UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS

PAULA KIYOMI OKURO

Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas
por *spray chilling*

Pirassununga

2013

Paula Kiyomi Okuro

**“Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas
produzidas por *spray chilling*”**

Versão corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de
Zootecnia e Engenharia de Alimentos da
Universidade de São Paulo como parte
dos pré-requisitos para obtenção do
título de Mestre em Ciências

Área de concentração: Ciências da
Engenharia de Alimentos

Orientadora: Prof^a Dr^a Carmen Sílvia
Fávaro Trindade

Pirassununga

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

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

041d	<p>Okuro, Paula Kiyomi</p> <p>Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por <i>spray chilling</i> / Paula Kiyomi Okuro. -- Pirassununga, 2013. 220 f.</p> <p>Dissertação (Mestrado) -- Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos - Universidade de São Paulo. Departamento de Engenharia de Alimentos.</p> <p>Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos.</p> <p>Orientadora: Profa. Dra. Carmem Sílvia Fávaro Trindade.</p> <p>1. Microencapsulação 2. Probióticos 3. Prebióticos 4. Simbióticos 5. Matriz Lipídica 6. Sorvete. I. Título.</p>
------	--

Aos meus pais Aldo e Maria, minha eterna gratidão, por todos os ensinamentos, pelo apoio, para vocês quero dedicar o meu melhor...

Às minhas irmãs Renata e Márcia, pela amizade, pelo carinho, e admiração mútua.

Ao Pedro, por todo seu amor, apoio, companheirismo e paciência, pela nossa escrita a quatro mãos.

BIOGRAFIA

Paula Kiyomi Okuro, filha de Aldo Mitsuo Okuro e Maria Kimiko Obuti Okuro, nasceu na cidade de Taquarituba no interior do Estado de São Paulo em 29 de outubro de 1987.

Graduada em Engenharia de Alimentos pela Universidade de São Paulo na Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos no ano de 2011. Durante a graduação, participou de estágio e iniciação científica no Departamento de Engenharia de Alimentos desta mesma instituição.

Na área de pesquisa teve experiências na área de microbiologia, produção de aromas por micro-organismos, quelação de ferro com proteínas, e, diante da experiência do mestrado, microencapsulação de micro-organismos probióticos.

AGRADECIMENTOS

À Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade, pela oportunidade e orientação que possibilitaram a realização deste trabalho. Pela sua competência profissional, pelos ensinamentos, paciência, incentivo, pelo seu exemplo de dedicação e entusiasmo, que desde a graduação, me faz admirá-la. Ser sua orientada foi um encontro do qual levarei muitas coisas boas. Muito Obrigada por tudo!

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo pela concessão da bolsa de estudos do mestrado e pela bolsa de estágio de pesquisa no exterior.

À Danisco, Fundação André Tosello, Vigor, Clariant, pela doação dos materiais utilizados neste projeto.

À Mariana do Infabric- Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Celular- da Unicamp e Guilherme Faria pelas análises de microscopia confocal de varredura e Difração de Raios-x.

À Profa. Ana Maria Gomes, Sérgio Sousa e Raquel Madureira pela recepção e atenção em Universidade Católica Portuguesa.

Aos professores que cederam seus laboratórios para a execução do trabalho e que de alguma forma contribuíram com meu crescimento durante o mestrado: Eliana, Eliana Rigo, Samantha, Chris, Cíntia, Rose, Sobral, Marta, Carlos, Mariza e Andrezza.

Ao Prof. Júlio pela disposição no auxílio das análises estatísticas.

À Profa. Bel pelas análises reológicas do sorvete.

À Riana, Dani, Marcelo, pessoas que me ensinaram muito e me auxiliaram em inúmeros momentos durante a execução do trabalho, e por serem pessoas maravilhosas.

Aos meus queridos amigos Adja, Fernando, Talitinha e Volnei, obrigada por todos os momentos que compartilhamos no laboratório e fora dele. Certamente as histórias do nosso quinteto nos acompanharão... Obrigada pelas ajudas no laboratório, pelas risadas, pelas conversas, enfim, pela troca intangível nestes dois anos, admiro e torço muito por todos vocês. Obrigada Mari, Júlio, Milla pessoas especiais que completaram ainda mais o LaProF.

À minha companheira de casa... Milla! Vou sentir tanta saudade de você, da sua alegria e do seu bom humor matinal! Morar com você foi um presente!

À Roberta, Aline, Fernanda, Ana Júlia, Alana e Lilou, trabalhar com vocês foi uma experiência ótima.

Às minhas queridas amigas Bruna, Duda, Vanessa, Lizzie, Camila, Maria, Helene, Tyemi, Jaque, Bia, Nati e Elisa, mesmo longe sempre presentes.

Aos meus amigos de Portugal, Diogo, Ana Bia, Tasha, João e Ana Izabel, espero pelos nossos reencontros.

Aos colegas do vôlei e do tênis pelos momentos de descontração e risadas durante estes anos na FZEA. Obrigada Prof. Margutti e Prof. Zeca!

À todos os colegas e amigos da pós graduação: Grazi, Taíse, Diane, Carol, Daniel, Mireli, Débora, Paola, Samira, Camila, Josi, Jana, Thaísa, Carol, Michele, Kelly, Natali, Sarah, Lú, Rafa...

Bah e Dih, meus queridos avós, obrigada por tudo.

Tia Teresa e Tio Yuji, obrigada por estarem sempre presentes, ajudando em tudo, vocês são muito especiais.

Aos meus sogros José Pedro e Márcia, vocês são pessoas maravilhosas, obrigada pela acolhida e torcida.

Pedro, meu companheiro, amigo e amor. Obrigada pela paciência e por dividir tantas coisas comigo. É tão bom ver o quanto tem sido bom...

Minhas irmãs, Rê e Marú, vocês são parte de mim, da minha história, minhas alegrias são sempre multiplicadas por três. Admiro muito vocês.

Mãe, obrigada por me ensinar o amor, que o próximo é extensão de nós mesmos. Obrigada por ser tão iluminada, pela sua serenidade e força. Você me inspira a ser uma pessoa melhor todos os dias...

Pai, obrigada por sempre nos apoiar e se preocupar. Por toda sua doação e por sempre nos motivar a estudar...

Ao Deus onipresente, pela proteção e luz, por me guiar e encorajar em todos os momentos da minha vida...

"...planeta vivo, Sofia! Somos um grande barco navegando ao redor de um sol incandescente no universo. Mas cada um de nós é um barco em si mesmo, um barco carregado de genes navegando pela vida. Se conseguirmos levar esta carga ao porto mais próximo, nossa vida não terá sido em vão."

O Mundo de Sofia (Jostein Gaarder)

"De que valeria a obstinação do saber se ele assegurasse apenas a aquisição dos conhecimentos e não, de certa maneira, e tanto quanto possível, o descaminho daquele que conhece? Existem momentos na vida onde a questão de saber se se pode pensar diferentemente do que se pensa, e perceber diferentemente do que se vê, é indispensável para se continuar a olhar ou a refletir."

Michel Foucault

RESUMO

OKURO, P. K. **Desenvolvimento, avaliação e aplicação de micropartículas simbióticas produzidas por *spray chilling***. 2013. 220f. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Foram produzidas micropartículas simbióticas com carreador de natureza lipídica, obtidas por *spray chilling*. Como materiais ativos foram utilizadas duas cepas de micro-organismos probióticos (*L. acidophilus*-LA e *L. rhamnosus*-LR), dois prebióticos (inulina e polidextrose) e gordura de palma e palmiste interesterificada. Estudou-se a resistência destes probióticos ao processo aplicado, o comportamento das micropartículas sólido lipídicas (MSLs) frente ao fluido gástrico e intestinal simulados e suas viabilidades durante 120 dias de armazenamento à -18, 7 e 22°C sob vácuo ou umidade relativa controlada. A caracterização morfológica, granulometria, análise térmica (DSC), atividade de água, espectroscopia na região do infravermelho (FTIR) e difração de raios-X (XRPD) foram estudados. *Spray chilling* configurou-se como processo adequado aos probióticos, devido à baixa perda de células viáveis durante a obtenção das micropartículas, sendo que não foi observado interferência da ausência, presença e do tipo de prebiótico. Foram obtidas MSLs esféricas com superfície relativamente uniforme, e com tamanho médio entre $62,4 \pm 2,8$ a $69,6 \pm 5,1$ μm , sendo que não houve diferença significativa entre as formulações. As análises de difração de raios-X indicaram que não ocorreram alterações polimórficas durante o armazenamento refrigerado das MSLs. Quanto à análise térmica pode-se dizer que a presença de probióticos e prebióticos praticamente não interferiu na alteração da temperatura de fusão para todas as formulações estudadas, que variou de 45,37°C a 47,58°C, inferindo-se a ausência de interações significativas entre os ingredientes microencapsulados e o carreador, ausência que foi reafirmada pelos espectros de infravermelho. A microencapsulação favoreceu a sobrevivência frente aos fluidos gástrico e intestinal simulados, e possibilitou a manutenção de células viáveis acima de 10^6 UFC por grama até 120 dias de armazenamento em umidade relativa controlada para a formulação com *L. acidophilus* e polidextrose, a qual foi influenciada pela atividade de água da

partícula, que por sua vez foi afetada pela incorporação de prebióticos. Tendo em vista o potencial das MSLs desenvolvidas, estas foram incorporadas ao sorvete. Nesta matriz as micropartículas não apresentaram um bom desempenho, seja na sobrevivência de *L. acidophilus* durante o armazenamento do produto, como na proteção diante da exposição às condições gastrointestinais simuladas. Além disso, sorvetes com adição das MSLs foram avaliados com notas significativamente menores ($p \leq 0,05$) nos atributos textura, sabor e aceitação global em relação a amostras controle e a com adição de probióticos livres na análise sensorial do produto desenvolvido. As micropartículas lipídicas produzidas mostraram-se aptas como ingrediente alimentício, porém no sorvete não atenderam as premissas de proteção e extensão de contagens apropriadas do probiótico. As MSLs também foram incorporadas em polpas de fruta, abacate e melão, neste tipo de matriz as MSLs conferiram proteção ao micro-organismo pois aumentaram sua viabilidade em relação aos micro-organismos livres.

Palavras-chave: microencapsulação, probióticos, prebióticos, simbióticos, matriz lipídica, sorvete.

ABSTRACT

OKURO, P. K. **Development, evaluation and application of symbiotic microparticles produced by *spray chilling* technology.** 2013. 220f. M.Sc. Dissertation – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2013.

Symbiotic microparticles were produced with a lipid carrier, obtained by *spray chilling* technology. In this study were used two strains of probiotic (*L. acidophilus*-LA and *L. rhamnosus*-LR) and two prebiotics (inulin and polydextrose) as active or core materials. The resistance of these probiotics to the *spray chilling* process was evaluated, as well as the viability of the solid lipid microparticles (SLMs) during the exposition to the simulated gastric and intestinal fluids and stability during 120 days of storage at -18, 7 and 22°C, in vacuum or controlled relative humidity. Morphology characterization, particle size, water activity, thermal analysis (DSC), infrared spectroscopy and X-ray diffraction (XRPD) were studied. *Spray chilling* process was configured as a suitable technology to probiotics due to low loss of viable cells in processing of the particle, and no interference was observed from the presence/absence and type of prebiotic component. MSLs were obtained with relatively uniform spherical surface, and average size between $62.4 \pm 2.8 \mu\text{m}$ to $69.6 \pm 5.1 \mu\text{m}$, there was no significant difference between formulations. Analyses of X-ray diffraction indicated that there were no polymorphic changes during refrigerated storage of SLMs. As for the thermal analysis it can be said that the presence of probiotics and prebiotics had practically no effect on the melting temperature for all formulations, which was 45.37° C up to 47.58° C, inferring with this the absence of significant interactions between the lipid carrier and microencapsulated ingredients, absence that was reaffirmed by the infrared spectra. Microencapsulation favored the survival against gastric and simulated intestinal fluids, and was possible to maintain viable cells up to 10^6 CFU per gram up to 120 days of storage for formulation with *L. acidophilus* and polydextrose in low temperatures and relative humidity (11%), which the stability was influenced by the water activity of the particle, which in turn is affected by the incorporation of prebiotics to the formulation of the SLMs. Given the potential of SLMs developed, they were incorporated into the ice cream. In this matrix microparticles not performed well, either on the survival of *L. acidophilus* during product storage, such as in protection against exposure to simulated gastrointestinal

conditions. Furthermore, the addition of SLMs on strawberry ice cream was evaluated with grades significantly lower ($p \leq 0.05$) in the attributes texture, flavor and overall acceptability compared to the control samples and with added of free probiotic sensory analysis of the product developed. The lipid microparticles produced were shown to be suitable as a food ingredient, but the ice cream did not meet the assumptions of protection and extension of appropriate probiotic counts. The MSLs were also incorporated in the fruit pulp, avocado and melon, in this application the SLMs provided protection to the micro-organism increasing the probiotic viability in relation to the free microorganisms.

Keywords: microencapsulation, probiotics, prebiotics, symbiotics, lipid matrix, ice cream.

LISTA DE FIGURAS

CAPÍTULO 1: Revisão Bibliográfica

Figura 1. Possíveis mecanismos de atuação de bactérias probióticas.	27
Figura 2. Exemplos de produtos probióticos encontrados no mercado mundial.	29
Figura 3. Estrutura da Inulina.	34
Figura 4. Estrutura da Polidextrose.	35
Figura 5. Tipos de estruturas obtidas através da microencapsulação.....	38
Figura 6. Objetivos requeridos na microencapsulação de probióticos.	41
Figura 7. Representação esquemática do intestino humano.....	47
Figura 8. Esquema de um <i>spray chiller</i>	50
Figura 9. Três tipos propostos de NLC como nova abordagem ao tipo convencional (SLN) que pode provocar a expulsão do recheio.	55
Figura 10. Desenvolvimento de estruturas de gordura em sorvete.	60

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas sólido lipídicas simbióticas

Figura 11. <i>Eppendorffs</i> com os micro-organismos para serem congelados.....	87
Figura 12. Esquema das análises realizadas na etapa de desenvolvimento, caracterização e avaliação das MSLs.	88
Figura 13. Micropartículas estocadas para estudo de viabilidade. (A) armazenamento com aplicação de vácuo; e (B) armazenamento com umidade relativa controlada com solução saturada de Cloreto de Lítio (11%).....	95
Figura 14. Termograma para a gordura obtida após processo de interesterificação de óleo de palma totalmente hidrogenado e óleo de palmiste.	96
Figura 15. Curvas de Concentração bacteriana para os micro-organismos <i>L.acidophilus</i> e <i>L. rhamnosus</i>	97
Figura 16. Imagem do pó contendo as MSLs obtidas por <i>spray chilling</i>	98
Figura 17. Imagens captadas por microscopia óptica, referentes às formulações 1(A); e 2(B), com uma lente de aumento de 100X.	99
Figura 18. Micropartículas obtidas por <i>spray chilling</i> . (A) Formulação 1 com aumento de 500x; (B) Formulação 1 com aumento de 600x.....	100
Figura 19. Visão interna de micropartículas produzidas por <i>spray chilling</i> produzidas por <i>spray chilling</i> , para a formulação 1(matriz lipídica+ <i>L. acidophilus</i>).....	101
Figura 20. Microscopia confocal de varredura para as MSLs referentes à formulação 1 (500x).	102
Figura 21. Histograma de distribuição de tamanho de todas as formulações estudadas.....	105
Figura 22. Termogramas dos tratamentos avaliados, inóculo e material encapsulante (gordura de palma e palmiste interesterificadas), obtidos por DSC.	108
Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho para os componentes das MSLs. (a) Agente carreador GPPI; (b) inulina e (c) polidextrose.....	110
Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho para o inóculo de <i>L. acidophilus</i> (a) e <i>L. rhamnosus</i> (b).	111

Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho para as formulações de MSLs para o micro-organismo <i>L. acidophilus</i> . (a) F1; (b) F2 e (c) F3.	112
Figura 26. Espectro de absorção na região do infravermelho para as formulações de MSLs para o micro-organismo <i>L. rhamnosus</i> . (a) F4; (b) F5 e (c) F6.	113
Figura 27. Difrátogramas XRPD para as formulações de <i>L. acidophilus</i> para amostras recém-preparadas e após 90 dias de armazenamento.	115
Figura 28. Difrátogramas XRPD para as formulações de <i>L. acidophilus</i> para amostras recém preparadas e após 90 dias de armazenamento.....	115
Figura 29. Atividade de água das diferentes formulações das MSLs durante o armazenamento em condições controladas.	119
Figura 30. Resistência aos fluidos gástricos e intestinais para o micro-organismo <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado.....	123
Figura 31. Resistência aos fluidos gástricos e intestinais para o micro-organismo <i>L. rhamnosus</i> livre e microencapsulado.	125
Figura 32. Microscopia das micropartículas lipídicas durante o ensaio de resistência a exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados.	128

CAPÍTULO 3: Aplicação de micropartículas sólido lipídicas em sorvete de morango

Figura 33. Processamento de sorvete sabor morango. Incorporação de ar e congelamento do sorvete através da sorveteira Brasfrio®.....	153
Figura 34. Esquema das análises realizadas na etapa de caracterização e avaliação das diferentes formulações de sorvete.....	154
Figura 35. Diagrama com a sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de nuances (Ângulo Hue).....	160
Figura 36. Reograma (curva ascendente e descendente) das amostras de sorvete à 20 °C.	161
Figura 37. Avaliação da sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livre e encapsulado adicionado em sorvete	163
Figura 38. Notas médias das amostras de sorvete para os atributos sensoriais: aroma, cor, textura, sabor e aceitação global do produto.	168

CAPÍTULO 4: Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado em micropartículas sólido lipídicas em polpa de fruta

Figura 39. Pasteurização e armazenamento da polpa de abacate para estudo de viabilidade de <i>L. acidophilus</i>	180
Figura 40. Valores de pH para o polpa de abacate durante 28 dias de armazenamento. Símbolos:.....	183
Figura 41. Valores de pH para o polpa de melão durante 28 dias de armazenamento.	184

Figura 42. Avaliação da viabilidade de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado em polpa de melão durante armazenamento por 28 dias à temperatura de refrigeração e congelamento.....	187
Figura 43. Avaliação da sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado em polpa de abacate durante armazenamento por 28 dias à temperatura de refrigeração e congelamento.....	188

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

Tabela 1. Bactérias probióticas, produtos de seu metabolismo e a correlação com propostas terapêuticas atribuídas a estas.	24
Tabela 2. Benefícios atribuídos aos probióticos e seus possíveis mecanismos.	26
Tabela 3. Algumas técnicas de microencapsulação aplicadas para microencapsulação de probióticos.	43
Tabela 4. Estudos de encapsulação pela técnica de <i>spray chilling</i>	52
Tabela 5. Materiais encapsulantes para encapsulação de alimentos, alimentos funcionais e ingredientes nutracêuticos.	53
Tabela 6. Exemplos de trabalhos científicos com sorvetes funcionais.	62

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas

sólido lipídicas simbióticas

Tabela 7. Tratamentos das micropartículas produzidas por <i>spray chilling</i>	90
Tabela 8. Composição dos fluidos gástrico e intestinal.	94
Tabela 9. Composição em ácidos graxos da gordura.	96
Tabela 10. Equações para predição da concentração bacteriana no inóculo e seus respectivos coeficientes de determinação.	97
Tabela 11. Informações sobre o tamanho das MSLs obtidas por <i>spray chilling</i>	103
Tabela 12. Parâmetros do DSC para a matriz encapsulante lipídica, material bioativo e formulações preparadas com diferentes probióticos e com ou sem a adição de prebióticos.	107
Tabela 13. Atividade de água para as MSLs.	117
Tabela 14. Aw após sete dias de armazenamento para as diferentes formulações de MSLs estudadas.	118
Tabela 15. Comparação entre células viáveis no inóculo, na suspensão (antes da atomização) e nas MSLs (após atomização e solidificação do carreador).	120
Tabela 16. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento na sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> durante 120 dias de armazenamento.	134
Tabela 17. Efeito do tipo de estocagem (umidade relativa e vácuo), e da adição e tipo do componente prebiótico na sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> durante 120 dias de armazenamento.	135
Tabela 18. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento na sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> durante 120 dias de armazenamento.	136
Tabela 19. Efeito do tipo de estocagem (umidade relativa e vácuo), e da adição e tipo do componente prebiótico na sobrevivência de <i>L. rhamnosus</i> durante 120 dias de armazenamento.	137

CAPÍTULO 3: Aplicação de micropartículas sólido lipídicas em sorvete de morango

Tabela 20. Ingredientes utilizados na fabricação de sorvete.....	152
Tabela 21. Preparação do inóculo para adição no sorvete.	153
Tabela 22. Formulações para o sorvete.....	154
Tabela 23. Valores de pH e <i>overrun</i> das amostras de sorvete das formulações S1, S3 e S2, referentes ao sorvete tradicional, com adição de MSLs e inóculo, respectivamente.	158
Tabela 24. Parâmetros de cor L*, a*, b*, h e C* para as amostras de sorvete.	159
Tabela 25. Parâmetros reológicos das amostras de sorvete.....	160
Tabela 26. Efeito da microencapsulação na sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> em sorvete durante 120 dias de armazenamento a -18 °C.....	165
Tabela 27. Notas médias dos consumidores para cada um dos atributos avaliados nas diferentes amostras de sorvetes.....	168

CAPÍTULO 4: Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado em micropartículas sólido lipídicas em polpa de fruta

Tabela 28. Média de teor de sólidos solúveis da polpa de abacate, melão e limão com ou sem adição de MSL ou micro-organismos livres, armazenados a temperatura de 4 e -20 °C.	185
Tabela 29. Contagens médias* de células viáveis dos tratamentos para o desdobramento dos fatores fruta (abacate ou melão) e tipo de micro-organismo (livre ou microencapsulado).	188
Tabela 30. Médias* das contagens de células viáveis, Log ₁₀ (UFC.g-1) de <i>L. acidophilus</i> , associadas ao desdobramento da interação dupla dos fatores: tipo de adição, se com MSL ou micro-organismos livres, e dias de estocagem.	189

SIGLAS E ABREVIATURAS

LA- *Lactobacillus acidophilus*

LR- *Lactobacillus rhamnosus*

INU- Inulina

POLI- Polidextrose

MSLs- Micropartículas sólido-lipídicas

DSC- Calorimetria Diferencial de Varredura

XRPD- Difração de raios-X

FTIR- Espectroscopia na região do infravermelho

UFC- Unidades formadoras de colônia

GPPI- Gordura obtida após processo de interesterificação de óleo de palma totalmente hidrogenado e óleo de palmiste

TGI- Trato gastrointestinal

UR- Umidade relativa

FGS- Fluido gástrico simulado

FIS- Fluido intestinal simulado

m- massa

v- volume

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1: Revisão bibliográfica

CAPÍTULO 1	22
1.1 Probióticos	22
1.1.1 Mecanismos de ação das bactérias probióticas.....	25
1.1.2 Gênero <i>Lactobacillus</i>	27
1.1.3 Produtos com adição de probiótico	28
1.2 Prebióticos	32
1.2.1 Inulina	33
1.2.2 Polidextrose	34
1.3 Simbióticos	36
1.4 Microencapsulação	37
1.5 Proteção necessária aos probióticos.....	39
1.6 Microencapsulação de probióticos	40
1.6.1 Liberação controlada para probióticos no intestino	46
1.7 <i>Spray Chilling</i>	48
1.7.1 Agentes encapsulantes.....	52
1.7.2 Lipídios como agentes encapsulantes	54
1.7.3 Polimorfismo em lipídios	57
1.7.4 Técnicas para análise de partículas sólido-lipídicas	58
1.8 SORVETE	59
1.8.1 SORVETES PROBIÓTICOS.....	61
1.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63

CAPÍTULO 2: Desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas sólido lipídicas simbióticas

2 CAPÍTULO 2.....	82
2.1 INTRODUÇÃO	84
2.2 OBJETIVOS	85
2.3 MATERIAL E MÉTODOS.....	86
2.3.1 Materiais	86
2.3.2 Composição em ácidos graxos do material encapsulante	86
2.3.3 Protocolo de congelamento para armazenamento das culturas	87
2.3.4 Estimativa da concentração bacteriana	87
2.3.5 Métodos	88
2.3.6 Caracterização Morfológica	91
2.3.7 Tamanho e distribuição das partículas	92
2.3.8 Atividade de água	92
2.3.9 Análise do comportamento térmico do agente carreador e das micropartículas produzidas- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)	92
2.3.10 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)	92
2.3.11 Difração de raios-X (XRPD).....	92
2.3.12 Avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação	93

2.3.13	Avaliação <i>in vitro</i> da sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> e <i>L. rhamnosus</i> nos fluidos gástrico e intestinal simulados.....	93
2.3.14	Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem	94
2.3.15	Análises Estatísticas.....	95
2.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO	96
2.4.1	Caracterização do carreador.....	96
2.4.2	Curva de concentração bacteriana	97
2.4.3	Caracterização morfológica das micropartículas	98
2.4.4	Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas sólido lipídicas.....	102
2.4.5	Análise do comportamento térmico (DSC).....	105
2.4.6	Espectroscopia na Região de infravermelho (FTIR)	109
2.4.7	Difração de Raios-X.....	114
2.4.8	Atividade de Água (Aw).....	116
2.4.9	Avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação	120
2.4.10	Resistência das MSLs aos fluidos gástrico e intestinal simulados.....	122
2.4.11	Avaliação da estabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem	129
2.5	CONCLUSÃO	138
2.6	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	139

CAPÍTULO 3: Aplicação de micropartículas sólido lipídicas em sorvete de morango

3	CAPÍTULO 3.....	149
3.1	INTRODUÇÃO	150
3.2	OBJETIVOS	151
3.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	151
3.3.1	Materiais	151
3.3.2	Definição da formulação da micropartícula lipídica para adição em sorvete	152
3.4	Métodos	152
3.4.1	Preparo do inóculo de <i>L. acidophilus</i>	152
3.4.2	Preparo do sorvete	153
3.4.3	Enumeração de <i>L. acidophilus</i> em sorvete.	154
3.4.4	Análises no sorvete.....	154
3.5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	157
3.5.1	Determinação de pH e <i>Overrun</i>	157
3.5.2	Cor instrumental.....	159
3.5.3	Comportamento reológico.....	160
3.5.4	Resistência de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado veiculado em sorvete aos fluidos gástrico e intestinal simulados	162
3.5.5	Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado em sorvete.....	164
3.5.6	Análise Sensorial	167
3.6	CONCLUSÃO	170
3.7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	170

CAPÍTULO 4: Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado em micropartículas sólido lipídicas em polpa de fruta

4	CAPÍTULO 4.....	176
4.1	INTRODUÇÃO.....	177
4.2	OBJETIVOS.....	179
4.3	MATERIAL E MÉTODOS.....	179
4.3.1	Materiais.....	179
4.3.2	Metodologia.....	179
4.4	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	182
4.4.1	Determinação de pH.....	182
4.4.2	Determinação do teor de sólidos solúveis.....	184
4.4.3	Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> adicionado às polpas de limão, melão e abacate sob temperatura de 4 e -20 °C durante o armazenamento.....	185
4.5	CONCLUSÃO.....	191
4.6	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	191
5	CONCLUSÃO GERAL.....	196
6	SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS.....	196
7	APÊNDICE.....	197

CAPÍTULO 1

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

1.1 Probióticos

Probiótico é um termo de origem grega que significa “para a vida”, também definido como micro-organismos vivos capazes de afetar benéficamente a saúde do hospedeiro melhorando o equilíbrio microbiano intestinal. Atualmente assume-se a definição de que são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades apropriadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, ou seja, na condição de se estabelecerem no local e contagem adequado, expressam sua funcionalidade (FAO, 2002).

O trato gastrointestinal abriga uma complexa e dinâmica população de micro-organismos, em sua maioria, bactérias, que constituem a microbiota intestinal (ANDOH; FUJIYAMA, 2006). Os micro-organismos presentes no trato intestinal podem estabelecer relações simbióticas, e, embora a composição desta microbiota seja estável em indivíduos saudáveis, a mesma pode ser influenciada por inúmeros fatores como a qualidade da dieta, estresse, estado imunológico, administração de fármacos, envelhecimento ou enfermidades que podem causar transtornos gastrintestinais (TESHIMA, 2003).

Esta microbiota, por sua vez, desempenha importante papel no desenvolvimento e na manutenção da resposta imune intestinal. Um aspecto interessante diz respeito à possibilidade de se promover a manipulação terapêutica para melhorar a saúde dos hospedeiros, através da administração de diversas espécies de micro-organismos, coletivamente denominados de probióticos (ALANDER et al., 1999). Através das evidências científicas, cada vez mais se solidifica a afirmativa de que a administração de culturas probióticas estimula a multiplicação de micro-organismos benéficos, e que podem ainda suprimir o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente patógenos, e, de reforçar os mecanismos naturais de defesa do corpo (SALMINEN et al., 1998).

Dentre os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas estão o controle e estabilização da microbiota intestinal após o uso de antibióticos; a promoção da resistência gastrintestinal à colonização por patógenos;

a diminuição da população de patógenos através da produção de ácido acético, ácido láctico, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; e o aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas (KAUR et al., 2002; TUOHY et al., 2003). Podem ainda estar relacionados ao controle de infecções intestinais e do nível de colesterol, auxiliar na digestão da lactose, pela produção de β -galactosidade, e possível atividade anticarcinogênica (KRASAEKOOB; BHANDARI; DEETH, 2003).

Para o processo de seleção de micro-organismos probióticos a serem incorporados em alimentos devem-se considerar características como: segurança para o hospedeiro, características tecnológicas, e funcionais. Para garantir a segurança é necessária a investigação da origem da cepa probiótica, onde a origem deve ser de indivíduos saudáveis, confirmar sua não patogenicidade e estudar as características de resistência a antibióticos. Quanto à questão funcional, abrange-se a viabilidade, capacidade de permanência no trato gastrointestinal (capacidade de colonizar, ao menos temporariamente o trato GI), modulação da resposta imune, propriedades antagônicas e antimutagênicas. Por fim, em termos tecnológicos, requiere-se a habilidade das cepas de resistir às condições de processamento industrial e à formulação do produto, permanecendo viáveis durante toda vida de prateleira (McCANN; EGAN; WEBER, 1995; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; ANNUK, et al., 2003).

Maasen, Holten-Neelen e Balk (2000) estudaram a síntese de citocinas pela mucosa intestinal, que está associada ao comportamento do perfil imune. Revelaram que a resposta imune dependia da cepa de *Lactobacillus* utilizada, salientando-se a necessidade de realizar uma cuidadosa seleção das cepas candidatas à função de probiótico.

Bactérias lácticas isoladas dos intestinos de homens e animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, quando consumidas em quantidade adequada gera benefícios à saúde. Dentre as bactérias probióticas mais estudadas encontram-se as espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. As primeiras atuam no intestino delgado, enquanto que as bifidobactérias no intestino grosso, especificamente na região do cólon. A veiculação destes grupos microbianos ao consumidor se dá através da administração de espécies selecionadas, que deverão estar em números elevados e viáveis no momento do consumo (ROBERFROID, 2002). A Tabela 1 apresenta as espécies de bactérias

probióticas mais utilizadas correlacionadas à funcionalidade, e, conseqüentemente à inserção de benefícios através do consumo de alimentos probióticos.

Tabela 1. Bactérias probióticas, produtos de seu metabolismo e a correlação com propostas terapêuticas atribuídas a estas.

Micro-organismos probióticos	Metabólitos	Propostas terapêuticas
<i>B. breve</i>	L(+) lactato, acetato	Ativação do sistema imune humoral; proteção contra rotavírus ou infecções, estabilização da microflora intestinal.
<i>B. longum</i>	L(+) lactato, acetato	Inibição do câncer de cólon, atividade anticancerígeno.
<i>L. acidophilus</i>	DL lactato	Ativação da mucosa do sistema imune; redução dos níveis de colesterol séricos e redução do risco de doenças coronarianas.
<i>L. casei</i>	L(+) lactato	Ativação do sistema imune celular, produção de imunoglobulina E (IgE).
<i>L. rhamnosus</i>	L(+) lactato	Ativação do sistema imune.

Adaptado de Ferreira (2003) e Islam et al. (2010).

A funcionalidade referente aos micro-organismos probióticos é determinada pela presença de moléculas bioativas específicas ou moléculas efetoras envolvidas na bactéria probiótica, estas são glicoproteínas que devem ser preservadas para que as bactérias possam expressar seus efeitos funcionais, logo a manutenção destas moléculas efetoras durante a passagem pelo trato gastrointestinal é mais importante do que a contagem de células viáveis propriamente ditas (KONSTANTINOV et al., 2008; KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009; VAN BAARLEN et al., 2009) . Ou seja, o aumento da taxa de sobrevivência das bactérias probióticas não necessariamente implica na manutenção de seu aspecto funcional (DE VOS et al., 2010).

As moléculas efetoras têm se mostrado susceptíveis a condições ácidas e às enzimas digestivas do estômago e intestino, portanto a tentativa de preservar e proteger estas moléculas efetoras traduz um desafio tecnológico a ser contornado (BETORET et al., 2011). Além desta questão da manutenção destas moléculas efetoras, outro viés negligenciado na administração de probióticos, é que, para a funcionalidade completa dos probióticos na saúde do hospedeiro, os mesmos tem que ser entregues em áreas específicas no intestino (DE VOS et al., 2010).

A legislação brasileira reconhece a utilização dos micro-organismos: *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei shirota*, *Lactobacillus casei* variedade *rhamnosus*, *Lactobacillus casei* variedade *defensis*, *Lactobacillus paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium animalis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *Bifidobacterium longum* e *Enterococcus faecium*, como probióticos (BRASIL, 2008).

1.1.1 Mecanismos de ação das bactérias probióticas

O arsenal dos probióticos incluem inúmeros mecanismos para a prevenção de infecções, aumento do sistema imunológico e promoção do aumento do valor nutricional dos alimentos. Cada mecanismo de ação depende do tipo de cepa, sugerindo-se então a importância da seleção e comparação científica de probióticos para cada finalidade (SAULNIER et al., 2009).

A maioria dos estudos conduzidos com bactérias ácido-láticas sugere que os probióticos possuam efeito imunoestimulante em animais e no homem, apesar de ainda não estarem completamente esclarecidos os mecanismos pelos quais isto ocorre. A Tabela 2 relaciona possíveis mecanismos e causas dos benefícios associados à administração contínua e em doses suficientes de probióticos em uma dieta equilibrada. Sugerem-se vários mecanismos de atuação que podem ocorrer independentemente ou de forma associada. Um desses supostos mecanismos é a exclusão competitiva, em que as bactérias probióticas competiriam com os patógenos por sítios de fixação e nutrientes, impedindo a ação destes transitoriamente (CROSS, 2002). Este processo de exclusão competitiva explicaria a necessidade da administração continuada e elevadas doses dos probióticos, para manifestar seus efeitos.

Saad (2006) indica três possíveis alternativas de atuação para os probióticos. Entre eles enumera a supressão do número de células viáveis de patógenos através da produção de compostos com atividade antimicrobiana, a competição por nutrientes e a competição por sítios de adesão. Em segundo lugar cita a alteração do metabolismo microbiano, através do aumento ou da diminuição da atividade enzimática. E, por fim, descreve o estímulo da imunidade do hospedeiro, através do aumento dos níveis de anticorpos e o aumento da atividade dos macrófagos. Divide

o espectro de atividade dos probióticos em efeitos nutricionais, fisiológicos e antimicrobianos.

O efeito de aumentar a resposta imune, possivelmente está relacionado à capacidade dos probióticos interagirem com as placas de *Peyer* e as células epiteliais intestinais, estimulando as células B produtoras de IgA (imunoglobulina A) e a migração de células T do intestino (PERDIGÓN; HOLGADO, 2000).

Também tem sido reportado que bactérias probióticas agiriam favorecendo a atividade fagocítica inespecífica dos macrófagos alveolares, correlacionando-se com uma ação sistêmica por secreção de mediadores que estimulariam o sistema imune (CROSS, 2002).

Tabela 2. Benefícios atribuídos aos probióticos e seus possíveis mecanismos.

Benefícios	Possíveis mecanismos associados
Melhora da digestibilidade	Promove degradação parcial de proteínas, lipídios e carboidratos.
Aumento do valor nutritivo	Apresentam quantidade relativamente alta de vitaminas do complexo B e de alguns aminoácidos essenciais.
Ação antagônica contra patógenos entéricos	Distúrbios intestinais (diarréias, colites, diverticulites) controlados pela diminuição do pH, inibidores microbianos e concorrência pelos sítios de adesão e ativação com os patógenos.
Modulação da imunidade	Aumento da produção de macrófagos e estimulação da produção de células supressoras.
Colonização da microbiota intestinal	Relacionado à sobrevivência ao ambiente gástrico, resistência à lisozima e a tensão superficial do intestino, e a possível habilidade de adesão e multiplicação dos probióticos no ambiente intestinal.
Ação hipocolesterolêmica	Produção de inibidores da síntese do colesterol/utilização do colesterol por assimilação e precipitação como sais biliares desconjugados.
Ação anticarcinogênica	Conversão de potenciais pré-carcinogênicos em compostos menos nocivos, relacionado também à modulação do sistema imune.

Adaptado de Moraes e Colla (2006).

O'Toole e Cooney (2008) enumeraram os mecanismos potenciais ou conhecidos em que as bactérias probióticas podem ter impacto sobre a microbiota como ilustra a Figura 1. Dentre os mecanismos citam a competição por ingredientes dietéticos como substratos de crescimento, a bioconversão de açúcares em produtos de fermentação com propriedades inibidoras, o antagonismo direto através

da síntese de bacteriocinas, a exclusão competitiva para sítios de ligação, a função de barreira, a redução da inflamação, a estimulação da resposta imune inata (por mecanismos não conhecidos).

Quanto à atividade antimicrobiana, agem de formas distintas os lactobacilos em relação às bifidobactérias, os primeiros atuam através da produção de ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas, enquanto que as bifidobactérias através da síntese de ácido láctico e acético. A produção destes ácidos promove a redução do pH intestinal, restringindo e/ou inibindo o desenvolvimento de bactérias patogênicas e putrefativas (MODLER; McKELLER; YAGUCHI,1990).

Figura 1. Possíveis mecanismos de atuação de bactérias probióticas.

(IEC: células epiteliais, DC: células dendríticas, T: células-T)

Fonte: O'Toole e Cooney (2008).

1.1.2 Gênero *Lactobacillus*

Pela primeira vez, em 1990, foram isolados das fezes de lactentes os lactobacilos, como hoje são conhecidos, denominados, na época, como *Bacillus acidophilus*, designação genérica dos lactobacilos intestinais. O gênero abrange o maior número de espécies de bactérias ácido lácticas, também caracterizado pela extensa variedade de propriedades bioquímicas e fisiológicas. Esta heterogeneidade pode ser explicada pela extensão do teor molar de Guanina + Citosina (32-53%) das espécies incluídas no gênero (BOTELHO, 2005). A atividade antimicrobiana dos

lactobacilos é relacionada à capacidade de produzir ácido láctico, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas.

O gênero é composto por espécies homofermentativas obrigatórias, onde há produção de ácido láctico a partir da glicose, heterofermentativas obrigatórias ou facultativas, sendo que as últimas produzem outros compostos como ácido láctico, acético, fórmico e succínico (BOTELHO, 2005). Possui forma de bacilos ou cocobacilos, e se organizam na forma de células livres, aos pares ou em cadeias curtas, apresentam-se isolados, aos pares ou formando cadeias curtas. Os *L. acidophilus* são bactérias gram-positivas, catalase negativas, anaeróbias a microaerófilas e homofermentativas. Desenvolvem-se em temperaturas entre 20 a 48°C, sendo a temperatura ótima de crescimento 37°C, e em pH entre 6 e 7 (GOMES; MALCATA, 1998).

L. acidophilus apresenta tamanho típico de 0,6-0,9 µm de largura e 1,5-6,0 µm de comprimento, esta espécie apresenta baixa tolerância à meios salinos e, também tem seu crescimento favorecido em condições de anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio (GOMES; MALCATA, 1998).

L. rhamnosus pode multiplicar-se em temperaturas de 15°C e 45°C, e, pode ser identificado bioquimicamente pela incapacidade de fermentar a rafinose, mas, por outro lado, por ser hábil para fermentação de ramnose, além de apresentar ácido meso-diaminopimélico em sua parede celular (KLEIN et al., 1998; CARR; CHILL; MAIDA, 2002).

1.1.3 Produtos com adição de probiótico

Durante os últimos anos têm sido crescente o desenvolvimento de alimentos funcionais, devido a fatores como elevados custos de serviços de saúde, aumento da expectativa de vida da população, estudos científicos na área de ingredientes alimentícios, maior conscientização e informação aos consumidores sobre a importância da qualidade da dieta (ARVANITOYANNIS; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLU, 2005).

Na classe dos funcionais, os produtos probióticos representam aproximadamente 65% desta parcela no mercado mundial de produtos (AGRAWAL, 2005). A Figura 2 ilustra produtos probióticos encontrados no mercado.

