogênio líquido foi usado para a refrigeração de amostra antes de cada corrida.

4.2.3 Preparo de inóculo de *B. lactis* e *L. acidophilus*

B. lactis (BI-01) e *L. acidophilus* (LAC-04), foram reativados de acordo com o método descrito por Liserre et al (2007), com algumas modificações. As culturas liofilizadas (0,15%) foram ativadas em leite desnatado reconstituído, suplementado com extrato de levedura (1%), glicose (1%), citrato de sódio (1%) e L-cisteína (0,05%), durante 20 horas, à 37°C. O caldo fermentado foi centrifugado a 2360 x g, por 8 minutos, e lavado em solução de NaCl (0,85%), por duas vezes. As células foram então suspensas nesta solução salina, para obtenção de uma suspensão com aproximadamente 10^9 - 10^{10} UFC/mL.

4.2.4 Enumeração de *B. lactis* e *L. acidophilus*

A enumeração das células viáveis de *B. lactis* e *L. acidophilus* foi realizada através de plaqueamento em profundidade, em Ágar MRS, de acordo com o método descrito por Grosso e Fávaro-Trindade (2004), com algumas modificações. Para *B. lactis*, o Ágar MRS foi suplementado com cloreto de lítio (0,1%), L-cisteína e azul de anilina (0,01%). Diluições seriadas foram preparadas em solução de citrato de sódio 2%, aquecidos a 40°C, para liberação prévia das células do material encapsulado. As placas foram incubadas em jarras contendo anaerobac (Probac, Brasil), o qual gera ambiente de anaerobiose, a 37°C por 72h. O plaqueamento foi realizado em duplicata.

4.2.5 Microencapsulação por *spray chilling*

Os ensaios de microencapsulação foram realizados no Laboratório de Controle de Qualidade, do Departamento de Planejamento Alimentar e Nutrição da FEA/UNICAMP. As micropartículas foram produzidas por *spray chilling*, de acordo com o método descrito por Chambi et al. (2008), com algumas modificações. Uma

solução contendo manteiga de cacau previamente derretida, inóculo e lecitina (1%), como emulsificante, foi homogeneizada em Ultraturrax (IKA-T10) a 9.500 rpm, por 60 segundos. Foram utilizadas as proporções de inóculo: gordura de 1:10 (*B. lactis*) e 1:4 (*L. acidophilus*), com o objetivo de atingir ao menos a contagem de 10^7 UFC/g nas micropartículas. As micropartículas lipídicas foram formadas pela atomização da emulsão em câmara fria, a 10°C, utilizando atomizador duplo fluido ($\varnothing = 0,7$ mm), com pressão do ar de 1,0 kgf/cm². As micropartículas foram mantidas congeladas para futuros ensaios de resistência e caracterização. Para os testes de viabilidade durante estocagem, as cápsulas foram armazenadas a -18, 7 e 20°C.

4.2.6 Caracterização das micropartículas

4.2.6.1 Morfologia das micropartículas

A morfologia das partículas lipídicas foi avaliada por microscopia eletrônica de varredura (MEV), conforme metodologia descrita em Oliveira et al. (2007a), e microscopia óptica, utilizando uma câmara digital e o programa Global Lab Image.

4.2.6.2 Diâmetro e distribuição de tamanho das micropartículas

O diâmetro médio, D(4,3), das micropartículas foi determinado por difração de raio laser, através do analisador Shimadzu Sald-201V (Japão). Também foram determinados os valores de diâmetro da partícula correspondente a 10%, D(0,1), e 75%, D(0,75), da distribuição acumulada.

4.2.7 Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* à microencapsulação

Com objetivo de determinar os efeitos do processo de microencapsulação na viabilidade dos microrganismos, *B. lactis* e *L. acidophilus* foram enumerados antes do processo de encapsulação (na emulsão) e nas micropartículas obtidas.

4.2.8 Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *B. lactis* e *L. acidophilus* nos fluidos gástrico e intestinal

A resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* nas formas livre, em inóculo, e encapsulados, em sistemas similares ao fluido gástrico (FGS) e intestinal (FIS), foram avaliadas, de acordo com os procedimentos descritos por Gbassi et al. (2009). As partículas foram inicialmente submetidas ao FGS, composto por cloreto de sódio (9 g/L), pepsina da mucosa estomacal de suínos (Sigma-Aldrich) (3 g/L), e pH ajustado para 1,8, com ácido clorídrico, durante 120 minutos. Neste pH, é atingida a atividade máxima da enzima pepsina (TOBEY et al., 2001).

Posteriormente, as micropartículas foram submetidas ao FIS, composto de cloreto de sódio (9 g/L), pancreatina e tripsina de pâncreas de bovinos (10 g/L) (Sigma-Aldrich) e sais biliares (3 g/L) (Oxgall, Difco), e pH ajustado para 6,5, com hidróxido de sódio, durante 180 minutos, a 37°C, totalizando 5 horas de ensaio. Alíquotas foram removidas nos tempos 0, 60 e 120 (FGS), e 0, 90 e 180 minutos de incubação (FIS), para avaliação da sobrevivência das células.

4.2.9 Avaliação da estabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

Com objetivo de determinar a vida de prateleira das micropartículas, foram realizadas contagens nestes sistemas após 0, 30, 60 e 90 dias de estocagem, a -18, 7 e 20°C, seguindo a técnica descrita por Oliveira et al. (2007a).

4.3 Resultados e Discussão

4.3.1 Análise do comportamento térmico do encapsulante

Através da análise de DSC, determinou-se o ponto de fusão da manteiga de cacau - 36,5°C - informação importante, uma vez que permite a aplicação da menor temperatura necessária para a fusão da gordura, no processo de microencapsulação e, portanto, minimiza as chances de danos térmicos aos microrganismos probióticos.

Pela análise do Gráfico 4.1, verifica-se que manteiga de cacau apresentou um pico com base relativamente larga, o que é indicativo de presença de triacilgliceróis, com distintos pontos de fusão. Isto pode ocasionar menor estabilidade térmica durante a estocagem e manipulação das micropartículas. Por outro lado, há possibilidade de formação de cristais com morfologias e tamanhos distintos, após o processo de *spray chilling*, o que pode contribuir para uma melhor acomodação destes cristais durante a formação da parede da partícula, e, portanto, para uma partícula com estrutura mais compactada, onde se espera menor permeabilidade ao oxigênio, íons H^+ e demais fatores deletérios às culturas probióticas.

Gráfico 4.1 – Ponto de fusão da gordura de palma interesterificada, obtido por DSC.

4.3.2 Caracterização morfológica e distribuição e tamanho das micropartículas

De acordo com as micrografias ópticas (Figura 4.1A e 4.1B), verificou-se que a microencapsulação de *B. lactis* e *L. acidophilus*, por *spray chilling* utilizando manteiga de cacau, originou partículas esféricas, o que é interessante, uma vez que este formato favorece o escoamento do material. Não foi possível verificar a

presença de microrganismos nas partículas, em função destas não terem recebido coloração de Gram.

Avaliando-se as Figura 4.1A e 4.1B, é possível afirmar que as partículas produzidas são do tipo matricial, onde o material ativo não está localizado somente no centro e perfeitamente recoberto pelo encapsulante, mas disperso por toda a partícula, podendo estar inclusive na superfície. Em função desta constituição, muitos autores denominam este tipo de partícula de microesferas (AZEREDO, 2005; JAFARI et al. 2008; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

As células dos microrganismos não foram visíveis na superfície das microesferas nem mesmo pela técnica de microscopia eletrônica de varredura (Figuras 4.2A e 4.2B). Todavia, esta técnica confirmou que havia algumas aglomerações das micropartículas e que estas apresentavam formato esférico. Este formato também foi observado por Rodriguez et al. (1999) quando estes autores encapsularam drogas por *spray-congealing* utilizando ácido esteárico como encapsulante e por Savolainen et al. (2002) e Chambi et al. (2008) quando estes autores encapsularam drogas e compostos solúveis em água de diferentes massas moleculares por *spray chilling* utilizando ácido esteárico e misturas de ácido esteárico, láurico, oléico e *sorbitan tristearate* como encapsulantes, respectivamente.

A técnica ainda revelou que as superfícies das microesferas produzidas neste estudo eram imperfeitas e apresentavam rugosidades. As imperfeições na superfície das microesferas obtidas neste estudo podem ser creditadas ao fato do material atomizado ser heterogêneo, ou seja, uma emulsão A/O composta por inúmeros constituintes, inclusive com uma fração lipídica bastante heterogênea. Rodriguez et al. (1999) e Chambi et al. (2008) também observaram imperfeições e/ou rugosidades, na superfície das microesferas que produziram e as atribuíram à presença de ácido esteárico na formulação das microesferas.