De acordo com a nova pesquisa de mercado publicada pela Transparency Market Research “*Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) – Global Industry Analysis, Market Size, Share, Trends, Analysis, Growth and Forecast, 2012 – 2018*,” a demanda global de produtos probióticos foi de 27,9 bilhões de dólares em 2011, este valor deve alcançar 44,9 bilhões de dólares em 2018, com taxa anual média de 6,8% ao ano de 2013 a 2018. Ásia e Europa dominam o mercado mundial em termos de demanda, enquanto que a Ásia e Oceania também representam o mercado mais promissor no futuro próximo (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013).

Figura 2. Exemplos de produtos probióticos encontrados no mercado mundial.

No continente asiático, China e Japão dominam a receita do mercado de probióticos, com a Índia e outras regiões demonstrando um crescimento significativo. Na Europa, Alemanha e Reino Unido estão os mercados mais atraentes. Os mercados da América do Norte e em países emergentes como o Brasil também mostram enorme potencial de crescimento da demanda em produtos probióticos (TRANSPARENCY MARKET RESEARCH, 2013).

Atualmente, a Organização Mundial da Saúde, preconiza a implementação de alternativas para controle de patologias, medidas condizentes e direcionadas no

sentido de explorar o potencial profilático e terapêutico das bactérias probióticas. Empresas interessadas no desenvolvimento deste tipo de produto podem explorar o reconhecimento e a valorização destes por parte dos consumidores, considerando-se o valor percebido desta categoria de produtos, como uma oportunidade de diferenciar e agregar valor à sua marca ou produto. O valor percebido pelo consumidor, associado principalmente aos *health claims* dos produtos probióticos, impulsiona indústrias na produção de alimentos dessa classe. Concomitantemente, o desenvolvimento de tecnologias permite inovações nos produtos, resultando em um número cada vez maior de produtos funcionais disponíveis no mercado, e, conseqüentemente, pesquisas nesta área.

A maior parte dos produtos probióticos produzidos, em particular nos Estados Unidos e Brasil, contém estirpes de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium ssp*, porém, também tem se desenvolvido produtos com cepas de outras espécies de *Lactobacillus*, como *L. casei* e *L. rhamnosus* (FERREIRA, 2003; THARMARAJ; SHAH, 2003).

Os probióticos podem ser utilizados na forma de preparações contendo um único ou uma combinação de micro-organismos, sendo que estes devem se apresentar viáveis no processamento e durante a manutenção no ecossistema digestivo, condição indispensável para a sua atuação (PENNA et al., 2000).

Com maior ênfase, a indústria de laticínios tem se configurado como importante pólo de aplicação de micro-organismos probióticos, convergindo no desenvolvimento de novos produtos funcionais (CHAMPAGNE et al., 2005).

Produtos como iogurtes e leites fermentados têm sido utilizados como principais veículos para culturas probióticas. No entanto, o desenvolvimento de novos produtos funcionais tem se ampliado como é o caso das sobremesas lácteas, preparados lácteos em pó em fórmulas infantis, sorvetes, manteigas, produtos fermentados, produtos cárneos fermentados, requeijão, sucos de fruta, queijos. As bactérias ácido-láticas possuem a característica de serem fermentadoras de lactose, levando à produção de ácido láctico. A maioria destas bactérias acidificam os alimentos, e a diminuição do pH age impedindo o desenvolvimento e atuação de bactérias indesejáveis, o que aumentaria o período de conservação de produtos fermentados (PIARD et al., 1997).

Para assegurar que a ingestão de produtos contendo probióticos de fato confira benefícios a saúde, deve-se atender à regularidade do consumo e a

quantidade adequada ingerida. Para que a manipulação da microbiota endógena do trato gastrointestinal seja bem conduzida estudos observaram que alterações desejáveis na composição da microbiota foram relacionadas com a contagem de 10^8 a 10^9 UFC de micro-organismos probióticos para 100 g de alimento, ou seja, um valor de 10^6 a 10^7 UFC por grama de produto (ROBERFROID, 1999; SHAH; RÁVULA, 2000; SABIKHI et al., 2010). Padrões internacionais, como International Dairy Federation, estabelecem que para que um produto tenha um *claim* probiótico também devem conter pelo menos 10^7 bactérias probióticas viáveis por grama de produto ou 10^9 células por porção servida, de 100 gramas (MANOJLOVIĆ et al., 2010). No Brasil a legislação regulamenta que a quantidade mínima de células probióticas viáveis deve estar entre 10^8 - 10^9 UFC por porção diária do produto e que a população de probiótico deve estar informada na etiqueta do produto (BRASIL, 2008).

Nesta conjuntura, o monitoramento do número de células viáveis de micro-organismos probióticos nos produtos é um parâmetro essencial que irá refletir na qualidade e eficácia dos mesmos. Para detecção de bifidobactérias e lactobacilos, inúmeras metodologias vêm sendo investigadas, tais como contagem em placa, técnicas moleculares (baseados em DNA ou rRNA), fluorescentes ou imunológicas, bem como os métodos enzimáticos (BOTELHO, 2005).

Visto a demanda por técnicas para identificação mais acuradas e rápidas, e para a análise da dinâmica de populações de linhagens individuais, os métodos de detecção moleculares têm se mostrado pertinentes e apropriados. Segundo Saccaro (2008) estes métodos possuem princípios e aplicações como: amplificação do rRNA 16S, DNA *microarray*, sequenciamento de genes específicos (como L-lactato desidrogenase), análise dos resultados de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase), RAPD (Polimorfismo de DNA Amplificado ao Acaso) e *Real Time* PCR por técnicas de *fingerprint*, como a eletroforese em gel de gradiente desnaturante (DGGE) e a eletroforese de campo pulsado (PFE).

Com o desenvolvimento de uma série de métodos baseados na análise ácidos nucleicos, a detecção específica de grupos de bactérias em detalhamento de espécie, subespécie tem sido possíveis. O uso combinado de meios de cultivo diferenciais e metodologias de tipagem molecular é capaz de fornecer uma abordagem acurada e orientada para a detecção, enumeração e identificação de

grupos de bactérias em uma ampla gama de alimentos e materiais biológicos (CHARTERIS et al., 1997).

Do ponto de vista tecnológico, devem ser incorporados aos alimentos sem provocar subtração das qualidades organolépticas, como impacto negativo na textura ou produção de *off-flavours*. A possibilidade de novas tecnologias envolve a busca de soluções para viabilidade de probióticos em matrizes alimentícias, sendo que a tecnologia de microencapsulação, explorando carreadores biológicos e novos materiais para a liberação entérica, tem se mostrado promissora (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

1.2 Prebióticos

Os prebióticos podem ser explorados como uma alternativa dietética para o aumento do número de bactérias benéficas na mucosa intestinal, estes ingredientes alimentares não digeríveis, passam pelo cólon e estimulam seletivamente a proliferação e/ou atividade de uma população de bactérias desejáveis *in situ* (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

Alguns dos principais representantes desta classe de compostos são os fruto-oligossacarídeos (FOS) e a inulina, além de galacto-oligossacarídeos, lactulose, isomalto-oligossacarídeo, xilo-oligossacarídeo, gentio-oligossacarídeo e oligossacarídeos de soja (MACEDO, 2005).

Gibson et al. (2004) definiram o termo prebiótico como “ingrediente seletivamente fermentável, que permite mudanças específicas na composição e ou atividade da microbiota gastrointestinal, conferindo benefícios para a saúde e o bem-estar do hospedeiro”.

Para se considerar um substrato dietético como prebiótico deve-se analisar seu enquadramento em três critérios: o substrato não deve ser hidrolisado ou absorvido no estômago ou intestino delgado; deve ser seletivo para bactérias benéficas comensais do cólon como as bifidobactérias; e a fermentação do substrato deve induzir efeitos sistêmicos benéficos para o hospedeiro (MANNING; GIBSON, 2004).

O intestino grosso, onde a microbiota benéfica é majoritariamente representada pelas bifidobactérias, é uma região susceptível à presença de antibióticos, os quais provocam o desbalanceamento da flora intestinal. Assim, a

utilização de prebióticos surge como alternativa para estabilização desta flora, pelo fato de que estes componentes estimulariam de maneira seletiva alguns grupos microbianos benéficos ao hospedeiro (FERREIRA, 2003). As bifidobactérias são micro-organismos anaeróbios estritos e pouco resistentes ao baixo pH, logo, o cultivo *in vitro* e a veiculação das mesmas em alimentos fermentados representa um desafio tecnológico para o processamento destes produtos.

No trato gastrointestinal os efeitos da presença de bifidobactérias são dependentes da sua viabilidade e atividade metabólica, sendo potencializados por carboidratos complexos e de fatores bifidogênicos, também denominados prebióticos (JELEN; LUTZ, 1998). Tais fatores bifidogênicos servem de substrato e estimulam a multiplicação de bifidobactérias e lactobacilos, no intestino grosso, promovem aumento da biodisponibilidade do Ca^{2+} e do Mg^{2+} , além de retardar ou inibir alguns estágios da carcinogênese (YOUNG, 1997).

Estudos sobre doses de consumo adequadas para que os prebióticos possam expressar sua funcionalidade inferem que doses diárias a partir de 4 a 5 g até 20g de inulina e/ou oligofrutose, quando administradas durante no mínimo 15 dias, são consideradas eficientes, já que garantiam a colonização de bifidobactérias no cólon (ROBERFROID, 1999; SHAH; RAVULA, 2000).

1.2.1 Inulina

A inulina é um polissacarídeo de reserva e industrialmente obtida da raiz da chicória. Além de ser utilizada como prebiótico, também confere propriedades tecnológicas, com função edulcorante para uso na indústria alimentícia, além de ser um ingrediente capaz de substituir gorduras e fibras alimentícias. Trata-se de carboidrato polidisperso, constituído de subunidades de frutose (2 a 150), mistura de oligômeros e polímeros, ligados entre si por ligações β -(2,1) frutofuranosídicas e a uma glicose terminal, como ilustra a Figura 3 (OLIVEIRA et al., 2009; SAAD, 2006). Este prebiótico pode ser considerado como um fruto-oligossacarídeo composto por uma mistura de oligômeros de diferentes graus de polimerização (GP), encontrado naturalmente em vegetais como: chicória, cebola, alho (LAURENZO; NAVIA; NEIDITCH, 1999).

Muitos benefícios para saúde estão associados à funcionalidade atribuída a inulina. Após a ingestão, por tratar-se de um carboidrato não digerível, devido à

resistência à hidrólise oferecida pelas ligações β -(2,1) entre as moléculas de frutose, não se gera a priori uma contribuição calórica, e, somente no cólon haverá a degradação da inulina, através da fermentação de bactérias, gerando uma baixa e indireta contribuição calórica (ROBERFROID, GIBSON, DELZENNE, 1993; ROBINSON, 1995). Parâmetros fisiológicos do sistema digestivo como: esvaziamento gástrico, pH, tempo de trânsito e metabolismo lipídico são afetados pela ação da Inulina (ROBERFROID, GIBSON, DELZENNE, 1993).

Figura 3. Estrutura da Inulina.
Fonte: De Vos et al. (2010).

A inulina é apenas hidrolisada em pequenas quantidades no estômago e no intestino grosso, sem a formação de monossacarídeos. Portanto, não há aumento do índice glicêmico, justificando-se a utilização como ingrediente para alimentos destinados à diabéticos (ROBERFROID, 2002).

A legislação brasileira confere a alegação “A inulina contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” e condiciona a alegação para uma quantidade de no mínimo 3 g de inulina no produto pronto para consumo - se o alimento for sólido - enquanto que, para alimentos líquidos, a porção recomendada é de 1,5 g (BRASIL, 2008).

1.2.2 Polidextrose

A polidextrose foi originariamente desenvolvida por cientistas com o objetivo de sintetizar uma substância de baixa caloria, permitindo a formulação de alimentos

em conjunto com outros açúcares visando à redução calórica destes produtos (STOWELL, 2009). Trata-se de um polissacarídeo sintetizado pela polimerização randômica da glicose, na presença de quantidades menores de sorbitol e um catalisador ácido adequado, sob alta temperatura e vácuo parcial. O produto obtido desta condensação não apresenta uma estrutura química bem definida, mas resulta em uma mistura de produtos de polimerização com massas moleculares entre 150-20.000 Da como ilustra a Figura 4 (STUMM; BALTES, 1997; JIE et al., 2000).

A funcionalidade da polidextrose pode ser atribuída às ligações aleatórias deste ingrediente, que por sua vez, impedem que as enzimas digestivas hidrolisem a molécula, ou seja, tornando-a de difícil digestão, sendo que aproximadamente 60% é excretada enquanto que 30% é fermentada no intestino grosso, resultando na produção de dióxido de carbono (CO_2) e ácidos graxos voláteis (YOSHIOKA; SHIMOMURA; SUZUKI, 1994; MURPHY, 2001).

Por ser um polímero solúvel da glicose, proporciona aos alimentos volume e textura, mas somente com um quarto do valor calórico da sacarose (BURDOCK; FLAMM, 1999). Craig et al. (1998) descrevem a polidextrose como polissacarídeo resistente ou oligossacarídeo resistente, reconhecido como fibra dietética, na mesma categoria da inulina e galactooligosacarídeos de soja, além de apresentar baixa digestibilidade e ser capaz de produzir efeitos fisiológicos similares aos de fibras alimentares solúveis.

Jie et al. (2000) observaram que o consumo de 4-12g de polidextrose favoreceu funções intestinais, além de inibir a absorção excessiva de glicose no intestino delgado e reduzir o pH intestinal, já que a fermentação gerou ácidos graxos de cadeia curta, que por sua vez levaram a redução do pH do intestino.

Figura 4. Estrutura da Polidextrose.
Fonte: Craig et al. (1998).

A legislação brasileira confere a alegação “As fibras alimentares auxiliam o funcionamento do intestino. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”, e, condiciona a alegação para uma quantidade de no mínimo 3g de povidexose no produto pronto para consumo, se o alimento for sólido, enquanto que, para alimentos líquidos, a porção é de 1,5 g (BRASIL, 2008).

1.3 Simbióticos

Entende-se por alimentos simbióticos produtos que contêm concomitantemente micro-organismos probióticos e ingredientes prebióticos em sua formulação (HOLZAPFEL; SCHILLINGER, 2002). O consumo destes produtos está associado a efeitos benéficos na saúde dos indivíduos (GIBSON; ROBERFROID, 1995).

O termo simbiótico sugere sinergismo, refere-se ao uso combinado de um composto prebiótico que favorece seletivamente um organismo probiótico, estimulando o seu desenvolvimento (GONZALEZ; ADHIKARI; MADRIZ, 2011).

De modo geral, os componentes prebióticos possuem propriedades que podem influenciar o desenvolvimento dos micro-organismos probióticos, afetando tanto a multiplicação dos probióticos como também das culturas *starters*, quando adicionadas juntamente com as culturas probióticas. As interações que ocorrem entre probióticos e prebióticos *in vivo* podem ser favorecidas devido à adaptação do probiótico ao prebiótico, que condiciona seu metabolismo com um substrato, resultando numa vantagem competitiva para o probiótico (SAARELA et al., 2000; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

O estudo conduzido por Sabikhi, Suthar e Thompson (2010) observou que a adição de inulina como um agente co-encapsulante melhorou a proteção aos micro-organismos probióticos frente às condições adversas como alta temperatura, baixo pH e altas concentrações de sais biliares, em relação à capsulas de alginato, e este comportamento foi relacionado ao potencial sinérgico entre o probiótico e a inulina.

É crescente a utilização combinada dos prebióticos e probióticos. Seguindo esta tendência encontram-se estudos que utilizam prebióticos como material encapsulante. A adição de prebióticos (frutooligossacarídeos e

isomaltooligosacarídeos) à cápsula de alginato melhorou a estabilidade, bem como à resistência a condições gastrointestinais simuladas de bifidobactérias em leite não fermentado (CHEN et al., 2005). Este sinergismo pode ser explicado já que prebióticos possibilitam a formação de estruturas vítreas, que estabilizariam estruturas biológicas através de pontes de hidrogênio (UBBINK; KRUGER, 2006).

1.4 Microencapsulação

O processo de encapsulação tem sido explorado como alternativa para contornar limitações no emprego de substâncias bioativas, fármacos, ingredientes alimentícios, componentes cosméticos, entre outros. A tecnologia de microencapsulação envolve a formação de um micro-ambiente, envolvendo ou incorporando ingredientes pouco estáveis e/ou sensíveis dentro de uma matriz carreadora, isolando-os total ou parcialmente do meio externo. Este dispositivo pode fazer a micropartícula liberar seu conteúdo em taxas controladas, através de uma perturbação externa como temperatura, pH, *stress* mecânico ou presença de enzimas (SHAHIDI; HAN, 1993; ANAL; SINGH, 2007; RODRIGUEZ et al., 2011; SOHAIL et al., 2011).

O conceito primário e o modelo mais bem sucedido deste sistema é aquele encontrado em células vivas, na qual a membrana celular confere proteção aos componentes internos, além de controlar seletivamente a comunicação com o meio externo através de fluxos de entrada e saída de substâncias (FANGER, 1974).

A retenção desses materiais encapsulados é regida pela sua funcionalidade química, solubilidade, polaridade e volatilidade (GHARSALLAOUI, 2007). Shahidi e Han (1993) propuseram seis razões para aplicação da técnica na indústria de alimentos: reduzir a reatividade do núcleo com fatores ambientais, a diminuição a taxa de transferência do material do núcleo para o exterior; promover o manejo mais fácil, controlar a liberação de material do núcleo, mascarar o sabor do núcleo e, finalmente, diluir o recheio quando ele deve ser usado somente em pequenas quantidades. O ingrediente ativo pode ser de material cristalino, de partículas adsorventes irregulares, emulsão, uma suspensão de sólidos, ou uma suspensão de microcápsulas menores.

As estruturas formadas são diferenciadas em função da distribuição do recheio: microcápsula ou micropartícula. A primeira (Figura 5, modelo A) é

denominada terminologicamente de micropartícula ou microesfera, sendo que o material encapsulado distribui-se por todo volume da partícula, homogeneamente, relacionando-se ao tipo “esponja” ou “matriz” onde a partícula é multinucleada (SCHROOYEN et al., 2001). Seguindo-se, o modelo B, é adicionado um recobrimento adicional à micropartícula tipo matriz, configurando-se como uma combinação entre o tipo matriz e reservatório. Por final o modelo C, caracteriza-se pela conformação do tipo “reservatório”, onde o material encapsulado fica localizado na parte central e é envolto pela matriz encapsulante, trata-se de uma partícula mononucleada, denominada microcápsula. Nesta, o núcleo pode ser composto por apenas um ou vários ingredientes e a parede pode ser única ou duas camadas.

Figura 5. Tipos de estruturas obtidas através da microencapsulação. (A) refere-se às chamadas micropartículas (multinucleadas)- tipo matriz, (B) a microcápsula aparece com um recobrimento adicional- combinação (A) e (C), e (C) microcápsula propriamente dita (mononucleada)- tipo reservatório.

Adaptado de Zuidam e Shimoni (2010).

Nos anos 60, no Instituto de Pesquisas Southwest, iniciou estudos utilizando a tecnologia de microencapsulação para óleos essenciais visando retardar e/ou prevenir a oxidação e a perda de substâncias voláteis, além de explorar a liberação controlada destes aromas. Posteriormente a técnica estendeu-se à incorporação de aditivos naturais, corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais, o que impactou diretamente na qualidade nutricional, vida de prateleira e características sensoriais dos produtos (RÉ, 2000). A microencapsulação traduz-se como uma técnica capaz de mascarar sabores indesejáveis, reduzir a reatividade de compostos, promover liberação controlada, e melhorar a absorção de vitaminas e minerais (JACKSON; LEE, 1991; RÉ, 2000).

Na área de alimentos a escolha da técnica de encapsulação a ser empregada é influenciada por fatores como o tamanho de partícula desejado, mecanismo de liberação do componente, escala e custo de produção, e pelas propriedades físico-químicas da matriz e do ingrediente ativo (RÉ, 2000).

1.5 Proteção necessária aos probióticos

Probióticos são considerados bactérias fastidiosas. Durante o intervalo entre processamento até o consumo de alimentos contendo probióticos, estes micro-organismos devem estar protegidos de variáveis como altas temperaturas durante o processamento; dessecação, se aplicado em um produto seco; condições de estocagem, interação com a matriz do alimento, embalagem e ambiente (temperatura, umidade presença de oxigênio). Além disso, depois de consumido, os probióticos devem sobreviver à degradação durante a passagem pelo trato gastrointestinal, em especial devido o meio ácido do estômago e presença de sais biliares no intestino delgado, já que estes sais possuem propriedades detergentes que dissolvem a membrana do micro-organismo, além da ação nociva de enzimas pancreáticas (MANOJLOVIĆ et al., 2010; MADUREIRA et al., 2011; SENAKA RANADHEERA; EVANS; BAINES, 2012).

O ambiente ácido configura-se como uma condição prejudicial ao micro-organismo, sendo um desafio à incorporação de probióticos e à sua liberação entérica. O pH baixo prejudica a viabilidade bacteriana devido a acidificação do citoplasma, que repercute no aumento do consumo de energia necessário para a manutenção do pH intracelular e inibição das reações enzimáticas, as quais por sua vez, afetam severamente a habilidade de produzir ATP, além de causar danos estruturais à membrana celular e macromoléculas como DNA e proteínas (COTTER; HILL, 2003; SHABALA et al., 2006).

Para aumentar a sobrevivência destes micro-organismos em ambiente ácido algumas estratégias têm sido investigadas. Shah e colaboradores (2010) estudaram a influência da adição de algumas vitaminas ou extratos de planta antioxidantes, vitamina B2, B3, B6, C, extrato de semente de uva e de chá verde. Os extratos de semente de uva e chá verde, bem como a vitamina C refletiram em alguma proteção em relação ao suco de fruta modelo, para os micro-organismos *Lactobacillus rhamnosus* HN001, *Bifidobacterium lactis* HN001, e *Lactobacillus paracasei* LPC 37.

Ying et al. (2013) utilizaram o conceito de microencapsulação para aumentar a resistência de *L. rhamnosus* GG (LGG) quando veiculados em suco de maçã. Como matriz encapsulante utilizaram a proteína isolada de soro de leite (WPI), WPI combinado com amido resistente modificado (ARM), ou somente ARM. Concluíram que as matrizes com a presença de WPI conferiram melhor desempenho no meio ácido do suco, já que proporcionaram um microambiente tamponado dentro da partícula, formando um colóide hidratado que protegeu o micro-organismo, portanto isolou o LGG do pH baixo do meio.

A técnica de UV mutagênese combinado com a passo de seleção específica com incubação em baixo pH permitiu o isolamento de uma cepa de *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 conferindo uma melhora na viabilidade do micro-organismo em matrizes de fruta com pH baixo, no caso, suco de maçã pH 3.5 (SAARELA et al., 2011).

Com o mesmo princípio de Ying et al. (2013), visando a proteção através da microencapsulação, Rodrigues et al. (2011) estudaram a microencapsulação de *Lactobacillus paracasei* L26 em rede de gel cálcio-alginato, visando a proteção desta bactéria em suco de fruta (laranja ou pêssego) com meio ácido, estocados sob refrigeração. Além de constatarem a maior resistência dos micro-organismos microencapsulados frente aos livres, também alegaram que o recobrimento com uma segunda camada na cápsula, quitosana ou sulfato de dextrano, pouco interferiu nos resultados de sobrevivência das bactérias.

A microencapsulação tem se consolidado como proteção frente a inúmeras situações, não somente diante do pH baixo, mas em ensaios de temperatura, capacidade de adesão à mucosa intestinal, estabilidade em alimentos, e ensaios que simulam o processo digestivo.

1.6 Microencapsulação de probióticos

Uma característica dos componentes bioativos aplicados em alimentos, como é o caso de uma cultura viva, é que estes são sujeitos à inativação ou degradação rápida, o que acontece no caso dos micro-organismos probióticos. Sendo assim, o “empacotamento” pode adiar o processo de degradação e/ou evitá-la, até que o produto seja exposto nos locais onde se é desejado, fazendo com que a liberação destes componentes se dê de forma controlada, ou seja, disponibilizando este

conteúdo em condições específicas como pH , temperatura ou pressão (DE VOS et al., 2010).

A técnica de microencapsulação pode ser utilizada para manutenção da viabilidade da bactéria probiótica durante o processamento e estocagem, além de assegurar que os probióticos mantenham-se ativos através do trato gastrointestinal e possam expressar sua funcionalidade ao alcançar o local adequado para colonização. A microencapsulação de probióticos é uma técnica capaz de minimizar inconvenientes encontrados com outras técnicas de imobilização das células, tais como limitado carregamento de células, baixa estabilidade mecânica, contaminação, e limitações de transferência de massa (PARK; CHANG, 2000). De acordo com o tipo de aplicação, as células microbianas podem ser encapsuladas para fins de isolamento, a proteção e/ou de liberação controlada (RATHORE et al., 2013). A Figura 6 ilustra os objetivos da microencapsulação dos probióticos.

Pode-se dizer que a microencapsulação de micro-organismos, é um exercício natural que algumas bactérias desenvolveram para responder às condições ambientais desfavoráveis. Estas bactérias produzem moléculas que recobrem elas mesmas, conformando-se como uma membrana protetora, reduzindo a difusão de componentes do meio que exercem efeitos nocivos, implicando na redução da viabilidade das mesmas (KALAIAPATHY, 2003). Por exemplo, algumas bactérias ácido-lácticas produzem exopolissacarídeos, como proposta de proteção, no entanto a proteção destes compostos é insuficiente em relação ao processo de encapsulação propriamente dito (DE VOS, 2010).

Figura 6. Objetivos requeridos na microencapsulação de probióticos.

Fonte: Cook et al. (2012).

Ao serem incorporados nos produtos, durante o processamento e estocagem, muitas situações podem ser nocivas aos micro-organismos probióticos, como a ação de compostos inibitórios produzidos por culturas *starters* em leites fermentados, congelamento, secagem, presença de oxigênio e outros ingredientes (sal, temperos, aromas) (CHAMPAGNE; KAILASAPATHY, 2008). Diante desta conjuntura a técnica é uma ferramenta ímpar, pois pode manter a viabilidade dos probióticos, conferir fácil manuseio e estocagem com efeitos limitados nas propriedades sensoriais, o que tecnologicamente é desejável (PICOT; LACROIX, 2003a, 2003b), além da possibilidade de liberar o probiótico em seu sítio de ação sem alterar as propriedades sensoriais do alimento que for utilizado para veicular o probiótico (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Devido ao tamanho das bactérias probióticas (1-5µm), há uma limitação quanto ao uso de técnicas em escala nano (para produção de nanopartículas), como por exemplo, nanocápsulas sólido-lipídicas (NSL), sendo assim, considera-se pertinente a referência à microencapsulação, quando se discursa sobre encapsulação de probióticos (DE VOS et al., 2010).

Para a microencapsulação de probióticos as técnicas mais utilizadas são a emulsão, a extrusão, spray drying, spray coating, gelificação, enquanto que os materiais mais empregados são polissacarídeos originados de alga marinhas como o alginato e a κ-carragena, de plantas (amidos e goma arábica), ou bactérias (goma gelana e goma xantana), além de proteínas animais como, por exemplo, proteínas do leite e gelatina (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010, FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Muitas são as justificativas e vantagens para encapsular probióticos: aponta-se a proteção de cepas sensíveis ao oxigênio (SUNOHARA et al., 1995); proteção ao congelamento (SHAH; RAVULA, 2000); proteção diante de condições adversas da passagem pelo trato gastrointestinal. Estes possíveis benefícios conferidos pela microencapsulação dependem do pH, composição e textura do alimento onde as micropartículas serão incorporadas, das cepas empregadas, da contagem inicial de células viáveis, do método de encapsulação, e do respectivo carreador utilizado (LEE; HEO, 2000; KALASAPATHY, 2003).

A utilização da técnica de extrusão é amplamente aplicada a encapsulação de probióticos, pois tem se mostrado eficiente em relação à manutenção da sobrevivência das células durante o armazenamento (FÁVARO-TRINDADE;

GROSSO, 2000; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). Outra técnica muito reportada pela literatura é o spray drying, onde o emprego de altas temperaturas é a força motriz para obtenção de partículas (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002). Zhao (2008) encapsulou *L. acidophilus*, utilizando como agente encapsulante β -ciclodextrina e goma arábica e observou a manutenção das células durante estocagem, todavia as células perderam atividade após algumas semanas de estocagem à temperatura ambiente, fato este correlacionado ao estresse provocado pela exposição às altas temperaturas (ANAL; SINGH, 2007).

A técnica de spray coating, é provavelmente a técnica mais disseminada na indústria, já que é possível alcançar grandes volumes de produção, os recobrimentos utilizados podem ser lipídicos. Comercialmente estão disponíveis no mercado as micropartículas PROBIOCAP® (DURAND; PANES, 2003; MANOJLOVIĆ; NÉDOVIĆ; KILASAPATHY; ZUIDAM, 2010).

Técnicas inovadoras, métodos combinados, ou mesmo utilização de materiais inéditos têm impulsionado pesquisas nesta área. Alguns exemplos de estudos de microencapsulação de probióticos estão ilustrados na Tabela 3.

Tabela 3. Algumas técnicas de microencapsulação aplicadas para microencapsulação de probióticos.

Técnica de microencapsulação	Materiais	Resultados	Referência
Gelificação induzida por GDL com caseinato de sódio confinado em sistemas emulsionados água em óleo	<i>Lactobacillus casei</i> , caseinato de sódio, goma gelana e óleo de canola	Obtenção de uma rede de gel densa e com baixa viscosidade. Eficiência de encapsulação de 89,5%. (+)	Nag, Han, e Singh (2011)
Formação de filme proteína-carboidrato-emulsão lipídica	<i>Bifidobacterium infantis</i> , óleo de canola, caseinato, frutoolissacarídeos	Proteção substancial à bactéria durante armazenamento não refrigerado. (+)	Crittenden, Weerakkody, Sanguansri e Augustin (2006)
Extrusão (Alginato de cálcio) e inclusão de prebiótico e recobrimento	<i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , quercetina e quitosana.	Veículo promissor de liberação de células viáveis no cólon. (+)	Chávarri et al. (2010)

Gelificação catalisada por transglutaminase de suspensões de caseína contendo células probióticas	<i>Lactobacillus paracasei</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> e caseinato de sódio	Rendimento de encapsulação de 70 a 93%. Matriz densa de caseína protege os probióticos (+)	Heidebach, Först e Kulozik (2009)
Emulsão dupla água em óleo em água	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , óleo de canola, concentrado de soro	Formação de uma biocápsula. (+)	Pimentel-González et al. (2009)
Emulsão dupla+ tecnologia <i>Supercritical Emulsion Extraction</i> (SEE)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , como bactéria modelo e ácido poli-lático-co-glicólico (PLGA, 75:25) como biopolímero	Produção de micropartículas esféricas contendo bactérias dentro da matriz polimérica. Processo com emulsões duplas. (-)	Della Porta et al. (2012)
Spray drying	<i>Lactobacillus acidophilus</i> (La-05) e <i>Bifidobacterium lactis</i> (Bb-12) Acetato ftalato de celulose como material de parede	<i>B. lactis</i> mais resistente ao processo do que <i>L. acidophilus</i> . <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> , livres e microencapsulados, foram resistentes depois de doze horas em solução de bile simulada. (+)	Fávaro-Trindade e Grosso (2002)
Coacervação complexa seguida por secagem por spray drying	<i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> Complexo caseína/pectina como material de parede.	O processo e o material da parede foram eficazes na proteção durante o processo, e durante à exposição ao suco gástrico simulado (+), <i>B. Lactis</i> microencapsulado perdeu sua viabilidade antes dos 120 dias de armazenamento (-).	Oliveira et al. (2007a)
Coacervação complexa seguida por secagem por leite de jorro	<i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i> e complexo caseína/pectina como material de parede.	Não foi eficiente na proteção destes micro-organismos em valores de pH encontrados no estômago porém boa viabilidade em estocagem à 7°C.	Oliveira et al. (2007b)
Co-extrusão (cloreto de cálcio)	<i>Bifidobacterium lactis</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i> em alginato de cálcio	pH 1 extremamente deletério para os dois probióticos seja na forma livre ou microencapsulada O efeito da exposição à bile não afetou a estabilidade de <i>B. lactis</i> e <i>L. acidophilus</i>	Fávaro-Trindade e Grosso (2000)

*GDL: Glucono- δ lactona

(+) Proteção diante de pH baixo e sais biliares (condições gástricas e intestinais simuladas.

(-) Produção de micropartículas com baixa viabilidade celular.

Kim et al. (2008) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 em alginato de sódio, e analisaram os efeitos da microencapsulação na viabilidade do micro-organismo quando exposto ao fluido gástrico simulado, e o efeito da aplicação de calor durante o tratamento térmico. Além disso, verificaram a assimilação ao colesterol intestinal e capacidade de adesão à mucosa intestinal tanto nos micro-organismos livres como nos encapsulados. As células microencapsuladas exibiram melhor desempenho tanto na resistência ao fluido gástrico como também ao calor, além de não apresentarem qualquer efeito adverso significativo sobre as funcionalidades dos probióticos, concerne a adesão à mucosa e assimilação ao colesterol.

Shah e Ravula (2000) observaram que a microencapsulação de bactérias probióticas repercutiu no aumento da viabilidade em sobremesa láctea fermentada em relação à adição dos micro-organismos na forma livre o que justificaria o emprego da tecnologia para melhorar a viabilidade destes micro-organismos quando aplicados em matrizes alimentícias. Confirmando a eficiência da técnica em outro alimento, no caso sorvete, Homayouni et al. (2008) relataram que as bactérias encapsuladas apresentaram uma viabilidade 30% maior do que as livres durante o mesmo período de armazenamento a mesma temperatura (180 dias e -20°C), indicando que a microencapsulação pode aumentar significativamente a taxa de sobrevivência de bactérias probióticas em sorvete durante um período prolongado. Além disso, adição de probióticos encapsulados não apresentou efeito significativo sobre as propriedades sensoriais do produto.

Um estudo com iogurte também inferiu que a microencapsulação de *L. acidophilus* e *B. Lactis* com cálcio, alginato e amido, refletiu na maior viabilidade do probiótico durante a monitoração da sobrevivência destes probióticos no produto por sete semanas, além de reduzir a pós acidificação do iogurte em relação à adição das bactérias na forma livre (KALAISAPATHY, 2006). Adhikari et al. (2006) analisaram a estabilidade de microcápsulas de *B. longum* com κ -carragena que foram adicionadas em iogurte batido após a fermentação e estocadas a 4,4°C por um período de 30 dias, observou-se que não houve declínio na contagem de células viáveis quando encapsuladas, enquanto que, na forma livre houve uma redução significativa de 89,3% para *B. longum* B6 e 91,8% para *B. longum* ATCC 15708, ressaltando-se mais uma vez que a microencapsulação melhorou a viabilidade dos probióticos.

Zomorodi et al. (2011) estudaram a adição de micro-organismos probióticos livres e encapsulados em queijo e constataram que amostras com lactobacilos microencapsulados receberam pontuações para o atributo sabor maior que os queijos com as formas livres, o que justifica a técnica de microencapsulação para a melhora da percepção sensorial.

Segundo Barreto et al. (2003) após realizar estudo de viabilidade de 177 amostras de 15 marcas de produtos probióticos comercializados no Brasil, no período de janeiro a agosto de 2001, e observar a perda de viabilidade durante a vida de prateleira e contagem inadequada em alguns produtos, ressaltaram a necessidade de pesquisas que objetivem o aprimoramento destes alimentos, melhorando a viabilidade dos mesmos, e pontuaram a microencapsulação como potencial alternativa a ser explorada, além da seleção de cepas mais resistentes , pré adaptação das cepas e adição de micronutrientes e agentes redutores.

1.6.1 Liberação controlada para probióticos no intestino

A microbiota intestinal desempenha importante papel no desenvolvimento e na manutenção da resposta imune intestinal. Um aspecto interessante diz respeito à possibilidade de se promover a manipulação terapêutica para melhorar a saúde do hospedeiro, pela administração de diversas espécies de micro-organismos, coletivamente denominados de probióticos (ALANDER et al., 1999). Por meio das evidências científicas, cada vez mais se solidifica a afirmativa de que a administração de culturas probióticas estimula a multiplicação de micro-organismos benéficos e que pode ainda suprimir o desenvolvimento de micro-organismos potencialmente patógenos, além de reforçar os mecanismos naturais de defesa do corpo (SALMINEN et al., 1998).

A Figura 7 é uma representação esquemática do intestino humano. As bactérias sofrem desafios sequenciais a partir do *stress* do pH baixo no estômago, seguido da ação dos sais biliares, que devido sua natureza antimicrobiana são capazes de dissolver a membrana do micro-organismo, além da atuação das enzimas pancreáticas no intestino delgado. Como resultado população relativamente pequena das bactérias endógenas nas primeiras porções do intestino delgado, duodeno e jejuno (10^2 - 10^4 g⁻¹), a suplementação de probióticos oriundos da dieta (como é o caso dos lactobacilos e bifidobactérias) geralmente se estabelece em

abundância. A elevada contagem temporária dos probióticos pode interagir significativamente com a mucosa intestinal, e, também, desempenhar um papel importante na determinação da taxa de bile e do metabolismo (MADUREIRA et al., 2011; SENAKA RANADHEERA, EVANS, BAINES, 2012).

Na parte posterior do intestino delgado a contagem de micro-organismos probióticos ingeridos decresce e eventualmente torna-se uma menor população no intestino grosso, onde há alta contagem de bactérias endógenas. A região do íleo, sítio responsável em grande parte da resposta imune, onde se encontra em maior abundância placas de Peyer na mucosa, é considerada como um importante sítio para a atividade imune dos probióticos (KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009).

Figura 7. Representação esquemática do intestino humano e distribuição da população de bactérias.

Adaptado de Kleerebezem e Vaughan (2009).

Bactérias lácticas isoladas dos intestinos dos homens e dos animais constituem atualmente uma subdivisão do grupo bactérias probióticas que, quando consumidas em quantidade adequada geram benefícios à saúde. Dentre as bactérias probióticas mais estudadas encontram-se as espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. As bifidobactérias predominam no intestino grosso, especificamente na região do cólon, e os lactobacilos na porção distal e no intestino delgado (PERDIGÓN et al., 2003).

O sistema imunológico do intestino é único e específico em cada parcela de sua extensão. Células imunes específicas amadurecem nos tecidos linfóides associados ao intestino (GALT- *gut associated lymphoid structures*). Estas mesmas

células nas estruturas linfóides ficam em contato contínuo com o lúmen para detectar componentes imunologicamente ativos, que porventura podem ser compostos alimentares bioativos, como os probióticos. Logo, os efeitos destas bactérias na saúde são facilitados pelo contato direto entre estas e as moléculas/receptores sobre a superfície das células imunes (BAUER et al., 2009; ERICKSON; HUBBARD, 2009; DE VOS et al., 2010).

Sob este ponto de vista, se os probióticos são adicionados aos alimentos para estimular a imunoregulação, facilitar a liberação dos probióticos na área em que ocorre a sinalização imunológica é uma condição de suma importância para permitir expressões benéficas na saúde do hospedeiro. Na maioria dos casos esta sinalização ocorre no íleo onde as placas de Peyer estão localizadas, ou mais a frente, onde outros GALTs podem ser encontrados (HARTMANN; MEISEL, 2007).

Diante do exposto, há grandes possibilidades de expressão do potencial terapêutico dos componentes bioativos quando se desenvolve e se domina a imunomodulação, neste caso, favorecendo a liberação dos probióticos no intestino, e por consequência, desencadeando toda cadeia imunológica. Para execução deste algoritmo a microencapsulação emerge como uma técnica capaz de possibilitar este tipo de controle de liberação (DE VOS et al., 2010).

A manipulação do mecanismo que irá desencadear a liberação do componente bioativo (“trigger”- gatilho) pode ser realizada a fim de se viabilizar a liberação no local desejado, através da escolha do método de encapsulação e dos materiais, configurando-se como estratégia efetiva para modulação da liberação. O emprego de técnicas brandas como “cold-induced gelation” descrito por Nag e colaboradores (2011), bem como matérias pertinentes: polímeros gatro-resistentes, biopolímeros e ácido esteárico, corroboram com esta mesma finalidade (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011; KANMANI et al., 2011).

1.7 Spray Chilling

A tecnologia de microencapsulação por *spray chilling* também é conhecida por *spray cooling* ou *spray congealing*. Não há um consenso na literatura com relação à nomenclatura da técnica de *spray chilling*, considerada por vezes, sinônima de *spray cooling* (KILLEEN, 1993; GOUIN, 2004) e também *spray*

congealing (THIES, 2001; ILIĆ et al., 2009; MASCHKE et al., 2007; ALBERTINI et al., 2008). Todavia, alguns trabalhos diferenciam os termos *spray chilling* e *cooling*, normalmente levando-se em consideração o ponto de fusão do material carreador. Assim, denominam *spray chilling* o processo onde se utiliza carreadores com ponto de fusão entre 34 e 44 °C, e *spray cooling* o processo de encapsulação cujo encapsulante possui ponto de fusão mais elevado, de 45 à 122 °C (JACKSON; LEE, 1991; RISCH, 1995; ZUIDAM; SHIMONI, 2010). Já o termo *spray congealing* é empregado quando se utiliza encapsulantes fundidos, independentemente da temperatura de fusão destes (ALBERTINI et al. 2008).