Figura 4.1 – Fotomicrografias ópticas das micropartículas contendo *B. lactis* (A) e *L. acidophilus* (B), obtidas por *spray chilling*.

Figura 4.2 – Fotomicrografias eletrônica de varredura das micropartículas de *L. acidophilus*, obtidas por *spray chilling*.

Para evitar um impacto sensorial negativo, o diâmetro médio das micropartículas aplicadas em alimentos devem ser, suficientemente, pequenos (HEIDEBACH, 2009). Hansen et al. (2002), sugerem um tamanho em torno de 100 μm . As micropartículas obtidas por *spray chilling* apresentaram diâmetros bastante variados (Tabela 4.1). Porém, diâmetro médio inferior a 100 μm . As partículas obtiveram diâmetro médio de 44,4 μm , dentro de uma faixa granulométrica de 1,6 a 126,9 μm (*Bifidobacterium*) e 49,6 μm , dentro de uma faixa granulométrica de 2,2 a 126,9 μm (*Lactobacillus*). Estes resultados indicam que tamanhos semelhantes de partículas foram obtidos independente da proporção inóculo:gordura utilizada. Gifani et al. (2009) encapsularam ácido salicílico em cera de abelha, por *melt dispersion*, e

observaram que quanto menores os valores de concentração de emulsificante, velocidade e tempo de emulsão aplicados, menor o tamanho da micropartícula obtida. Desta forma, a padronização destes parâmetros de processo é importante, uma vez que eles podem interferir no tamanho das partículas obtidas.

Tabela 4.1 - Diâmetro médio (μm) das micropartículas obtidas por *spray chilling*.

Microrganismo	D(4,3)*	D(0,1)**	D(0,75)***
<i>B. lactis</i>	44,4	3,0	60,9
<i>L. acidophilus</i>	49,6	0,4	66,1

* diâmetro médio das partículas em volume.

** diâmetro da partícula correspondente a 10% da distribuição acumulada.

*** diâmetro da partícula correspondente a 75% da distribuição acumulada.

4.3.3 Resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* ao processo de microencapsulação

Uma vez que a microencapsulação de microrganismos probióticos é aplicada com objetivo de aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura, a escolha do método de encapsulação é muito importante (OLIVEIRA et al., 2007a; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002). Dentre as técnicas de microencapsulação de probióticos, a extrusão é a mais popularmente empregada, devido ao baixo custo e simplicidade, além de não envolver altas temperaturas (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). A microencapsulação por *spray chilling* representa um método alternativo, que pode proporcionar novas opções de agentes encapsulantes. No entanto, nada se sabe sobre os efeitos deste método sobre a manutenção da viabilidade das células e a proteção proporcionada contra os agentes externos. Os resultados obtidos no presente trabalho (Tabela 4.2) indicam que microencapsulação por *spray chilling* não foi agressiva aos microrganismos, uma vez que a viabilidade das células não foi afetada. Além disso, pode-se prever que as condições empregadas neste processo, tais como, homogeneização, atomização e resfriamento foram suficientemente brandas, garantindo a integridade celular da maioria da população.

Tabela 4.2 – Avaliação da resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* ao processo de microencapsulação por *spray chilling*.

	Células viáveis (Log 10 UFC/g)	
	Emulsão	Cápsula
<i>B. lactis</i>	8,3 ± 0,2	8,2 ± 0,0
<i>L. acidophilus</i>	6,5 ± 0,3	6,6 ± 0,2

4.3.4 Resistência de *B. lactis* e *L. acidophilus* aos fluidos gástrico e intestinal simulados

Para que os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro ocorram, os probióticos devem sobreviver à passagem pelo estômago e colonizar o intestino (KIM et al., 2008). No entanto, um dos maiores problemas encontrados é a baixa sobrevivência dos microrganismos ao pH gástrico e alta concentração de bile no intestino (SABIKHI et al., 2010).

Alguns estudos indicam um aumento da resistência de *L. acidophilus* encapsulados em alginato de sódio, comparado às células livres, quando submetidos a testes *in vitro* simulando condições gástricas e intestinais (MOKARRAM et al., 2009; KIM et al., 2008; SABIKHI et al., 2010). Outros estudos, no entanto, mostraram que a microencapsulação em alginato de cálcio (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2000), assim como em uma mistura de alginato e amido (SULTANA et al., 2000), não aumentou a resistência de *L. acidophilus* e *B. lactis* frente à acidez do estômago e presença de sais biliares.

No presente estudo, *B. lactis* livres mostraram-se bastante resistentes aos fluidos gástrico e intestinal, tendo uma queda de 0,1 log UFC/g, nos primeiros 120 minutos e 1,3 log UFC/g, após 5 horas de ensaio (Gráfico 4.2). Para as células encapsuladas, a mesma redução de 1,3 log UFC/g foi observada, indicando que a microencapsulação não aumentou a resistência das células frente aos fluidos gastrointestinais. Devido ao baixo ponto de fusão da manteiga de cacau, à 37°C, temperatura utilizada neste ensaio, parte dos triacilgliceróis que a compõem está no estado líquido, proporcionando desintegração da partícula e liberação parcial

prematura dos microrganismos, no FGS. Além disso, estando a estrutura da microcápsula menos compactada, aumenta permeabilidade aos íons H^+ , por exemplo. Para evitar a formação de cristais com baixos pontos de fusão, as condições do processo de resfriamento subsequente devem ser otimizadas para evitar formas de cristais com baixos pontos de fusão (LAHTINEN et al., 2007).

No entanto, para as células de *L. acidophilus*, considerando que na forma livre elas alcançaram o limite de detecção do método (10^2 UFC/g), em 210 minutos, a microencapsulação aumentou a resistência das células, que permaneceram viáveis (67%), durante as cinco horas de incubação, sofrendo 2,7 reduções decimais. Portanto, considerando esta perda de viabilidade, faz-se necessário uma contagem inicial de *L. acidophilus* nas micropartículas mais elevada, para que esta chegue ao intestino ainda com alta viabilidade.

A proteção necessária para a sobrevivência do microrganismo encapsulado, quando submetido a meio ácidos, está associada a fatores tais como tamanho da cápsula, além da concentração e características do agente encapsulado utilizado (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; DESMOND et al., 2002). No presente trabalho, a diferença de comportamento de *B. lactis* e *L. acidophilus*, quando submetidos aos fluidos gastrointestinais, pode ser atribuída fatores incluindo espécies e gêneros de microrganismos mais resistentes.

Gráfico 4.2 – Sobrevivência de *B. lactis* (—) e *L. acidophilus* (—) livres (♦) e encapsulados (●) nos fluidos gástrico e intestinal.

4.3.5 Viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

Danos às células e perda de viabilidade podem ocorrer não somente durante o processamento, mas também durante o armazenamento do produto. Portanto, um bom sistema de encapsulamento deve assegurar que os microrganismos probióticos permaneçam viáveis nas partículas, durante todo o período de estocagem.

No presente estudo, a população de *B. lactis* livres mostrou-se instável durante o armazenamento, perdendo viabilidade ao longo dos 90 dias de estocagem, com redução decimal de 2,16 (20°C), 7,47 (7°C) e 4,53 log UFC/g (-18°C) (Tabela 4.3). A perda da viabilidade, durante estocagem, pode estar relacionada a uma série de fatores, incluindo formação de radicais livres, na presença de oxigênio, oxidação de ácidos graxos e danos no DNA das células (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1997). Células encapsuladas, armazenadas a 20°C tiveram maior perda de viabilidade, comparado às células livres, indicando que, nessas condições de estocagem, a encapsulação não conferiu maior estabilidade à células. Células encapsuladas mostraram-se mais estáveis durante estocagem a 7°C, apresentando redução decimal de 2 ciclos log e 72,1% de células viáveis após 90 dias de estocagem. Para que as micropartículas tenham uma maior vida útil, considerando esta perda de viabilidade, faz-se necessário uma contagem inicial de

B. lactis nas micropartículas mais elevada. Sob -18°C, a microcápsula aumentou a estabilidade das células durante os 90 dias de estocagem, proporcionando um aumento de vida útil de 30 (livres) para 90 dias de estocagem (encapsuladas).

Este resultado foi similar aos obtidos por Oliveira et al. (2007a) e Oliveira et al. (2007b) onde as populações de *B. lactis* encapsulado por coacervação complexa seguida de secagem em *spray-drying* e *spouted bed*, respectivamente, perderam sua viabilidade gradualmente durante estocagem a 37°C e 7°C, durante 120 dias de estocagem. Diante do exposto, a manutenção da viabilidade das células encapsuladas de *B. lactis*, à temperatura ambiente ou sob refrigeração, continua sendo um desafio para a tecnologia de microencapsulação.

Tabela 4.3 - Estabilidade de *B. lactis* livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.