Em linhas gerais, o processo de encapsulação por *spray chilling* pode ser dividido em duas etapas. A primeira consiste na mistura do material a ser encapsulado ao material carreador, normalmente gorduras ou ceras fundidas. Tal incorporação pode ocorrer por dissolução ou mecanicamente (dispersão), sendo a última, a mais aplicada, ou então por meio de uma emulsão, para alguns bioativos hidrofílicos. E, posteriormente à preparação da mistura, segue-se a atomização, normalmente por um bico atomizador aquecido, para manutenção da temperatura adequada, no sentido de evitar a solidificação do material de alimentação no bico. Quando este material nebulizado entra em contato com um ambiente refrigerado (câmara com injeção de ar frio ou N₂ líquido), com temperatura abaixo do ponto de fusão do material da matriz, ocorre transferência de calor entre o material fundido e o ar frio, levando à solidificação do carreador, e, concomitantemente, há formação das micropartículas (KILLEEN, 1993; ILIĆ et al., 2009). A Figura 8 apresenta um esquema de um *spray chiller*, compreendido por uma câmara de resfriamento e um ciclone separador.

A temperatura do material fundido, a temperatura da câmara, a temperatura do ar de atomização, a pressão do ar de atomização e o fluxo de alimentação da mistura fundida são as variáveis com maior influência no processo (ILIĆ et al., 2009). Um revestimento adicional pode ser aplicado às micropartículas obtidas por *spray chilling* para garantir a completa cobertura da partícula e eliminar interações indesejáveis circundantes à mesma, durante o armazenamento e incorporação (LAKKIS, 2007).

Agentes encapsulantes como misturas naturais, semissintéticas ou sintéticas, na maioria das vezes de natureza lipídica são comumente utilizados pela técnica. Os agentes encapsulantes mais utilizados no preparo de partículas são ácidos e alcoóis

graxos, triacilgliceróis e ceras com alto ponto de fusão (FINI et al., 2011). Tais materiais têm sido intensivamente utilizados como excipientes farmacêuticos, pois são produtos de baixo custo, são bem tolerados fisiologicamente, além disso, triacilgliceróis são susceptíveis à ação de lipases e apresentam boa biocompatibilidade, o que minimiza os riscos de toxicidade (FINI et al., 2011).

Figura 8. Esquema de um *spray chiller*.

Inúmeras aplicações para as micropartículas sólido lipídicas têm sido investigadas como, por exemplo, o mascaramento de odor e sabor (AKIYAMA et al., 1993; YAJIMA et al., 1999), proteção do material de recheio, das condições como por exemplo pH, ação de enzimas, umidade, oxigênio, luz, otimização da dissolução de medicamentos pouco solúveis, modulação da liberação do composto, melhorar as propriedades de fluxo, manipulação, aparência entre outras finalidades (ILIC et al., 2009).

Jeon et al. (2005) estudaram a produção de cápsulas de isoflavona com uma matriz lipídica (triacilglicerídeo de cadeia média), na razão lipídio para recheio 15:1 (p/p) por *spray chilling* para posterior aplicação em leite. A isoflavona possui gosto amargo e cor castanha, o que limita sua incorporação direta aos alimentos. Desta

forma a encapsulação foi empregada para contornar estas limitações, e concluiu-se que houve uma redução do colesterol no sangue dos ratos que foram alimentados durante 6 semanas com o leite aditivado com micropartículas de isoflavona. A Tabela 4 exemplifica o emprego da técnica na área alimentícia. Observa-se que a exploração da temática de encapsulação de probióticos em matrizes lipídicas ainda é pouco estudada.

Seguindo este raciocínio, Wegmuller et al. (2006) trabalharam no desenvolvimento, estabilidade e avaliação sensorial pelo teste triangular, de micropartículas contendo ferro, iodo e vitamina A para uso em suplementação de alimentos.

O controle da temperatura durante o processo de solidificação da parede lipídica é importante, já que a manutenção desta ajuda a reduzir o polimorfismo em gorduras, fator que impacta diretamente no perfil de liberação do recheio. A matriz lipídica pode cristalizar em diferentes formas polifórmicas devido às diferentes razões de resfriamento. Por exemplo, no caso de razões de resfriamento rápidas o lipídio fica preferencialmente na forma instável α , já, quando o resfriamento é lento a tendência é o aparecimento da forma β , que é mais estável (ELDEM et al., 1991).

Na temática das MSLs pode-se pontuar a liberação ativada por degradação, ou ativada pela temperatura. No caso da primeira, os lipídios se degradam pela ação das lipases, de acordo com toda evolução do metabolismo lipídico realizado pelo organismo. Em relação à ativação pela temperatura, o núcleo é liberado em resposta à alteração da temperatura, afetando o estado físico e a taxa de liberação do material de recheio. Neste contexto permeiam dois conceitos distintos: sensibilidade à temperatura, pertinente a materiais que se colapsam ou expandem quando uma temperatura crítica é alcançada, e a ativação por fusão, relacionada à fusão do material de parede em resposta a elevação da temperatura, como é o caso das paredes constituídas por um lipídio modificado ou cera (DEPYPERE, 2003).

Pedroso et al. (2012) microencapsularam *L. acidophilus* e *B. lactis* pela técnica de *spray chilling* utilizando material lipídico como agente carreador. Observaram que a sobrevivência dos micro-organismos não foi afetada pelo processo de microencapsulação, além disso, a micropartícula protegeu *L. acidophilus* quando expostos aos fluidos gástrico e intestinal simulados, o que não ocorreu no caso do *B. lactis*. Resultados promissores de viabilidade em temperaturas de refrigeração e congelamento foram observados.

Tabela 4. Estudos de encapsulação pela técnica de *spray chilling*.

Material encapsulado	Agente encapsulante	Referência bibliográfica
Isoflavona	Triacilglicerídeo de cadeia média	Jeon et al. (2005)
Ácido cítrico Solução de glicose	Gorduras de diferentes pontos de fusão Combinações de: (i) ácidos esteárico e oléico, (ii) óleo de soja totalmente hidrogenado e oléico e (iii) álcool cetoestearílico e ácido oléico em diferentes proporções	Nori (1996) Ribeiro (2010)
Ferro, Iodo e Vitamina A Solução de glicose	Óleo hidrogenado de palma Ácidos graxos (esteárico e oléico) e gordura vegetal hidrogenada	Wegmuller et al. (2006) Leonel (2008)
Compostos solúveis em água Vitaminas lipossolúveis	Mistura de lipídios Óleo vegetal hidrogenado, tal como o óleo de amêndoa de palma, óleo de semente de algodão, óleo de semente de sésamo, óleo de palma, cera de carnaúba ou cera de abelha	Chambi et al. (2008) Zoet et al. (2011)
<i>Bifidobacterium lactis</i> e <i>Lactobacillus acidophilus</i>	Gordura obtida da interesterificação de óleo de palma e palmiste	Pedroso et al. (2012)

A técnica de *spray chilling* é muito conveniente para encapsulação de alimentos, já que representa um processo de baixo custo, de fácil *scale up*, contínuo e que pode não necessitar de solventes ou emprego de temperaturas altas, para o caso de compostos termolábeis. Todavia, tem como desvantagens, a reduzida eficiência de encapsulação, a possibilidade de expulsão do recheio durante o armazenamento da partícula, pela natureza lipídica requer incorporação em matrizes com afinidade para evitar separação das micropartículas no produto, principalmente se este for líquido.

1.7.1 Agentes encapsulantes

Dentre as características que definem carreadores hábeis para a técnica, estão à capacidade de ser estáveis sob condições típicas do processo, facilidade de atomização e temperatura de fusão moderada, visando à minimização da degradação do componente do recheio (ACHANTA et al., 1997).

Algumas características como boa propriedade emulsificante, de formação de filme; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade; além da boa estabilidade e ausência de sabores desagradáveis são desejáveis para o processo de encapsulação (SHAHIDI; HAN, 1993).

Na área alimentícia estes agentes encapsulantes podem ser filmes naturais ou sintéticos de grau alimentício. A Tabela 5 apresenta as opções de materiais encapsulantes empregados para encapsulação de alimentos funcionais e ingredientes nutracêuticos.

Tabela 5. Materiais encapsulantes para encapsulação de alimentos, alimentos funcionais e ingredientes nutracêuticos.

Carboidratos	Amido, maltodextrina, xarope de milho, amido modificado, ciclodextrinas;
Celulose	Carboximetilcelulose, metilcelulose, etilcelulose, nitrocelulose, acetilcelulose;
Goma	Goma acácia, ágar, alginato de sódio, carragena;
Lipídios	Cera, parafina, cera de abelha, diacilgliceróis, monoacilgliceróis, óleos, gorduras;
Proteínas	Glúten, caseína, gelatina, albumina, peptídeos, hemoglobina;

Adaptado de: Sahidi; Han, 1993; Fávaro-Trindade; Heinemann; Pedroso, 2011.

Entretanto, os encapsulantes utilizados em processos de encapsulação podem ser divididos, de maneira geral, naqueles de natureza hidrofílica e os hidrofóbicos. Para a aplicação em alimentos, os materiais hidrofóbicos comumente utilizados são os triacilglicerídios, diacilglicerídios, monoacilglicerídios, alcoóis, ácidos graxos livres, ceras naturais entre outros materiais, sendo que a temperatura de fusão destes materiais oscila aproximadamente entre 45 a 85 °C.

A seleção adequada do agente encapsulante, seja de caráter hidrofílico ou hidrofóbico, impacta diretamente na modulação da liberação do princípio encapsulado. A escolha apropriada do material de parede é ímpar, pois terá repercussão em alterações nas propriedades do material encapsulado, propriedades como aumento da estabilidade, controle do perfil de liberação, mascaramento de gosto desagradável, redução da irritação gastrointestinal, possibilitando a viabilidade em determinados meios (WANASUNDARA; SHAHIDI, 1995; YAJIMA et al., 1996; PASSERINI et al., 2002; MASCHKE et al., 2007).

1.7.2 Lipídios como agentes encapsulantes

Lipídios são amplo grupo de compostos quimicamente diversos, compostos solúveis em solventes orgânicos e pouco solúveis ou insolúveis em água (MCCLEMENTS; DECKER, 2010). Ésteres de glicerol com ácidos graxos (AG), os triacilgliceróis constituem 99% dos lipídios de plantas e animais. Podem ser óleos (forma líquida), gorduras (forma sólida) e ceras, ésteres formados a partir de AG e alcoóis de cadeia longa (HOLUM, 1994). A organização da cadeia carbônica interfere sobre características como o ponto de fusão, a estabilidade, a estrutura e a permeabilidade de componentes lipídicos.

Matrizes lipídicas são alternativas interessantes para aplicação como material de revestimento, devido sua habilidade relacionada a uma variedade de estados morfológicos como, por exemplo, emulsões, lipossomas e micropartículas sólidas (LEONEL, 2008).

A utilização de matrizes lipídicas na encapsulação de fármacos é vasta. Inicialmente foi aplicada a partir da técnica de *spray congealing*, na formação de micropartículas sólido lipídicas, e, posteriormente na homogeneização por alta pressão e precipitação de microemulsões (ELDEM; SPEISER; HINCAL, 1991; MULLER; LUCKS, 1996). Comparadas com lipossomas e emulsões as partículas sólidas apresentam algumas vantagens como proteção do ingrediente ativo contra degradação química e modulação da liberação do componente, já as vantagens dos lipossomas e emulsões são suas composições (excipientes bem tolerados).

No início dos anos 90 as vantagens das partículas sólidas, emulsões e lipossomas foram combinados, o que originou as nanopartículas sólido lipídicas-SLN (MÜLLER et al. 2002a). As SLNs podem ser preparadas a partir de lipídios sólidos ou *blends* de lipídios sólidos. Após a preparação pela técnica de *hot homogenisation*, as partículas cristalizam-se, pelo menos parcialmente, nas formas α e β' . Durante o armazenamento, modificações de baixa energia, transformações no cristal tipo β , podem ocorrer. Devido ao alto grau de ordenação e número reduzido de imperfeições no cristal, as NSLs podem causar a expulsão do recheio. Sendo assim, alguns aspectos negativos deste tipo de sistema lipídico como o baixo carregamento da droga, expulsão da droga durante o armazenamento e alto conteúdo de água das dispersões SLN podem ser pontuados. Diante destas limitações desenvolveram-se as nanopartículas lipídicas transportadoras- NLC, que são obtidas de lipídios sólidos e líquidos, incompatíveis espacialmente, levando a

melhor acomodação do ingrediente ativo em suas imperfeições do cristal e da distância entre ácidos graxos e glicerídeos (MÜLLER et al. 2002a).

A Figura 9 ilustra a proposta das NCL para reduzir comportamentos indesejáveis das matrizes lipídicas, como a expulsão do carregamento do componente bioativo. A NCL I baseia-se na mistura de lipídios líquidos e sólidos gerando estruturas que permitem a melhor acomodação das drogas, a NCL II, onde o lipídio solidifica, mas em estado amorfo (sólido, mas não cristalino) e, por fim o tipo NCL III, onde há estruturação do óleo em gordura sólida em água.

Figura 9. Três tipos propostos de NLC como nova abordagem ao tipo convencional (SLN) que pode provocar a expulsão do recheio. NLC I – tipo imperfeito; NLC II – tipo amorfo; NLC III – tipo múltiplo.

Fonte: Müller; Radtke; Wissing (2002a, 2002b)

Ainda sabe-se pouco a respeito do efeito da microencapsulação com matrizes lipídicas na sobrevivência de probióticos, mas por outro lado, sabe-se que óleos/gorduras são barreiras ao oxigênio e à umidade. Mandal et al. (2012) produziram chocolate com adição de *L. casei* NCDC 298 livre ou microencapsulado, observaram que as contagens de células viáveis não se alteraram durante armazenamento refrigerado por 60 dias, atribuíram a sobrevivência dos probióticos independentemente de estarem microencapsulados ou não, ao efeito protetor da matriz, ou seja ao total de sólidos totais no chocolate incluindo os lipídios.

Lahtinen et al. (2007) estudaram a imobilização de bifidobactérias (*B. longum*) em uma matriz lipídica, a qual continha manteiga de cacau, em modelos que simulavam bebidas fermentadas e não fermentadas. A pesquisa mostrou que houve manutenção na viabilidade da bactéria probiótica durante estocagem, o que sugere um resultado positivo, já que provavelmente a matriz lipídica protegeu os micro-organismos frente à água e íons H^+ . Adicionalmente, a possibilidade de veicular micro-organismos probióticos em matrizes lipídicas surge como uma proposta interessante, já que os lipídios são digeridos pelas lípases intestinais, possibilitando a liberação dos mesmos no local onde devem atuar, o que é essencial para assegurar os efeitos benéficos destas bactérias (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDRODO, 2011).

Vantagens como baixo nível de toxicidade, biocompatibilidade, possibilidade de uso de formulações GRAS, fácil processamento, baixo custo, são quesitos que enfatizam alternativa da produção de micropartículas lipídicas.

Pedroso et al. (2012) produziram MSLs contendo *B. lactis* e *L. acidophilus* usando o método de *spray chilling*, com carreador lipídico. Ao analisar as MSLs, observaram que *L. acidophilus* encapsulados foram resistentes aos fluidos gástrico e intestinal simulados e que apresentavam viabilidade de 30 e 60 dias de armazenamento a 37 e 7°C, respectivamente. Diante dos resultados promissores apresentados neste estudo, foi concebida a proposta deste projeto, cujos objetivos foram produzir micropartículas lipídicas sólidas com *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, além de estudar o efeito da adição de componentes prebióticos, para avaliar a influência destes componentes na viabilidade dos probióticos durante 120 dias de armazenamento em diferentes temperaturas, e diferentes formas de estocagem (vácuo e umidade relativa). A estratégia de adição de inulina ou polidextrose foi concebida pela possibilidade de redução da atividade de água da micropartícula que poderia impactar no aumento da viabilidade durante o armazenamento, e pela simbiose com o próprio probiótico, obtendo-se um ingrediente simbiótico. Além disso, a aplicação das micropartículas foi planejada para avaliar o efeito da adição em alimentos, no caso o sorvete.

1.7.3 Polimorfismo em lipídios

Os triacilglicerídios manifestam o polimorfismo, devido à sua capacidade de existir em diferentes estruturas cristalinas, com diferentes empacotamentos moleculares (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

O principal componente estrutural das gorduras plásticas é sua rede de cristais tridimensional. O processo de cristalização é um sistema de ordenação espontâneo, caracterizado pela restrição total ou parcial de movimentos, restrição esta, causada pelas ligações químicas ou físicas entre moléculas de triacilglicerol (RIBEIRO et al., 2009).

Por definição, formas polifórmicas referem-se a fases cristalinas de uma mesma composição química, que diferem na estrutura pela inclinação da ligação química ou pela variação de organização da cadeia carbônica. Sendo que, estas diferentes formas possuem propriedades específicas, como espaço de raios-X, volume específico e ponto de fusão. Muitos fatores determinam a forma polifórmica que será ajustada à circunstância, como pureza, temperatura, razão de resfriamento, presença de núcleos de cristalização e tipo de solvente (LARSSON, 1993).

No estado cristalino, átomos e moléculas organizam-se em posições rígidas, levando a formação de repetições das unidades celulares, altamente organizadas, em padrão tridimensional (LARSSON, 1993).

Ácidos graxos ocorrem em um de três tipos polimórficos básicos, designados α (forma hexagonal), β' (forma ortorômbica) e β (forma triclinica). A forma α é a menos estável e com menor ponto de fusão e a forma β é a mais estável e apresenta o maior ponto de fusão. Transformações de α para β' para β acontecem nesta ordem e são irreversíveis. A matriz lipídica pode cristalizar em diferentes formas polifórmicas devido às diferentes razões de resfriamento. Por exemplo, no caso de razões de resfriamento rápidas o lipídio fica preferencialmente na forma instável α , já, quando o resfriamento é lento a tendência é o aparecimento da forma β (ELDEM; SPEISER; ALTORFER, 1991). A estabilidade termodinâmica e o ponto de fusão relacionado ao tipo do cristal decrescem na ordem: β ; β' ; α . (MCCLEMENTS; DECKER, 2010).

A taxa de nucleação, fenômeno que diz respeito à orientação e, conseqüentemente, à formação de estruturas altamente ordenadas, é influenciada pelo comportamento termodinâmico e por fatores cinéticos, e impacta diretamente sobre o polimorfismo em lipídios (SATO, 2001).

1.7.4 Técnicas para análise de partículas sólido-lipídicas

Uma possível desvantagem da técnica de *spray chilling*, é que o processo impõe a rápida solidificação da mistura fundida, o que pode acarretar em modificação no carreador e/ou no ingrediente bioativo, por exemplo, no estado sólido de drogas (cristalinidade, estado amorfo), diante desta perspectiva algumas análises podem ser realizadas, como DSC (Calorimetria Diferencial de Varredura), HTM (*hot stage microscopy*) e XRD (Difração de raios-X), a fim de detectar possíveis modificações nas características físico-químicas do componente ativo e/ou dos carreadores, e possível interação entre os dois (PASSERINI et al., 2003).

A análise calorimétrica por calorimetria diferencial de varredura (DSC) fornece informações sobre a temperatura de fusão, cristalização, entalpia, transição polimórfica e grau de cristalinidade das partículas. A técnica de difração de raios-X também infere sobre a cristalinidade e eventos de transição polimórfica que podem eventualmente ocorrer em micropartículas e nanopartículas sólido lipídicas (MEHNERT; MÄDER, 2001; HEURTAULT et al., 2003).

A calorimetria diferencial de varredura (DSC) é um método muito explorado e conveniente para estudar as transições de primeira e segunda ordem nos processos de transição de fase. Os termogramas geram informações como a temperatura crítica, o sinal e a quantidade de calor latente envolvido na transição de fase em processos de fusão e de cristalização de óleos e gorduras (DADARLAT et al., 1996).

Na técnica de difração de raios-X, os elétrons são a principal causa da dispersão. Analisam-se estruturas moleculares, principalmente em amostras com reconhecida presença de cristais. No caso de lipídios, difração de raios-X revela a forma polimórfica apresentada pela amostra, pode ainda levantar informações adicionais como o comprimento da cadeia carbônica ou densidade da camada lipídica, através do espaço interplanar (TIMMS, 1984).

Tratando-se de micropartículas sólido lipídicas, a possibilidade de reorganização polimórfica deste lipídio, para níveis mais organizados e energeticamente mais favoráveis é ruim, já que e poderia provocar a expulsão do material de recheio devido à propensão a uma situação de cristalinidade durante a transição de fase polimórfica lipídica após a produção das micropartículas (JENNING et al., 2000). Toda a organização das cadeias dos ácidos graxos pode ser determinada por medidas de difração de raios-X (LARSSON, 1993; JORES et al., 2004).

Kalnin et al. (2002) estudaram as evoluções térmicas e estruturais relacionadas ao fenômeno de cristalização da gordura de óleo de palma interesterificado utilizando-se as técnicas de DSC e difração de raio-X. A análise concomitante das duas técnicas permitiu a monitoração térmica do polimorfismo da gordura.

Grimaldi et al. (2001) analisaram composições diferentes de óleo de palma e palmiste, antes e depois do processo de interesterificação, utilizaram a técnica de DSC, onde obtiveram curvas de fusão e cristalização. Verificou-se então que a reação de interesterificação acarretou no aumento da velocidade de cristalização das frações avaliadas, além de promover uma boa compatibilidade entre os óleos de palma e palmiste.

1.8 SORVETE

Pela legislação brasileira vigente, o sorvete é considerado gelado comestível, esta categoria é definida como produtos alimentícios congelados obtidos a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias ou uma mistura de água e açúcares e outros ingredientes e substâncias previamente submetidas ao congelamento. Podem ser adicionados de outros ingredientes desde que não descaracterizem o produto (BRASIL, 2005).

Sorvete é considerado uma combinação de componentes misturados e congelados como leite, estabilizantes, emulsificantes agentes flavorizantes e adoçantes (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003).

Do ponto de vista tecnológico, os sorvetes são definidos como sistemas alimentícios coloidais estruturalmente complexos. Os cristais de gelo e os glóbulos de gordura sólida estão dispersos em uma fase contínua líquida não congelada, que contém proteínas, carboidratos, sais e gomas, denominada fase soro. A importância da estrutura da gordura e aspectos coloidais do sorvete é amplamente reconhecida. No caso do desenvolvimento de produtos *low-fat* é essencial entender como criar estruturas equivalentes (WALSTRA et al., 1999; GOFF, 2008).

Goff (1997) define o sorvete como um complexo coloidal que consiste em bolhas de ar, glóbulos de gordura, cristais de gelo e uma fase de soro não congelada. Os cristais de gelo e bolhas de ar apresentam tamanho aproximado de 20 a 50µm, e estas bolhas são parcialmente recobertas por glóbulos de gordura que por sua vez são recobertos por uma camada de proteína/emulsificante. A fase

contínua é constituída de açúcares e polissacarídeos de alto peso molecular. A estrutura do sorvete é influenciada por várias etapas do processamento: pasteurização, homogeneização, maturação, congelamento. Por fim, após o processo dinâmico de congelamento, quatro principais componentes estruturais no são desenvolvidos: uma espuma descontínua, uma rede de gordura parcialmente coalescida circundando as bolhas de ar, cristais de gelo e uma contínua, concentrada e não congelada solução aquosa.

Emulsionantes estão incluídos na maioria das formulações industriais, devido o efeito sobre a estrutura de gordura, através do deslocamento de proteínas da interface com o ar, e tornando os glóbulos de gordura mais suscetíveis a coalescência parcial (GOFF, 2008). A Figura 10 ilustra as transformações que ocorrem no glóbulo de gordura durante o processamento do sorvete.

Figura 10. Desenvolvimento de estruturas de gordura em sorvete.
Adaptado de: (EISNER; WILDMOSER; WINDHAB, 2005)

1.8.1 SORVETES PROBIÓTICOS

À composição do sorvete atribui-se a boa capacidade de funcionarem como veículos para culturas probióticas, devido à presença de proteínas do leite, gordura e lactose além de outros componentes, além da condição de armazenamento a temperaturas de congelamento. Além disso, o pH relativamente alto do produto (de 5.5 até 6.5) pode conduzir ao aumento da sobrevivência de culturas lácteas durante a estocagem (CRUZ et al., 2009a).

Do ponto de vista nutricional o sorvete apresenta atributos positivos já que contém leite e porventura incorporação de frutas em sua formulação (Favaro-Trindade et al. 2006 e 2007). A adição de probióticos a este produto remete ao aumento do valor agregado, devido ao apelo funcional.

As matrizes alimentícias funcionais contendo micro-organismos probióticos devem assegurar a viabilidade e estabilidade da cultura probiótica em quantidade adequadas durante armazenamento sem provocar alterações sensoriais indesejáveis no produto (STANTON et al., 2003).

Em especial para produtos congelados, como é o caso do sorvete, algumas etapas do processamento como a incorporação de ar, overrun, e a maneira como o inóculo é adicionado ao produto, e escolha de outros ingredientes (polpas de fruta, suco de frutas) são importantes na viabilidade do produto como matriz com probióticos (CRUZ et al., 2009a).

A incorporação de ar, como etapa imprescindível para a obtenção das características tecnológicas do sorvete, pode comprometer a viabilidade de micro-organismos probióticos, já que o excesso de oxigênio pode ser tóxico para estas bactérias, que são caracterizadas por serem microaerófilas ou anaeróbias facultativas (KAILASAPATHY; SULTANA, 2003).

Singh et al. (2011) estudaram o efeito do consumo de sorvete probiótico com *Bifidobacterium lactis* Bb12 e *Lactobacillus acidophilus* La5 na saúde bucal de indivíduos entre 12 e 14 anos de idade. Os autores concluíram que a administração deste produto em crianças sem cárie aparente, age de maneira positiva reduzindo significativamente o nível de *salivary mutans streptococci*, deslocando as bactérias patogênicas por bactérias probióticas, refletindo na prevenção da desmineralização do esmalte.

Apesar de apresentar-se como um veículo favorável à adição de probióticos o sorvete pode sofrer operações de congelamento e descongelamento, tal

eventualidade pode reduzir a viabilidade dos probióticos, devido à danificação das estruturas celulares, decorrentes da formação de cristais de gelo, e, conseqüentemente, redução ou interrupção da atividade metabólica (PAPADEMAS; BINTZES, 2002).

Trabalhos têm sido reportados na literatura especializada sobre a utilização da matriz sorvete como veiculadora de micro-organismos probióticos. A Tabela 6 apresenta alguns estudos neste contexto com diferentes abordagens sobre o tema.

Tabela 6. Exemplos de trabalhos científicos com sorvetes funcionais.

Variáveis independentes	Sorvete funcional	Resultados	Referência
Efeito da adição de probióticos e prebióticos	1. Sorvete probiótico: adição de <i>Lactobacillus casei</i> e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> 2. Sorvete prebiótico: adição de inulina 3. Sorvete simbiótico: adição de micro-organismos probióticos e inulina	Produtos com boas propriedades nutricionais e sensoriais, Sendo que os melhores resultados obtidos foram observados para o sorvete com <i>Lb. casei</i> e 2,5% inulina.	Di Criscio et al. (2010)
Efeito da variação do teor de gordura da formulação na viabilidade de probiótico.	<i>Lactobacillus delbrueckii</i> UFV H2B20 em três formulações de sorvetes: 1. baixo teor de gordura 2. livre de gordura 3. alto teor de gordura	A sobrevivência do probiótico não foi afetada significativamente ($p > 0,05$) independente da formulação. Células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 incorporadas nas três formulações de sorvete sobreviveram quando expostas ao stress ácido e sais biliares.	Leandro et al. (2013)
Efeito do tipo de embalagem na estabilidade de sorvete probiótico	Sorvete de leite de cabra sabor chocolate com adição de probióticos: <i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>Lactis</i> BB-12, <i>Propionibacterium jensenii</i> 702. Armazenado em três diferentes embalagens: polipropileno, polietileno e vidro.	Durante o armazenamento os probióticos mantiveram contagens adequadas (10^7 - 10^8 UFG/g) por 52 semanas a -20°C . A influência da embalagem não foi evidente em relação a outras propriedades físico-químicas e os atributos sensoriais do produto.	Senaka Ranadheera et al. (2013)

Efeito da microencapsulação na sobrevivência do probiótico.	Sorvetes simbióticos contendo os probióticos <i>Lactobacillus casei</i> (Lc-01) e <i>Bifidobacterium lactis</i> (Bb-12) livres e microencapsulados.	Probióticos microencapsulados em alginato de cálcio apresentaram estabilidade 30% em relação aos livres durante armazenamento por 180 dias e -20°C. Não afetou negativamente as propriedades sensoriais.	Homayouni et al. (2008)
Efeito da matriz carreadora na resistência às condições gastrointestinais e capacidade de adesão.	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5, <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 e <i>Propionibacterium jensenii</i> 702 foram incorporados às matrizes: sorvete de leite de cabra, iogurte tradicional e iogurte com adição de frutas.	O sorvete apresentou a melhor resposta frente a acidez e sais biliares comparados aos iogurtes. O iogurte com frutas promoveu a melhor capacidade de adesão as células Caco-2.	Senaka Ranadheera et al. (2012)

Senaka Ranadheera et al. (2012) após estudarem o efeito do tipo de alimento carreador, quando avaliados em relação a sobrevivência dos probióticos após simulação in vitro pela passagem pelo trato gastrointestinal e a capacidade de adesão de *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 e *Propionibacterium jensenii* 702, observaram que o sorvete apresentou a melhor resposta concerne a resistência frente a acidez e sais biliares comparado com o iogurte natural e iogurte com adição de polpa de frutas.

1.9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACHANTA, A.S.; ADUSUMILLI, P.S.; JAMES, K.W.; RHODES, C.T. Development of hot melt coating methods. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 23, p. 441-449, 1997.

ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRUN, I.U. Survival and Metabolic Activity of Microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Stirred Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 275-280, 2003.

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

AKIYAMA, Y.; YOSHIOKA, A.; ORIBE, H.; HIRAI, S.; KITAMORI, N.; TOGUCHI, H. Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids. **Journal of Controlled Release**, v. 26, p. 1-10, 1993.

ALANDER, M.; DE SMET, I.; NOLLET, L.; VERSTRATE, W.; VON WRIGHT, A.; MATTILA-SANDHOLM, T. The effect of probiotic strains on the microbiota of the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **International Journal of Food Microbiology**, v. 46, n. 1, p. 71-79, 1999.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 348-357, 2008.

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

ANDOH, A.; FUJIYAMA, F. Therapeutic approaches targeting intestinal microflora in inflammatory bowel disease. **World Journal of Gastroenterology**, v. 12, n. 28, p. 4452-4460, 2006.

ANNUK, H.; SHCHEPETOVA, J.; KULLISAAR, T.; SONGISEPP, E.; ZILMER, M.; MIKELSAAR, M. Characterization of intestinal lactobacilli as putative probiotic candidates. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 403-412, 2003.

ARVANITOYANNIS, I.S.; HOUWELINGEN-KOUKALIAROGLOU, M.V. Functional foods: a survey of health claims, pros and cons, and current legislation. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, p. 385-404, 2005.

BAUER, S.; MULLER, T.; HAMM, S. Pattern recognition by Toll-like receptors. **Advances in Experimental Medicine and Biology**, v. 653, p. 15-34, 2009.

BARRETO, G.P.M.; SILVA, N.; SILVA, E.N.; BOTELHO, L.; YIM, P.K.; ALMEIDA, C.G.; SABA, G.L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.6, n.1, p. 119-126, 2003.

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

BOTELHO, L. **Isolamento e Identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em Alimentos Probióticos Disponíveis no Mercado Brasileiro**. 2005. 227 f. Tese (Doutorado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. [2008] Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 28 abr. 2013.

BRASIL. Resolução de Diretoria Colegiada n. 266, de 22 de setembro de 2005. Regulamento técnico para gelados comestíveis e preparados para gelados comestíveis. Diário Oficial da União, Brasília, 22 set. 2005. Disponível em: http://www.suvisa.rn.gov.br/contentproducao/aplicacao/sesap_suvisa/arquivos/gerados/resol_266_set_2005.pdf. Acesso em 25 mar. 2013.

BURDOCK, G.A.; FLAMM, W.G. A review of the studies of the safety of polydextrose in food. **Food and Chemical Toxicology**, v. 37, n. 2-3, p. 233-264, 1999.

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: A literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, n. 4, p. 281-370, 2002.

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

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Selective detection, enumeration and identification of potential probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in mixed bacterial populations. **International Journal of Food Microbiology**, v. 35. n. 1, p. 1-27, 1997.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival on simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 42, p.185-189, 2010.

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

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

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low Ph. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.3, p. 429-453, 2003.

CRAIG, S.A.S.; HOLDEN, J.F.; TROUP, J.P.; AUERBACH, M.H.; FRIER, H.I. Polydextrose as soluble fiber: physiological and analytical aspects. **American Association of Cereal Chemists**, v. 43, n. 5, p. 84-88, 1998.

CRITTENDEN, R., WEERAKKODY, R., SANGUANSRI, L., AUGUSTIN, M. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p. 2280-2282, 2006.

CROSS, M.L. Microbes versus microbes: immune signals generated by probiotic lactobacilli and their role in protection against microbial pathogens. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 34, n.4, p. 245-253, 2002.

CRUZ, A. G.; ANTUNES, A. E. C.; SOUSA, A. L. O. P.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p.1233-1239, 2009a.

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v. 20, p. 344-354, 2009b.

DADARLAT, D.; BICANIC, D.; GIBKES, J.; KLOEK, W.; VAN DEN DRIES, I.; GERKEMA, E. Study of melting processes in fatty acids and oils mixtures. A

comparison of photopyroelectric (PPE) and differential scanning calorimetry (DSC). **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 82, p. 15-23, 1996.

DELLA PORTA, G.; CASTALDO, F.; SCOGNAMIGLIO, M.; PACIELLO, L.; PARASCANDOLA, P.; REVERCHON, E. Bacteria microencapsulation in PLGA microdevices by supercritical emulsion extraction. **The Journal of Supercritical Fluids**, v. 63, p. 1-7, 2012.

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

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, n.4, p. 292-302, 2010.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, A.; MIGNOGNA, R.; CINQUANTA, L.; COPPOLA, R.; SORRENTINO, E.; PANFILI, G. Production of functional probiotic, prebiotic, and synbiotic ice creams. **Journal of Dairy Science**, v. 93, p. 4555-4564.

DURAND, H., PANES, J., 2003. Particles containing coated living micro-organisms, and method for producing same. US Patent and Trademark Office, No. 20030109025.

EISNER, M. D.; WILDMOSER, H.; WINDHAB, E. J. Air cell microstructuring in a high viscous ice cream matrix. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 263, n. 1-3, p. 390-399, 2005.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; ALTORFER, H. Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 178-184, 1991.

ELDEM, T.; SPEISER, P.; HINCAL, A. Optimization of spray-dried and congealed lipid micropellets and characterization of their surface morphology by scanning electron microscopy. **Pharmaceutical Research**, v. 8, p. 47-54, 1991.

ERICKSON, K.L.; HUBBARD, N.E. Assessing mucosal immunity with new concepts and innovative, time-honored strategies. **Nutrition Reviews**, v. 67, p. S172-S182, 2009.

FANGER, G.O. Microencapsulation: A brief history and introduction. In: Microencapsulation: **Processes and applications**. VANDEGAER, J.E. (Ed.), Plenum Press, New York, p. 1-20, 1974.

FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evolution of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; BALIEIRO, J.C.C.; DIAS, P.F.; SANINO, F.A.; ALMEIDA, E. Sensory Acceptability and Stability of Probiotic Microorganisms and Vitamin C in Fermented Acerola (*Malpighia emarginata* DC.) Ice Cream. **Journal of Food Science**, v. 71, n. 6, p. S492-S495, 2006.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; BALIEIRO, J.C.C.; DIAS, P.F.; SANINO, F.A.; BOSCHINI, C. Fermented Yellow Mombin (*Spondias mombin* L) Ice Creams Effects of Culture, pH and Fat Concentration on Melting Rate and Sensory Characteristics of Probiotic. **Food Sci Tech Int.** v.13, n.4, p. 285–291, 2007.

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.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. The effect of the *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Michwissensschaft**, v. 55, n.9, p. 496 -499, 2000.

FÁVARO-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.

FERREIRA, C.L.L.F. Grupo de bactérias lácticas – Caracterização e aplicação tecnológica de bactérias probióticas. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prebióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa, p. 206, 2003.

FINI, A.; CAVALLARI, C.; OSPITALI, F.; GONZALEZ-RODRIGUEZ, M.L. Theophylline-loaded Compritol microspheres prepared by ultrasound-assisted atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 100, n. 2, p. 743-757, 2011.

GOFF, H.D. Review: Colloidal Aspects of Ice Cream-A Review. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 363-373, 1997.

GOFF, H.D. 65 years of ice cream science. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 754-758, 2008.

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

GIBSON, G.R.; PROBERT, H.M.; VAN LOO, J.; RASTALL, R.A.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. **Nutrition Research Review**, v. 17, p. 259-275, 2004.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

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

GOMES, A.M.P.; MACALTA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.

GONZALEZ, N.J.; ADHIKARI, K.; SANCHO-MADRIZ, M.F. Sensory characteristics of peach-flavored yogurt drinks containing prebiotics and synbiotics. **Food Science and Technology**, v.44, n.1, p. 158-163, 2011.

GRIMALDI, R.; GONÇALVES, L.A.G.; GIOIELLI, L.A.; SIMÕES, I.S. Interactions in interesterified palm and palm kernel oils mixtures. II- Microscopy and differential scanning calorimetry. **Grasas y Aceites**, v. 52, n. 6, p. 363-368, 2001.

HARTMANN, R., MEISEL, H. Food-derived peptides with biological activity: from research to food applications. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p. 163-169, 2007.

HEIDEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

HOLUM, R.J. Lipids. In: McMURRY, J.E.; BALLANTINE, D.S.; HOEGER, C.A.; PETERSON, V.E.; CASTELLION, M.E. **Fundamentals of general, organic, and biological chemistry**. John Wiley & Sons, Ins, 1994, p. 566-582.

HOLZAPFEL, W.H.; SCHILLINGER, U. Introduction to pre- and probiotics. **Food Research International**, v. 35, n.2/3, p. 109-116, 2002.

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

ILIĆ, I.; DREU, R.; BURJAK, M.; HOMAR, M.; KERČ, J.; SRČIČ, S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 176-183, 2009.

ISLAM, M.A.; CHEOL, H.Y.; YUN, J.C.; CHONG, S.C. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology Technology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and the food industry. **Lebensmittel-Wissenschaft Technologie**, v. 24, n.4, p. 289-297, 1991.

JELEN, P.; LUTZ, S. Functional milk and dairy products. In: MAZZA, G. **Functional foods: biochemical and processing aspects**. Lancaster: Technomic Publishing, 1998, p. 357-381.

JEON, B.J.; KIM, N.C.; HAN, E.M.; KWAK, H.S. Application of microencapsulated isoflavone into milk. **Archives of Pharmacal Research**, v. 28, n. 7, p. 859-865, 2005.

JIE, Z.; BANG-YAO, L.; MING-JIE, X.; HAI-WEI, L.; ZU-KANG, Z.; TING-SONG, W.; CRAIG, S.A. Estudo sobre os efeitos da ingestão de povidexose sobre as funções fisiológicas em Chineses. **Americam Journal Clinical Nutrition**, v. 72, p. 1503-1509, 2000.

JORES, K.; MEHNERT, W.; DRESHSLER, M.; BUNJES, H.; JOHANN, C.; MÄDER, K. Investigations on the structure of solid lipid nanoparticles (SLN) and oil-loaded solid lipid nanoparticles by photon correlation spectroscopy, field-flow fractionation and transmission electron microscopy. **Journal of Controlled Release**, v. 95, p. 217-227, 2004.

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

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

KAILASAPATHY, K.; SULTANA, K. Survival and β galactosidase activity of encapsulated and free *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in ice-cream. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 223-227, 2003.

KALNIN, D.; GARNAUD, G.; AMENISTSCH, H.; OLLIVON, M. Monitoring fat crystallization in aerated food emulsions by combined DSC and time-resolved synchrotron X-ray diffraction. **Food Research International**, v. 35, p. 927-934, 2002.

KANMANI, P.; KUMAR, R. S.; YUVARAJ, N.; PAARI, K. A.; PATTUKUMAR, V.; ARUL, V. Cryopreservation and Microencapsulation of a Probiotic in Alginate chitosan Capsules Improves Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v.16, n.6, p. 1106-1114, 2011.

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

KILLEN, M.J. Process of spray drying and spray congealing. **Pharmaceutical Engineering**, v. 13, p. 56-64, 1993.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, I.S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **Food Science and Technology**, v.41, n.3, p. 493-500, 2008.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E.E. Probiotic and gut lactobacilli and bifidobacteria: molecular approaches to study diversity and activity. **Annual Reviews of Microbiology**, v. 63, p. 269-290, 2009.

KLEIN, G.; PACK, A.; BONAPARTE, C.; REUTER, G. Taxonomy and physiology of probiotic lactic acid bacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 41, p. 103-125, 1998.

KONSTANTINOV, S.R.; SMIDT, H.; DE VOS, W.M.; BRUIJNS, S.C.; SINGH, S.K.; VALENCE, F.; *et al.* S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 19474-19479, 2008.

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

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. 500-505, 2007.

LAKKIS, J.M. Marketing perspective of encapsulation technologies. In: LAKKIS, J.M. **Encapsulation and controlled release technologies in food systems**. 2007. Blackwell Publishing, Iowa, p. 217-218.

LARSSON, K. **Lipids – molecular organization, physical functions and technical applications**. The Oily Press, Suécia, 237p., 1993.

LAURENZO, K.S.; NAVIA; J.L.; NEIDITCH; D.S. *Preparation of inulin products*. USA Patent number 5,968,365, 1999.

LEANDRO, E.S.; ARAUJO, E.A.; CONCEIÇÃO, L.L.; MORAES, C.A.; CARVALHO, A.F. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2b20 in ice cream produced with different fat levels and after submission to stress acid and bile salts. **Journal of Functional Foods**, v.5, p. 503-507, 2013.

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

LEONEL, A.J. **Produção e Caracterização de Partículas Lipídicas Constituídas por Ácidos Graxos, Gordura Vegetal Hidrogenada e Lecitina na Encapsulação de um Composto Hidrofílico de Baixa Massa Molar**. 2008. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Alimentos e Nutrição, Universidade Estadual de Campinas Campinas, 2008.

MAASSEN, C.B., HOLTEN-NEELEN, C.; BALK, F. Strain-dependant induction of cytokine profiles in the gut by orally administered lactobacillus strains. **Vaccine**, v. 18, p. 2613-2623, 2000.

MACEDO, R.E.F. **Utilização de culturas lácticas probióticas no processamento de produto cárneo fermentado**. 2005. Tese (Doutorado) – Universidade Federal do Paraná, 2005.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011.

MANDAL, S.; HATI, S.; PUNIYA, A.K.; SINGH, R.; SINGH, S. Development of symbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, p.1-7, 2012.

MANOJLOVIC, V., NEDOVIC, V.A., KAILASAPATHY, K., ZUIDAM, N.J., 2010. Encapsulation of probiotics for use in food products. In: Nedovic, N.J.Z.a.V. (Ed.), **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. Springer, New York, pp. 269-302.

MARSHALL, R. T., GOFF, H. D., HARTEL, R. W. (2003). Ice cream. New York: Springer. 357p.

MASCHKE, A.; BECKER, C.; EYRICH, D.; KIERMAIER, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p.175-187, 2007.

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

McCANN, T.; EGAN, T.; WEBER, G.H. Assay procedures for commercial probiotic cultures. **Journal of Food Protection**, v. 59, p. 41-45, 1995.

MCCLEMENTS, D.J.; DECKER, E.A. Lipídeos. In: DAMODARAN, S.; PARHIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 900p.

MEHNERT, W.; MÄDER, K. Solid lipid nanoparticles- production, characterization and applications. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 47, p. 165-196, 2001.

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.

MORAES F.P.; COLLA L.M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v. 3, n. 2, p. 99-112, 2006.

MÜLLER, R.H.; LUCKS, J.S. Medication vehicles made of solid lipid particles (solid lipid nanospheres - SLN). **Eur. Patent Nº 0605497**. Germany, 1996.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 121-128, 2002a.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002b.

MURPHY, O. Non-polyol low-digestible carbohydrates: food applications and functional benefits. **The British Journal of Nutrition**, v. 85, p. S47-S53, 2001.

NAG, A.; HAN, K.S.; SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 4, p. 247-253, 2011.

NORI, M.A. **Produção de microcápsulas de ácido cítrico para utilização em produtos cárneos**. 1996. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas)-Universidade de São Paulo.

OLIVEIRA, E.G.; ROSA, G.S.; MORAES, M.A.; PINTO, L.A.A. Characterization of thin layer drying of *Spirulina platensis* utilizing perpendicular air flow. **Biosource Technology**, v. 100, p. 1297-1303, 2009.

OLIVEIRA, A.C.; MORETTI, T.S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J.C.C.; FREITAS, O.; FÁVARO-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, O.; FÁVARO-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.

O'TOOLE, P. W.; COONEY, J. C. Probiotic Bacteria Influence the Composition and Function of the Intestinal Microbiota. **Interdisciplinary Perspectives on Infectious Diseases**, p. 01-09, 2008.

PAPADEMAS, P.; BINTSIS, T. Microbiology of ice cream and related products. In: ROBINSON, R. K. (Org.). Dairy microbiology handbook. 3.ed. New York: Wiley Inter-Science, 2002. cap. 6, p. 213-260.

PARK, J.K.; CHANG, H.N. Microencapsulation of microbial cells. **Biotechnology Advances**, v. 18, p. 303-319, 2000.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; ALBERTINI, B.; VOINOVICH, D.; MONEGHINI, M.; RODRIGUEZ, L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v. 88, p. 263-275, 2003.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; MONEGHINI, M.; VOINOVICH, D.; ALBERTINI, B.; CAVALLARI, C.; RODRIGUEZ, L. Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 91, p. 699-707, 2002.

PEDROSO, D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, p.127-132, 2012.

PENNA, F. J.; FILHO, L. A. P.; CALÇADO, A.C.; JUNIOR, H.R.; NICOLI, J.R. Bases experimentais e clínicas atuais para o emprego dos probióticos. **Jornal de Pediatria**, v. 76, n. 2, p. 209-217, 2000.

PERDIGÓN, G.; HOLGADO, A.P.R. Mechanisms involved in the immunostimulation by lactic acid bacteria. In: FULLER, R.; PERDIGÓN, G. **Probiotics 3:**

Immunodulation by the Gut Microflora and Probiotics. Dordrecht : Kluwer Academic, 2000, p. 213-233.

PERDIGÓN, G.; LOCASCIO, M.; MEDICI, M.; PESCE DE RUIZ HOLGADO, A.; OLIVER, G. Interaction of Bifidobacteria with the gut and their influence in the immune function. **Biocell**, v. 27, n. 1, p.1-9, 2003.

PIARD, C.; HAUTEFORD, I.; FISCHETTI, V.A.; EHRLICH, D.S.; FONS, M.; GRUSS, A. Cell wall anchoring of the Streptococcus pyogenes M6 protein in various lactic acid bacteria. **Journal of Bacteriology**, v. 179, p. 3068-3072, 1997.

PICOT, A., LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 455-462, 2003a.

PICOT, A., LACROIX, C. Optimization of dynamic loop mixer operating conditions for production of o/w emulsion for cell microencapsulation. **Lait**, v. 83, p. 237-250, 2003b.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J., CAMPOS-MONTIEL, R.G., LOBATO-CALLEROS, C., PEDROZA-ISLAS, R., VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 292-297, 2009.

RATHORE, S.; DESAI, P.M.; LIEW, C.V.; CHAN, L.W.; HENG, P.W.S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.

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

RIBEIRO, A.P.B.; BASSO, R.C.; GRIMALDI, R.; GIOIELLI, L.A.; DOS SANTOS, A.O., CARDOSO, L.P.; GUARALDO GONÇALVES, L.A. Influence of chemical interesterification on thermal behavior, microstructure, polymorphism and crystallization properties of canola oil and fully hydrogenated cottonseed oil blends. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 1153-1162, 2009.

RIBEIRO, M.M.M. **Comportamento de misturas binárias lipídicas na produção de micropartículas por spray chilling e sua influência na liberação de recheio hidrofílico.** 2010. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

RISCH, S.J. Encapsulation: Overview of uses and techniques. In Risch S.J., Reineccius G.A., editors. *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, Washington: American Chemical Society. p 2-7, 1995.

ROBERFROID, M.B. Concepts in functional foods: the case of inulin and oligofructose. **Journal of Nutrition**, v. 129, n. 7, p. 1398S-1401S, 1999.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Digestive and Liver Disease**, v.34, n.2, p. S105-S110, 2002.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G.R.; DELZENNE, N. The biochemistry of oligofructose, a nondigestible fiber: na approach to calculate its caloric value. **Nutrition Reviews**, v. 51, n. 5, p. 137-146, 1993.

ROBINSON, R.K. The potential of inulin as a functional ingredient. **British Food Journal**, v. 97, n. 4, p. 30-32, 1995.

RODRIGUES, D., SOUSA, S., ROCHA-SANTOS, T., SILVA, J. P., SOUSA LOBO, J. M., COSTA, P., AMARAL, M. H., PINTADO, M. M., GOMES, A. M., MALCATA, F. X., FREITAS, A. C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.

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

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 42, n. 1, p. 01-16, 2006.

SAARELA, M.; ALAKOMI, H.L.; MÄTTÖ, J.; AHONEN, A.M.; TYNKKYNNEN, S. Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with improved stability in fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1012-1018, 2011.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p. 197-215, 2000.

SABIKHI, L.; SUTHAR, B.K.; THOMPSON, D.K. Co-encapsulation with inulin to improve the survival of probiotic *Lactobacillus acidophilus* NCDC15 for synbiotic food applications. **Milchwissenschaft**, v. 66, n. 1, p. 18-22, 2011.

SACCARO, D. M. **Efeito da associação de culturas iniciadoras e probióticas na acidificação, textura e viabilidade em leite fermentado**. 2008. 101f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Bioquímica Farmacêutica) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2008.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p. 563-572, 1998.

SATO, K. Crystallization behaviour of fats and lipids- a review. **Chemical Engineering Science**, v. 56, p. 2255-2265, 2001.

SAULNIER, D.M.A.; SPINGLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 135-141, 2009.

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.

SENAKA RANADHEERA, C.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.

SENAKA RANADHEERA, C.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. Production of probiotic ice cream from goat's milk and effect of packaging materials on product quality. **Small Ruminant Research**, v. 112, n. 1-3; p. 174-180; 2013.

SHABALA, L.; MCMEEKIN, T.; BUDDE, B. B.; SIEGUMFELDT, H. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 1-7, 2006.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 127-131, 2000.

SHAH, N.P.; DING, W.K.; FALLOURD, M.J.; LEYER, G. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. **Journal of Food Science**, v.75, n. 5, p.278-282, 2010.

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

SINGH, R.P.; DAMLE, S.G.; CHAWLA, A. Salivary mutans streptococci and lactobacilli modulations in young children on consumption of probiotic ice-cream containing *Bifidobacterium lactis* Bb12 and *Lactobacillus acidophilus* La5. **Acta Odontologica Scandinavica**, V.69, p. 389-394, 2011.

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

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

STOWELL, J.D. Polydextrose. In: CHO, S.S.; SAMUEL, P. **Fiber ingredients: food application and health benefits**. Boca Raton, CRC Press, p. 173-201, 2009.

STUMM, I.; BALTES, W. Analysis of the linkage positions in polydextrose by the reductive cleavage method. **Food Chemistry**, v. 59, n. 2, p. 201-297, 1997.

SUNOHARA, H.; OHNO, T.; SHIBATA, N.; SEKI, K. Process for producing capsule and capsule obtained thereby, Patent number 5478570, US Patent Office, Alexandria,VA, 1995.

TESHIMA, E. Aspectos terapêuticos de probióticos, prebióticos e simbióticos. In: FERREIRA, C.L.L.F. **Prébióticos e Probióticos: Atualização e Prospecção**. Viçosa, 2003.

THARMARAJ, N.; SHAH, N.P. Selective enumeration of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus*, *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacteria*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus rhamnosus*, and *Propionibacteria*. **Journal of Dairy Science**, v. 86, p. 2288-2296, 2003.

THIES, C. A survey of microencapsulation processes. In Benita, S, editors. Microencapsulation: methods and industrial applications, New York: Marcel Dekker p.1-20, 1996.

TRANSPARENCY MARKET RESEARCH. Probiotics Market (Dietary Supplements, Animal Feed, Foods & Beverages) - Global Industry Size, Share, Trends, Analysis, Growth And Forecast, 2012 – 2018. [2013]. Disponível em: <http://www.transparencymarketresearch.com/probiotics-market.html>. Acesso em: 02 abr. 2013.

TUOHY, K.M.; PROBERT, H.M.; SMEJKAL, C.W.; GIBSON, G.R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today, Haywards Heath**, v. 8, n. 15, p. 692-700, 2003.

UBBINK, J.B.; KRUGER, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. **Trends Food Science Technology**, v. 17, p. 244-254, 2006.

VAN BAARLEN, P.; TROOST, F.J.; VAN HEMERT, S.; VAN DER MEER, C.; DE VOS, W.M.; DE GROOT, P.J.; *et al.* Differential NF- κ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 106, p. 2371-2376, 2009.

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. 1349-1354, 2008.

ZOMORODI, S.; ASL, A.K.; ROHANI, S.M.R.; MIRAGHAEI, S. Survival of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium bifidum* in free and microencapsulated forms on Iranian white cheese produced by ultrafiltration. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 1, p. 84-91, 2011.

ZUIDAM, N.J.; SHIMONI, E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: ZUIDAM, N.J.; NEDOVIĆ, V.A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. 2010. Springer Science+Business Media, LLC.

WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.; VAN BOEKEL, M. A. J. S. Cream products. In: WALSTRA, P.; GEURTS, T. J.; NOOMEN, A.; JELLEMA, A.;

VAN BOEKEL, M. A. J. S. (Org.). Dairy technology: principles of milk properties and processes. New York: Marcel Dekker, 1999. cap. 15, p. 405-424.

WANASUNDARA, U.N.; SHAHIDI, F. Storage stability of microencapsulated seal blubber oil. **Journal of Food Lipids**, v. 2, p. 73-86, 1995.

WEGMULLER, R.; ZIMMERMANN, M.B.; BUHR, V.G.; WINDHAB, E.J., HURREL, R. Development, stability, and sensory testing of microcapsules containing iron, iodine and vitamin A for use in food fortification. **Journal of Food Science**, v. 71, p. 181-187, 2006.

YAJIMA, T.; NOGATA, A.; DEMACHI, M.; UMEKI, N.; ITAI, S. Particle design for taste-masking using a spray-congealing technique. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 44, p. 187-191, 1996.

YAJIMA, T.; UMEKI, N.; ITAI, S. Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of clarithromycin in wax matrix. **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**, v. 47, n. 2, p. 220-225, 1999.

YING D.Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHIC, C.; AUGUSTIN, M.A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 1, p. 98-105, 2013.

YOSHIOKA, M.; SHIMOMURA, Y.; SUZUKI, M. Dietary polidextrose affects the large intestine in rats. **The Journal of Nutrition**, v. 124, n. 4, p. 539-547, 1994.

YOUNG, J. N. Developments in probiotics, prebiotics, and synbiotics. IFT Annual Meeting, Orlando, Flórida, 1997.

CAPÍTULO 2

DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO E AVALIAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SÓLIDO-LIPÍDICAS SIMBIÓTICAS

RESUMO

Foram produzidas micropartículas sólido-lipídicas (MSLs) simbióticas com carreador de natureza lipídica, a gordura de palma e palmiste interesterificadas. Foram utilizadas duas cepas de micro-organismos probióticos (*L. acidophilus*-LA e *L. rhamnosus*-LR) e dois prebióticos [inulina (INU) e a polidextrose (POL)], e, a partir destes materiais foram estudadas seis formulações: F1(LA); F2(LA+INU); F3(LA+POL); F4(LR); F5(LR+INU) e F6(LR+POL), sendo que a duas destas, F₁ e F₄, não houve adição dos prebióticos. Avaliação da resistência de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* ao processo de microencapsulação, caracterização morfológica por microscópio ótico, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e confocal, tamanho e distribuição das partículas (por difração de luz laser), análise térmica (DSC), difração de raios-X (XRPD) e espectroscopia na região do infravermelho foram estudados. Avaliou-se a estabilidade das MSLs por 120 dias de armazenamneto em três temperaturas: -18, 7 e 22 °C, com aplicação de vácuo ou umidade relativa controlada (11%), além do ensaio de resistência aos fluidos gástrico e intestinal. A avaliação da resistência dos probióticos em relação à tecnologia de microencapsulação empregada mostrou resultados promissores, já que, o processo de *spray chilling* não levou a reduções significativas de suas células viáveis. Micropartículas esféricas e com superfícies relativamente uniformes foram obtidas, as quais apresentaram uma distribuição de tamanho semelhante para todas as formulações. As análises de difração de raios-X indicaram que as amostras de todos os tratamentos cristalizaram homogeneamente, porém não foi possível determinar quantitativamente o grau de cristalinidade, mas especula-se que a mesma quantidade de material cristalizou em todas as amostras e não foram observadas alterações polimórficas durante o armazenamento. Quanto à análise térmica pode-se dizer que a presença de probióticos e prebióticos não interferiu na alteração da temperatura de fusão para todos os tratamentos estudados, que ficou na faixa de 45,37 a 47,58 °C. Os ensaios de estabilidade mostraram resultados promissores para a formulação F3, contendo

L. acidophilus e polidextrose, que manteve contagens superiores a 10^6 UFC/g durante 120 dias de armazenamento com umidade relativa controlada à -18 e 7°C. As micropartículas conferiram proteção diante das condições gastrointestinais simuladas em relação ao micro-organismo livre. A co-encapsulação de probióticos e prebióticos em matrizes lipídicas demonstrou características de um potencial veículo simbiótico e ser explorado.

2.1 INTRODUÇÃO

Na abordagem de produtos destinados à alimentação, a incorporação de compostos bioativos tem se destacado, tendo em vista a possibilidade de promoção do bem estar e saúde. Associa-se o consumo destes ingredientes ativos a inúmeros benefícios para o consumidor, que por sua vez, reconhece e atenta-se cada vez mais, à relação entre a dieta e sua saúde.

Diante desta perspectiva, projeta-se a investigação dos alimentos funcionais. Nesta classe, a popularidade dos alimentos contendo micro-organismos probióticos é manifesta. Atribui-se à estas bactérias a capacidade de colonizar favoravelmente a microbiota intestinal, modular a resposta imune, melhorar a digestão de lactose e sintomas da constipação intestinal, entre muitos outros reportados pela literatura (SALMINEN et al., 1998; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002; SANDERS, 2003; TEOH et al., 2005; ISLAM et al., 2010).

A partir deste viés, admite-se que a colonização dessas bactérias probióticas, dar-se-á, tanto pelo consumo direto, como através da ingestão de produtos que melhoram seletivamente sua multiplicação no sistema gastrointestinal (CHAMPAGNE; KAILASAPATHY, 2008). Porém, partindo-se da premissa de que situações como meio ácido, presença de oxigênio e/ou sais biliares e processamento, representam condições adversas aos micro-organismos, depara-se com desafios tecnológicos, tanto em relação à incorporação das cepas nos produtos, considerando-se o processamento; a interação com a matriz do alimento; a viabilidade durante a vida de prateleira, como também, o comportamento dos mesmos após a ingestão, sendo que nesta situação os probióticos são expostos ao ambiente nocivo do sistema digestivo.

Um requisito para que os probióticos possam expressar sua funcionalidade no organismo é que cheguem vivos, em contagem e local adequado. Para isso, entende-se que é necessário o consumo regular de produtos com contagens adequadas de probióticos (CHOU; WEIMER, 1999). A Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO, 2002) especifica que o padrão para qualquer alimento comercializado com alegações de saúde devido adição de probióticos, deve conter, por grama, pelo menos, 10^6 a 10^7 UFC (unidades formadoras de colônia) viáveis de bactérias probióticas (SABIKHI et al., 2010).

Portanto, visto as barreiras a serem contornadas, tem-se a técnica de microencapsulação como uma alternativa pertinente para proteção e possibilidade

de liberação controlada do micro-organismo. Trata-se do processo de empacotamento do material de interesse, condicionando-o em um microambiente, com o objetivo de protegê-lo das condições adversas do meio e liberá-lo em seu sítio de ação (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). As micropartículas, além de protegerem os compostos bioativos da degradação química (oxidação e hidrólise, por exemplo), também conferem proteção diante das condições de armazenamento do produto.

A viabilidade de produtos probióticos está associada à sobrevivência destes micro-organismos durante as condições de processamento, e ao resultado sensorial final atingido, já que, se o produto não sustentar qualidades organolépticas agradáveis durante a vida de prateleira o consumidor dificilmente o comprará uma segunda vez (HEENAN et al., 2004).

Outra estratégia para se colonizar benéficamente o intestino é através da ingestão de prebióticos, que são considerados componentes não digeríveis que agem no equilíbrio microbiano intestinal, já que estimulam a proliferação e/ou atividade de bactérias benéficas (GIBSON; ROBERFROID, 1995). Muitos estudos reportam a relação simbiótica entre prebióticos e probióticos, já que os primeiros agem como substrato para as bactérias, gerando uma vantagem competitiva para a colonização e estabelecimento destes micro-organismos benéficos.

Desta maneira, a proposta de produzir e avaliar micropartículas sólido-lipídicas (MSLs) simbióticas sustenta-se na possibilidade de conferir proteção e liberação controlada dos probióticos, baseando-se na utilização de matrizes lipídicas, além da adição do componente prebiótico, atuando em sinergismo, para que a micropartícula apresente maior estabilidade durante o armazenamento. Realizou-se ainda o estudo do comportamento destas MSLs em fluidos gástrico e intestinal simulados, e, também, a estabilidade durante o armazenamento por 120 dias sob temperaturas de -18, 7 e 22°C, tanto com aplicação de vácuo como umidade relativa controlada (11%).

2.2 OBJETIVOS

Esta etapa do projeto de mestrado teve como objetivo o desenvolvimento, caracterização e avaliação de micropartículas sólido-lipídicas (MSLs), obtidas da co-

encapsulação de prebióticos e probióticos por *spray chilling*. Para alcançar o objetivo principal os seguintes objetivos específicos foram atendidos:

- Produção de MSLs com os probióticos, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, e os prebióticos, inulina (INU) e polidextrose (POL), com gordura de palma e palmiste interesterificadas como material carreador, através do método de *spray chilling*;
- Avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação;
- Caracterização das MSLs segundo sua morfologia, tamanho e atividade de água, e através das análises de calorimetria diferencial de varredura, difração de raios-X e espectroscopia na região de infravermelho- FTIR.
- Avaliação da resistência dos micro-organismos em soluções que simulam os fluidos gástrico e intestinal;
- Avaliação da estabilidade durante a estocagem por 120 dias a -18, 7 e 22°C com umidade relativa controlada ou aplicação de vácuo;

2.3 MATERIAL E MÉTODOS

2.3.1 Materiais

Para o preparo da MSL foi utilizado como carreador, uma gordura obtida após processo de interesterificação de óleo de palma totalmente hidrogenado e óleo de palmiste (GPPI), da Vigor (São Caetano do Sul, Brasil). Enquanto que, como material ativo, empregaram-se as culturas de *Lactobacillus acidophilus* (LAC-04) e *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469, gentilmente doadas pela Danisco (Cotia, Brasil) e pelo banco de culturas tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, Brasil), respectivamente.

Os prebióticos incorporados às micropartículas foram inulina (Raftiline® ST - Orafiti GR) e polidextrose (Litesse®), gentilmente cedidos pela Clariant (Suzano, Brasil) e Danisco (Cotia, Brasil), respectivamente.

2.3.2 Composição em ácidos graxos do material encapsulante

A composição em ácidos graxos do agente encapsulante GPPI foi definida através de cromatografia gasosa de ésteres metílicos de ácidos graxos, de acordo com o método oficial 1-62 da AOCS (1998). Utilizou-se um cromatógrafo gasoso da

Shimadzu, modelo GC 2010 AF (Kyoto, Japão) com detector de ionização de chama: coluna SP-2560 0.2 μm , 100 m x 0.25 mm i.d. (Supelco); hélio como gás de arraste na taxa de 1,12 mL/min; temperatura do injetor de 250°C. A temperatura da coluna foi programada de 140°C (5 min), seguida por um aumento de 140 a 240°C a uma taxa de 4°C/min, e 240°C (15 min). A temperatura do detector foi de 250°C. Os ésteres metílicos dos ácidos graxos foram identificados por comparação com os tempos de retenção dos padrões Supelco 37 (PA, EUA) e a quantificação foi realizada por normalização.

2.3.3 Protocolo de congelamento para armazenamento das culturas

As culturas de bactérias probióticas foram congeladas para manutenção de sua viabilidade e, no caso, também para a padronização da contagem do inóculo. As misturas contendo culturas dos micro-organismos em MRS (*DeMan Rogosa and Sharp*) e solução de glicerol 40%, previamente esterilizada, na proporção de 1:1 (v/v), foram acondicionados em tubos *ependorf*, como ilustrado na Figura 11. Os *ependorfs* foram agitados e congelados rapidamente. Posteriormente foram armazenados em ultrafreezer à -80°C.

Figura 11. *Eppendorffs* com os micro-organismos para serem congelados.

2.3.4 Estimativa da concentração bacteriana

A estimativa da concentração microbiana para as cepas bacterianas nos inóculos preparados foi deduzida através da Turbidimetria, técnica baseada em medidas de densidade óptica. Após a multiplicação das culturas em caldo MRS (37°C/24h), realizaram-se diluições e suas respectivas leituras em espectrofotômetro

a 600 nm. Desta maneira, após o plaqueamento do inóculo, relacionou-se a concentração bacteriana, obtida por plaqueamento em profundidade, com a medida de absorbância observada (BEGOT et al., 1996).

2.3.5 Métodos

A Figura 12 ilustra a organização das análises realizadas no desenvolvimento, caracterização e avaliação das MSLs.

Análises para investigar o tamanho e morfologia das partículas são essenciais, uma vez que, a caracterização estrutural e respostas sobre a forma das microcápsulas inferem sobre o comportamento de liberação da matriz, bem como a incorporação do composto de interesse.

Para caracterização das MSLs obtidas por *spray chilling* foram realizadas as seguintes análises: caracterização morfológica, por microscopia ótica, eletrônica de varredura (MEV) e confocal; tamanho e distribuição de partícula, por difração a laser; atividade de água (Aw), difração de raios-X (XRPD), calorimetria diferencial de varredura (DSC) e espectroscopia na região do infravermelho (FTIR).

As avaliações das MSLs produzidas por *spray chilling* foram realizadas para investigar a resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação empregado, a viabilidade dos probióticos microencapsulados durante armazenamento por 120 dias e a resistência aos fluidos gástrico (FGS) e intestinal simulados (FIS).

Figura 12. Esquema das análises realizadas na etapa de desenvolvimento, caracterização e avaliação das MSLs.

2.3.5.1 Preparo do inóculo

As culturas de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foram ativadas em 10 mL de caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe), e incubadas em Biochemical Oxygen Demand- B.O.D. (Tecnal TE 391, Piracicaba-Brasil) por 37°C/18 horas. Posteriormente transferiu-se novamente 5 mL deste material em dois frascos *shots* de 45 mL de caldo MRS, e incubou-se por mais 18h/37°C em jarras contendo gerador de anaerobiose Anaerobac (Probac, São Paulo-Brasil). O material obtido desta última etapa foi centrifugado a 2400g por 9 minutos, e lavado duas vezes com aproximadamente 30 mL de citrato de sódio 2%, e, depois suspenso em um volume de citrato de sódio 2% para obtenção de uma suspensão com contagem final de 10^9 - 10^{10} UFC/mL.

2.3.5.2 Enumeração de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*

A enumeração de células viáveis de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foi realizada através do plaqueamento em profundidade (*pour plate*), com ágar MRS (DeMan Rogosa and Sharp) da Acumedia (Indaiatuba, Brasil), de acordo com o método descrito por Grosso e Fávaro-Trindade (2004). Para a contagem dos micro-organismos nas MSLs utilizou-se citrato de sódio 2% aquecido à temperatura de 50°C para que houvesse a completa fusão do material de parede lipídico, possibilitando a liberação dos micro-organismos nas diluições seriadas. As condições anaeróbicas foram atendidas com a utilização de jarras de anaerobiose, contendo um gerador de anaerobiose (Probac do Brasil- São Paulo, Brasil). As jarras foram incubadas a temperatura de 37°C±1°C por 72 horas. As análises foram realizadas em duplicata, e os resultados expressos em unidades formadoras de colônia (UFC) por grama.

2.3.5.3 Microencapsulação por *spray chilling*

As micropartículas foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Chambi et al. (2008) e Pedroso et al. (2012), com algumas modificações. Inicialmente fundiu-se a gordura em banho-maria (Marconi- MA 184, Piracicaba-Brasil) à temperatura de 50°C. Paralelamente pesou-se o prebiótico em um béquer e o inóculo (preparado conforme o item 2.3.5.1).

Misturou-se o inóculo (4% m/m) ao prebiótico (3% m/m) e posteriormente a gordura fundida. A suspensão foi produzida agitando-se a mistura (probiótico + prebiótico + gordura fundida) em ultra turrax IKA® T-25 (Staufen, Alemanha) a 7000 rpm por 60 segundos. A suspensão foi mantida sob agitação e foi transportada a uma vazão de 60 mL/min por uma bomba peristáltica Masterflex- model 77201-62 (Illinois- Estados Unidos) e posteriormente atomizada em um *spray chiller* (Labmaq, Ribeirão Preto-Brasil) através de um atomizador duplo fluido ($\varnothing=1,2$ mm) em câmara resfriada com corrente de ar à temperatura de $15^{\circ}\text{C}\pm 2^{\circ}\text{C}$ (variação associada às condições ambientais: temperatura e umidade), com pressão de ar de 5 bar.

As MSLs produzidas foram armazenadas em recipientes fechados e estocados em temperaturas de congelamento, para análises posteriores, enquanto que, as amostras destinadas ao estudo de viabilidade foram estocadas em frascos de vidro, com aplicação de vácuo através do liofilizador Terroni LC 1500 (Brasil) ou armazenadas em recipientes hermeticamente fechados com solução saturada de cloreto de lítio (umidade relativa controlada 11%).

2.3.5.4 Formulações das micropartículas

Foram preparadas seis formulações para a atomização, onde se variou os micro-organismos probióticos (*L. acidophilus* e *L. rhamnosus*), e os prebióticos (inulina e polidextrose). A Tabela 7 apresenta as combinações testadas para as formulações das MSLs produzidas. A concentração do inóculo, 4% (m/m) adicionado foi determinada para que fossem produzidas micropartículas com contagem entre 10^7 - 10^8 UFC por grama de MSLs. Já a proporção dos prebióticos, 3% (m/m) foi definida de acordo com Klemmer et al. (2011).

Tabela 7. Tratamentos das micropartículas produzidas por *spray chilling*.

Formulação	Probiótico		Prebiótico	
	Micro-organismo	Concentração	Componente	Concentração
F1	<i>L. acidophilus</i>	4% (v/m)	S/P*	0
F2	<i>L. acidophilus</i>	4% (v/m)	Inulina	3%(v/m)
F3	<i>L. acidophilus</i>	4% (v/m)	Polidextrose	3%(v/m)
F4	<i>L. rhamnosus</i>	4% (v/m)	S/P*	0
F5	<i>L. rhamnosus</i>	4% (v/m)	Inulina	3%(v/m)
F6	<i>L. rhamnosus</i>	4% (v/m)	Polidextrose	3%(v/m)

*S/P: Sem incorporação de prebiótico.

F1: *L. acidophilus*; F2: *L. acidophilus* + inulina; F3: *L. acidophilus* + polidextrose; F4: *L. rhamnosus*; F5: *L. rhamnosus* + inulina; F6: *L. rhamnosus* + polidextrose.

Incluíram-se dois tratamentos controle (F1 e F4), sem a adição de prebióticos, a fim de se avaliar o efeito da adição dos mesmos nas micropartículas.

2.3.6 Caracterização Morfológica

2.3.6.1 Microscopia óptica

A morfologia das micropartículas foi estudada por microscópio óptico (BEL Photonics®, Milão-Itália) equipado com câmera, utilizando-se o software BEL View v. 62, e por microscopia eletrônica de varredura (MEV), utilizando-se microscópio Tabletop Microscope Hitachi (Tóquio, Japão) TM 3000, com o programa TM 3000.

2.3.6.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Para o MEV, as micropartículas foram acomodadas em uma fita de carbono dupla face (Ted Pella, Inc., Redding- Estados Unidos) a qual foi fixada em *stubs* de alumínio. As imagens foram captadas com aceleração de voltagem de 5 kV, com corrente de 1750 mA. Com o objetivo de se investigar a morfologia interna das micropartículas, estas receberam nebulização de N₂ líquido e sucessivos cortes com uma lâmina.

2.3.6.3 Microscopia confocal

A microscopia confocal foi realizada no Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Fotônica Aplicada à Biologia Molecular (INFABIC) da Universidade Estadual de Campinas, utilizando o microscópio confocal LSM 780-NLO Zeiss Axio Observer Z.1 (Carl Zeiss AG, Alemanha), com a objetiva Plan Apochromat 63x/1.4 Oil DIC. Imagens foram coletadas usando o laser de excitação de 605 nm, com pinhole ajustado para 1 unidade em cada canal. Imagens 1024x1024 foram obtidas. Para a fluorescência das bactérias utilizou-se o SYTO 9, o qual é componente do kit de viabilidade L13152: LIVE/DEADs BacLight (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA).

2.3.7 Tamanho e distribuição das partículas

Para a avaliação do tamanho e distribuição de tamanho das MSLs utilizou-se o analisador de partículas por difração de raio laser Shimadzu Sald-201V (Kyoto, Japão). Para a análise, as partículas foram dispersas em álcool etílico (Synth, Brasil) e estabilizadas durante 5 minutos.

2.3.8 Atividade de água

A atividade de água foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices, Pullman, WA).

2.3.9 Análise do comportamento térmico do agente carreador e das micropartículas produzidas- Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC)

Para caracterização do material lipídico e das MSLs, em relação ao seu ponto de fusão, foi realizada a análise de Calorimetria Diferencial de Varredura (Differential Scanning Calorimeter- DSC M2010 TA Instruments, Newcastle, USA), no Laboratório de Tecnologia de Alimentos (LTA) do Departamento de Engenharia de Alimentos ZEA/FZEA/USP. Aproximadamente 10 mg da amostra (gordura/MSLs) foram acondicionadas em cápsulas de alumínio, onde foram submetidas ao aquecimento (10°C/min), entre -50 e 100°C, sob atmosfera inerte (45mL/min de N₂), sendo que, uma cápsula vazia foi utilizada como referência. Os dados foram tratados pelo software Universal Analysis 2000 versão 3.9^a (TA Instruments).

2.3.10 Espectroscopia na região de infravermelho (FTIR)

A caracterização dos ingredientes puros e das MSLs através de espectroscopia de infravermelho na região de 4000 a 600 cm⁻¹ foi realizada utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts/EUA) com o auxílio do software Spectrum One versão 5.3.1.

2.3.11 Difração de raios-X (XRPD)

As amostras de todas as formulações estudadas foram submetidas à análise de difração de raios-X, onde as medidas foram realizadas em um Difractômetro AXS Analytical X - Ray Systems Siemens D 5005 (Alemanha), com radiação Cu-K alfa ($\lambda=1.54056 \text{ \AA}$), inerente ao tubo de cobre, operando com 1600 W de potência (40 kV

x 40 mA). As medidas foram realizadas de 3° a 90° em $\theta/2\theta$, com passo de 0.033° com 1s de contagem por passo. As análises foram realizadas no Laboratório de Caracterização Estrutural - LCE Raio X, do Departamento de Engenharia de Materiais–DEMa da Universidade Federal de São Carlos – UFSCar. As amostras foram analisadas recém-preparadas e depois de 90 dias de armazenamento refrigerado, com a finalidade de investigar o comportamento polimórfico durante o armazenamento das MSLs.

2.3.12 Avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação

Para a avaliação da resistência ao processo de *spray chilling* das bactérias probióticas, os micro-organismos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* foram enumerados antes do processo de encapsulação, na suspensão, e depois, nas micropartículas, as quais foram previamente fundidas em solução aquecida de citrato de sódio (2%). A técnica empregada para a contagem dos probióticos procedeu-se conforme descrito no item 2.3.5.2.

Para a avaliação da resistência ao processo utilizou-se a equação abaixo:

$$Resistência (\%) = \frac{W_{MICROPARTÍCULAS}}{W_{SUSPENSÃO}} \times 100 \quad (\text{Equação 2.1})$$

Onde $W_{MICROPARTÍCULAS}$ é o conteúdo total (dentro e na superfície da MSL) de micro-organismos nas MSLs e $W_{SUSPENSÃO}$, é o conteúdo de micro-organismos na suspensão antes da atomização em câmara refrigerada.

2.3.13 Avaliação *in vitro* da sobrevivência de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* nos fluidos gástrico e intestinal simulados

Avaliou-se a resistência dos micro-organismos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*, simulando a exposição dos mesmos, tanto na forma livre (inóculo) como microencapsulado, aos fluidos gástrico (FGS) e intestinal (FIS) simulados, cujas formulações estão apresentadas na Tabela 8, verificando-se a sobrevivência dos probióticos quando expostos a estas condições específicas.

Realizou-se este ensaio segundo a metodologia descrita por Gbassi et al. (2009). Primeiramente o material estudado, na forma livre ou microencapsulada, foi

exposto ao FGS, durante 120 minutos, com pH ajustado para $1,8 \pm 0,1$, com ácido clorídrico 0,2 M, já que neste pH a enzima pepsina apresenta sua atividade máxima (TOBEY et al., 2001). Nesta etapa foram coletadas alíquotas com 0, 60 e 120 minutos para posterior contagem por plaqueamento. Em seguida, o material remanescente da etapa que simula o FGS, foi submetido ao FIS, com pH ajustado para $6,5 \pm 0,1$ com hidróxido de sódio 0,5 M, durante 180 minutos de ensaio, onde plaqueou-se amostras após 0, 90 e 180 minutos, totalizando-se 5 horas de ensaio. Durante todo o ensaio as amostras ficaram em banho-maria Dubnoff (Diadema-Brasil), com temperatura de 37°C , sob agitação, representando uma situação análoga à passagem pelo trato gastro intestinal humano.

Tabela 8. Composição dos fluidos gástrico e intestinal.

Fluido	Componentes	Proporção	Marca
FGS	Cloreto de sódio	9g/L	Êxodo-científica
	Pepsina da mucosa intestinal de suínos	3g/L	Sigma-Aldrich
FIS	Cloreto de Sódio	9g/L	Êxodo-científica
	Pancreatina	10g/L	Sigma-Aldrich
	Tripsina de pâncreas bovino	10g/L	Sigma-Aldrich
	Sais biliares	3g/L	Oxgall, Dfico

2.3.14 Avaliação da viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem

A viabilidade dos micro-organismos livres e microencapsulados foi determinada através de contagens realizadas após 0, 7, 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem às temperaturas de -18 , 7 e 22°C , com umidade relativa controlada com LiCl (11%U.R.) conforme descrito por Heidebach; Först e Kulozik (2010) ou com aplicação de vácuo. A Figura 13 apresenta as micropartículas armazenadas e depois estocadas em B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand), modelo TE-391 (TECNAL).

Figura 13. Micropartículas estocadas para estudo de viabilidade. (A) armazenamento com aplicação de vácuo; e (B) armazenamento com umidade relativa controlada com solução saturada de Cloreto de Lítio (11%).

2.3.15 Análises Estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas ao nível de 5% de significância, de acordo com o teste de Tukey (quando a Anova detectou alguma diferença significativa) e Anova, com auxílio do software Statistica versão 10 for Windows (Statsoft Inc., 2011). Todas as análises foram realizadas em duplicata.

Para avaliar a variável dependente, contagem de células viáveis, para cada tipo de micro-organismo (*Lactobacillus acidophilus* ou *Lactobacillus rhamnosus*) durante o teste de estabilidade, de acordo com o tipo de formulação concerne adição ou não de prebiótico (inulina, polidextrose ou sem adição de prebiótico), tipo de estocagem (vácuo ou umidade relativa controlada), temperatura de estocagem (-18, 7 e 22°C) e dias de armazenamento (0, 7, 30, 60, 90 e 120), um Delineamento Inteiramente Casualizado (DIC), em um desenho fatorial 3 x 2 x 3 x 6, foi utilizado.

Para este modelo estatístico, uma vez que foram observados efeitos significativos para a interação quádrupla, os desenvolvimentos foram realizados pelo teste de Tukey dentro de cada combinação: prebiótico- tipo de armazenamento- temperatura, prebiótico- tipo de armazenamento- dias de estocagem, prebiótico- temperatura- dias de estocagem e tipo de armazenamento- temperatura- dias de estocagem. Todos os testes foram realizados com o auxílio do Statistical Analysis System © (SAS, 2005), usando o procedimento PROC MIXED.

2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

2.4.1 Caracterização do carreador

A fim de se caracterizar a matriz lipídica utilizada realizou-se estudo da composição em ácidos graxos por cromatografia gasosa e determinação do ponto de fusão através da análise de DSC.