	Livre			Encapsulado		
	20°C	7°C	-18°C	20°C	7°C	-18°C
0	9,98 ± 0,02	9,89 ± 0,16	9,89 ± 0,16	7,15 ± 0,13	7,15 ± 0,13	7,15 ± 0,13
30	8,30 ± 0,05	10,73 ± 0,36	9,65 ± 0,11	5,08 ± 0,05	6,46 ± 0,15	7,18 ± 0,14
60	8,45 ± 0,06	6,13 ± 0,16	5,06 ± 0,05	5,32 ± 0,23	5,33 ± 0,04	8,10 ± 0,09
90	7,82 ± 0,07	2,42 ± 0,06	5,36 ± 0,26	3,79 ± 0,06	5,16 ± 0,07	7,34 ± 0,08

A população de *L. acidophilus* livres decresceu drasticamente, durante estocagem a 20 e 7°C, perdendo a viabilidade antes dos 30 e 60 dias, respectivamente (Tabela 4.4). Sob as mesmas temperaturas, a perda de viabilidade também foi grande nas células encapsuladas, em que menos de 20% dos probióticos mantiveram-se viáveis ao fim dos 90 dias de estocagem. Uma população mínima de 10⁶ UFC/g de micropartículas foi atingida somente no primeiro mês de estocagem.

Resultados promissores, no entanto, foram alcançados com as micropartículas armazenadas sob congelamento, que asseguraram 90 dias de vida de prateleira, onde a microencapsulação aumentou a viabilidade das células de 36,6% (células livres) para 81,1% (células encapsuladas).

Os resultados obtidos nos permite concluir que, assim como encontrado por Desmond et al. (2002), quanto menor a temperatura de estocagem utilizada, mais eficaz é o efeito da microcápsula na manutenção da viabilidade dos probióticos, proporcionando maior vida de prateleira. Menores temperaturas empregadas parecem retardar o rearranjo dos cristais, característicos de muitos lipídios, que pode proporcionar a expulsão do recheio e consequente exposição aos fatores ambientais e perda de viabilidade.

Tabela 4.4 - Estabilidade de *L. acidophilus* livres e encapsulados, durante 90 dias de estocagem.

	Livre			Encapsulado		
	20°C	7°C	-18°C	20°C	7°C	-18°C
0	9,43 ± 0,14	9,53 ± 0,06	9,53 ± 0,06	8,16 ± 0,11	8,16 ± 0,11	8,16 ± 0,11
30	Sc	4,98 ± 0,13	8,41 ± 0,09	3,94 ± 0,20	4,17 ± 0,05	8,33 ± 0,16
60	Sc	Sc	2,00 ± 0,00	2,62 ± 0,05	3,65 ± 0,07	8,62 ± 0,05
90	Sc	Sc	3,45 ± 0,15	1,59 ± 0,16	1,48 ± 0,00	6,62 ± 0,05

Sc = Sem crescimento.

4.4 CONCLUSÃO

De acordo com os resultados obtidos neste estudo, e considerando os objetivos propostos, pode-se concluir que a tecnologia de encapsulação por *spray chilling*, utilizando gordura de cacau, como agente encapsulante, proporcionou a obtenção micropartículas eficientes na proteção dos probióticos frente ao processo de encapsulação, passagem pelos fluidos gastrointestinais, no caso de *L. acidophilus*, e na manutenção da estabilidade das células, quando estocados sob congelamento. Além disso, a morfologia e granulometria das micropartículas obtidas permitem fácil escoamento no alimento, evitando um impacto sensorial negativo. As micropartículas lipídicas obtidas são, portanto, uma matriz inovadora para a aplicação de probióticos, de baixo custo e com grande possibilidade de obtenção em escala industrial.

O desafio futuro para o presente estudo é a seleção de um agente encapsulante que aumente a estabilidade das células, em temperaturas ambiente de

refrigeração, a fim de aumentar a aplicação destas micropartículas em produtos alimentícios.

5 - CONCLUSÕES

O presente estudo mostrou que a tecnologia de encapsulação por *spray chilling*, utilizando gordura de palma e manteiga de cacau, como agente encapsulante, permite a obtenção de micropartículas eficientes na proteção dos probióticos frente ao processo de encapsulação, passagem pelos fluidos gastrointestinais, e na manutenção da estabilidade das células, quando estocados sob temperatura de congelamento, principalmente. Além disso, a morfologia e granulometria das micropartículas obtidas permitem fácil escoamento no alimento, evitando um impacto tecnológico e sensorial negativo. As micropartículas lipídicas obtidas são, portanto, uma matriz inovadora para a aplicação de probióticos, de baixo custo e com grande possibilidade de obtenção em escala industrial.