Conforme os resultados apresentados na Tabela 9 verifica-se que a matriz lipídica utilizada era composta exclusivamente de ácidos graxos saturados e majoritariamente pelos ácidos láurico e esteárico. A presença de diferentes ácidos graxos na composição da gordura pode ser interessante para a formação de cristais com tamanhos e formatos distintos, o que facilitaria a acomodação na formação das MSLs, conferindo-lhe maior estabilidade, evitando a expulsão do ingrediente ativo durante o armazenamento devido ao polimorfismo, conferindo proteção ao ingrediente bioativo.

Tabela 9. Composição em ácidos graxos da gordura.

Ácido graxo		Massa (%)
Caprílico	C8:0	3,12 ± 0,01
Cáprico	C10:0	3,14 ± 0,01
Láurico	C12:0	46,59 ± 0,50
Mirístico	C14:0	15,40 ± 0,08
Palmitico	C16:0	9,02 ± 0,15
Esteárico	C18:0	22,64 ± 0,43

A análise de DSC determinou que o ponto de fusão médio da gordura foi de 43,34°C, como ilustra a Figura 14, o que garante a integridade física da micropartícula à temperatura ambiente e durante a passagem na boca, no que diz respeito ao derretimento.

Figura 14. Termograma para a gordura obtida após processo de interesterificação de óleo de palma totalmente hidrogenado e óleo de palmiste.

2.4.2 Curva de concentração bacteriana

As curvas de concentração bacteriana, ilustradas pela Figura 15, correlacionam medidas de absorbância e contagem bacteriana obtida através do plaqueamento em profundidade, conforme descrito no item 2.3.5.2. Utilizou-se esta correlação para a determinação aproximada da contagem de micro-organismos no inóculo, determinando o volume de solução de citrato de sódio 2% a ser adicionado, para a produção de MSLs com contagem de micro-organismos adequada.

Figura 15. Curvas de Concentração bacteriana para os micro-organismos *L. acidophilus* e *L. rhamnosus*.

A partir dos dados obtidos, ajustaram-se os pontos às equações potenciais, que foram utilizadas para o cálculo que estimava a concentração bacteriana no meio, ajustando-se assim a concentração de células requeridas. O ajuste das equações foi satisfatório, como pode ser observado por meio dos valores dos coeficientes de determinação apresentados na Tabela 10.

Tabela 10. Equações para predição da concentração bacteriana no inóculo e seus respectivos coeficientes de determinação.

Bactéria	Equação	Coeficiente de Determinação (R^2)
<i>L. acidophilus</i>	$y = 8,161x^{0,064}$	0,986
<i>L. rhamnosus</i>	$y = 8,597x^{0,057}$	0,999

2.4.3 Caracterização morfológica das micropartículas

Após a produção das MSLs por *spray chilling*, observou-se a obtenção de um pó fino de coloração esbranquiçada como ilustra a Figura 16. Os pós apresentaram a mesma aparência para todas as formulações estudadas.

Figura 16. Imagem do pó contendo as MSLs obtidas por *spray chilling*.

2.4.3.1 Microscopia óptica

A partir das imagens das MSLs captadas por microscopia óptica, apresentadas na Figura 17, observa-se a obtenção de partículas esféricas, o que, possivelmente, facilitaria seu escoamento e a aplicação em alimentos, como relatado por Ilić et al. (2009) que utilizaram também a técnica de encapsulação por *spray chilling* para encapsular o fármaco Glimepiride, uma droga para o tratamento de diabetes, utilizando como matriz encapsulante polímeros hidrofílicos (Gelucire® 50/13, poloxamer 188, e PEG 6000).

A forma esférica da micropartícula de natureza hidrofóbica pode facilitar sua incorporação à matriz alimentícia devido à redução da tensão superficial entre a superfície hidrofóbica da MSL e o ambiente onde será adicionada. Esta forma também facilita o fluxo das MSLs, refletindo em melhor fluidez e escoamento do material (LAKKIS, 2007). Porém algumas limitações relacionadas à própria natureza lipídica das MSLs, como a separação no alimento e a incorporação incompleta no alimento, podem ocorrer.

Figura 17. Imagens captadas por microscopia óptica, referentes às formulações 1(A); e 2(B), com uma lente de aumento de 100X.

2.4.3.2 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A partir da análise das imagens captadas pelo MEV, foi possível observar detalhes da morfologia e microestrutura das MSLs. Esta técnica tem sido empregada para obter informações sobre tamanho, morfologia e algumas vezes inferir sobre a distribuição do recheio nas micropartículas.

As imagens coletadas pelo MEV, ilustradas na Figura 18, novamente mostram o formato esférico das MSLs obtidas por *spray chilling* e informações adicionais, como a presença de superfície relativamente lisa e contínua. Estas características de superfície podem estar associadas ao fato de que o processo de *spray chilling* não envolve evaporação de solventes, fenômeno comumente observado em outras técnicas de microencapsulação, como *spray drying*, que gera partículas geralmente ocas devido à evaporação do solvente em contato com o ar quente, logo as MSLs produzidas por *spray chilling* são usualmente densas e não porosas, além de mecanicamente resistentes, como ilustrado pela Figura 18.

O formato esférico das partículas produzidas pela mesma técnica também foi observado por outros estudos como o de Chambi et al. (2008), onde encapsularam soluções de glicose, caseína e caseína hidrolisada por *spray chilling* utilizando como material carreador misturas de ácido esteárico com ácido laurico ou com ácido oléico, e o de McCarron et al. (2008), que produziram por *spray chilling* micropartículas esféricas carregadas com uma droga hidrossolúvel, Witepsol®, e com triglicerídeos como material encapsulante.

Figura 18. Micropartículas obtidas por *spray chilling*. (A) Formulação 1 com aumento de 500x; (B) Formulação 1 com aumento de 600x.

Por meio da Figura 19, pode-se assumir que as MSLs produzidas não eram microcápsulas verdadeiras, ou seja, partículas do tipo reservatório, onde o material encapsulado é alocado somente no centro sendo recoberto em toda sua extensão pelo agente encapsulante. Trata-se de micropartículas do tipo “matriz” onde o ingrediente ativo distribui-se homogeneamente por todo volume da partícula, inclusive em sua superfície, neste caso a terminologia mais adequada para definir o veículo seria agente carreador ao invés de agente encapsulante, já que não há formação de uma cápsula verdadeira (FÁVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008; JAFARI et al., 2008).

Pedroso et al. (2012) produziram MSLs com probióticos, *L. acidophilus* e *B. lactis*, por *spray chilling* com carreador lipídico, obtiveram também MSLs esféricas. Além disso, observaram que as paredes das MSLs eram irregulares, sendo que o aumento da porção aquosa da emulsão foi correlacionado com o aumento da presença de irregularidades na superfície. Tais irregularidades na superfície não foram claramente observadas na Figura 18, possivelmente pelas diferentes proporções de inóculo e gordura utilizados neste trabalho, porém a presença de alguns poros pode ser observada na Figura 19.

Embora não tenha sido possível visualizar os micro-organismos e nem tampouco sua distribuição na partícula pela técnica empregada, é possível inferir que o material carreador e o componente bioativo se misturam, originando a estrutura densa visualizada na Figura 19. Adicionalmente, como não ocorreu evaporação de solvente, a estrutura formada não era oca, mas sim, totalmente

preenchida em todo seu volume. O principal inconveniente dessa estrutura é que como os micro-organismos estão dispersos por toda partícula, podem estar inclusive em sua superfície e nesta localização apresentam-se susceptíveis às condições adversas do meio, por não estarem propriamente protegidos pelo carreador.

Em função deste comportamento organizacional (característica estrutural), alguns autores denominam partículas do tipo matriz, micropartículas ou microesferas (JAFARI et al., 2008).

Observações similares, como partículas com forma esférica, tamanho em escala micrométrica, e o material de “recheio” normalmente distribuído de maneira uniforme dentro de todo volume da partícula, foram relatadas em estudo de Ilić et al. (2009) que utilizaram mesma técnica de microencapsulação com carreador lipídico.

Figura 19. Visão interna de micropartículas produzidas por *spray chilling* produzidas por *spray chilling*, para a formulação 1 (matriz lipídica+ *L. acidophilus*).

2.4.3.3 Microscopia Confocal

O principal inconveniente da estrutura do tipo matriz, como já exposto, é que, como os micro-organismos estão dispersos por toda partícula, e podem estar inclusive na superfície. A imagem obtida pela da microscopia confocal (Figura 20) confirmou a presença do componente ativo sobre a superfície da MSL. Além disso, ficou claro o formato característico de bacilo dos micro-organismos encapsulados.

Na imagem da Figura 20(A) foi possível diferenciar os micro-organismos coloridos pela fluorescência, onde os coloridos em verde estavam vivos enquanto que os vermelhos estavam mortos. O kit LIVE/DEAD® BacLight™ empregado na microscopia confocal utiliza dois corantes de ácido nucléico o verde fluorescente

SYTO® 9 e o corante vermelho fluorescente iodeto de propídio. Estes marcadores diferem em sua habilidade de penetrar em células bacterianas saudáveis. O SYTO® 9 marca ambas as bactérias vivas e mortas, em contraste o iodeto de propídio penetra somente nas bactérias com danos na membrana reduzindo a fluorescência do SYTO® 9 quando os dois corantes estão presentes. Assim, as bactérias vivas com membranas íntegras apareceram coloridas de verde, enquanto as bactérias mortas com membranas danificadas coloridas de vermelho.

Figura 20. Microscopia confocal de varredura para as MSLs referentes à formulação 1 (500x).

2.4.4 Distribuição de tamanho e diâmetro médio das micropartículas sólido lipídicas

Inúmeros fatores podem influenciar o tamanho médio das partículas obtidas por *spray chilling*, como por exemplo, parâmetros de processo (temperatura e velocidade do ar de resfriamento, equipamento de homogeneização, tubulação do equipamento), composição lipídica da matriz, presença e tipo de tensoativo, composição do recheio, proporção da mistura (recheio/revestimento), condições de armazenamento, entre outros. Isso porque estes se correlacionam com o processo de cristalização lipídica (HEURTAULT et al., 2003).

A Tabela 11 apresenta o diâmetro médio volumétrico das MSLs obtidas por *spray chilling*.

Tabela 11. Informações sobre o tamanho das MSLs obtidas por *spray chilling*.

	Micro-organismo	
	<i>L. acidophilus</i> Tamanho (µm)	<i>L. rhamnosus</i> Tamanho (µm)
Sem prebiótico	65,2±8,1 ^a	62,4±2,8 ^a
Inulina	63,7±5,1 ^a	66,2±3,9 ^a
Polidextrose	66,1±3,9 ^a	69,6±5,1 ^a

Médias de tamanho de partícula seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Os tamanhos médios de partículas variaram de 62,4±2,8 µm a 69,6±5,1 µm, com valor médio de 65,6 ± 4,9 µm, e pela análise estatística inferiu-se que não houve diferença significativa ($p \leq 0,05$) entre os tamanhos médios das MSLs obtidas a partir das diferentes formulações estudadas. Com este resultado entende-se que a adição dos prebióticos nas suspensões não influenciou significativamente o tamanho de partícula independentemente do micro-organismo estudado.

Os valores encontrados estão de acordo com a literatura. Zuidam e Shimoni (2010) descreveram que a técnica de *spray chilling* produz MSLs com tamanho médio que varia de 20 a 200 µm. Também está em conformidade com trabalho desenvolvido por Martins (2010), que encapsulou um fármaco (carbamazepina), com polioxilglicerídeo e polietilenoglicóis como agentes encapsulantes por *spray chilling*, onde se obteve tamanhos médios de partícula entre 53,09 a 78,75 µm.

Pedroso et al. (2012) com estudo de microencapsulação de probióticos por *spray chilling* obtiveram diâmetro médio de partícula inferior ao observado neste trabalho, encontraram diâmetros médios de 40,3 e 24 µm para *B lactis* e *L. acidophilus*, respectivamente. Esta diferença de tamanho pode ser explicada pelo diâmetro do bico atomizador utilizado, que foi menor (0.7mm) e pela incorporação de lecitina nas misturas atomizadas, além de outros parâmetros de processo.

O aspecto sensorial de alimentos pode ser diretamente influenciado pela adição de partículas em sua formulação, todavia diâmetros médios reduzidos podem evitar um impacto sensorial negativo (HEIDEBACH, 2009). Hansen et al. (2002) realizaram testes preliminares no qual revelaram que tamanhos de microcápsulas entre 1 e 3 mm, tinham um aspecto negativo no que diz respeito ao impacto sensorial, fator este que limitava a incorporação direta destas microcápsulas em sistemas alimentícios, tais como creme de leite, iogurte e leite. Esses autores sugeriram que a redução do tamanho da partícula para valores inferiores a 100 µm

seria desejável, considerando o menor impacto na textura, o que permitiria a adição direta de microcápsulas contendo micro-organismos probióticos em vários alimentos. Por outro lado, um tamanho de partícula muito reduzido pode levar a subtração das propriedades de proteção exercidas pelas matrizes encapsulantes, pois, Chandramouli et al. (2004) observaram que quanto maior o diâmetro da cápsula, maior a viabilidade de *Lactobacillus spp.*, em condições gástricas simuladas.

Em todos os tratamentos foram observados diâmetros médios menores que 100 μm , o que parece adequado, já que possivelmente a inclusão destas micropartículas não levará a um impacto sensorial negativo. O próximo capítulo desta dissertação discute a incorporação das MSLs em sorvete, possibilitando então especular se esta afirmativa é de fato pertinente ou não, no caso das MSLs produzida com gordura de palma. No entanto como ilustra a Figura 21, parte das partículas apresentou tamanho entre 100 e 120 μm .

A Figura 21 explora a apresentação da distribuição do tamanho das MSLs por histograma, observa-se um perfil muito similar entre as formulações, com comportamento próximo ao unimodal, onde a maioria das MSLs apresentaram em sua maioria tamanhos entre 60 e 90 μm .

Sugere-se que a adição do prebiótico na concentração estudada não impactou na viscosidade do sistema que por sua vez não influenciou no tamanho e distribuição das MSLs. A não influência dos prebióticos no tamanho e distribuição do tamanho pode ter acontecido devido às baixas concentrações estudadas nas formulações, pois alguns estudos indicam a correlação entre a viscosidade do sistema a ser atomizado e o tamanho de partícula. O aumento da viscosidade levou à uma diminuição da faixa entre $50 < x < 355 \mu\text{m}$, e, ao mesmo tempo um aumento da fração maior, $355 < x < 750 \mu\text{m}$ (ALBERTINI et al., 2008; ALBERTINI et al., 2009).

Observou-se ainda, uma ampla faixa na distribuição de tamanho, corroborando com as imagens obtidas na microscopia ótica e eletrônica de varredura que ilustras MSLs de variados tamanhos (Figuras 17, 18 e 19).

Figura 21. Histograma de distribuição de tamanho de todas as formulações estudadas. (■) F1; (■) F2; (■) F3; (■) F4; (■) F5 e (■) F6.

Observou-se na Figura 21, que grande parte das MSLs apresentou tamanho entre 60 e 90 μm , e cerca de 10% entre 100 a 120 μm . Esses tamanhos de MSLs comportam o carregamento com micro-organismos probióticos, pois o tamanho destas bactérias é da ordem micrométrica. *L. acidophilus* apresenta tamanho típico de 0,6-0,9 μm de largura e 1,5-6,0 μm de comprimento (GOMES; MACALTA, 1998). Desta maneira, por conta destas características dimensionais dos probióticos e das MSLs produzidas, tem-se que foi possível o carregamento dos probióticos nas MSLs obtidas.

2.4.5 Análise do comportamento térmico (DSC)

Uma desvantagem da técnica de *spray chilling*, devido a utilização de carreadores lipídicos, é que pode haver recristalização deste material lipídico durante o armazenamento das MSLs levando à expulsão do princípio ativo. Análises de DSC e XRPD podem detectar possíveis modificações nas características físico-químicas nos componentes do sistema (carreador-componente ativo) (PASSERINI et al., 2003).

A técnica de Calorimetria Diferencial de Varredura é comumente aplicada para estudo do comportamento térmico de compostos e por isso responde à caracterização da cristalinidade em MSLs.

As propriedades térmicas de fusão das MSLs foram estudadas por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) com o objetivo de identificar possíveis diferenças nas formulações produzidas em relação a interação do probiótico com o prebiótico, ou com a gordura.

A técnica baseia-se na diferença do fluxo de calor na amostra e na respectiva referência, que é medida como uma função da temperatura da amostra quando submetida a um programa de temperatura monitorada. Nos diagramas de respostas obtidos, sob forma de curvas, a temperatura *onset* é aquela correspondente ao ponto no qual a curva começa a se desviar da linha base e corresponde ao início da fase de transição. A temperatura máxima de pico correlaciona-se à evolução máxima de pico, corresponde ao momento em que a maioria das espécies lipídicas cristaliza ou funde, dependendo da fase de transição. Por fim, a temperatura de conclusão do fenômeno térmico (*endset*) é a temperatura na qual a curva volta à linha base após a conclusão do fenômeno térmico em questão: fusão ou cristalização (NASSU, 1994). Portanto, resumidamente, no termograma, a temperatura de início é a temperatura na qual se inicia o processo térmico, a temperatura final é aquela na qual o processo é finalizado, e por fim, a temperatura do pico refere-se ao efeito máximo, e a área da curva traduz a intensidade do efeito (entalpia). A Tabela 12 apresenta a temperatura *onset*, temperatura máxima, e entalpia, envolvidos no estudo da gordura; do inóculo; dos micro-organismos e das MSLs, respectivamente.

Pode-se observar que as entalpias da gordura e das amostras estudadas foram relativamente próximas: 123,4 J/g e para as formulações 118,9; 111,0; 123,0; 126,5; 94,66; 127,6, para as formulações F1, F2, F3, F4, F5, F6, respectivamente. Portanto, verificou-se que o gasto de energia requerido para a fusão das amostras e da gordura foi muito similar e que não houve um efeito claro da presença dos prebióticos neste gasto de energético.

Silva et al. (2011) estudaram a produção de nanopartículas sólido-lipídicas carregadas com risperidona, e encontraram valores de entalpia mais baixos para todos os tratamentos em relação ao agente encapsulante (Imwitor® 900K), porém neste estudo as nanocápsulas foram produzidas com adição de surfactantes para produção de pré emulsões e depois por duas técnicas diferentes, ultrassom (US) e homogeneização à alta pressão (HPH), enquanto que no presente estudo não houve adição de agentes emulsificantes, sendo que uma suspensão de material lipídico e

inóculo foram atomizados ao invés da emulsão, o que poderia explicar os diferentes resultados encontrados, isso porque a redução de entalpia está associado a ocorrência de interações entre lipídios sólidos e surfactantes, ou com o aumento da superfície das nanopartículas (BUNGES; UNRUH, 2007).

Tabela 12. Parâmetros do DSC para a matriz encapsulante lipídica, material bioativo e formulações preparadas com diferentes probióticos e com ou sem a adição de prebióticos.

Amostras	Pico de Fusão (°C)	OnSet (°C)	Entalpia(J/g)
Gordura	43,34	32,28	123,4
Inóculo	47,82	47,24	2,89
F1	47,43	39,29	118,9
F2	47,27	34,98	111,0
F3	47,58	34,52	123,0
F4	45,53	34,08	126,5
F5	45,33	36,84	94,66
F6	45,37	35,45	127,6

F1: *L. acidophilus*; F2: *L. acidophilus* + inulina; F3: *L. acidophilus* + polidextrose; F4: *L.rhamnosus*; F5: *L.rhamnosus* + inulina; F6: *L.rhamnosus* + polidextrose.

A GPPI utilizada como material carreador apresentou um pico endotérmico acentuado a 43,34°C. Já o inóculo um pico endotérmico a 47,82°C.

O ponto de fusão para as formulações com adição de *L. acidophilus* foi aproximadamente 4°C superior ao da gordura, enquanto que as formulações com *L. rhamnosus* foi de 2°C acima da temperatura de fusão da GPPI. Variações na quantidade de citrato de sódio 2% do inóculo de micro-organismos podem ter levado a diferenciação quanto ao pico de fusão entre as formulações F1, F2, F3 em relação às F4, F5 e F6, diferenciando-se, portanto, no tipo do probiótico adicionado, *L. acidophilus* ou *L. rhamnosus*.

Na Figura 22, pode-se observar que os termogramas de fusão apresentam-se muito semelhantes para todos os tratamentos (F1, F2, F3, F4, F5 e F6) estudados. E, comparando-se com os termogramas da gordura de palma interesterificada com os tratamentos pode-se concluir que a presença dos diferentes prebióticos ou sua ausência nas micropartículas não provocou alterações significativas no comportamento térmico analisado.

As temperaturas de fusão obtidas foram próximas, variando-se de 45,33 a 47,58°C, entre as formulações avaliadas, e ligeiramente superiores à temperatura de fusão da gordura pura, que foi 43,7°C. De fato esperavam-se resultados similares

entre as amostras, já que a matriz lipídica utilizada foi constante para todas as formulações e que o componente bioativo, composto pelo inóculo de micro-organismos ou inóculo com prebiótico, não deveria apresentar interação com a matriz lipídica e, portanto, não provocaria modificações no comportamento polimórfico da amostra.

Geralmente a inclusão de componentes de recheio lipofílicos, e, portanto, parcialmente solúveis na matriz lipídica, é normalmente acompanhada por uma depressão do ponto de fusão (ZUR MUHLEN et al., 1998; JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000) o que não parece ser o caso de recheios veiculados em solução aquosa, que, neste trabalho, provocou uma pequena elevação. As quatro formulações, que continham a mesma quantidade de prebiótico (F2, F3, F5 e F6) apresentaram temperaturas de fusão muito próximas, em relação ao tratamento de referencia (F1 e F4) indicando pouca influência do prebiótico na alteração da temperatura de fusão das diferentes formulações estudadas.

Figura 22. Termogramas dos tratamentos avaliados, inóculo e material encapsulante (gordura de palma e palmiste interesterificadas), obtidos por DSC. (a) Inóculo de probiótico; (b) carreador GPPI; (c) F1; (d) F2; (e) F3; (f) F4; (g) F5 e (h) F6.

As temperaturas de fusão obtidas para as formulações avaliadas, entre 45,33 a 47,58 °C, conferem estabilidade física ao material à temperatura ambiente e na boca, no que diz respeito à possibilidade de derretimento. No que se refere à funcionalidade tecnológica, permite a incorporação em alimentos que já sofreram ou que não sofrerão tratamento térmico e manutenção da integridade da MSLs incorporadas.

2.4.6 Espectroscopia na Região de infravermelho (FTIR)

A análise FTIR prevê principalmente a detecção de possíveis interações entre o material encapsulado e a matriz encapsulante.

Observa-se na Figura 23 no espectro (a) que há picos característicos para gordura de palma e palmiste interesterificadas, em 2851 e 2919 cm^{-1} estes picos estão associados à presença de compostos carbonilados, mais precisamente a vibração de grupos carboxila, e o pico a 1738 cm^{-1} relacionado à vibração de grupos carbonila. As cadeias de ácidos graxos são principalmente responsáveis pela absorção observada entre 3000 e 2800 cm^{-1} . As ligações ésteres do triacilglicerol C-O (~1175 cm^{-1}); grupo carbonila (~1750 cm^{-1}), e da cadeia acil C-H (3000-2800 cm^{-1}), que se correlacionam com compostos lipídicos, foram detectados no espectro 23 (a) (DUFOUR, 2009).

O espectro de infravermelho para a inulina (Figura 23-b) foi delineado pela natureza de polissacarídeo com ligação C-O-C, característica de carboidratos, entre 1200 e 950 cm^{-1} , confirmando a ligação entre os monômeros. Este intervalo corresponde às vibrações das ligações C-O e ligações C-C (DUFOUR, 2009). Em 3600 a 2800 cm^{-1} há vibrações das ligações O-H e C-H existente nas estruturas dos monossacarídeos e a deformação angular da ligação apareceu em 1639 cm^{-1} . O estiramento assimétrico do grupamento CH_2 foi observado em 2900 a 2950 cm^{-1} (SILVERSTEIN et al., 2006). Segundo Dufour (2009), bandas observadas na região entre 1220-500 cm^{-1} para o polissacarídeo inulina são: 1197; 1162; 1119; 1023; 985 e 932 cm^{-1} , sendo que nos dados experimentais obtidos, bandas claras foram observadas em número de ondas similares, a saber: 1108; 1018; 987 e 930 cm^{-1} .

Em relação à polidextrose (Figura 23-c) há uma vibração pronunciada referente à ligação glicosídica C-O-C (1202- 927 cm^{-1}), vibração de estiramento do aldeído

(1659 cm^{-1}), vibração de estiramento da ligação O-H ($3640\text{-}2978\text{ cm}^{-1}$) e vibração de estiramento de C-H a 2946 cm^{-1} (MICKOVA, COPIKOVA, SYNYTSYA, 2007).

Figura 23. Espectro de absorção na região do infravermelho para os componentes das MSLs. (a) Agente carreador GPPI; (b) inulina e (c) polidextrose.

Figura 24. Espectro de absorção na região do infravermelho para o inóculo de *L. acidophilus* (a) e *L. rhamnosus* (b).

A Figura 24 ilustra os espectros dos inóculos de *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* que se apresentaram muito parecidos.

O amplo pico observado a 3302 cm^{-1} refere-se ao OH *stretching peak*, o que está associado ao fato de que o inóculo para ter a contagem desejada de micro-organismos é suspenso em solução de citrato 2%. A 1640 cm^{-1} a absorção corresponde à ligação C=O (KODALI; DAS; SEN, 2009).

Figura 25. Espectro de absorção na região do infravermelho para as formulações de MSLs para o micro-organismo *L. acidophilus*. (a) F1; (b) F2 e (c) F3.

Figura 26. Espectro de absorção na região do infravermelho para as formulações de MSLs para o micro-organismo *L. rhamnosus*. (a) F4; (b) F5 e (c) F6.

Observando-se o espectro infravermelho das MSLs produzidas, Figuras 25 e 26, em todos os tratamentos apareceram bandas típicas da molécula de água (aproximadamente 3300 cm^{-1}), correspondente ao inóculo, que foi suspenso em meio aquoso. Também foi recorrente a presença das bandas caracterizadas no agente carreador lipídico, próximas a 2900 cm^{-1} e 1800 cm^{-1} em todas as formulações.

Nos espectros das amostras observou-se os mesmos picos que apareceram nos espectros dos ingredientes (gordura, prebiótico e inóculo), sugerindo que não houve interação química entre estes compostos. A ausência de interação entre os componentes nas MSLs obtidas por *spray chilling* tem sido registrada em outros estudos.

Albertini et al. (2010) encapsularam atenolol em excipiente lipídico, e caracterizaram as MSLs obtidas por DSC, XRPD e FTIR, sendo que, nenhuma modificação no estado sólido ou interações químicas foram detectados nas microesferas depois do processamento e durante a estocagem. Passerini et al. (2006) encapsularam praziquantel em *spray congealing* utilizando um dispositivo ultrasonico e como agente carreador lipídico Gelucire 50/13 e na análise dos espectros observaram que aqueles correspondentes às misturas físicas e as micropartículas eram sobreponíveis, ou seja, nenhuma alteração nas características dos picos da droga e do carreador foram evidentes, sugerindo a ausência de interações significativas.

2.4.7 Difração de Raios-X

As Figuras 27 e 28 apresentam os perfis de difração das amostras recém-preparadas e com 90 dias de armazenamento refrigerado. Observa-se que os difratogramas apresentaram perfis que se sobrepõem, independentemente da formulação ou tempo de estocagem, indicando que não houve recristalização com alteração da forma polimórfica ao longo da estocagem, o que poderia acarretar na expulsão dos micro-organismos da MSL. Pois, por se tratar de uma matriz lipídica, deve-se considerar a tendência de uma reorganização polimórfica para níveis energeticamente mais favoráveis, sendo que tal comportamento poderia levar a possível expulsão do material encapsulado, uma vez que seria produzido outro arranjo cristalino (JENNING; THÜNEMANN; GOHLA, 2000; MÜLLER; RADTKE;

WISING, 2002a; MÜLLER; RADTKE; WISING, 2002b; SCHUBERT; MÜLLER GOYMANN, 2005; GAMBOA et al 2011).

Figura 27. Difrátogramas XRPD para as formulações de *L. acidophilus* para amostras recém-preparadas e após 90 dias de armazenamento. (—) F1: 0 dias; (.....) F1: 90 dias; (—) F2: 0 dias; (.....) F2: 90 dias; (—) F3: 0 dias; e (.....) F3: 90 dias.

Figura 28. Difrátogramas XRPD para as formulações de *L. acidophilus* para amostras recém preparadas e após 90 dias de armazenamento. (—) F4: 0 dias; (.....) F4: 90 dias; (—) F5: 0 dias; (.....) F5: 90 dias; (—) F6: 0 dias; (.....) F6: 90 dias.

Adicionalmente, o comportamento observado para o material lipídico (Figura 27 e 28), onde foi detectada a presença de picos principais próximos aos ângulos 20,95° e 23,46°, foi pertinente ao encontrado na literatura. Gamboa, Gonçalves e Grosso (2011) produziram MSLs com tocoferol por *spray chilling* e encontraram picos principais correspondentes aos ângulos 19,3°; 22,8° e 23,1°. Estes autores associaram estes picos com a forma polimórfica β . Da mesma maneira Schenk et al. (2006) e Keller et al. (1996) realizaram análises de difração de raios-X para amostras lipídicas e constataram presença de um pico principal em torno de 19,5° e também associaram este pico à forma cristalina β .

De acordo com os picos observados e com o embasamento da literatura, pode-se dizer que as MSLs estavam associadas com a forma polimórfica β , ou forma triclinica, que é a forma cristalina mais estável e que apresenta, portanto o maior ponto de fusão. Esta condição é muito importante, considerando-se que as MSLs produzidas devem conferir proteção aos micro-organismos e também evitar a exclusão deste componente ativo durante o armazenamento, que consequentemente levaria a perda de viabilidade do probiótico.

Outro viés a ser explorado nas Figuras 27 e 28 foi a ausência de transformações polimórficas durante o armazenamento das MSLs, onde os difratogramas obtidos nas amostras recém preparadas e após 90 dias de estocagem, apresentaram-se muito similares.

O mesmo comportamento frente à estocagem de MSLs também foi encontrado por Gamboa, Gonçalves e Grosso (2011), que estudaram a encapsulação de tocoferol em matrizes lipídicas obtidas pelo mesmo método de encapsulação deste trabalho. Esses autores observaram padrões de difrações similares e não encontraram diferenças significativas devido ao tempo de estocagem das MSLs após 180 dias de armazenamento. Os difratogramas foram muito similares entre os testes, além de registrarem uma baixa porcentagem de cristalinidade possivelmente devido à presença de sólidos amorfos.

2.4.8 Atividade de Água (Aw)

A atividade de água é um parâmetro muito importante no que se refere à viabilidade de micro-organismos (KAILASASAPATHY, 2003; TCHAWALKAR; KALAISAPATHY, 2003). Os valores de atividade de água (Aw) se equilibram com a

situação de umidade relativa do ambiente, logo, a estocagem em altas umidades relativas aumenta o conteúdo de água livre na amostra o que é prejudicial para a sobrevivência dos micro-organismos. Por outro lado, umidades relativas muito reduzidas promove remoção de água das células podendo aumentar a possibilidade de danos aos probióticos. Assim, umidades relativas entre 7 e 11% tem sido indicadas como valores ideais para a sobrevivência de bactérias probióticas (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1995). A Aw das MSLs foi medida durante o armazenamento e se observou que as melhores respostas de estabilidade correlacionaram-se com os tratamentos armazenados a umidade relativa controlada de 11%, onde as Aws apresentaram-se reduzidas, em relação àquelas que não foram armazenadas com este controle de umidade.

A Tabela 13 apresenta a Aw das MSLs recém-preparadas, para todas as formulações estudadas.

Tabela 13. Atividade de água para as MSLs.

Tratamento	Atividade de água	
	<i>L. acidophilus</i>	<i>L. rhamnosus</i>
Sem prebiótico	0,948 ± 0,023 ^a	0,931 ± 0,019 ^a
Inulina	0,882 ± 0,014 ^b	0,905 ± 0,029 ^a
Polidextrose	0,871 ± 0,013 ^b	0,891 ± 0,032 ^a

Médias de Aw das MSLs seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Observa-se que no caso das formulações com *L. acidophilus* a inclusão dos componetes prebióticos levou a uma significativa redução na Aw das MSLs, fato que não foi observado no caso do *L. rhamnosus*, onde as Aws para as formulações F4, F5 e F6 não apresentaram diferença significativa.

Vesterlund et al. (2012) avaliaram o efeito da Aw na estabilidade de *L. rhamnosus* GG (LGG) por longo período em um alimento seco, em uma matriz a base de semente de linhaça triturada e em matrizes de maltodextrina como referência. Estes autores estudaram três Aw, 0,11, 0,22 e 0,43, sendo que as preparações foram estocadas a temperatura ambiente por 14 meses. A viabilidade deste probiótico foi pouco dependente da matriz em que foi veiculado, porém, fortemente dependente da Aw. A perda de viabilidade do micro-organismo na matriz de linhaça foi rápida na maior Aw, na Aw intermediária foi de 2,4 ciclos logarítmicos, enquanto que, na menor Aw foi de somente 0,29 ciclos log durante todo período de

armazenamento. Este estudo ilustra o impacto da Aw na viabilidade de micro-organismos, esta correlação entre Aw e viabilidade dos micro-organismos também foi observada no caso das MSLs.

Na Figura 29 é possível visualizar a dinâmica da atividade de água das MSLs dentro de cada sistema de armazenamento estudado proveniente da combinação vácuo e umidade relativa controlada e temperatura (-18, 7 e 22 °C), durante os 120 dias de estocagem.

Após sete dias de armazenamento sob vácuo ou sob UR controlada as MSLs apresentaram diferentes Aws em relação à inicial. A Tabela 14 registra as Aws determinadas nesta condição.

Tabela 14. Aw após sete dias de armazenamento para as diferentes formulações de MSLs estudadas.

Condição Estocagem	Formulações					
	F1	F2	F3	F4	F5	F6
V _{-18°C}	0,975±0,004 ^{aA}	0,923±0,010 ^{aAB}	0,866±0,053 ^{aB}	0,923±0,011 ^{aA}	0,887±0,021 ^{bA}	0,908±0,010 ^{aA}
V _{7°C}	0,918±0,026 ^{bA}	0,840±0,008 ^{bB}	0,888±0,007 ^{aA}	0,951±0,006 ^{aA}	0,949±0,006 ^{aA}	0,837±0,005 ^{bcB}
V _{22°C}	0,924±0,009 ^{bA}	0,842±0,004 ^{bB}	0,906±0,005 ^{aA}	0,942±0,008 ^{aA}	0,836±0,012 ^{cC}	0,882±0,013 ^{abB}
UR _{-18°C}	0,893±0,029 ^{bA}	0,672±0,013 ^{cC}	0,757±0,006 ^{bB}	0,973±0,021 ^{aA}	0,865±0,012 ^{bcB}	0,801±0,045 ^{cB}
UR _{7°C}	0,672±0,013 ^{dA}	0,423±0,006 ^{dB}	0,667±0,025 ^{CA}	0,548±0,049 ^{CA}	0,438±0,007 ^{eB}	0,443±0,007 ^{dB}
UR _{22°C}	0,757±0,006 ^{CA}	0,429±0,010 ^{dB}	0,417±0,026 ^{dB}	0,777±0,028 ^{bA}	0,488±0,003 ^{dB}	0,442±0,006 ^{dC}

Médias de Aw das MSLs seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância. Médias de Aw das MSLs seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não diferem estatisticamente entre si de acordo com cada tipo de micro-organismo, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Onde V corresponde a estocagem sob vácuo, e UR a umidade relativa controlada com solução saturada de cloreto de lítio

Observa-se na Figura 29 e na Tabela 14 que as MSLs acondicionadas em recipientes com UR controlada apresentaram redução da Aw a partir de sete dias de armazenamento, o que pode ser explicado pelo equilíbrio da UR da MSL com a umidade de 11% do ambiente obtido pelo cloreto de lítio. Desde o início da proposta de incorporação de ingredientes prebióticos especulou-se a possibilidade de redução da atividade de água das MSLs, o que repercutiria na sobrevivência durante a estocagem.

Figura 29. Atividade de água das diferentes formulações das MSLs durante o armazenamento em condições controladas. (A)F1, (B)F2; (C)F3; (D)F4; (E)F5; (F)F6; (—●—) vácuo e -18°C ; (—■—) vácuo e 7°C ; (—▲—) vácuo e 22°C ; (···■···) UR e -18°C ; (···■···) UR e 7°C ; (···●···) UR e 22°C

De fato, os melhores resultados considerando-se a sobrevivência dos probióticos foram obtidos na condição de UR controlada, como descrito no item 2.4.11, para *L. acidophilus* na formulação F3 houve contagens adequadas até 120 dias de armazenamento em UR de 11%, nas temperaturas -18 e 7°C e para *L. rhamnosus* na formulação F6, houve estabilidade até 30 dias de armazenamento em UR de 11%, nas temperaturas -18 e 7°C ou sob vácuo a -18°C.

Observa-se que com exceção da F4 os menores valores de A_w estavam associados com a temperatura de 7°C e em UR controlada com solução de cloreto de lítio, e que, a adição do prebiótico reduziu a A_w das MSLs.

2.4.9 Avaliação da resistência dos micro-organismos ao processo de microencapsulação

A Tabela 15 ilustra o impacto da tecnologia aplicada, no caso o *spray chilling*, na sobrevivência dos micro-organismos. Ou seja, se a elaboração da suspensão, onde o micro-organismo ficou exposto ao stress mecânico do turrax e térmico da gordura fundida, e, depois, durante a obtenção das MSLs propriamente dita (stress mecânico e térmico-resfriamento/solidificação do carreador), levaram à perda de probióticos.

Tabela 15. Comparação entre células viáveis no inóculo, na suspensão (antes da atomização) e nas MSLs (após atomização e solidificação do carreador).

Contagem inicial no inóculo de <i>L. acidophilus</i> : 10,46±0,30			
Contagens UFC/g			
	Suspensão	Micropartícula	Resistência (%)
Sem prebiótico	8,67 ± 0,31	8,34 ± 0,38	96,89 ± 1,35 ^a
Inulina	8,53 ± 0,34	8,29 ± 0,27	97,57 ± 0,94 ^a
Polidextrose	8,57 ± 0,26	8,32 ± 0,09	97,10 ± 2,09 ^a
Contagem inicial no inóculo de <i>L. rhamnosus</i> : 10,67±0,11			
Contagens UFC/g			
	Suspensão	Micropartícula	Resistência (%)
Sem prebiótico	8,97 ± 0,48	8,27 ± 0,56	93,11 ± 1,73 ^a
Inulina	8,90 ± 0,53	8,15 ± 0,09	91,67 ± 5,58 ^a
Polidextrose	8,90 ± 0,31	8,07 ± 0,31	90,92 ± 1,04 ^a

Médias de resistência dos probióticos ao processo seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna dentro de cada micro-organismos não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Comparando-se as contagens determinadas no inóculo e na suspensão verifica-se a redução de aproximadamente dois ciclos logarítmicos nas populações de ambos os micro-organismos. Esta redução pode ser explicada primeiramente pelo efeito diluente que a gordura produziu, mas também pelos efeitos deletérios da gordura quente (50 °C) e da agitação no turrax.

Os dados apresentados na Tabela 15 mostram que se comparando as contagens nas suspensões e nas MSLs, verifica-se que o processo de atomização a temperatura de 15±2 °C praticamente não teve efeito deletério sobre a população de ambas as culturas, pois as reduções nas contagens foram todas inferiores a 1 ciclo logarítmico. A manutenção das células viáveis mostrou que a técnica de *spray chilling* foi apropriada para encapsulação de probióticos e o fato da técnica dispensar a utilização de solventes orgânicos e o emprego de temperaturas altas pode ter contribuído para a adequação do processo quando empregado para micro-organismos.

Da mesma maneira, Pedroso et al. (2012), que estudaram a microencapsulação de probióticos por *spray chilling*, encontraram diferenças mínimas nas contagens de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium lactis* na emulsão e nas MSLs.

Foi constatada uma alta resistência ao processo, que variou de 90,92% a 97,57%, sendo que o *L. acidophilus* parece ter sofrido menor perda de viabilidade durante o processamento da MSL. Observou-se ainda que a adição ou não do prebiótico, bem como o tipo de prebiótico adicionado não influenciaram a resistência ao processo para ambos os micro-organismos.

Em relação à resistência ao processo, deve-se considerar que em muitos estudos ao invés de ser dito resistência considera-se eficiência de encapsulação, isso porque não se destingue o conteúdo total de ingrediente bioativo e a eficiência de encapsulação. O conteúdo total é a quantidade total de material ativo presente, enquanto o segundo termo expressa a quantidade de material ativo que foi efetivamente encapsulado, neste deve-se subtrair o conteúdo de material ativo presente na superfície da micropartícula, ou seja, o material que não foi propriamente encapsulado.

A utilização equivocada dos termos leva a uma falta de consenso em relação à nomenclatura, se deve-se considerar “resistência ao processo” ou então “eficiência de encapsulação”(EE).

No presente estudo o resultado da Equação 1 foi considerado resistência ao processo, já que não foi possível validar uma metodologia capaz de quantificar a quantidade de probióticos efetivamente encapsulado, pois como discutido anteriormente as MSLs produzidas por *spray chilling* caracterizam-se por apresentar o componente ativo alocado inclusive na superfície da MSL.

Sobrepondo-se a questão de nomenclatura, comparou-se os resultados com outros trabalhos que empregaram a mesma equação descrita no item 2.3.12, independente da nomenclatura adotada.

Maschke et al. (2007) encapsularam insulina pela técnica de *spray congealing* e observaram que não houve perda deste composto, independentemente do nível de carregamento da droga na MSLs. Estes autores detectaram que a insulina foi totalmente encapsulada com uma eficiência de $107,7\% \pm 3,36\%$, $106,7\% \pm 1,32\%$ e $103,5\% \pm 3,75\%$ para 0,5%, 1% e 2% de insulina, e, relacionaram a eficiência superior a 100% encontrada à perda de lipídios dentro do bocal do equipamento. Estes autores enfatizaram ainda que a bioatividade da insulina foi mantida por 28 dias. McCarron; Donnelly; Al-Kassas (2008) também encontraram EE próximas de 100% ao encapsularem drogas pouco solúveis em água em triglicerídeos de baixo ponto de fusão pela técnica de *spray congealing*. Passerini et al. (2003) defendem que ao ajustar as proporções dos componentes da matriz, a completa encapsulação do material bioativo poderia ser alcançado. Em outro estudo, Cavallari et al. (2005) obtiveram uma eficiência de encapsulação de 90% para partículas carregadas com diclofenaco. Desta maneira observa-se que a técnica de *spray chilling* de forma recorrente e independente do componente ativo gera poucas perdas no processo.

2.4.10 Resistência das MSLs aos fluidos gástrico e intestinal simulados

Umas das diretrizes da microencapsulação é que os probióticos cheguem vivos ao seu local de ação, para que possam colonizar o intestino. Para isso devem superar barreiras naturais do hospedeiro, referentes à passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), a qual representa condições adversas como pH baixo e presença de sais biliares (KIM et al., 2008; DE VOS et al., 2010; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011). A Figura 30 ilustra a resistência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado sem adição de prebióticos e com adição de

inulina ou polidextrose, frente à exposição ao fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS).

Figura 30. Resistência aos fluidos gástricos e intestinais para o micro-organismo *L. acidophilus* livre e microencapsulado. O eixo vertical da esquerda ilustra a sobrevivência em termos de porcentagem e o direito em ciclos logarítmicos (UFC/mL). (■) La livre; (■) F1; (■) F2; (■) F3; (●) La livre; (●) F1; (●) F2; (●) F3.

Barras relacionadas à porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* frente à exposição ao FGS e FIS, seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma formulação não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Observa-se na Figura 30 que *L. acidophilus* em sua forma livre atingiu o limite de detecção da metodologia empregada (10^{-2} UFC/g) em 210 minutos de inoculação. Ou seja, para *L. acidophilus* livre as condições impostas pelo FGS e pelo FIS foram intensamente nocivas, sendo que, após o contato com o FIS este micro-organismo perdeu totalmente sua viabilidade. Porém, nas MSLs seja com ou sem prebiótico, e independente do tipo de prebiótico, se inulina ou polidextrose, mantiveram pelo menos 60% das células viáveis. Estes resultados comprovam a

eficiência das micropartículas para proteção de *L. acidophilus* no fluido gástrico e intestinal simulados.

Para o *L. acidophilus* microencapsulado, houve redução de 2,99; 2,74 e 2,76 ciclos logarítmicos para as formulações F1 (sem adição de probiótico), F2 (com adição de inulina) e F3 (com adição de povidexose), respectivamente, ao final de 300 minutos de experimento. Houve redução significativa das células viáveis nos dois pontos experimentais da simulação dos fluidos intestinais (120-210 minutos e 210-300 minutos), para F1 e F3 (b,c,d) e F2 (c,d,e), enquanto que na simulação dos fluidos gástricos não houve redução significativa para F1 e F3, nos intervalos de 0 à 60 min e 60 à 120 min, respectivamente. As reduções significativas de células viáveis durante a exposição ao fluido intestinal podem estar relacionadas à natureza antimicrobiana dos sais biliares, que possuem propriedades detergentes, capazes de dissolver as membranas dos micro-organismos levando a morte celular (MADUREIRA et al., 2011; RANADHEERA et al., 2012).

De acordo com os resultados apresentados na Figura 30, a diminuição das células viáveis durante a simulação da passagem pelo TGI foi da mesma ordem de redução em ciclos logarítmicos que Kim et al. (2008) observaram, apesar de utilizarem método de encapsulação diferente. Estes autores registraram a redução de células viáveis em 3 ciclos logarítmicos quando micropartículas de *L. acidophilus* ATCC 43121 microencapsuladas com alginato de sódio por extrusão, foram expostas a fluidos gastrointestinais artificiais.

A Figura 31 apresenta a resistência de *L. rhamnosus* livre, microencapsulado sem adição de prebióticos e com adição de inulina ou povidexose, frente à exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados.

Figura 31. Resistência aos fluidos gástricos e intestinais para o micro-organismo *L. rhamnosus* livre e microencapsulado. O eixo vertical da esquerda ilustra a sobrevivência em termos de porcentagem e o eixo direito em ciclos logarítmicos (UFC/mL). (■) LR livre; (●) F4; (■) F5; (■) F6; (●) LR livre; (●) F4; (■) F5; (■) F6.

Barras relacionadas à porcentagem de sobrevivência de *L. rhamnosus* frente à exposição ao FGS e FIS, seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma formulação não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O *L. rhamnosus* apresentou-se resistente mesmo em sua forma livre, sendo que reduziu 3,43 ciclos logarítmicos nesta condição, ou seja, diferentemente do *L. acidophilus* que não sobreviveu ao final do ensaio, o *L. rhamnosus* foi relativamente resistente durante todos os pontos amostrais. Já para *L. rhamnosus* microencapsulado sua população apresentou redução de 2,55; 1,85 e 1,86 para as formulações F4, F5 e F6 respectivamente, como ilustra a Figura 31. Para o *L. rhamnosus* livre, reduções significativas de células viáveis ocorreram nos intervalos de 60-120 minutos e 120-210 minutos do experimento, ao final do fluido gástrico e ao início do intestinal.

Para o *L. rhamnosus* foi notório que a adição dos prebióticos à MSLs melhorou sua resistência aos fluidos gastrointestinais simulados, porém não foi observado diferenças diante do tipo de prebiótico, se inulina ou polidextrose.

Os resultados apresentados para os dois micro-organismos, Figura 30 e 31, comprovaram que a proteção pela MSL de fato ocorreu, ou seja, pela condição de estarem protegidos pela matriz lipídica apresentaram maior sobrevivência frente aos fluidos gástricos e intestinais simulados quando comparados aos micro-organismos livres. Isso pode ser explicado pelo fato de que matrizes lipídicas podem proteger as células devido ao bloqueio de íons H^+ (LAHTINEN et al., 2007). A redução de células viáveis nas primeiras etapas do experimento pode estar correlacionada com a presença de micro-organismos alocados na superfície da partícula, não propriamente protegidos das condições externas adversas, já que a micropartícula é do tipo matriz, o que explicaria a redução de células viáveis no primeiro intervalo (0-60 min) de exposição ao fluido gástrico. Além disso, a estratégia da utilização de gorduras com ponto de fusão superior à temperatura corpórea evita a fusão das MSLs durante a passagem pelo trato gastrointestinal.

A matriz lipídica utilizada, cuja composição foi apresentada no item 2.4.1, caracterizou-se pela presença de ácidos graxos com cadeia saturada, porém com diferentes tamanhos de cadeia carbônica, que faz com que estes ácidos graxos apresentem diferentes pontos de fusão, esta característica do agente carreador pode levar a formação de estruturas que permitem a melhor acomodação do ingrediente ativo, favorecendo a formação de MSLs estáveis e capazes de conferir proteção e menor permeabilidade aos íons H^+ presentes. A utilização de mistura de lipídios líquidos e sólidos gerando estruturas que permitem a melhor acomodação das drogas foi proposta por Müller et al. (2002) no caso de nanopartículas lipídicas transportadoras (Figura 9), para reduzir comportamentos indesejáveis das matrizes lipídicas, como a expulsão do carregamento do componente bioativo.

Resultados de outros estudos também encontraram desempenhos melhores para probióticos encapsulados em relação aos livres, quanto expostos a soluções gástricas e intestinais simuladas (KIM et al., 2008; SABIKHI et al., 2010). Fávaro-Trindade e Grosso (2002) avaliaram o desempenho de microcápsulas em soluções de pH e bile simulando condições encontradas no estômago e intestino, as cápsulas foram produzidas com os micro-organismos *L. acidophilus* e *B. lactis* pela técnica *spray drying*, utilizando-se acetato ftalato de celulose como carreador. A proposta de

maior proteção aos micro-organismos foi atendida, já que, a sobrevivência das bactérias encapsuladas foi superior à sua forma livre.

Tanto para o *L. acidophilus* como para o *L. rhamnosus* o tipo de probiótico adicionado, inulina ou polidextrose, não levou a diferenças significativas na sobrevivência destes micro-organismos. No entanto, do ponto de vista do efeito da adição de prebiótico, os probióticos apresentaram diferentes respostas de sobrevivência durante simulação de condições da passagem pelo TGI. Para *L. acidophilus* não houve diferença significativa na sobrevivência deste micro-organismo em relação à ausência de prebiótico (F1) ou na presença deste ingrediente (F2 e F3). Porém, para *L. rhamnosus* as formulações com adição do prebiótico (F5 e F6) comparadas à formulação sem adição destas fibras (F4) apresentou maior resistência aos fluidos simulados, o que pode estar associado com a resistência destes prebióticos à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal (TGI).

Da mesma forma que o efeito da adição de prebióticos foi observado para o *L. rhamnosus*, outros estudos apontaram resultados similares para testes que simulam a passagem pelo TGI “*in vitro*” para formulações com adição de prebióticos. A melhor barreira atribuída aos prebióticos estaria provavelmente associada com a resistência à hidrólise pelas enzimas do trato gastrointestinal (TGI) e, no caso da inulina, também ao grau de polimerização, que se refere ao número de unidades individuais de monossacarídeos que compõem a molécula (CARABIN, FLAMM, 1999). Inulina com alto grau de polimerização apresenta baixa solubilidade, aumentando a capacidade de formação de uma rede de microcristais tridimensional que interagem uns com os outros levando a formação de pequenos agregados, obstruindo a passagem de água (VILLEGAS; COSTELL, 2007; TÁRREGA, ROCAFULL, COSTELL, 2010). Uma possível proteção física é dada através desta estrutura envolvendo a célula bacteriana (BURITI; CASTRO; SAAD, 2010). Devido às suas propriedades físicas e resistência às enzimas GIT, a inulina foi avaliada, em combinação com outros polímeros, como um componente de micro e nanocápsulas para entrega específica de cólon de drogas e compostos bioativos (POULAIN et al., 2003; BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2005; KOSARAJU, 2005).

Assim como foi observado para o *L. rhamnosus* com adição de Inulina (F5), Fritzen-Freire et al. (2013) e Crittenden et al. (2006) produziram microesferas para proteção de bifidobactérias com adição de inulina, e em ambos casos o prebiótico

apresentou efeito positivo durante teste “*in vitro*” de simulação do trato gastrointestinal. A morfologia das MSLs durante a simulação da passagem ao FGS e FIS foi registrada como ilustra a Figura 32.

Figura 32. Microscopia óptica das micropartículas lipídicas durante o ensaio de resistência a exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados.

Observa-se através das imagens captadas por microscopia óptica, Figura 32, que no início do ensaio de simulação pela passagem no trato gastrointestinal a integridade das MSLs era clara, evidenciando-se o formato esférico bem definido. A desintegração mais eminente das micropátículas sólido- lipídicas ocorreu quando expostas ao fluído intestinal simulado (FIS), onde a presença de pancreatina, tripsina e sais biliares juntamente com elevação do pH (6,5), representavam condições favoráveis a ruptura/desintegração da cápsula concerne a natureza lipídica da mesma. A liberação do componente ativo, neste caso as bactérias, correlaciona-se com a redução mais drástica da contagem de células viáveis, já que, os probióticos, sem a proteção das MSLs, ficaram mais susceptíveis às condições do ambiente externo.

2.4.11 Avaliação da estabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem

Micro-organismos probióticos usualmente são armazenados por períodos consideráveis, para então serem requeridos para a produção de alimentos e ingestão (DE GIULIO et al., 2005; SU et al., 2007). A avaliação de estabilidade dos micro-organismos durante a estocagem é uma resposta importante visto que, tanto durante o processamento como também armazenamento do produto ou mesmo das microcápsulas, as células dos micro-organismos probióticos podem perder a viabilidade, comprometendo a funcionalidade dos mesmos. A perda de viabilidade parece estar relacionada a danos aos componentes celulares da membrana celular e DNA (TEIXEIRA et al., 1995)

Variáveis como alta atividade de água, temperatura de estocagem e presença de oxigênio, aparentemente comprometem a viabilidade celular de micro-organismos probióticos durante o armazenamento prolongado, tornando-se um desafio à aplicação de uma variedade de produtos alimentícios (TEIXEIRA et al., 1995; ANAL; SINGH, 2007; RODRIGUES et al., 2011).

Para a viabilidade dos micro-organismos durante o armazenamento foram estudados o efeito da adição e tipo de prebiótico (sem prebiótico, com inulina ou com polidextrose), o efeito da temperatura (-18, 7 e 22°C), do tipo de

armazenamento, sob vácuo ou umidade relativa (UR) controlada com solução saturada de cloreto de lítio (11%), e do tempo (0, 7, 30, 60, 90 e 120 dias).

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 16 e 17 a formulação F3 armazenada em UR e temperatura controlada a -18 e 7°C manteve contagens superiores a 10^6 - 10^7 UFC/g durante os 120 dias de armazenamento e apresentaram redução de 1,97 e 2,15 ciclos logarítmicos, respectivamente. Os bons resultados obtidos para baixa temperatura de armazenamento podem ser explicados pelo fato dos micro-organismos estarem mantidos em uma condição latente, além de evitar rearranjos dos cristais na matriz lipídica e, conseqüentemente, evitando a expulsão do componente bioativo (PEDROSO et al., 2012).

Da mesma maneira, Oliveira et al. (2007b) encontraram que o *L. acidophilus* apresentou maior viabilidade na temperatura de armazenamento de 7°C (120 dias), a mesma temperatura em que a melhor viabilidade foi observada para a formulação F3. O efeito da temperatura de armazenamento predominou mesmo tratando-se de micropartículas de natureza distintas, estes autores produziram microcápsulas por coacervação complexa seguida de desidratação pelo método de leite de jorro.

Para F1, o armazenamento à temperatura de congelamento (-18°C) mostrou a melhor manutenção de células viáveis com contagem superior à 6 ciclos logarítmicos, tanto com aplicação de vácuo como sob UR controlada até 30 dias de armazenamento. No entanto, para as outras temperaturas analisadas, a estabilidade foi reduzida, uma vez que, houve uma grande redução no número de células viáveis nos primeiros 7 dias de armazenamento, exceto para condição de UR com estocagem à 7°C, cuja contagem diminuiu em 30 dias.

A formulação F2 demonstrou seu melhor desempenho a -18°C, sob UR controlada, com contagens satisfatórias (acima de 10^6 UFC/g) até 90 dias de armazenamento, e, até 30 dias, quando estocadas sob UR controlada à temperatura de 7°C, e sob aplicação de vácuo à -18°C. Finalmente, F3 apresentou as melhores respostas de viabilidade durante o armazenamento em UR controlada (11%), onde contagens superiores a 10^6 UFC/g de MSL foram registrados até 120 dias às temperaturas de -18°C e 7°C, e até 60 dias à 22°C, enquanto que, sob vácuo viável por 90 dias à -18°C.

Dos resultados apresentados, tem-se que para todas as formulações de *L. acidophilus* avaliadas o armazenamento nas temperaturas mais baixas corroboraram com a melhor viabilidade celular, com exceção da formulação F3 após 7 dias de

armazenamento em UR controlada. Há um consenso de que as temperaturas em torno de 0°C proporcionam melhores taxas de sobrevivência celular, isso porque estas reduzem as taxas de reações químicas que são prejudiciais para os micro-organismos, tais como a oxidação de ácidos graxos (TEIXEIRA et al., 1995; CORCORAN; ROSS; FITZGERALD; STANTON, 2004). A viabilidade reduzida dos probióticos na temperatura de 22°C pode estar relacionada a uma maior atividade metabólica dos micro-organismos que pode levar a produção de ácidos metabólicos e bacteriocinas, e/ou a perda de substratos, o que explicaria a inativação das células viáveis nas MSLs durante o armazenamento nesta temperatura.

O efeito da adição de prebióticos e do tipo de prebiótico pode ser analisado pelos resultados expressos na Tabela 17. Ao final dos 120 dias de armazenamento houve diferença significativa concerne a adição de componentes prebióticos nas formulações. No armazenamento com UR controlada nas temperaturas -18, 7 e 22°C e no vácuo a -18°C, a melhor condição, considerando-se a sobrevivência dos micro-organismos, foi a adição de polidextrose (F3), seguida da adição de inulina (F2) e do tratamento sem a adição do prebiótico (F1), sendo que algumas exceções foram observadas, como o caso da adição de inulina e da ausência do prebiótico que não apresentaram diferenças significativas. Resultados recorrentes inferiram que a adição de prebióticos possibilitou a maior viabilidade aos probióticos microencapsulados, na maioria das condições de armazenamento estudadas.

O efeito positivo da incorporação de prebióticos foi relatado em outros estudos. A mistura de prebióticos como carreadores resultou em uma melhor proteção dos probióticos encapsulados durante o armazenamento, em relação ao controle sem adição do ingrediente prebiótico, já que estes podem fornecer carbono e durante o armazenamento. Prebióticos e alginato de cálcio como materiais carreadores podem proteger melhor os probióticos em sistemas alimentares e na passagem pelo trato gastrointestinal devido a relação de simbiose (BIELECKA; BIEDRZYCKA; MAJKOWSKA, 2002; CHEN; CHEN; LIU; LIN; CHIU, 2005).

A atuação positiva do prebiótico durante o armazenamento pode ser correlacionada com a barreira física proporcionada por estas fibras, que contribuíram para a maior viabilidade determinada. Alguns prebióticos podem formar redes de microcristais tridimensionais que interagem uns com os outros formando pequenos agregados que podem contribuir para as propriedades de barreira protegendo a

célula bacteriana (VILLEGAS; COSTELL, 2007; BURITI; CASTRO; SAAD, 2010; TÁRREGA; ROCAFULL; COSTELL, 2010).

Quanto ao tipo de armazenamento, se acondicionado em vácuo ou em UR controlada (LiCl), na temperatura de congelamento observou-se diferenças significativas a partir de 60 dias de armazenamento, sendo a melhor sobrevivência foi relacionada ao armazenamento em UR controlada. Já para o caso das temperaturas de 7 e 22°C essa diferença significativa foi apontada após sete dias de armazenamento, novamente, com melhor desempenho observado para a UR controlada. A influência significativa da UR na sobrevivência de micro-organismos encapsulados foi observado também por Rodrigues et al. (2011) que estudou o armazenamento em diferentes URs controladas 12, 32 e 45%, onde a menor UR corroborou com melhor sobrevivência dos probióticos, com contagens de células viáveis satisfatórias por 180 dias de estocagem para *L. paracasei* L26; 150 dias para o *B. animalis* BB-12 e de 120 a 150 dias para o *L. acidophilus* Ki.

Altas URs podem prejudicar a viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante o armazenamento, já que, está relacionado ao aumento do teor de água, o que pode ser prejudicial ao micro-organismo, devido à possibilidade de aceleração de processos oxidativos (TEIXEIRA et al., 1995; RODRIGUES et al., 2011). Sabe-se que, não só a temperatura, mas também a UR é determinante para a sobrevivência do probiótico durante o armazenamento. Além disso, os valores de A_w se equilibram com a UR. Assim, o armazenamento em altas URs aumenta a concentração de água nas micropartículas, o que pode ser prejudicial à sobrevivência dos probióticos. Por outro lado, a UR muito baixa provoca a remoção de água a partir das células, o que pode aumentar a possibilidade de danos. Portanto, a umidade relativa entre 7 e 11%, foram relatadas como sendo valores ideais para a sobrevivência bacteriana (CASTRO; TEIXEIRA; KIRBY, 1995).

Pedroso et al. (2012) mostraram que *L. acidophilus* microencapsulado por *spray chilling* apresentou contagens maiores que 10^6 UFC/g de MSL por 30 e 60 dias nas temperaturas de 7 e 22°C, respectivamente. Embora estes autores tenham utilizado o mesmo processo de encapsulação e matriz lipídica, não estudou-se a adição de componentes prebióticos ou armazenamento das micropartículas com UR controlada, o que explicaria a menor estabilidade determinada. A presença de um prebiótico e condições de armazenamento controladas melhoraram a viabilidade de MSLs de *L. acidophilus*. A incorporação de prebióticos para redução de A_w e

consequentemente sua atividade metabólica, visando melhorar a estabilidade perante o armazenamento.

Tabela 16. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento na sobrevivência de *L. acidophilus* durante 120 dias de armazenamento.

Preb	Estoc.	T(°C)	Células viáveis (log UFC g ⁻¹)											
			0 dias	7 dias	30 dias	60 dias	90 dias	120 dias						
SP	UR	-18	8,38±0,64	a A	7,51±0,11	b A	7,03±0,16	b A	5,64±0,14	c A	5,27±0,24	c A	4,02±0,09	d A
SP	UR	7			7,15±0,29	b A	5,02±0,83	c B	4,53±0,82	cd B	4,06±0,85	d B	3,08±0,18	e B
SP	UR	22			4,23±0,49	b B	3,47±0,72	c C	2,31±0,16	d C	1,43±0,30	e C	NS	f C
SP	Vac	-18			7,52±0,37	b A	6,72±0,17	c A	5,83±0,08	d A	5,08±0,09	e A	3,76±0,54	f A
SP	Vac	7			4,99±0,09	b B	2,94±0,65	c B	2,00±0,99	d B	NS	e B	NS	e B
SP	Vac	22			3,71±0,18	b C	2,32±0,58	c B	1,72±0,34	c B	NS	d B	NS	d B
Inu	UR	-18	8,19±0,44	a A	7,81±0,27	a A	6,75±0,12	b A	6,43±0,19	bc A	6,06±0,21	cd A	5,71±0,20	d A
Inu	UR	7			6,99±0,09	b B	6,36±0,17	c A	4,84±0,15	d B	4,45±0,16	de B	3,95±0,04	e B
Inu	UR	22			6,25±0,08	b C	5,08±0,20	c B	4,55±0,15	cd B	4,26±0,09	d B	3,60±0,51	e B
Inu	Vac	-18			7,75±0,26	ab A	7,12±0,06	b A	5,65±0,10	c A	5,12±0,20	c A	4,46±0,15	d A
Inu	Vac	7			4,99±0,45	b B	2,46±1,41	c B	0,96±1,10	d B	NS	e B	NS	e B
Inu	Vac	22			3,76±0,15	b C	1,74±0,74	c C	NS	d C	NS	d B	NS	d B
Poli	UR	-18	8,96±0,33	a A	8,47±0,54	ab A	7,98±0,39	bc A	7,62±0,19	cd A	7,13±0,06	d A	7,00±0,08	d A
Poli	UR	7			8,31±0,22	b A	7,49±0,37	c AB	7,40±0,20	cd A	7,07±0,04	cd A	6,81±0,04	d A
Poli	UR	22			8,11±0,41	b A	6,91±0,85	c B	6,01±0,72	d B	5,55±0,44	de B	4,94±0,59	e B
Poli	Vac	-18			7,97±0,27	b A	7,52±0,12	bc A	6,89±0,17	cd A	6,39±0,25	d A	5,52±0,40	e A
Poli	Vac	7			6,01±0,96	b B	2,39±1,37	c B	NS	d B	NS	d B	NS	d B
Poli	Vac	22			4,33±0,40	b C	2,01±1,26	c B	NS	d B	NS	d B	NS	d B

Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-estocagem- temperatura de armazenamento, foram afetados pelo tempo de armazenamento. Os valores indicados com letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$). Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-estocagem-tempo de estocagem foram afetados pela temperatura de armazenamento, os valores indicados com letras maiúsculas diferentes nas colunas são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$).

NS: Ausência de células viáveis; SP: sem prebiótico; Inu: inulina; Poli: povidexose; UR: umidade relativa; Vac: vácuo.

Tabela 17. Efeito do tipo de estocagem (umidade relativa e vácuo), e da adição e tipo do componente prebiótico na sobrevivência de *L. acidophilus* durante 120 dias de armazenamento.

Preb.	Estoc.	T(°C)	Células viáveis (log UFC g ⁻¹)																	
			0 dias		7 dias		30 dias		60 dias		90 dias		120 dias							
SP	UR	-18	8,38±0,64	a	A	7,51±0,11	b	A	7,03±0,16	b	A	5,64±0,14	c	A	5,27±0,24	c	A	4,02±0,09	c	A
Inu	UR	-18	8,19±0,44	b	A	7,81±0,27	b	A	6,75±0,12	b	A	6,43±0,19	b	A	6,06±0,21	b	A	5,71±0,20	b	A
Poli	UR	-18	8,96±0,33	a	A	8,47±0,54	a	A	7,98±0,39	a	A	7,62±0,19	a	A	7,12±0,06	a	A	7,00±0,08	a	A
SP	UR	7	8,38±0,64	ab	A	7,15±0,29	b	A	5,02±0,83	c	A	4,53±0,82	b	A	4,06±0,85	b	A	3,08±0,18	c	A
Inu	UR	7	8,19±0,44	b	A	6,99±0,09	b	A	6,36±0,17	b	A	4,84±0,15	b	A	4,45±0,16	b	A	3,95±0,04	b	A
Poli	UR	7	8,96±0,33	a	A	8,31±0,22	a	A	7,49±0,37	a	A	7,40±0,20	a	A	7,07±0,04	a	A	6,81±0,04	a	A
SP	UR	22	8,38±0,64	ab	A	4,23±0,49	c	A	3,47±0,72	c	A	2,31±0,16	c	A	1,43±0,30	c	A	NS		
Inu	UR	22	8,19±0,44	b	A	6,25±0,08	b	A	5,08±0,20	b	A	4,55±0,15	b	A	4,26±0,09	b	A	3,60±0,51	b	A
Poli	UR	22	8,96±0,33	a	A	8,11±0,41	a	A	6,91±0,85	a	A	6,01±0,72	a	A	5,55±0,44	a	A	4,94±0,59	a	A
SP	Vac	-18	8,38±0,64	ab	A	7,52±0,37	a	A	6,72±0,17	b	A	5,83±0,08	b	A	5,08±0,09	b	A	3,76±0,54	c	A
Inu	Vac	-18	8,19±0,44	b	A	7,75±0,26	a	A	7,12±0,06	ab	A	5,65±0,10	b	B	5,12±0,20	b	B	4,46±0,15	b	B
Poli	Vac	-18	8,96±0,33	a	A	7,97±0,27	a	A	7,52±0,12	a	A	6,89±0,17	a	B	6,39±0,25	a	B	5,52±0,40	a	B
SP	Vac	7	8,38±0,64	ab	A	4,99±0,09	b	B	2,94±0,65	a	B	2,00±0,99	a	B	NS			NS		
Inu	Vac	7	8,19±0,44	b	A	4,99±0,45	b	B	2,46±1,41	a	B	0,96±1,10	b	B	NS			NS		
Poli	Vac	7	8,96±0,33	a	A	6,01±0,96	a	B	2,39±1,37	a	B	NS			NS			NS		
SP	Vac	22	8,38±0,64	ab	A	3,71±0,18	a	A	2,32±0,58	a	B	1,72±0,34	a	A	NS			NS		
Inu	Vac	22	8,19±0,44	b	A	3,76±0,15	a	B	1,74±0,74	a	B	NS			NS			NS		
Poli	Vac	22	8,96±0,33	a	A	4,33±0,40	a	B	2,01±1,26	a	B	NS			NS			NS		

Contagens de células viáveis para cada combinação “estocagem- temperatura de armazenamento- tempo de estocagem” foram afetados pelo tipo de prebiótico. Os valores indicados com letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$). Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-temperatura-tempo de estocagem foram afetados pela estocagem, os valores indicados com letras maiúsculas diferentes nas colunas são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$).

NS: Ausência de células viáveis; SP: sem prebiótico; Inu: inulina; Poli: polidextrose; UR: umidade relativa; Vac: vácuo.

Tabela 18. Efeitos da temperatura e do tempo de armazenamento na sobrevivência de *L. rhamnosus* durante 120 dias de armazenamento.

Preb.	Estoc.	T(°C)	Células viáveis (log UFC g ⁻¹)																	
			0 dias			7 dias			30 dias			60 dias			90 dias			120 dias		
SP	UR	-18	8,38±0,53	a	A	6,99±0,85	B	A	5,41±0,80	c	A	5,10±0,59	c	A	4,834±0,52	c	A	4,02±0,70	d	A
SP	UR	7				6,56±0,74	B	A	3,28±1,73	c	B	NS			NS			NS		
SP	UR	22				5,65±0,93	B	B	2,75±1,60	c	B	NS			NS			NS		
SP	Vac	-18				7,24±0,58	B	A	5,00±1,04	c	A	4,36±0,57	c	A	2,48±0,74	d	A	NS		
SP	Vac	7				6,77±0,73	B	A	3,93±1,77	c	B	4,23±0,63	c	A	3,06±0,99	d	A	1,09±1,26	e	A
SP	Vac	22				4,91±0,93	B	B	4,38±0,57	b	AB	2,98±1,11	c	B	NS			NS		
Inu	UR	-18	8,14±0,07	a	A	6,07±0,14	B	A	5,15±0,58	c	A	5,07±0,27	c	A	4,03±0,18	d	A	3,72±0,22	d	A
Inu	UR	7				4,60±0,15	B	B	4,31±0,16	b	B	3,87±0,02	bc	B	3,56±0,07	c	A	3,35±0,03	c	A
Inu	UR	22				4,38±0,28	B	AB	1,57±0,14	c	C	1,29±0,28	c	C	NS			NS		
Inu	Vac	-18				6,85±0,12	B	A	5,75±0,40	c	A	5,38±0,48	cd	A	4,96±0,20	de	A	4,21±0,32	e	A
Inu	Vac	7				6,01±0,06	B	B	5,29±0,57	bc	AB	4,75±0,32	cd	AB	4,58±0,20	cd	A	4,20±0,23	d	A
Inu	Vac	22				5,36±0,15	B	B	4,58±0,20	c	B	4,27±0,09	c	B	3,83±0,04	c	B	1,41±1,63	d	B
Poli	UR	-18	8,14±0,26	a	A	6,65±0,26	B	A	6,59±0,15	b	A	5,98±0,17	bc	A	5,49±0,28	cd	A	4,87±0,38	d	A
Poli	UR	7				6,52±0,35	B	A	6,08±0,14	bc	AB	5,58±0,09	cd	A	5,48±0,02	cd	A	5,12±0,01	d	A
Poli	UR	22				5,96±0,06	B	A	5,73±0,03	b	B	4,10±0,13	c	B	3,50±0,10	cd	B	2,99±0,10	d	B
Poli	Vac	-18				6,45±0,17	B	A	6,03±0,17	b	A	4,92±0,22	c	B	4,63±0,06	c	B	4,31±0,09	c	A
Poli	Vac	7				6,35±0,13	B	A	6,00±0,05	bc	A	5,83±0,11	bc	A	5,53±0,11	c	A	4,74±0,19	d	B
Poli	Vac	22				6,13±0,12	B	A	5,03±0,27	c	B	1,16±1,75	d	C	NS			NS		

Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-estocagem- temperatura de armazenamento foram afetados pelo tempo de armazenamento. Os valores indicados com letras minúsculas diferentes dentro da mesma linha são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$). Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-estocagem-tempo de estocagem foram afetados pela temperatura de armazenamento, os valores indicados com letras maiúsculas diferentes nas colunas são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$).

NS: Ausência de células viáveis; SP: sem prebiótico; Inu: inulina; Poli: polidextrose; UR: umidade relativa; Vac: vácuo.

Tabela 19. Efeito do tipo de estocagem (umidade relativa e vácuo), e da adição e tipo do componente prebiótico na sobrevivência de *L. rhamnosus* durante 120 dias de armazenamento.

Preb.	Estoc.	T(°C)	Células viáveis (log UFC g ⁻¹)															
			0 dias		7 dias		30 dias		60 dias		90 dias		120 dias					
SP	UR	-18	8,38±0,53	a A	6,99±0,85	a A	5,41±0,80	b A	5,10±0,60	b A	4,83±0,52	a A	4,02±0,70	b A				
Inu	UR	-18	8,14±0,07	a A	6,07±0,14	b B	5,15±0,58	b A	5,07±0,27	b A	4,03±0,18	b B	3,72±0,22	b A				
Poli	UR	-18	8,14±0,26	a A	6,65±0,26	ab A	6,59±0,15	a A	5,98±0,17	a A	5,49±0,28	a A	4,87±0,38	a A				
SP	UR	7	8,38±0,53	a A	6,56±0,74	a A	3,28±1,73	c A	NS		NS		NS					
Inu	UR	7	8,14±0,07	a A	4,60±0,15	b B	4,31±0,16	b B	3,87±0,02	b B	3,56±0,07	b B	3,35±0,03	b B				
Poli	UR	7	8,14±0,26	a A	6,52±0,35	a A	6,08±0,14	a A	5,58±0,09	a A	5,48±0,02	a A	5,12±0,01	a A				
SP	UR	22	8,38±0,53	a A	5,65±0,93	a A	2,75±1,60	b B	NS	c	NS		NS					
Inu	UR	22	8,14±0,07	a A	4,38±0,28	b B	1,57±0,14	c B	1,24±0,28	b B	NS		NS					
Poli	UR	22	8,14±0,26	a A	5,96±0,06	a A	5,73±0,03	a A	4,10±0,13	a A	3,50±0,10	a A	2,99±0,10	a A				
SP	Vac	-18	8,38±0,53	a A	7,24±0,58	a A	5,00±1,04	b A	4,36±0,57	b A	2,48±0,74	b B	NS					
Inu	Vac	-18	8,14±0,07	a A	6,85±0,12	ab A	5,75±0,40	ab A	5,38±0,48	a A	4,96±0,20	a A	4,21±0,32	a A				
Poli	Vac	-18	8,14±0,26	a A	6,45±0,17	b A	6,03±0,17	a A	4,92±0,22	ab B	4,63±0,06	a B	4,31±0,09	a A				
SP	Vac	7	8,38±0,53	a A	6,77±0,73	a A	3,93±1,76	b A	4,23±0,63	b A	3,05±0,99	c A	1,09±1,26	b A				
Inu	Vac	7	8,14±0,07	a A	6,01±0,06	b A	5,29±0,57	a A	4,75±0,32	b A	4,58±0,20	b A	4,20±0,23	a A				
Poli	Vac	7	8,14±0,26	a A	6,35±0,13	ab A	6,00±0,05	a A	5,83±0,11	a A	5,53±0,11	a A	4,74±0,19	a A				
SP	Vac	22	8,38±0,53	a A	4,91±0,93	b A	4,38±0,57	a A	2,98±1,11	b A	NS		NS					
Inu	Vac	22	8,14±0,07	a A	5,36±0,15	b A	4,58±0,20	a A	4,27±0,09	a A	3,83±0,04	a A	1,41±1,63	a A				
Poli	Vac	22	8,14±0,26	a A	6,13±0,12	a A	5,03±0,27	a A	1,16±1,75	c B	NS		NS					

Contagens de células viáveis para cada combinação “estocagem- temperatura de armazenamento- tempo de estocagem” foram afetados pelo tipo de prebiótico. Os valores indicados com letras minúsculas diferentes dentro da mesma coluna são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$). Contagens de células viáveis para cada combinação prebiótico-temperatura-tempo de estocagem foram afetados pela estocagem, os valores indicados com letras maiúsculas diferentes nas colunas são significativamente diferentes (teste de Tukey: $p \leq 0,05$).

NS: Ausência de células viáveis; SP: sem prebiótico; Inu: inulina; Poli: polidextrose; UR: umidade relativa; Vac: vácuo.

De acordo com os resultados apresentados nas Tabelas 18 e 19, *L. rhamnosus* encapsulados apresentaram, de maneira geral, baixa viabilidade, com 60 dias de armazenamento nenhuma formulação em qualquer condição estudada manteve contagens superiores a 10^6 UFC/g de MSL. E com 30 dias somente a F6 com UR controlada nas temperaturas de -18 e 7°C, e no vácuo à -18°C apresentaram contagens adequadas.

Para F4 e F5, nenhuma condição de estocagem foi pertinente à manutenção da contagem de probióticos em números superiores à 10^6 UFC/g em 30 dias de armazenamento. Sendo que, assim como para o *L. acidophilus* as menores temperaturas corroboraram com a maior sobrevivência dos probióticos, para o *L. rhamnosus* a temperatura apresentou o mesmo efeito. Já para a formulação F6 observou-se contagens superiores a 10^6 UFC/g até 30 dias de armazenamento tanto no vácuo como em UR controlada, nas menores temperaturas estudadas (-18 e 7°C).

Conforme ilustrado pela Tabela 19 a partir dos 30 dias de armazenamento é constante o comportamento de que melhores contagens estavam associadas à inclusão dos componentes prebióticos, com exceção do armazenamento sob vácuo à temperatura de 22°C em 30 dias de armazenamento, sob vácuo à -18°C depois de 60 dias de estocagem, com UR controlada à -18°C e 90 dias de armazenamento (F4=F6) e, 120 dias com UR controlada à -18°C (F4=F5). Com relação ao armazenamento não houve um comportamento constante. Ora o vácuo ora a UR controlada estavam associadas às maiores contagens de células viáveis dos probióticos.

2.5 CONCLUSÃO

A co-encapsulação de *L. acidophilus* ou *L. rhamnosus* com inulina ou polidextrose pelo método *spray chilling* produz veículos promissores de probióticos e prebióticos. As MSLs simbióticas protegem *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* perante a exposição aos fluidos gástrico e intestinal simulados permitindo a liberação, em função da digestão lipídica, de células viáveis no intestino, local onde os probióticos devem atuar.

Inulina e polidextrose não diferiram quanto à proteção aos micro-organismos, no entanto a adição desses prebióticos levou a maior proteção durante a exposição ao FIS e FGS no caso do *L.rhamnosus*.

Além disso, *L. acidophilus* nas MSLs apresentaram viabilidade em 120 dias de armazenamento, em temperaturas de refrigeração e congelamento, em UR de 11%.

Já para *L. rhamnosus* a viabilidade foi abreviada a 30 dias de armazenamento na melhor condição, atribuída a formulação com adição de polidextrose.

As interações químicas entre os componentes funcionais e a matriz lipídica não foram observadas, e também não foi constatado alteração no comportamento polimórfico lipídico das MSLs durante o armazenamento por 90 dias.

A morfologia e granulometria das micropartículas traduz a potencial aplicação destas partículas no alimento, já que a forma esférica pode facilitar o fluxo e a aplicação em sistemas alimentícios. Ademais, a utilização da técnica de *spray chilling* viabiliza a microencapsulação de probióticos a custos relativamente baixos, além do fácil *scale up* do processo.

Há questões a serem exploradas, como a avaliação do efeito de diferentes níveis de adição de prebióticos, na morfologia das MSLs e na viabilidade do probiótico, bem como o efeito da utilização de outras matrizes lipídicas que possam prolongar a viabilidade celular durante a estocagem, além disso favorecer a aplicação das MSLs em produtos alimentícios.

2.6 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; DI SABATINO, M.; VITALI, B.; BRIGIDI, P.; RODRIGUEZ, L. Polymer-lipid based mucoadhesive microspheres prepared by spray-congealing for the vaginal delivery of econazole nitrate. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 36, n. 4-5, p. 591-601, 2009.

ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; PATTARINO, F.; RODRIGUEZ, L. New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 69, n. 1, p. 348-357, 2008.

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, n. 4, p. 359-366, 2010.

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

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J.D.; LABADIE, J.C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v.25, p. 225-232, 1996.

BEIRÃO-DA-COSTA, M.L.; JANUÁRIO, M.I.N.; SIMÃO, F.M.S.; LEITÃO, A.E.B. Characterisation of inulin from chicory and salsify cultivated in Portugal. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.16, n. 3, p. 221-225, 2005.

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

BUNJES, H.; UNRUH, T. Characterization of lipid nanoparticles by differential scanning calorimetry, X-ray and neutron scattering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 59, p. 379-402, 2007.