O desafio futuro para o presente estudo é a seleção de um agente encapsulante que aumente a estabilidade das células, em temperaturas ambiente de refrigeração, a fim de aumentar a aplicação destas micropartículas em produtos alimentícios.

REFERÊNCIAS

AGHEYISI, R. The Probiotics Market: Ingredients, Supplements, Foods. Report Code: FOD035B. **BCC Research**, june 2008. Disponível em: <<http://www.bccresearch.com/report/FOD035B.html>>. Acesso em: 22 abril 2011.

ALBERTINI, B.; VITALI, B.; PASSERINI, N.; CRUCIANI, F.; DI SABATINO, M.; RODRIGUEZ, L.; BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v.40, p.359-366, 2010.

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.

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

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos & Nutrição**, v. 16, n.1, p. 89-97, 2005.

BAKAN, J. A. Microencapsulation of foods and related products. **Food Technology**, Chicago, v.27, n.11, p.34-44, 1973.

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

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries. **In: Polymeric delivery systems: properties and applications**. Oxford: Oxford University Press, chapter 3, p.42-52, 1993.

ANVISA. AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA. Alimentos com alegações de propriedades funcionais ou de saúde: alegações de propriedades

funcionais aprovadas. [200-?] Disponível em:

≤http://portal.anvisa.gov.br/wps/portal/anvisa/home/alimentos?cat=Alimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude&cat1=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Category%2FAlimentos+Com+Alegacoes+de+Propriedades+Funcionais+e+ou+de+Saude%2Fbf42a30040803883a2b0e642f89e3ba5%2FPUBLISHED&con=com.ibm.workplace.wcm.api.WCM_Content%2FAlegacoes+de+propriedade+funcional+Aprovadas%2F0409f3804005a2a49d509f54e035b7cb%2FPUBLISHED&showForm=no&siteArea=Alimentos&WCM_GLOBAL_CONTEXT=/wps/wcm/connect/Anvisa/Anvisa/Inicio/Alimentos/Publicacao+Alimentos/Alegacoes+de+propriedade+funcional+Aprovadas>. Acesso em: 22 abr. 2011.

CASTRO, H.P.; TEIXEIRA, P.M.; KIRBY, R. Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying. **Journal Applied Microbiology**, v.82, p.87-94, 1997.

CHAMBI H.N.M.; ALVIM I.D.; BARRERA-ARELLANO D.; GROSSO, C.R.F. Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterization and release profiles. **Food Research International**, v. 41, p. 229-236, 2008.

CHAMPAGNE, C.P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Food biotechnology**, v.18, p.184-190, 2007.

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

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, Long Hanborough, v.51, n.4, p.123-136, 1998.

CONSTANT, P.B L.; STRINGHETA, P.C. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Boletim da Sociedade ANVISA, 200-?eira de Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.36, n.1, p.12-18, 2002.

CUI, J.H.; GOH, J.S.; KIM, P.H.; CHOI, S.H.; LEE, B.J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceuticals**, v.210, p.51-9, 2000.

DASHEVSKY, A.; ZESSIN, G. The effect of ethylcellulose molecular weight on the properties of theophylline microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v.4, n.3, p.273-280, 1997.

DAVIDSON, R.H.; DUNCAN, S.E.; HACKNEY, C.R.; EIGEL, W.N.; BOLING, J.W. Probiotic culture survival and implications in fermented frozen yogurt characteristics. **Journal of Dairy Science**, v.83, p.666-673, 2000.

DE ROOS, K.B. Physicochemical models of flavor release from foods. In: ROBERTS, D.D.; TAYLOR, A.J. **Flavour release**. Washington, DC: ACS, 2000. p.126-141.

DE VOS, P.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v.20, p.292-302, 2010.

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

DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O' CALLAGHAN E.; FITZGERALD G.; STANTON C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p.1003-1011, 2002.

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

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of *L. acidophilus* and *B. lactis* and evaluation of their survival at the pHs values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Michwissenschaft**, v.55, p.496-499, 2000.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; HEINEMANN, R.J.B.; PEDROSO, D.L. Developments in probiotic encapsulation. **CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources**, v.6, n.4, p.1-8, 2011.

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

GANDER, B.; JOHANSEN, P.; NAM-TRÂN, H.; MERKLE, H.P. Thermodynamic approach to protein microencapsulation into poly (D,L-lactide) by spray drying. **International Journal of Pharmaceutics**, v.129, p.51-61, 1996.

GARDINER, G.E.; ROSS, R.P.; WALLACE, J.M.; SCANLAN, F.P.; JAGERS, P.P.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; STANTON, C. Influence of a probiotic adjunct culture of *Enterococcus faecium* on the quality of cheddar cheese. **Journal Agricultural and Food Chemistry**, v.47, n.12, p.4907-4916, 1999.

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

GIBBS, B. F.; KERMASH, 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.

GIFANI, A.; TAGHIZADEH, M.; SEIFKORDI, A.A.; ARDJMAND, M. Preparation and investigation the release behavior of wax microsphere loads with salicylic acid. **Journal of Microencapsulation**. v.26 (6), p.485-492, 2009.

GIUNCHEDI, P.; CONTE, U. Spray-drying as a preparation method of microparticulate drug delivery systems: overview. **STP Pharma Sciences**, Paris, v.5, p. 276-290, 1995.

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

GROSSO, C.R.F.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and immobilized *B. lactis* in yoghurt. **Brazilian Journal of Microbiology**, v.35, p.151-156, 2004.

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

HEIDEBACH, T. et al. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk Proteins. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.1670-1677, 2009.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **Lebensmittel-Wissenschaftat Technologie**, v.24, p. 289-297, 1991.

JAFARI, S.M.; ASSADPOOR, E.; HE, Y.; BHANDARI, B.; Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. **Drying Technology**, v.26, n.7, p. 816-835, 2008.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products - challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v.21, p.175-181, 2010.

JONKERS, D.; STOCKBRÜGGER, R. Review article: probiotics in gastrointestinal and liver diseases. **Alimentary Pharmacology and Therapeutics**, v.26, p.133-48, 2007.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p.80-8, 2000.

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

KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H. Alginate encapsulation bifidobacteria survival in mayonnaise. **Journal of Food Science** v.63, p.702-5, 1998.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, p.493-500, 2008.

KING, A.H. Encapsulation of food ingredients. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995. p.26-39. (ACS Symposium. Series, 590).

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

KWOK, K.K.; GROVES, M.J.; BURGESS, D.J. A novel method for the determination of sterility of microcapsules and measurement of viability of encapsulated organisms. **Pharmaceutical Research**, v.13, p.410-413, 1992.

LAHTINEN, S.J.; OUWEHAND, A.C.; SALMINEN, S.J.; FORSSELL, P.; MYLLÄRINEN, P. Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. **Letters in Applied Microbiology**, v.44, p.500-5, 2007.

LANNITTI, T.; PALMIERI, B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clinical Nutrition**, v.29, n.6, p.701-25, 2010.

LARROIA, S.; MARTIN, J.H. Bifidobacteria as possible dietary adjuncts in cultured dairy products - A review. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 25, p.18-22, 1990.

LILLY, D.M.E.; STILLWELL, R.H. Probiotics: growth promoting factors produced by microorganisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965.

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

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

MELLENTIN J. America wakes up to probiotics – but what's the best delivery system? **Functional Ingredients Magazine**, dez. 2007. Disponível em: <<http://www.functionalingredientsmag.com/article/Viewpoint/america-wakes-up-to-probiotics-8212-but-whats-the-best-delivery-.aspx>>. Acesso em: 22 abril 2011.

MODLER, H.W.; McKELLER, R.C.; YAGUCHI, M. Bifidobacteria and bifidogenic factors. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v.23, n.1, p.29-41, 1990.

MOKARRAM R.R.; MORTAZAVI S.A.; HABIBI NAJAFI M.B.; SHAHIDI F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Research International**, v.42, p.1040-1045, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; MORETTI, T.S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J.C.C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24, n.7, p. 685-69, 2007a.

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

OLIVEIRA, M.N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J.H.A.; SAAD, S.M.I. Aspectos tecnológicos de alimentos funcionais contendo probióticos. **Revista ANVISA, 200-ªeira de Ciências Farmacêuticas**, v.38, p.1-21, 2002.

PARKER, R.B. Probiotics, the other half of the antibiotics story. **Animal Nutrition and Health**, v.29, p.4-8, 1974.

PEREIRA, D.I.; GIBSON, G.R. Effects of consumption of probiotics and prebiotics on serum lipid levels in humans. **Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology**, v.37, p.259-81, 2002.