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

CARABIN, I.G.; FLAMM, W.G. Evaluation of safety of inulin and oligofructose as dietary fiber. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v.30, p. 268-282, 1999.

CASTRO, H. P.; TEIXEIRA, P. M.; KIRBY, R. Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 44, p. 172-176, 1995.

CAVALLARI, C.; RODRIGUEZ, L.; ALBERTINI, B.; PASSERINI, N.; ROSETTI, F.; FINI, A. Thermal and fractal analysis of diclofenac/Gelucire 50/13 microparticles obtained by ultrasound-assisted atomization. **Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 94, p. 1124-1134, 2005.

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

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

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

CHOU, L.S.; WEIMER, B. Isolation and characterization of acid and bile-tolerant isolates from strains of *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 1, p. 23-31, 1999.

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024-1039, 2001.

CRITTENDEN, R.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; AUGUSTIN, M. Synbiotic Microcapsules That Enhance Microbial Viability during Nonrefrigerated Storage and Gastrointestinal Transit. **Applied and Environmental Microbiology**, v.72, n.3, p. 2280-2282, 2006.

DADARLAT, D.; BICANIC, D.; GIBKES, J.; KLOEK, W.; VAN DEN DRIES, I.; GERKEMA, E. Study of melting processes in fatty acids and oils mixtures. A comparison of photopyroelectric (PPE) and differential scanning calorimetry (DSC). **Chemistry and Physics of Lipids**, v. 82, p. 15-23, 1996.

DE GIULIO, B.; ORLANDO, P.; BARBA, G.; COPPOLA, R.; DE ROSA, M.; SADA, A.; DE PRISCO, P.P.; NAZZARO, F. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 21, p. 739-746, 2005.

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, n.4, p. 292-302, 2010.

DUFOUR, E. Principles of Infrared Spectroscopy In: SUN, D.W. **Infrared spectroscopy-for food quality- analysis and control**. Elsevier Academic Press, p.4-27, 2009.

FAO/WHO. Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evolution of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 2002.

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.

FÁVARO-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.

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

FRITZEN-FREIRE, C.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; PINTO, S.S.; MUÑOZ, I.B.; AMBONI, R.D.M.C. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n.1, p. 39-44, 2013.

GAMBOA, O.D.; GONÇALVES, L.G.; GROSSO, C.F. Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. **Procedia Food Science**, v. 1, p.1732-1739, 2011.

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.

GIBSON, G.R.; ROBERFROID, M.B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. **Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401-1412, 1995.

GOMES, A.M.P.; MACALTA, F.X. Development of probiotic cheese manufactured from goat milk: response surface analysis via technological manipulation. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 6, p. 1492-1507, 1998.

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.L.; 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.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 309-316, 2010.

HEENAN, C.N.; ADAMS, M.C.; HOSKEN, R.W.; FLEET, G.H. Survival and sensory acceptability of probiotic microorganisms in a nonfermented frozen vegetarian dessert. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 461-466, 2004.

HEURTAULT, B.; SAULNIER, P.; PECH, B.; PROUST, J. E.; BENOIT, J. P. Physico-chemical stability of colloidal lipid particles. **Biomaterials**, v. 24, p. 4283-4300, 2003.

ILIĆ, I.; DREU, R.; BURJAK, M.; HOMAR, M.; KERČ, J.; SRČIČ, S. Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 381, p. 176-183, 2009.

ISLAM, M.A.; CHEOL, H.Y.; YUN, J.C.; CHONG, S.C. Microencapsulation of live probiotic bacteria. **Journal of Microbiology Technology**, v. 20, n. 10, p. 1367-1377, 2010.

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.

JENNING, V.; THÜNEMANN, A.F.; GOHLA, S.H. Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 199, p. 167-177, 2000.

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

KELLER, G.; LAVIGNE, F.; LOISEL, C.; OLLIVON, M.; BOURGAUX, C. Investigation of the complex thermal behavior of fats – combined DSC and X-ray diffraction techniques. **Journal of Thermal Analysis**, v.47, p.1545-1565, 1996.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, I.S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **Food Science and Technology**, v.41, n.3, p. 493-500, 2008.

KLEMMER, K.J.; KORBER, D.R.; LOW, N.H.; NICKERSON, M.T. Pea protein-based capsules for probiotic and prebiotic delivery. **Food Science & Technology**, v.46, p. 2248-2256, 2011.

KODALI, V.P.; DAS, S.; SEN, R. An exopolysaccharide from a probiotic: Biosynthesis dynamics, composition and emulsifying activity. **Food Research International**, v. 42, n. 5-6, p. 695-699, 2009.

KOSARAJU, S.L. Colon Targeted Delivery Systems: Review of Polysaccharides for Encapsulation and Delivery. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 5; n. 4, p. 251-258, 2005.

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. 500-505, 2007.

LAKKIS, J.M. Marketing perspective of encapsulation technologies. In: LAKKIS, J.M. **Encapsulation and controlled release technologies in food systems**. 2007. Blackwell Publishing, Iowa, p. 217-218.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n. 1, p. 465-470, 2011.

MARTINS, R. Desenvolvimento de dispersões sólidas microparticuladas contando carbamazepina por spray congealing. 2010. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

MASCHKE, A.; BECKER, C.; EYRICH, D.; KIERMAIER, J.; BLUNK, T.; GÖPFERICH, A. Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 65, n. 2, p.175-187, 2007.

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

McCARRON, P.A.; DONNELLY, R.F.; AL-KASSAS, R. Comparison of a novel spray congealing procedure with emulsion-based methods for the micro-encapsulation of water-soluble drugs in low melting point triglycerides. **Journal of Microencapsulation**, v. 25, p. 365-378, 2008.

MICKOVA, K.; COPIKOVA, J.; SYNITSYA, A. Determination of polydextrose as a fat replacer in butter. **Czechoslovak Journal of Food Sciences**, v. 25, p. 25-31, 2007.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 242, p. 121-128, 2002a.

MÜLLER, R.H.; RADTKE, M.; WISSING, S.A. Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 54, p. S131-S155, 2002b.

NASSU, R. **Estudo do comportamento térmico de óleos e gorduras por calorimetria de varredura diferencial**. 1994. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas.

OLIVEIRA, A.C.; MORETTI, T.S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J.C.C.; 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.

PASSERINI, N.; ALBERTINI, B.; PERISSUTTI, B.; RODRIGUEZ, L. Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 318, p. 92-102, 2006.

PASSERINI, N.; PERISSUTTI, B.; ALBERTINI, B.; VOINOVICH, D.; MONEGHINI, M.; RODRIGUEZ, L. Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing. **Journal of Controlled Release**, v. 88, p. 263-275, 2003.

PEDROSO, D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, p.127-132, 2012.

POULAIN, N.; DEZ, I.; PERRIO, C.; LASNE, M.C.; PRUD'HOMME, M.P.; NAKACHE, E. Microspheres based on inulin for the controlled release of serine protease inhibitors: preparation, characterization and in vitro release. **Journal of Controlled Release**, v. 92, p. 27-38, 2003.

RANADHEERA, C.S.; EVANS, C.A.; ADAMS, M.C.; BAINES, S.K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics in goat's milk ice cream and yogurt. **Food Research International**, v. 49, n. 2, p. 619-625, 2012.

RODRIGUES, D., SOUSA, S., ROCHA-SANTOS, T., SILVA, J. P., SOUSA LOBO, J. M., COSTA, P., AMARAL, M. H., PINTADO, M. M., GOMES, A. M., MALCATA, F. X., FREITAS, A. C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D.K.; KAPILA, S. Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 586-593, 2010.

SCHENK, H.; VISSER, P.; PESCHAR, R. Alternative precrystallization of cocoa butter. **The Manufacturing Confectioner**, v.86, n.1, p.67-72, 2006.

SALMINEN, S.; OUWEHAND, A.; ISOLAURI, E. Clinical applications of probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p. 563-572, 1998.

SANDERS, M.E. Probiotics: Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, n. 3, p. 91-99, 2003.

SCHUBERT, M.A.; MÜLLER-GOYMANN, C.C. Characterisation of surfacemodified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 61, p. 77-86, 2005.

SILVA, A.C.; GONZÁLEZ-MIRA, E.; GARCÍA, M.L.; EGEA, M.A.; FONSECA, J.; SILVA, R.; SANTOS, D.; SOUTO, E.B.; FERREIRA, D. Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): High pressure homogenization versus ultrasound. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 86, p. 158-165, 2011.

SILVERSTEIN, R.M.; WEBSTER, F.X.; KIEMLE, D.J. **Identificação espectrométrica de compostos orgânicos** (7th ed.). Rio de Janeiro: LTC, 2006.

SU, L.C.; LIN, C.W.; CHEN, M.J. Development of an oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 49-54, 2007.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 36-39, 2003.

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

TEIXEIRA, P. C., CASTRO, M. H., MALCATA, F. X., KIRBY, R. M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p.1025-1031, 1995.

TEOH, P.L.; MIRHOSSEINI, H.; MUSTAFA, S.; HUSSIN, A.S.M.; MANAP, M.Y.A. Recent approaches in the development of encapsulated delivery systems for probiotics. **Food Biotechnology**, v.19, n.2, p.77-101, 2005.

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.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 319-21, 2012.

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

ZUIDAM, N.J.; SHIMONI, E. Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: ZUIDAM, N.J.; NEDOVIĆ, V.A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. 2010. Springer Science+Business Media, LLC.

ZUR MUHLEN, A.; SCHWARZ, C.; MEHNERT, W. Solid lipid nanoparticles (SLN) for controlled drug delivery – Drug release and release mechanism. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 45. p.149-55, 1998.

CAPÍTULO 3

APLICAÇÃO DE MICROPARTÍCULAS SÓLIDO-LIPÍDICAS EM SORVETE

RESUMO

Micropartículas sólido-lipídicas (MSLs) contendo *L. acidophilus* e polidextrose foram incorporadas ao sorvete de massa de morango, com o objetivo de se avaliar o desempenho destas no produto. Foram produzidas três formulações de sorvete: i) controle (S1), referente à formulação tradicional; ii) com micro-organismos livres (S2); iii) onde o probiótico foi adicionado na forma de inóculo com adição de polidextrose, e, por fim, a adicionada de MSLs (S3). Caracterizou-se os sorvetes de acordo com a porcentagem de incorporação de ar (*overrun*), pH, cor instrumental e comportamento reológico da massa. Avaliou-se ainda a viabilidade de *L. acidophilus* livre e microencapsulado durante 120 dias de armazenamento dos sorvetes à $-18\pm 2^{\circ}\text{C}$, a resistência dos micro-organismos veiculados no sorvete aos fluidos gástrico e intestinal simulados, além da análise de aceitação sensorial dos sorvetes. As amostras de sorvete apresentaram pH em torno de 5,5 e a maior incorporação de ar foi observada na amostra com adição de MSLs. Os parâmetros obtidos pela análise de cor indicaram que as formulações que sofreram adições de inóculo ou MSLs a partir da formulação convencional tiveram uma redução na coloração vermelha, que, todavia não foi percebida pelos provadores na análise sensorial. A análise reológica evidenciou o comportamento não newtoniano do fluido, onde o melhor ajuste foi encontrado com o modelo Herschel-Bulkley e o maior índice de comportamento do fluido foi atribuído à formulação S3. No que diz respeito à viabilidade do probiótico no sorvete, observou-se a menor sobrevivência durante o armazenamento dos que estavam nas MSLs comparados aos adicionados na forma livre, na qual a vida de prateleira foi determinada em no mínimo 30 e 120 dias para o sorvete S3 e S2, respectivamente. E, na avaliação de resistência aos fluidos simulados, a premissa de proteção anexa à microencapsulação não foi atendida. Por fim, a análise sensorial registrou as menores notas nos atributos textura, sabor e aceitação global das amostras com adição de MSLs. A micropartícula estudada mostrou-se, nas condições estudadas, inadequada para aplicação em sorvete, porém a possibilidade de aplicação em outros produtos pode ser explorada.

3.1 INTRODUÇÃO

A preocupação do consumidor com sua dieta, e a crescente associação entre hábitos alimentares saudáveis e o impacto positivo na saúde, tem impulsionado o desenvolvimento de novos produtos na indústria de alimentos, em especial os alimentos funcionais.

Probióticos são definidos como micro-organismos vivos que quando consumidos com regularidade e quantidade adequados promovem inúmeros benefícios à saúde do hospedeiro. Porém, a estabilidade destas bactérias nos alimentos é baixa e, nem todas sobrevivem ao efeito do pH baixo do estômago e à presença de sais biliares. Para contornar as limitações impostas pelo processamento, armazenamento e condições nocivas depois de ingeridos, a microencapsulação tem sido explorada como alternativa pertinente visando à proteção, frente à degradação química (oxidação e hidrólise, por exemplo), e liberação controlada destes ingredientes ativos. Trata-se do processo de empacotamento do material de interesse, que promove um micro-ambiente capaz de aumentar a sobrevivência destas bactérias.

A técnica de microencapsulação por *spray chilling* consiste em atomizar a mistura fundida em uma câmara onde se injeta também ar resfriado para que o material atomizado se solidifique, formando as micropartículas lipídicas.

O desafio tecnológico envolvido na produção de alimentos contendo probióticos é a boa aceitação sensorial, uma vez que algumas destas cepas podem produzir *off-flavors* caso multipliquem-se no alimento, e, novamente a técnica de microencapsulação pode representar uma alternativa para viabilizar o produto (DESMOND et al., 2002; LISERRE et al. 2007; OLIVEIRA et al. 2007a; OLIVEIRA et al. 2007b; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

Sorvete é um produto muito apreciado pelo público em geral, independente da idade ou poder aquisitivo. O crescimento do consumo interno estimula a investigação de agregação de valor, através do *claim* funcional, devido à incorporação de componentes bioativos (CRUZ et al., 2009a; CRUZ et al., 2011; ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES, 2012).

A literatura especializada tem reportado a utilização do sorvete como matriz com potencial para aplicação de micro-organismos probióticos e alguns componentes prebióticos, embora sejam necessárias algumas modificações

tecnológicas para aumentar a viabilidade do sorvete com adição de probióticos (CRUZ et al., 2009a; FÁVARO-TRINDADE et al. 2006 e 2007).

A etapa apresentada neste capítulo estudou a aplicação das micropartículas sólido-lipídicas (MSLs) produzidas e avaliadas na primeira etapa deste projeto. A MSLs foram incorporadas em sorvete de massa sabor morango. Caracterizou-se o produto desenvolvido segundo pH e *overrun*, além da avaliação da sobrevivência de *L. acidophilus* em sua forma livre e microencapsulada neste produto, durante armazenamento por 120 dias a -18°C, além disso, foi avaliada a resistência deste probiótico incorporado em sorvete, quando submetido aos fluidos gástrico e intestinal simulados.

3.2 OBJETIVOS

Esta etapa do projeto teve como objetivo a aplicação das micropartículas sólido-lipídicas (MSLs), em sorvete de morango. Para alcançar o objetivo principal os seguintes objetivos específicos foram atendidos:

- Produção de sorvete com incorporação de MSLs e micro-organismos livres;
- Caracterização do sorvete segundo pH, incorporação de ar (*overrun*), cor instrumental e reologia;
- Avaliação da viabilidade de micro-organismos livres e microencapsulados no sorvete durante o armazenamento, da resistência frente aos fluidos gástrico e intestinal simulados e análise sensorial do produto;

3.3 MATERIAL E MÉTODOS

3.3.1 Materiais

Para a produção das MSLs e do sorvete simbiótico utilizou-se como componente prebiótico a polidextrose (Litesse®, Danisco, Cotia, Brasil) e a cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* LAC-04, gentilmente doada pela Danisco (Cotia, Brasil). A micropartículas sólido lipídicas utilizadas refere-se ao tratamento 3 (Ver item 2.3.5.3. e 2.3.5.4. do capítulo 2), produzida com *Lactobacillus acidophilus* e polidextrose.

Os ingredientes utilizados na produção do sorvete sabor morango, e suas respectivas proporções, são apresentados na Tabela 20.

Tabela 20. Ingredientes utilizados na fabricação de sorvete.

Ingredientes	Marca	Quantidade
Açúcar cristal	Itaraquê (Usina Santa Fé S.A., Brasil)	900g
Glicose	Fruta Viva (Brasil)	350g
Sabor	Algernix & Selecta (Duas Rodas Industrial, Brasil)	150g
Leite em pó_base para sorvete	Algernix	500g
Liga neutra	Selecta_Sorvetina	50g
Emulsificante	Emustab Selecta_2rodas	50g
Leite pasteurizado	**	5l

**Produto cedido pelo Laticínio da prefeitura do campus de Pirassununga da USP.

3.3.2 Definição da formulação da micropartícula lipídica para adição em sorvete

Diante dos resultados expostos no Capítulo 2, concerne a caracterização e avaliação das MSLs elegeu-se a formulação 3, que tem como probiótico *L. acidophilus* e como prebiótico a polidextrose, para o teste de incorporação em sorvete.

A escolha baseou-se principalmente no fato de que esta formulação apresentou a melhor estabilidade frente o armazenamento a baixas temperaturas, que estaria condizente com a aplicação em sorvete, já que se trata de um produto congelado. Além disso, boas taxas de sobrevivência do probiótico após a simulação à exposição das MSLs aos fluidos gástrico e intestinal foram consideradas. A utilização de micropartículas com *L. acidophilus* foi explorada visto a questão da proteção a ser atendida pela microencapsulação, já que esta cepa mostrou pouca resistência aos fluidos gástrico e intestinais, e baixa estabilidade frente o armazenamento.

3.4 Métodos

3.4.1 Preparo do inóculo de *L. acidophilus*

O inóculo de *L. acidophilus* adicionado à formulação de sorvete foi preparado conforme a fórmula descrita na Tabela 21. Três inoculações progressivas foram realizadas para atingir o volume final de 500 mL de leite enriquecido, sendo armazenadas *overnight* a 37°C. O inóculo obtido foi centrifugado a 2400 g à temperatura de 4°C. O material precipitado (massa celular), foi suspenso em leite Mólico (Nestlé) até um volume final de 500 mL.

Tabela 21. Preparação do inóculo para adição no sorvete.

Componente	Proporção (%)
<i>L. acidophilus</i> Lac-04 Danisco	1%
Extrato de levedura	1%
Glicose	1%
Citrato de sódio	1%
L-cisteína	0.05%
Leite desnatado Molico Nestlé	-

3.4.2 Preparo do sorvete

O sorvete em massa sabor morango foi preparado no Laticínio Escola da Prefeitura do Campus de Pirassununga da Universidade de São Paulo. A partir da mistura dos ingredientes apresentados na Tabela 20 foi produzida a massa para veiculação das MSLs e do inóculo de micro-organismos (item 3.3.1).

O sorvete foi preparado com a mistura em liquidificador dos ingredientes seguindo as proporções indicadas na Tabela 20. A mistura foi armazenada na câmara de resfriamento e no dia seguinte submetida ao processo de incorporação de ar e congelamento propriamente dito, em sorveteira Brasfrio (São Carlos, Brasil), conforme ilustrado na Figura 33 (a).

Figura 33. Processamento de sorvete sabor morango. Incorporação de ar e congelamento do sorvete através da sorveteira Brasfrio® (batedura através de sistema de pás) (a), e processo de incorporação e homogeneização para as MSLs ou para o inóculo de micro-organismos livres (b).

Após a obtenção da massa do sorvete tradicional as MSLs ou inóculo foram incorporados ao sorvete com agitador mecânico (modelo Fisatom-713, São Paulo, Brasil) a 200 rpm por 4 minutos (Figura 33-b). Posteriormente a massa foi acondicionada em frascos de plástico descartáveis e armazenada em freezer por no mínimo 24 horas.

3.4.2.1 Tratamentos

Foram produzidas três formulações de sorvete. Uma formulação padrão, sem adição de nenhum ingrediente diferente dos apresentados na Tabela 20, uma formulação com adição de inóculo de *L.acidophilus*, produzido conforme descrito no item 3.3.1 e polidextrose em pó. Por fim, uma formulação com adição de MSLs simbióticas (*L. acidophilus* e polidextrose- F3), na proporção 50g de MSLs em 1500g de massa de sorvete. As formulações para o sorvete estão apresentas na Tabela 22.

Tabela 22. Formulações para o sorvete.

Formulação	Sorvete de morango	MSLs	Polidextrose	Inóculo
Controle_ S1	X			
Inóculo_ S2	X		X	X
MSLs_ S3	X	X		

3.4.3 Enumeração de *L. acidophilus* em sorvete.

A enumeração de células viáveis de *L. acidophilus* livre e microencapsulado em sorvete foi realizada através do plaqueamento em profundidade (*pour plate*), com ágar MRS (*DeMan Rogosa and Sharp*) da Acumedia (Indaiatuba, Brasil), como apresentado no item 2.3.5.2.

3.4.4 Análises no sorvete

O sorvete produzido foi caracterizado pelas suas características físico-químicas: pH, *overrun* e comportamento reológico. Analisou-se também a cor instrumental. A fim de se estudar a matriz sorvete como potencial carreador de probióticos, avaliou-se a estabilidade do produto ao armazenamento, a resistência do sorvete aos fluídos gástrico e intestinal simulados e, por fim, a análise sensorial da aceitação do produto. A Figura 34 ilustra as análises realizadas.

Figura 34. Esquema das análises realizadas na etapa de caracterização e avaliação das diferentes formulações de sorvete.

3.4.4.1 Determinação do pH

O pH das amostras de sorvete foi medido com potenciômetro (Marte® MB10, Brazil). As medidas foram realizadas em triplicata.

3.4.4.2 Overrun

As medições de *overrun* foram realizadas por amostra através da comparação do peso da mistura do sorvete não congelado (mistura/calda) e do sorvete em um recipiente de volume fixo (MARSHALL; GOFF; HARTEL, 2003; MUSE; HARTEL, 2004; WILDMOSER; SCHEIWILLER; WINDHA, 2004). *Overrun* (%) foi calculado segundo a equação abaixo.

$$\text{Overrun} = \frac{\text{peso da mistura} - \text{peso do sorvete}}{\text{peso do sorvete}} \times 100$$

3.4.4.3 Cor instrumental

A cor das amostras de sorvete foi determinada pelo colorímetro modelo Mini Scan XE (Hunterlab, Reston, Estados Unidos). A resposta foram os parâmetros L^* , a^* e b^* de acordo com o sistema de cor CIELAB. Inicialmente o equipamento era calibrado nas placas branca e preta, para então proceder-se a análise.

A análise de cor permite registrar a luminosidade (L^*) das amostras de sorvete e as coordenadas cromáticas a^* ($+a^*$, verde; $-a^*$, vermelho) e b^* ($+b^*$, azul; $-b^*$, amarelo). O instrumento de refletância determinou três parâmetros de cor: Luminosidade L^* , a^* e b^* , a partir destes valores calculou-se o ângulo hue ($^\circ h$) e cromaticidade (croma, C^*) segundo as equações 3.1 e 3.2, respectivamente.

As coordenadas cilíndricas L^* , $^\circ h$ e C^* descrevem a luminosidade, tonalidade e saturação respectivamente. Através das coordenadas a^* e b^* calcula-se o ângulo hue ou tonalidade de acordo com a Equação 3.1, e o croma (C^*) através da Equação 3.2, estes são dois parâmetros efetivos na caracterização da cor das amostras estudadas.

$$H^\circ = \arctg(b^*/a^*), \text{ onde } a^* > 0; b^* > 0; \quad (\text{Equação 3.1})$$

Quando os valores do ângulo hue estão próximos de 0° , a cor é púrpura, quando estão próximos de 90° , amarelada, ou verde-azulada (180°) ou azul (270°).

$$[C^* = (a^{*2} + b^{*2})^{1/2}] \quad (\text{Equação 3.2})$$

O índice croma corresponde à pureza, vivacidade, saturação, quanto mais forte e brilhante é a cor, mais afastado está da origem das coordenadas.

3.4.4.4 Caracterização reológica do sorvete

Para determinação das propriedades reológicas das formulações de sorvete, utilizou-se um reômetro rotacional AR 2000, TA Instruments (New Castle, Delaware, EUA) e o software Rheology Advantage Instrument control AR e Rheology Advantage Data Analysis, para análise dos dados. As medidas reológicas foram obtidas com a geometria cilindros concêntricos, à temperatura de 20°C, variando a taxa de deformação de 0,01 a 200 s⁻¹ (curva ascendente) e de 200 s⁻¹ a 0,01 s⁻¹ (curva descendente), com um tempo total de ensaio de 4 minutos.

A temperatura de 20°C foi escolhida, pois provavelmente é próxima à temperatura que o sorvete atinge quando entra em contato com a temperatura corpórea no consumo.

As amostras de sorvete descansaram por 2 minutos após o carregamento da amostra antes de se efetuar as medições.

O modelo ajustado foi o de Herschel-Bulkley, descrito na Equação 3.3.

$$\tau = \tau_o + K(\dot{\gamma})^n \quad (\text{Equação 3.3})$$

Onde: K é o índice de consistência (Pa.sⁿ); τ_o a tensão de cisalhamento inicial (Pa); τ a tensão de cisalhamento (Pa); $\dot{\gamma}$ a taxa de deformação (s⁻¹); e, n o índice de comportamento de fluxo (adimensional).

3.4.4.5 Viabilidade de *L. acidophilus* em sorvete durante estocagem

Com o objetivo de avaliar a viabilidade de *L. acidophilus* na forma livre e encapsulada quando incorporados em sorvete foram realizadas suas contagens durante armazenamento por 120 dias a temperatura de -18±2°C. As células viáveis do probiótico foram enumeradas nos dias 0, 15, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento.

3.4.4.6 Resistência de *L. acidophilus* veiculado em sorvete aos fluidos gástrico e intestinal simulados

Avaliou-se a resistência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado veiculado em sorvete, simulando a exposição destes sistemas, aos fluidos gástrico (FGS) e intestinal (FIS), conforme descrito no item 2.3.13.

3.4.4.7 Análise Sensorial

Foram realizados estudos de aceitação das amostras de sorvete em relação aos quesitos: aroma, cor, textura, textura e aceitação global. As amostras foram apresentadas em blocos completos balanceados monadicamente. Foram servidas em copos descartáveis que foram codificados com números aleatórios de três dígitos marcados em sua base.

A avaliação da aceitação sensorial das amostras foi realizada em cabines individuais com luz fluorescente branca, de acordo com a metodologia descrita por Meilgaard et al. (1999). Os ensaios foram executados nas amostras com 3 dias de estocagem. As amostras foram avaliadas usando-se escala hedônica de 9 pontos (1 - "desgostei muitíssimo" e 9 - "gostei muitíssimo"). Sessenta provadores não treinados, de ambos os sexos participaram do teste. Os provadores foram selecionados em função de serem consumidores habituais de sorvetes e por se disponibilizarem a participar dos ensaios. A ficha sensorial utilizada está apresentada no Apêndice A.

As amostras foram referentes às formulações S1 (controle), S2 (Polidextrose+inóculo *L. acidophilus*) e S3 (MSLs simbióticas).

Os provadores que participaram da análise sensorial assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice B), bem como esta análise foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos FZEA/USP.

3.5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.5.1 Determinação de pH e *Overrun*

De acordo com alguns estudos reportados pela literatura especializada, de maneira geral, a viabilidade e crescimento das células probióticas em alimentos depende de muitos fatores, entre eles a cepa do micro-organismo, acidez final e concentração de ácido láctico e acético do produto entre outros (YOON; WOODAMS; HANG, 2004).

Os pH e o *overrun* das amostras de sorvete para as formulações S1, S2 e S3, estão apresentados na Tabela 23. A média dos pH registrados no dia da fabricação do sorvete foi de 5,51; 5,37 e 5,49 para a formulação controle, com adição de inóculo e com adição de MSLs, respectivamente. Observa-se pelos dados

apresentados que a adição de inóculo ao sorvete reduziu ligeiramente o pH da amostra, possivelmente decorrente do pH baixo da mistura do inóculo de micro-organismos. Por sua vez a adição de MSLs não impactou no pH quando comparado a formulação tradicional (S1). O que pode ser explicado pelo fato das bactérias estarem protegidas no micro-ambiente da micropartícula lipídica, onde não tem contato direto com o meio (alimento), podendo ainda indicar que o acesso aos nutrientes foi mais lento provocando a lenta liberação de metabólitos através da MSL.

A redução de pH em produtos devido a adição de probióticos pode estar associada à fermentação de açúcares o que leva à produção de ácido lático e acético, o que impacta na redução do pH do meio (EL KOSSORI et al., 1998; KELEBEK et al., 2009; SOHAIL et al, 2012). Além desta via de conversão de açúcares, a acidificação pode ocorrer devido à liberação de enzimas das bactérias mortas, e como a β -galactosidase é ainda ativa a 0-5°C atua na hidrólise de açúcares, atuando na pós-acidificação de iogurtes, por exemplo, devido a presença de mais íons hidrogênio do que lactato. O que não ocorre no sorvete devido ao armazenamento em temperaturas próximas a -18°C. A medição de pH durante o armazenamento do sorvete (dados não apresentados) pouco variou entre as amostras devido à temperatura de congelamento.

Tabela 23. Valores de pH e *overrun* das amostras de sorvete das formulações S1, S2 e S3, referentes ao sorvete tradicional, com adição de MSLs e inóculo, respectivamente.

	pH	<i>Overrun</i> (%)
S1 – controle	5,51±0,05 ^a	41,14±1,92 ^b
S2 – inóculo	5,37±0,05 ^b	40,61±4,13 ^b
S3 – MSLs	5,49±0,05 ^a	53,87±1,91 ^a

Médias de pH ou *overrun*, seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O *overrun* das amostras foi de 41,14±1,92; 40,61±4,13; 53,87±1,91 para o controle, formulação com adição de inóculo e com adição de MSLs, respectivamente. O maior valor de *overrun* foi observado no sorvete com adição de MSLs, tal fato pode estar relacionado com o volume ocupado pelas micropartículas, o que diminuiu a densidade (maior volume) desta formulação impactando na maior porcentagem de *overrun*. As MSLs podem ter sido alocadas na estrutura tridimensional de gordura e ar, aumentando o volume da mistura.

Os valores de *overrun* para a formulação S2 com adição de povidexose e micro-organismos livres foi semelhante ao registrado por Turgut e Cakmakci (2009) que produziram sorvete com probióticos, onde para as formulações com 5% de creme apresentou valores médios de 41,08%.

Pinto et al. (2012) produziram e avaliaram amostras de frozen iogurte adicionado de microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 produzidas com diferentes conteúdos de agente carreador (leite desnatado reconstituído e inulina), observaram que a adição das microcápsulas aumentou o conteúdo de sólidos totais e os valores de *overrun*. O mesmo comportamento registrado para o sorvete de morango com adição de MSLs.

3.5.2 Cor instrumental

A caracterização da cor experimental das amostras de sorvete gerou os parâmetros L^* , a^* e b^* , ângulo Hue e cromaticidade apresentados na Tabela 24. De acordo com Hutchings (2002) é pertinente se analisar os resultados das coordenadas não de forma isolada, já que as coordenadas não são independentes, para isso o cálculo do ângulo Hue (tonalidade) e cromaticidade é apropriado para este tipo de descrição.

Tabela 24. Parâmetros de cor L^* , a^* , b^* , h e C^* para as amostras de sorvete.

	L^*	a^*	b^*	h	C^*
CONTROLE	59,46±1,01 ^a	14,16±0,22 ^a	1,02±0,13 ^a	14,07±1,91 ^a	14,19±0,23 ^a
INÓCULO	58,05±0,26 ^b	11,67±0,41 ^b	1,23±0,11 ^a	9,46±0,67 ^b	11,74±0,42 ^b
MSLs	59,47±0,84 ^a	11,87±0,73 ^b	1,20±0,39 ^a	10,89±3,88 ^{ab}	11,93±0,73 ^b

Médias dos parâmetros de cor, seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

O parâmetro a^* positivo indica a coloração em direção ao vermelho, enquanto que a^* negativo vai em direção ao verde. A adição de inóculo ou MSLs parece ter reduzido a coloração vermelha das amostras S2 e S3, em relação a S1, onde o parâmetro a^* de S1 apresentou-se significativamente maior que as outras amostras.

A tonalidade da cor foi mais acentuada para a amostra controle assim como a cromaticidade da amostra. Na cromaticidade e a^* as amostras com adição de inóculo e MSLs não apresentaram diferença significativa.

Estrada et al. (2011) desenvolveram iogurte de morango com adição de óleos de peixes marinhos, e um iogurte de morango tradicional, e comparam os dois produtos. Considerando a cor similar do sorvete de morango com o iogurte, os parâmetros observados, principalmente a^* foram parecidos, sendo que neste estudo esta grandeza variou de 9,1 à 12.

A Figura 35 ilustra a correlação de alguns parâmetros de cor observados com a coloração do produto.

Figura 35. Diagrama com a sequência de nuances de cores e orientação do ângulo de nuances (Ângulo Hue).

Adaptado de: Handprint (2009)

3.5.3 Comportamento reológico

A Tabela 25 ilustra alguns parâmetros obtidos na análise reológica das amostras de sorvete. A viscosidade aparente foi determinada a 50 s^{-1} , que seria a taxa de cisalhamento correspondente à executada durante o consumo (BOURNE, 2002).

Tabela 25. Parâmetros reológicos das amostras de sorvete

	Viscosidade aparente * (Pa.s)	Viscosidade ** (Pa.s)	Índice de comportamento do fluido n	τ_o (Pa)
S1	$0,22 \pm 0,02^a$	$1,14 \pm 0,17^a$	$0,57 \pm 0,01^c$	$0,73 \pm 0,19^a$
S2	$0,20 \pm 0,02^{ab}$	$0,71 \pm 0,12^b$	$0,66 \pm 0,01^b$	$0,42 \pm 0,01^{ab}$
S3	$0,16 \pm 0,03^b$	$0,43 \pm 0,14^b$	$0,75 \pm 0,03^a$	$0,26 \pm 0,08^b$

*Considerada 50 s^{-1}

** Medida ao longo da taxa de cisalhamento $0,01 \text{ s}^{-1}$ a 200 s^{-1}

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Segundo Oliveira, Souza e Monteiro (2008), conforme aumenta a viscosidade do sorvete, aumenta resistência do produto ao derretimento e, também sua cremosidade. A viscosidade aparente a 50 s^{-1} do sorvete com adição das MSLs foi menor, fato que está relacionado com a maior incorporação (*overrun*) de ar destas amostras, onde S1 e S2 apresentaram *overrun* significativamente menor que S3.

Além disso, a incorporação de MSLs esféricas, e de natureza hidrofóbica podem ser bem incorporadas à matriz alimentícia, devido à redução da tensão superficial entre a superfície hidrofóbica da micropartícula e o meio onde será adicionada, permitindo o fluxo das partículas no alimento, refletindo melhor fluidez e escoamento do material (LAKKIS, 2007).

A tensão inicial de ruptura traduz a resistência estrutural interna do fluido, pode se dizer que a adição da MSLs reduziu a força estrutural interna desta formulação de sorvete em relação à S1. Entende-se que esta força interna é superada quando a tensão inicial é atingida (VIDIGAL et al., 2012).

A partir da análise dos reogramas, infere-se que todas as amostras de sorvete apresentaram uma relação não linear entre a tensão de cisalhamento e a taxa de deformação na temperatura estudada, logo, as amostras comportaram-se como fluido não newtoniano (Figura 36). Através do software de análise de dados constatou-se que o melhor ajuste foi com o modelo Hersch-Bulkley.

A maior tensão de cisalhamento para a amostra controle pode estar relacionada a menor cremosidade, já que para as amostras S2 e S3 foram acrescentados inóculo em meio aquoso e micropartículas lipídicas, respectivamente, sendo que estes aditivos parecem ter diminuído a tensão de cisalhamento na faixa aproximada de 20 a 120 s^{-1} , na curva ascendente.

Figura 36. Reograma (curva ascendente e descendente) das amostras de sorvete à 20°C . (■) S1: controle; (◆) S2: adição de inóculo; e (▲) S3: adição de MSLs.

As propriedades reológicas de sorvetes têm sido caracterizadas como pseudoplásticas (COTREL; GEOFFREY; PHILLIPS, 1980; GOFF; DAVIDSON, 1992). Sendo assim os valores de índice de comportamento (n) observados de 0,57 a 0,75 (Tabela 26) são coerentes com o comportamento não newtoniano observado à 20°C. Índices n menores que a unidade caracterizam as amostras como pseudoplásticas, pois quando são newtonianos o n é igual a unidade. Ou seja, a viscosidade diminui com a taxa de deformação (OLIVEIRA; SOUZA; MONTEIRO, 2008). Rossa et al. (2011) sugerem que esta diminuição da viscosidade deve-se a agregação dos glóbulos de gordura, que reduzem de tamanho durante o cisalhamento, onde então a viscosidade é reduzida.

Da mesma forma, Rezaei et al. (2011), Oliveira et al. (2008) e Pinto et al. (2012), observaram uma redução na viscosidade aparente com o aumento da taxa de deformação para *frozen yogurt*.

3.5.4 Resistência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado veiculado em sorvete aos fluidos gástrico e intestinal simulados

O ensaio de resistência aos fluidos gástrico e intestinal foi realizado para as amostras com adição de micro-organismos livres e microencapsulados.

As MSLs veiculadas em sorvete, apresentaram uma sobrevivência de aproximadamente 70% (Figura 37), enquanto que, no estudo com as MSLs sem estarem incorporadas no produto, a sobrevivência foi de 61-64% (Ver item 5.9 resistência das MSLs aos fluidos gástrico e intestinal simulados), pode-se observar o efeito protetivo da matriz, que também foi observado por Buriti et al. (2010).

Como mencionado o efeito protetivo da matriz influencia na sobrevivência dos probióticos durante a simulação da passagem pelo TGI. Este efeito protetivo pode estar relacionado com a possibilidade de ligação dos componentes do alimento com os ácidos biliares, evitando que estes exerçam sua toxicidade no metabolismo bacteriano, que pode levar a morte celular (BEGLEY et al., 2005).

Bedani, Rossi e Saad (2013) não verificaram o efeito protetivo da adição inulina e/ou da farinha de okara, frente a condições gástricas e intestinais simuladas, porém concluíram que a matriz, produto de soja fermentada, melhorou a sobrevivência de ambas cepas probióticas (*L. acidophilus* e *B. animalis*) testadas nas mesmas condições, sendo que, *B. animalis* Bb-12 veiculada teve melhor

desempenho quando comparada a cultura recém preparada submetida as mesmas condições.

Queijo de soro de leite também foi uma matriz que segundo Madureira et al. (2011) protegeu os probióticos *L. casei*, *L. acidophilus* e *B. animalis*, durante análise *in vitro* de exposições sequenciais à saliva artificial, suco gástrico e intestinal simulados e íleo, a fim de mimetizar o processo digestivo. Neste caso os micro-organismos também foram inoculados em meio MRS, como situação de referência, sendo que quando veiculados no queijo, os probióticos tiveram melhores respostas de sobrevivência em praticamente todas as etapas simuladas.

Neste estudo observou-se o efeito protetivo do sorvete, porém não das micropartículas (Figura 37), que poderiam proteger o probiótico das condições adversas do processo digestivo, em relação à forma livre de *L. acidophilus* incorporada ao sorvete.

Figura 37. Avaliação da sobrevivência de *L. acidophilus* livre e encapsulado adicionado em sorvete. O eixo vertical da esquerda ilustra a sobrevivência em termos de porcentagem e o eixo direito em ciclos logarítmicos (UFC/mL). Onde: (■) e (▲) sorvete com adição de inóculo livre; (□) e (◆) sorvete com adição de MSLs.

Como pode ser observado houve uma redução significativa de células viáveis depois da exposição à bile. De 120 para 210 minutos do ensaio de fluidos, que é a transição para a exposição aos fluidos intestinais, houve redução significativa para

ambas as formulações estudadas, com adição de micro-organismos livres (b-c) e com adição das MSLs (c-d). Os sais biliares agem negativamente na sobrevivência dos probióticos, pois afetam os fosfolípidios e proteínas da membrana celular perturbando a homeostase/troca celular e consequentemente sua estabilidade (BEGLEY et al., 2005).

O fato das MSLs não protegeram *L. acidophilus* no sorvete pode estar relacionado às condições prévias de stress dos micro-organismos durante o processamento da MSL e do sorvete, que podem deixar o micro-organismo mais sensível e por isso menos resistente do que o inóculo recém ativado. A presença de alguns poros nas MSLs também pode estar associada a menor proteção da MSLs para o probiótico, nestas porções o bloqueio aos íons H^+ foi reduzido deixando o probiótico mais susceptível aos fluidos simulados.

3.5.5 Viabilidade de *L. acidophilus* livre e microencapsulado em sorvete

Foi realizada a avaliação da estabilidade dos micro-organismos livres e encapsulados no sorvete durante o armazenamento do produto. Os probióticos podem perder a viabilidade, o que pode comprometer sua funcionalidade no que se refere aos benefícios para saúde do hospedeiro. A perda de viabilidade parece estar relacionada a danos às componentes celulares da membrana celular e DNA do probiótico (TEIXEIRA et al., 1995).