PSZCZOLA, D. Encapsulated ingredients: providing the right fit. **Food Technology**, v.52, n.12, p.70-77, 1998.

PUUPPONEN-PIMIÄ, R.; AURA, A.M.; OKSMANCALDENTY, K.M.; MYLLÄRINEN, P.; SAARELA, M.; MATTILA-SANHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of functional ingredients for gut health. **Trends Food Science and Technology**, Amsterdam, v.13, p.3-11, 2002.

RÉ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, p.1195-1236, 1998.

REID, G. Minireview - the scientific basis for probiotic strains of *Lactobacillus*. **Applied and Environmental. Microbiology**, Washington, v.65, n.9, p.3763-3766, 1999.

REINECCIUS, G.A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology**, v.51, n.3, p.144-146, 149, 1991.

RISCH, S.J. Encapsulation: overview of uses and techniques. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. **Encapsulation and controlled release of food ingredients**. Washington, DC: ACS, 1995, p.2-7. (ACS Symposium. Series, 590)

RODRIGUEZ, L.; PASSERINI, N.; CAVALLARI, C.; CINI, M.; SANCIN P.; FINI, A. Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomizer for pray-

congealing processes, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 183, p. 133-143, 1999.

ROKKA, S.; RANTAMAKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v.231, p.1-12, 2010.

ROSS, R.P.; STANTON, C.; HILL, C.; FITZGERALD, G.F.; COFFEY, A. Novel cultures for cheese improvement. **Trends in Food Science. Technology**, v.11, p.96-104, 2000.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D.K.; KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v.3, p.586-593, 2010.

SANDERS, M.E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.341-347, 1998.

SATO, K.; UENO, S. **Polymorphism in fats and oils. Industrial oil and fat products edible oil and fat products: Chemistry properties and health effects.** Inc F. Shahidi Ed., New York, USA, 2005.

SAVOLAINEN, M.; KHOO, C.; GLAD, H.; DAHLQVIST C.; JUPPO, A.M. Evaluation of controlled-release polar lipid microparticles, **International Journal of Pharmaceutics**, v. 244, p. 151-161. 2002.

SCHROOYEN, P.M.M.; VAN DER MEER, R.; KRUIF, C.G. Microencapsulation: its application in nutrition. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 60, p. 475-479, 2001.

SEVGI, F.; OZYAZICI, M.; GÜNERI, T. Sustained release dosage form of phenylpropanolamine hydrochloride. Part II: Formulation and in vitro release kinetics from tableted microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v.11, n.3, p. 335-344, 1994.

SHIMA, M.; MATSUO, T.; YAMASHITA, M.; ADACHI, S. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from bile salts in a model intestinal juice by incorporation into the inner-water phase of a W/O/W emulsion. **Food Hydrocolloids**, v.23, p.281-5, 2009.

SIUTA-CRUCÉ, P.; GOULET, J. Improving probiotic survival rates. **Food Technology**, Chicago, v.55, n.1, p. 36-42, 2001.

STANTON, C.; DESMOND, C.; COAKLEY, M.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD G.F.; ROSS, R.P. Challenges facing development of probiotic-containing functional foods. In: FARNWORTH, E.R., (Ed.). **Handbook of fermented functional foods**. Boca Raton: CRC Press, p.27-58, 2003.

STANTON, C.; GARDINER, G.; LYNCH, P.B.; COLLINS, J.K.; FITZGERALD, G.; ROSS, R.P. Probiotic cheese. **International Dairy Journal**, v.8, p.491-496, 1998.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v.62, n.1-2, p.47-55, 2000.

TOBEY, N.A.; HOSSEINI, S.S.; CAYMAZ-BOR, C.; WYATT, H.R.; ORLANDO, G.S.; ORLANDO, R.C. The role of pepsin in acid injury to esophageal epithelium. **American Journal of Gastroenterology**, v.96, n.11, p.3062-3070, 2001.

TODD, R.D. Microencapsulation and flavor industry. **Flavor Industry**, v.1, n.11, p.768-771, 1970.

WESTESEN, K.; BUNJES, H.; KOCH, M.H.J. Physicochemical characterization of lipid nanoparticles and evaluation of their drug loading capacity and sustained release potential. **Journal of Controlled Release**, v.48, p.223-236, 1997.

ZHAO, R.X.; SUN, J.L.; TORLEY, P. WANG, D.H.; NIU, S.Y. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology Biotechnology**, v.24, p.1349-54, 2008.