Variáveis como alta atividade de água, temperatura de estocagem e presença de oxigênio, aparentemente comprometem a viabilidade celular de micro-organismos probióticos durante o armazenamento prolongado, tornando-se um desafio a aplicação em produtos alimentícios (TEIXEIRA et al., 1995; ANAL; SINGH, 2007; RODRIGUES et al., 2011).

A viabilidade dos probióticos em matrizes alimentícias depende, entre outros fatores, da cepa selecionada, da interação entre espécies microbianas presentes, produção de peróxido de hidrogênio devido ao metabolismo bacteriano e acidez do produto final (VASILJEVIC; SHAH, 2008).

A Tabela 26 ilustra a sobrevivência do probiótico livre e em MSLs quando adicionado em sorvete sabor morango.

Tabela 26. Efeito da microencapsulação na sobrevivência de *L. acidophilus* em sorvete durante 120 dias de armazenamento a -18 °C.

Armazenamento (dias)	Formulações	
	Inóculo Log(UFC/g)	MSLs Log(UFC/g)
0	8,75±0,02 ^a	7,33±0,13 ^a
15	8,38±0,09 ^b	7,38±0,11 ^a
30	8,36±0,06 ^b	7,30±0,13 ^a
60	8,09±0,07 ^c	5,85±0,06 ^b
90	8,15±0,13 ^c	5,64±0,16 ^b
120	7,64±0,06 ^d	5,31±0,15 ^c

Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não diferem estatisticamente entre si, pelo teste de Tukey a 5% de significância.

Inicialmente (0 para 15 dias) a redução da contagem de probióticos foi maior para os micro-organismos adicionados livres do que os microencapsulados, o mesmo comportamento observado por Homayouni et al. (2008) e Pinto et al. (2012), esta situação foi relacionada às injúrias causadas pelo frio às células, que eventualmente levam à morte celular do probiótico.

Para a formulação com adição das MSLs a contagem de *L. acidophilus* manteve-se praticamente constante até 30 dias de armazenamento, porém, depois, nos intervalos de 30 para 60 e, de 90 para 120 dias, registrou-se uma redução significativa nas células viáveis. Diferentemente, Pinto et al. (2012) registraram contagens constantes para probióticos encapsulados adicionados ao *frozen yogurt* por 90 dias. Estes autores produziram micropartículas de *Bifidobacterium* BB-12 com diferentes agentes carreadores (leite desnatado reconstituído e inulina) por *spray drying*. A diferença de resultados de viabilidade nos produtos está associada ao processo aplicado na produção das micropartículas bem como os agentes carreadores, que geraram micropartículas de natureza distintas.

Como apresentado na Tabela 26 a contagem inicial do sorvete com MSLs foi aproximadamente 1,3 ciclos logarítmicos inferior ao sorvete com inóculo, esta condição experimental inicial, imposta pela própria contagem das micropartículas, desfavoreceu a extensão de vida de prateleira do produto, e, mesmo do ponto de vista de redução com o armazenamento, o sorvete com adição das MSLs reduziu 2,02±0,10 enquanto que o com adição de inóculo reduziu 1,12±0,05, e em porcentagem 12,82±0,59% e 27,59±1,44% de morte celular, para o probiótico livre e microencapsulado, respectivamente.

Segundo a legislação brasileira vigente a quantidade mínima de células viáveis para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. A porção diária registrada é de 60 gramas ou 130 mililitros de sorvete (BRASIL, 2003, 2008). De acordo com estes padrões, sorvetes com adição de MSLs podem ser considerados “probióticos” num período de vida de prateleira de 30 dias, pois em 60 dias a contagem do produto é de 7,63 log (UFG/60g). E, segundo estes mesmos parâmetros no sorvete com adição de inóculo livre e presença de polidextrose o micro-organismo apresentou viabilidade de 120 dias durante estocagem.

Sendo assim, uma alternativa para melhorar o desempenho da formulação com adição das MSLs seria aumentar a contagem inicial de *L. acidophilus* no produto, através da produção de micropartículas com maior carregamento, ou aumentar a concentração destas partículas na formulação, porém, neste caso, há o limitante sensorial da percepção das MSLs.

A viabilidade de *L. acidophilus* tem se mostrado variável em diferentes estudos descritos na literatura, esta variação de viabilidade da bactéria está relacionada a inúmeros fatores como concentração do inóculo, tempo de fermentação, processo de fermentação, composição do produto, principalmente devido ao pH e a presença ou ausência de fatores de crescimento como componentes prebióticos e proteínas (BURITI et al., 2010).

Buriti et al. (2010) estudaram a viabilidade de mousse de goiaba simbiótico e inferiram que a temperatura de congelamento confere uma condição mais estável ao micro-organismo, preservando-o, quando comparada à refrigeração. Explicaram que durante o armazenamento a morte dos probióticos pode ocorrer devido à presença de água não congelada no produto e altas concentrações de soluções residuais ainda presentes. A taxa de morte celular do micro-organismo reduz gradualmente até se estabilizarem. No entanto a taxa de mortalidade de probióticos a -20°C é reduzida em relação à 0°C (CONRAD et al., 2000; MAGARIÑOS et al., 2007).

Homayouni et al. (2008) obtiveram resultados mais promissores na incorporação de micropartículas com probióticos em sorvete. Encapsularam probióticos com amido resistente e produziram sorvete simbiótico, acrescentando *L. casei* e *B. lactis* nas formulações do produto. No caso das células livres *L. casei*

reduziram cerca de 3,4 log em 180 dias de armazenamento a -20°C, enquanto que *B. lactis* 2,9 log, já na forma microencapsulada estes mesmos micro-organismos reduziram, 1,4 e 0,7 log para *B. lactis* e *L. casei*, respectivamente.

Geralmente os sorvetes são considerados bons veículos para os micro-organismos probióticos, devido a alta viabilidade em armazenamento sob temperaturas reduzidas (FÁVARO-TRINDADE et al., 2007; MAGARIÑOS et al., 2007).

A baixa viabilidade de *L. acidophilus* em MSLs no sorvete pode ser explicada pelo fato de que os micro-organismos encapsulados passaram por estresses na microencapsulação: do calor quando adicionados na gordura fundida, da atomização e do contato com o ar frio. Como avaliado no item 2.4.9 esses efeitos não foram *a priori* deletérios, porém podem ter causado injúrias aos micro-organismos que ficaram mais sensíveis, e quando adicionados no sorvete, onde ainda passaram pelo stress da incorporação, tiveram menor viabilidade que os probióticos livres que estavam recém-ativados.

De acordo com Maness et al (1999), a membrana celular bacteriana é constituída por fosfolipídios poliinsaturados que são susceptíveis ao ataque de espécies reativas ao oxigênio, desta forma a oxidação da matriz lipídica da MSL pode ter desencadeado a oxidação dos fosfolipídios da membrana celular do probióticos contribuido para a viabilidade de *L. acidophilus* reduzida no caso da formulação S3.

3.5.6 Análise Sensorial

Os resultados da análise sensorial em relação aos atributos pesquisados estão apresentados na Figura 38 e Tabela 27. Observa-se que a linha em cinza escuro (formulação com adição das MSLs) está associada as menores notas para textura, sabor e aceitação global. A Tabela 27 apresenta as notas dos julgadores e a análise estatística dos resultados. Os resultados comprovam a diferença estatística ($p \leq 0,05$) da formulação S3 das outras duas (S1 e S2) para textura, sabor e aceitação global.

Figura 38. Notas médias das amostras de sorvete para os atributos sensoriais: aroma, cor, textura, sabor e aceitação global do produto. (—◆—) S1; (···■···) S2 e (---▲---) S3.

Segundo Wang et al. (1999), o atributo sabor e textura impactam diretamente na boa aceitabilidade do produto, no caso deste estudo leite de soja reconstituído. O que pode explicar o impacto das notas reduzidas para o sabor e textura do sorvete com as micropartículas na nota da aceitação global da mesma. Observa-se que a textura impactou tanto no sabor como na aceitação global das amostras com adição das MSLs.

Tabela 27. Notas médias dos consumidores para cada um dos atributos avaliados nas diferentes amostras de sorvetes.

	Controle (S1)	Inóculo (S2)	MSLs (S3)
Aroma	7.13 ± 1.45 ^a	6.87 ± 1.64 ^a	6.85 ± 1.72 ^a
Cor	7.87 ± 1.13 ^a	7.70 ± 1.15 ^a	7.55 ± 1.27 ^a
Textura	7.29 ± 1.69 ^a	7.03 ± 1.89 ^a	5.93 ± 2.09 ^b
Sabor	7.35 ± 1.74 ^a	7.23 ± 1.67 ^a	5.82 ± 2.33 ^b
Aceitação	7.43 ± 1.51 ^a	7.20 ± 1.60 ^a	6.00 ± 1.98 ^b

Letras minúsculas diferentes na mesma linha são significativamente diferentes ao nível de 5% de significância pelo teste de Tukey.

Como exposto na Tabela 27, não foi observada diferença significativa entre as amostras quanto ao aroma e a cor. Porém em relação aos quesitos textura, sabor e aceitação a amostra com adição das MSLs receberam as menores notas.

A formulação com adição das micropartículas apresentou a menor nota no quesito textura, o que correlaciona-se com a presença das micropartículas sólido lipídicas. Na ficha de análise sensorial (APÊNDICE A) havia espaço para comentários sobre as amostras, dos sessenta provadores, treze escreveram sobre a presença de partículas, arenosidade, presença de cristais, “farinhento”, granuloso, “grumos perceptíveis”, “partículas dispersas” e similares, o que pode ser a razão das menores notas em relação à textura e consequentemente na aceitação geral. A presença de MSLs na proporção estudada foi perceptível para o consumidor, por conta da diferença significativa em relação às outras amostras, e rejeitada, no sentido que à amostra foi atribuída as menores notas para os atributos textura, sabor e aceitação global.

Nos sorvetes tradicionais a “arenosidade” é considerada uma alteração sensorial negativa provocada pela formação de cristais de lactose, com menor solubilidade que a sacarose, que pode cristalizar com o congelamento do produto, sendo que as oscilações da temperatura potencializam tal alteração (SOLER; VEIGA, 2001). Logo a sensação de arenosidade provocada pela adição das MSLs, foi percebida negativamente pelo provador. Uma alternativa para reduzir esta percepção negativa, ou mascarar a presença das micropartículas, seria utilizar sorvetes com pedaços de fruta, como coco, ou partículas de chocolate, partículas estas que estariam associadas a própria identidade do produto.

O aspecto sensorial dos alimentos com adição de partículas é influenciado pelo tamanho destas, todavia diâmetros médios reduzidos podem evitar um impacto sensorial negativo (HEIDEBACH, 2009). Sugere-se que diâmetros inferiores a 100 μm seriam desejáveis, considerando o menor impacto na textura o que permitiria a adição direta de microcápsulas contendo micro-organismos probióticos em vários produtos (HANSEN et al, 2002; HOMAYOUNI et al., 2007). Tyle (1993) por sua vez, diz que partículas com até 80 μm não contribuem com aspecto arenoso. Por sua vez, Sheu, Marshall e Heymann (1993) reportaram que partículas com diâmetros de 30 μm seria desejável para o uso em sobremesas lácteas congeladas, porém há o limiar de que tamanhos muito reduzidos de partículas são inadequados para o carregamento de micro-organismos probióticos.

Considerando-se que as partículas adicionadas tem tamanho entre 30 e 120 μm , pode-se inferir a percepção das mesmas pelos provadores, que deram notas menores na presença das MSLs.

Além disso, a natureza lipídica da partícula com ponto de fusão superior ao da temperatura corpórea pode contribuir para sua percepção pois não derreteram na boca.

As medidas instrumentais reológicas podem ser correlacionadas com a análise sensorial (VIDIGAL et al., 2012). Neste estudo a viscosidade aparente observada a 50 s^{-1} , e o índice de comportamento (n), foram significativamente diferentes para a amostra S3 em relação às amostras S2 e S2, que também se diferenciou nos parâmetros textura, sabor e aceitação na análises sensorial.

3.6 CONCLUSÃO

O presente estudo mostra que a adição de probióticos livres ao sorvete é adequada para a obtenção de um produto com qualidades sensoriais satisfatórias e contagens de micro-organismos elevadas ao final de 120 dias de armazenamento.

A viabilidade de *L. acidophilus* microencapsulados na presença de polidextrose foi adequada, segundo padrões da ANVISA, por apenas 30 dias de armazenamento. Quanto ao comportamento das micropartículas frente aos fluidos gástrico e intestinais simulados, não houve proteção significativa em relação ao inóculo livre. Ainda devido à percepção das MSLs no produto, textura, sabor e aceitação global tiveram notas inferiores àquelas outras estudadas (formulação controle e adição de micro-organismos livres). Diante destas informações coletadas, entende-se que a veiculação das MSLs simbióticas em sorvete não foi um produto interessante com potencialidade de se tornar viável.

Do comportamento reológico avaliado, o enquadramento como fluido não newtoniano era esperado, porém se faz pertinente a realização das análises em outras temperaturas, e não apenas a 20°C . Alguns parâmetros reológicos que deram indícios de diferenciação frente à adição das micropartículas devem ser estudados com maior profundidade para indicar correlação da inclusão desta partícula com a análise sensorial.

3.7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DAS INDÚSTRIAS DE SORVETES. Brasil deve produzir mais de 1 bilhão de litros em 2010. São Paulo, 2010. Disponível em: <http://www.abis.com.br/noticias_2010_3.html> Acesso em: 06 fev. 2013.

BEDANI, R.; ROSSI, E.A.; ISAY SAAD, S.M. Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **Food microbiology**, v. 34(2), p. 382-389, 2013.

BEGLEY, M.; GAHAN, C.G.M.; HILL, C. The interaction between bacteria and bile. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 625-651, 2005.

BOURNE, M.C. (2002). Physics and texture. In Chapter 3, Food texture and viscosity. concept and measurement. Harcourt Place, London, UK: Academic Press (pp.59-106).

BRASIL (2008). Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos. <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em 04 mar. 2013.

BRASIL (2003). RDC nº 360 de 23/12/2003 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/wps/wcm/connect/d12c9e804745947f9bf0df3fbc4c6735/RDC_359.pdf?MOD=AJPERES>,. Acesso em 01 jun. 2013.

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

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

COTRELL, J.I.L.; GEOFFREY, P.; PHILIPS, G.O. The effect of stabilizers on the viscosity of an ice-cream mix. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 31, p. 1066-1070, 1980.

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.

EL KOSSORI, R.L., VILLAUME, C., EL BOUSTANI, E., SAUVAIRE, Y., MEJEAN, L. Composition of pulp, skin and seeds of prickly pears fruit (*Opuntia ficus indica* sp.). *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 52, p. 263–270, 1998.

ESTRADA, J.D.; BOENEKE, C.; BECHTEL, P.; SATHIVEL, S. Developing a strawberry yogurt fortified with marine fish oil. **Journal of dairy science**, v. 94(12), p. 5760-9, 2011.

FÁVARO-TRINDADE, C.S.; BALIEIRO, J.C.C.; DIAS, P.F.; SANINO, F.A.; BOSCHINI, C. Effects of culture, pH and fat concentration on melting rate and sensory characteristics of probiotic fermented yellow mombin (*Spondias mombin* L) ice creams. *Food Science and Technology International*, v. 13, p. 285-291, 2007.

FÁVARO-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.

GOFF, H.D.; DAVIDSON, V.J. Flow characteristics and holding time calculations of ice cream mixes in HTST holding tubes. **Journal of Food Protection**, v. 55, p. 34-37, 1992.

HANDPRINT. Disponível em: <http://www.handprint.com/HP/WCL/color13.html>. Acesso em 20 de maio de 2013.

HANSEN, L.T.L.; 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, L.T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells by means of rennet-gelation of milk proteins. **Food Hydrocolloids**, v. 23, p. 1670-1677, 2009.

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

HOMAYOUNI, A.; EHSANI, M.R.; AZIZI, A.; YARMAND, M.S.; RAZAVI, S.H. Effect of Lecithin and Calcium Chloride Solution on the Microencapsulation Process Yield of Calcium Alginate Beads. **Iranian Polymer Journal**, v. 16(9), p. 597–606, 2007.

HUTCHINGS, J.B. The perception and sensory assessment of Colour. In: MACDOUGALL, D.B. (Ed.). *Colour in Food*. England: Woodhead Publishing Limited, p.9-32, 2002.

KELEBEK, H., SELLI, S., CANBAS, A., CABAROGLU, T. HPLC determination of organic acids, sugars, phenolic compositions and antioxidant capacity of orange juice and orange wine made from a Turkish cv. Kozan. **Microchemical Journal**, v. 91, p. 187-192, 2009.

LAKKIS, J.M. Marketing perspective of encapsulation technologies. In: LAKKIS, J.M. *Encapsulation and controlled release technologies in food systems*. 2007. Blackwell Publishing, Iowa, 217-218.

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.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44(1), p. 465-470, 2011.

MAGARIÑOS, H.; SELAIVE, S.; COSTA, M.; FLORES, M.; PIZARRO, O. Viability of probiotic micro-organisms (*Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12) in ice cream. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 128-134, 2007.

MANESS, P.C.; SMOLINSKI, S.; BLAKE, D.M.; HUANG, Z.; WOLFRUM, E.J.; JACOB, W.A. Bactericidal Activity of Photocatalytic TiO₂ Reaction: toward an Understanding of Its Killing Mechanism. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 65, n.9; p. 4094-4098, 1999.

MARSHALL, R. T., GOFF, H. D., HARTEL, R. W. (2003). *Ice cream*. New York: Springer. 357p.

MEILGAARD, M.; CIVILLE, G.V.; CARR, B.T. Sensory evaluation techniques. third edition Boca Raton: CRC, 390p., 1999.

MUSE, M.R.; HARTEL, R.W. Ice Cream Structural Elements that Affect Melting Rate and Hardness. **Journal of Dairy Science**, v. 87, p.1-10, 2004.

OLIVEIRA, A. C., MORETTI T. S., BOSCHINI C., BALIERO J. C. C., FREITAS L. A. P., 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, p. 685-693, 2007a.

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

OLIVEIRA, K.H.; SAOUZA, J.A.R.; MONTEIRO, A. R. Caracterização reológica de sorvetes. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28(3), p. 592-598, 2008.

PINTO, S.S.; FRITZEN-FREIRE, C.B.; MUÑOZ, I.B.; BARRETO, P.L.M.; PRUDÊNCIO, E.S., AMBONI, R.D.M.C. Effects of the addition of microencapsulated *Bifidobacterium* BB-12 on the properties of frozen yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 111(4), p. 563-569, 2012.

REZAEI, R.; KHOMEIRI, M.; KASHANINEJAD, M.; AALAMI, M. Effects of guar gum and arabic gum on the physicochemical, sensory and flow behaviour characteristics of frozen yoghurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64(4), p. 563-568, 2011.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules, **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.

ROSSA, P.N.; DE SÁ, E.M.F.; BURIN, V.M.; BORDIGNON-LUIZ; M. T. Optimization of microbial transglutaminase activity in ice cream using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44(1), p. 29–34, 2011.

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

SOHAIL, A.; TURNER, M.S.; PRABAWATI, E.K.; COOMBES, A.G.A.; BHANDARI, B. Evaluation of Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus acidophilus NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p. 162-166, 2012.

SOLER, M. P.; VEIGA, P. G. Série Publicações Técnicas do Centro de Informação em Alimentos: **Sorvetes**. Instituto de **Tecnologia de Alimentos**, Campinas, 2001.

TEIXEIRA, P. C., CASTRO, M. H., MALCATA, F. X., KIRBY, R. M. Survival of Lactobacillus delbrueckii ssp. bulgaricus following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p.1025-1031, 1995.

TURGUT, T. CAKMAKCI, S. Investigation of the possible use of probiotics in ice cream manufacture. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, n. 3, p.444-451, 2009.

TYLE, P. Effect of size, shape and hardness of particles in suspension on oral texture and palatability. **Acta psychologica**, v. 84(1), p. 111-8, 1993.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Probiotics – From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18(7), p. 714-728, 2008.

VIDIGAL, M.C.T.R.; MINIM, V.P.R.; RAMOS, A.M.; CERESINO, A.B.; DINIZ, M.D.M.S.; CAMILLOTO, G.P.; MINIM, L.A. Effect of whey protein concentrate on texture of fat-free desserts: sensory and instrumental measurements. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 32(2), p. 412-418, 2012.

WANG, S. H.; CABRAL, L.C.; ARAÚJO, F.B.; MAIA, L.H. Características sensoriais de leites de soja reconstituídos. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 34, n. 3, p. 467-472, 1999.

WILDMOSER, H.; SCHEIWILLER, J.; WINDHAB, E.J. Impact of disperse microstructure on rheology and quality aspects of ice cream. **Lebensmittel Wissenschaft und Technologie**, v. 37, p. 881-891, 2004.

CAPÍTULO 4

Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado em micropartículas sólido lipídicas em polpa de fruta

RESUMO

O objetivo deste estudo foi avaliar a influência da adição de *Lactobacillus acidophilus* na forma livre e em micropartículas sólido lipídicas (MSLs) quando incorporados às polpas de frutas. Avaliou-se a viabilidade deste probiótico em polpa de abacate, limão e melão durante 28 dias de armazenamento, sob temperatura de refrigeração e congelamento, e foram estudadas as características físico-químicas dos produtos desenvolvidos: pH e sólidos solúveis. As polpas mostraram-se potenciais veiculadoras para este micro-organismo, com exceção da polpa de limão, que abreviou a viabilidade do probiótico tanto na sua forma livre como microencapsulada, em menos de três dias de estocagem, independentemente da temperatura de armazenamento. A polpa de abacate concedeu um ambiente mais propício à manutenção da viabilidade dos micro-organismos em relação ao melão, e, às micropartículas sólido-lipídicas (MSLs) simbióticas foi atribuída a maior viabilidade dos micro-organismos probióticos nas polpas de abacate e melão em relação aos probióticos livres. As polpas de abacate e melão representam alternativas de veiculação de *Lactobacillus acidophilus* configurando-se como um ingrediente com propriedades funcionais com potencialidade para o processamento de iogurte, sorvetes, entre outros produtos.

4.1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos capazes de exercer uma série de benefícios ao hospedeiro, quando consumidos em quantidade e regularidade adequados numa dieta balanceada. Para exercer os benefícios a saúde, recomenda-se que a concentração mínima de probióticos deva estar em torno de 10^6 à 10^7 UFC por mL ou g no final da vida de prateleira do produto (TALWALKAR et al., 2004; DING; SHAH, 2008; SABIKHI et al., 2010).

Um desafio relacionado à utilização de probióticos em produtos alimentícios é a natureza fastidiosa destas bactérias, ou seja, os probióticos podem perder sua viabilidade devido às condições de processamento, no caso de serem empregadas altas temperaturas, ou devido às condições de estocagem, e possibilidade de interação com a matriz do alimento. Além disso, depois de consumidas, estas bactérias devem sobreviver ao processo de digestão, em especial devido ao ambiente ácido do estômago e à presença de sais biliares no intestino delgado, já que estes sais possuem propriedades detergentes que dissolvem a membrana da bactéria, além da ação nociva de enzimas pancreáticas (MANOJLOVIĆ et al., 2010; MADUREIRA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; SENAKA-RANADHEERA; EVANS; BAINES, 2012). Probióticos também podem produzir “*off flavors*” se crescerem no alimentos, impactando negativamente na aceitação sensorial (FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011).

A microbiota intestinal, pela possibilidade de manipulação terapêutica, é um alvo comum no desenvolvimento e consumo de produtos alimentícios funcionais, principalmente aqueles com incorporação de probióticos, sendo que, grande parte dos produtos deste setor é representada por matrizes lácteas, basicamente queijos, leites fermentados e principalmente iogurtes (GROSSO; FÁVARO-TRINDADE, 2004; SIRÓ et al., 2008; MARCATI et al., 2009; GRANATO et al., 2010; SHOJI et al., 2013). Porém, é crescente o interesse em desenvolver alternativas para incorporação de probióticos em matrizes não lácteas, como é o caso dos produtos a base de frutas, verduras, cereais, produtos cárneos fermentados entre outros.

Para aumentar a sobrevivência destes micro-organismos em ambiente ácido algumas estratégias têm sido investigadas: adição de algumas vitaminas ou extratos de planta antioxidantes em suco de fruta, técnica de UV mutagênese combinado com a passo de seleção específica com incubação em baixo pH para aplicação em

suco de maçã, e a microencapsulação como ferramenta para proteção e liberação controlada de probióticos em matrizes com fruta (SHAH et al., 2010; SAARELA et al., 2011; RODRIGUES et al., 2011; YING et al., 2013).

A microencapsulação tem se consolidado como alternativa que possibilita proteção durante o processamento, estocagem, e liberação controlada aos probióticos, promovendo adequado e conveniente micro ambiente permitindo a liberação em locais apropriados, por exemplo, o intestino delgado (OLIVEIRA et al., 2007; WEINBRECK et al., 2010; FÁVARO-TRINDADE; HEINEMANN; PEDROSO, 2011; COOK; TZORTZIS; CHARALAMPOPOULOS; KHUTORYANSKIY, 2012).

Ainda sabe-se pouco a respeito do efeito da microencapsulação com matrizes lipídicas na sobrevivência de probióticos em produtos com fruta, mas por outro lado sabe-se que óleos/gorduras são barreiras ao oxigênio e umidade. Lipídios têm emergido como materiais carreadores promissores. Mandal et al. (2012) produziram chocolate com adição de *L. casei* NCDC 298 e observaram que no chocolate com *L. casei* livre ou microencapsulado não houve alteração durante armazenamento refrigerado por 60 dias, atribuíram o efeito protetor da matriz, independentemente da encapsulação, ao total de sólidos totais no chocolate incluindo a lipídios, proteínas e a capacidade tamponante.

Lahtinen et al. (2007) sugeriram que a matriz lipídica aumentou a proteção em face do stress oferecido pela estocagem, devido à possibilidade de bloquear as células da exposição à água e fatores de estresse como íons H^+ . Além desta propriedade atribui-se o fato de que as MSL são digeridas no intestino por lipases, o que possibilita a liberação dos probióticos nas vizinhanças do seu sítio de ação (FÁVARO-TRINDADE et al., 2011).

Estudo do nosso grupo mostrou que a co-encapsulação de *L. acidophilus* (LAC-04) e polidextrose em MSLs resultou em proteção destes micro-organismos e maior viabilidade durante o armazenamento, o que estimulou a realização do presente trabalho (OKURO et al., 2013).

A proposta deste trabalho consistiu na avaliação de micropartículas sólido lipídicas (MSLs) simbióticas em polpas de fruta: abacate; melão e limão. Além do estudo da microencapsulação visando aumentar a sobrevivência do probiótico, pensou-se também no desenvolvimento da polpa como ingrediente que combina os benefícios nutricionais do próprio fruto com o probiótico e prebiótico.

4.2 OBJETIVOS

Esta etapa do projeto teve como objetivo produzir MSLs com atividade de água reduzida e aplicação destas em polpas de fruta. Para alcançar o objetivo principal os seguintes objetivos específicos foram atendidos:

- Produção de MSLs com redução de atividade de água;
- Preparo das polpas de fruta (limão, abacate e melão) com incorporação de MSLs;
- Caracterização físico-química das polpas de fruta (pH e sólidos solúveis);
- Avaliação da viabilidade de micro-organismos livres e em MSLs nas polpas de fruta durante o armazenamento sob temperatura de refrigeração e congelamento;

4.3 MATERIAL E MÉTODOS

4.3.1 Materiais

Para o preparo das MSLs simbióticas foi utilizado como carreador, a gordura obtida após processo de interesterificação de óleo de palma totalmente hidrogenado e óleo de palmiste (GPPI), da Vigor (São Caetano do Sul, Brasil). Enquanto que, como material ativo, empregou-se a cultura de *Lactobacillus acidophilus* (LAC-04) e a polidextrose (Litesse®), gentilmente doadas pela Danisco (Cotia, Brasil).

As frutas, abacate e limão, foram adquiridas no comércio local da cidade do Porto (Portugal). O melão foi gentilmente doado pela empresa Frulact (Maia, Portugal).

4.3.2 Metodologia

4.3.2.1 **Preparo dos micro-organismos livres e das micropartículas sólido-lipídicas**

Lactobacillus acidophilus (LAC-04) foram reativados como pré-culturas em *Man-Rogosa-Sharpe* (MRS) *broth* (Biokar Diagnostics, Beauvais, França), e incubados *overnight* à 37°C. A cultura foi propagada inoculando-se em meio de cultura MRS a 10% (v/v), e incubando-se novamente a 37°C. A cultura resultante foi centrifugada (Thermo Scientific-Multifuge X3FR) a 5000 rpm por 20 min, a 4°C. O sobrenadante foi descartado, lavado uma vez com citrato de sódio 2%, e novamente descartado. O precipitado foi então re-suspendido em 10 mL de citrato de sódio 2%. As MSLs foram produzidas de acordo com a metodologia descrita por Okuro et al.

(2013) com algumas modificações. Os micro-organismos liofilizados foram adicionados diretamente à gordura fundida juntamente com a polidextrose, ao invés de adicionar o inóculo reativado e suspenso em solução de citrato de sódio 2%.

4.3.2.2 Enumeração de *L. acidophilus* em polpa de fruta

Para cada amostra, dois gramas de polpa de fruta adicionada de bactérias livres ou microencapsuladas foram diluídos em 18 ml de citrato de sódio 2% estéril, homogeneizados e incubados a 53°C por nove minutos, para possibilitar a completa ruptura das MSL permitindo a contagem de bactérias viáveis. As diluições também foram feitas em tubos de citrato de sódio 2% aquecido à mesma temperatura. O número de células viáveis foi enumerado seguindo a metodologia descrita por Miles e Misra (1938) em MRS ágar (Biokar Diagnostics, Beauvais, França). As placas foram incubadas por 48 horas a 37°C em jarras mantidas em anaerobiose com sachês AnaeroGen AN0025 (Oxoid Ltd., Basingstoke, Hampshire, Inglaterra).

4.3.2.3 Preparo das polpas de frutas

Os frutos foram lavados, despulpados e congelados em pedaços. Uma quantidade de abacate, melão ou limão foi descongelada, no dia anterior ao uso, sob temperatura de refrigeração. O fruto foi triturado em um misturador “mixer” (Troia, Portugal) até a obtenção de polpa homogênea. Posteriormente o material foi pasteurizado em frascos *shot* em banho-maria Julabo SWZ 2 (Seelbach, Alemanha) a 90°C durante 3 min. Após a pasteurização do material, aguardou-se o resfriamento do mesmo em banho gelado, e depois, foi adicionado de MSLs simbióticas, ou micro-organismos livres na proporção de 5% (m/m) em fluxo laminar. A Figura 39 ilustra o preparo e armazenamento da polpa de abacate.

Figura 39. Pasteurização e armazenamento da polpa de abacate para estudo de viabilidade de *L. acidophilus*.

4.3.2.4 Análises físico-químicas

Para caracterização da polpa com adição de probióticos livres ou de MSLs simbióticas foram realizadas análises para determinar pH e sólidos solúveis. Todas as análises foram executadas em duplicata.

O pH das polpas de fruta foram medidos através do potenciômetro Crison modelo Basic 20 (Crison Instruments S.A., Barcelona, Espanha). As leituras foram realizadas em triplicata.

Para a medida do conteúdo de sólidos solúveis totais foi utilizado refratômetro digital ATAGO modelo PR-32α (Atago CO Ltda., Tóquio, Japão).

4.3.2.5 Viabilidade de *L. acidophilus* adicionado às polpas de limão, melão e abacate sob temperatura de 4 e -20 °C

Após a obtenção das polpas adicionados das MSLs e com inóculo de micro-organismos livres, as mesmas foram acondicionadas em microplacas Costar®3524 (Corning, NY 14831, EUA), quando armazenados a 4 °C, e em tubos de plástico estéreis quando armazenados a -20 °C. As MSLs ou micro-organismos livres foram adicionados a 5% (m/m). Para estudo da estabilidade foram enumerados (Item 4.2.2.2) os micro-organismos viáveis nos tempos 0, 3, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento.

4.3.2.6 Análise estatística

A fim de avaliar a variável contagem de células viáveis de *L. acidophilus* durante o teste de viabilidade de acordo com a temperatura de armazenamento, tipo de adição (se MSLs ou micro-organismos livres), tipo de fruta e dias de armazenamento, um delineamento completamente casualizado fatorial (DIC), em 2x2x2x6 foi adotado. Para este modelo estatístico, uma vez que foram observados efeitos significativos para a interação dupla, a evolução foi realizada através do teste de Tukey, dentro de cada dupla de fatores com interação significativa, fruta e adição; fruta e temperatura; fruta e dias e adição *versus* dias. Todos os testes foram realizados com o Sistema de Análise Estatística © (SAS, 2005), usando o procedimento PROC MIXED.

4.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.4.1 Determinação de pH

De acordo com alguns estudos a viabilidade e multiplicação das células probióticas nas frutas e vegetais depende de muitos fatores, entre eles a cepa do micro-organismo, acidez final do produto, concentração de ácido láctico e acético do produto (DAVE; SHAH, 1997; YOON et al., 2004).

As Figuras 40 e 41 ilustram o pH dos polpas de abacate e melão respectivamente, durante todo o período de armazenagem do estudo. Observa-se que, de maneira geral, o pH do polpa abacate foi superior ao do polpa de melão independente do sistema estudado ou da adição de micro-organismos livres ou microencapsulados. E, que também, a adição do micro-organismo livre implicou na redução do pH de forma mais severa do que a adição das MSLs, e ainda, a temperatura de congelamento, de certa forma, impactou na menor variação de pH.

O pH médio encontrado para o polpa de limão foi de $2,35 \pm 0,01$, e de $2,35 \pm 0,01$ e $2,46 \pm 0,01$, para polpa com adição de MSLs e micro-organismos livres, respectivamente. O pH da polpa de limão não foi monitorado durante os 28 dias de armazenamento já que no primeiro ponto de amostragem (3 dias) indicou a perda de viabilidade de probiótico livre ou microencapsulado.

A temperatura de congelamento inibiu a atividade metabólica dos micro-organismos, independentemente da forma de aplicação – livre ou encapsulada – o que implicou em pouca alteração do pH dos produtos estocados sob esta condição.

Para os produtos estocados sob refrigeração, a utilização de micro-organismos livres causou redução de pH devido à disponibilidade e fácil acesso dos açúcares presentes nos polpas a estes micro-organismos, levando à produção de ácido láctico e acético, ou seja, o *L. acidophilus* na forma livre causou pós-acidificação nos polpas durante o armazenamento, o que impactou na redução do pH dos produtos. Porém, quando se utilizou a MSL, a alteração do pH durante o armazenamento foi muito pequena, porque a maior parte da população de *L. acidophilus* estava imobilizada nas partículas, configurando-se no menor acesso aos açúcares. Todavia, a pequena alteração determinada no pH pode ser atribuída aos micro-organismos que estavam situados na superfície da micropartícula, não propriamente protegidos no interior da mesma. Além disso, a presença de poros nas

partículas pode ter permitido a difusão dos açúcares e consequentemente seu acesso às bactérias.

Sohail et al. (2012) investigaram o efeito da microencapsulação por geleificação iônica com alginato na sobrevivência de *Lactobacillus rhamnosus* GG e *Lactobacillus acidophilus* NCFM e sua capacidade de acidificação em sucos de frutas armazenados a 25°C por nove dias e 4°C por trinta e cinco dias. A microencapsulação não aumentou a viabilidade dos lactobacilos estudados, porém, assim como no presente estudo, reduziu a acidificação. Estes autores reportaram uma pequena acidificação nos sucos que continham os probióticos encapsulados, que foi atribuída à alta porosidade do gel de alginato, que permitiu a difusão dos açúcares, e dos ácidos produzidos.

Figura 40. Valores de pH para o polpa de abacate durante 28 dias de armazenamento. Símbolos: — Polpa de Abacate (4°C), — Polpa de Abacate (-20°C), — Abacate+MSLs (4°C), — Abacate +MSLs (-20°C), — Abacate +La livre (4°C), — Abacate +La livre (-20°C).

Figura 41. Valores de pH para o polpa de melão durante 28 dias de armazenamento. Símbolos: — Polpa de melão (4 °C), — Polpa de melão (-20 °C), — melão +MSLs (4 °C), — melão +MSLs (-20 °C), — melão +La livre (4 °C), — melão +La livre (-20 °C).

4.4.2 Determinação do teor de sólidos solúveis

Os sólidos solúveis presentes na polpa dos frutos compreendem compostos importantes, que estão entre os responsáveis pelo sabor do produto. Dentre estes os com maior destaque são os açúcares e os ácidos orgânicos (PRATES et al, 2010). A concentração de ácidos orgânicos impacta no pH dos produtos, que por sua vez influencia a viabilidade dos probióticos. A presença de açúcares fermentáveis pode induzir a atividade metabólica dos micro-organismos, propiciando a redução do pH, o que também impacta na viabilidade microbiana.

O teor de sólidos solúveis é característico da cada fruta e depende de vários fatores, como variedade e estágio de maturação. Em uma polpa de frutas a sua forma de despulpamento também pode influenciar no teor de sólidos solúveis.

Como pode ser observado, por meio da Tabela 28, de maneira geral, o teor de sólidos solúveis nas três polpas foi próximo, variando de 7,92 à 10,58%. Observa-se ainda, que a incorporação dos micro-organismos na forma livre resultou em uma pequena redução no teor de sólidos solúveis, para todas as polpas, em função do efeito diluente que o inóculo promoveu.

Tabela 28. Média de teor de sólidos solúveis da polpa de abacate, melão e limão com ou sem adição de MSL ou micro-organismos livres, armazenados à temperatura de 4 e -20°C.

Tratamento	°BRIX (Média ± DP)		
	Melão	Abacate	Limão*
Polpa pura	8,22±0,19	9,27±0,21	10,25±0,14
+ MSLs	8,46±0,10	9,54±0,24	10,58±0,19
+ LA livre	7,92±0,11	9,09±0,22	9,75±0,16

*Médias calculadas para dados amostrais de 7 dias de armazenamento.

4.4.3 Viabilidade de *L. acidophilus* adicionado às polpas de limão, melão e abacate sob temperatura de 4 e -20°C durante o armazenamento

A avaliação da viabilidade dos micro-organismos durante a estocagem é uma resposta importante visto que, tanto durante o processamento como também armazenamento do produto ou mesmo das microcápsulas, as células dos micro-organismos probióticos podem perder a viabilidade, o que pode comprometer a funcionalidade dos mesmos. A perda de viabilidade parece estar relacionada a danos a componentes celulares da membrana celular e DNA (TEIXIERA et al., 1995).

Para o polpa de limão as contagens iniciais obtidas foram de 7,65±0,33 e 5,26±0,13 log (UFC.g⁻¹) para o produto adicionado de micro-organismos livres e das MSLs simbióticas, respectivamente. Porém, no terceiro dia de armazenamento, correspondente ao primeiro ponto de análise após a produção das polpas, já nenhuma célula viável foi detectada pelo método empregado, resultado que manteve-se nos dois próximos dias estudados (7 e 14 dias de estocagem).

A rápida perda de viabilidade dos probióticos na polpa de limão - seja na forma livre ou microencapsulada - parece estar relacionada com o meio ácido. O pH encontrado para o polpa de limão foi em torno de 2,35±0,01, e de 2,35±0,01 e 2,46±0,01, para polpa com adição de MSLs e micro-organismos livres, respectivamente. O meio ácido provoca a redução do pH citoplasmático, reduzindo a atividade de enzimas glicolíticas relativamente sensíveis ao pH baixo, as quais por sua vez, afetam severamente a habilidade de produzir ATP, além de causar danos estruturais a membrana celular e macromoléculas como DNA e proteínas (COTTER; HILL, 2003). A acidificação do citoplasma repercute no aumento do consumo de

energia necessário para a manutenção do pH intracelular e inibição das reações enzimáticas (SHABALA et al., 2006).

Por isso, o ambiente ácido que a polpa de limão proporcionou ao *L. acidophilus*, pode explicar a perda de viabilidade deste microrganismo antes dos três dias de armazenamento, independentemente da temperatura de armazenamento ou da forma de incorporação do probiótico (livre ou em MSLs).

As MSLs não foram efetivas para proteger o lactobacilo na polpa de limão. Como a polpa de limão era pouca viscosa, durante a estocagem os íons H^+ podem ter penetrado nas MSLs, que apresentavam poros, expondo os micro-organismos a este fator deletério, levando-os a morte. Há ainda a possibilidade de que as MLSs tenham sofrido recristalização durante a estocagem da polpa, processo que pode ter ocasionado a expulsão dos micro-organismos das micropartículas e consequentemente sua exposição às condições adversas do meio, o que ocasionou sua morte. Este resultado diferiu do obtido em outro trabalho do grupo de pesquisa, onde as MLSs foram eficientes para proteger estes micro-organismos em condições estomacais simuladas (OKURO et al., 2013). Todavia, no trabalho citado, o tempo de exposição em meio ácido foi bem menor, de 120 min, o que pode justificar a diferença entre os resultados.

Diferentemente Nualkaekul e Charalampopoulos (2011) encontraram bons resultados de viabilidade de probióticos em suco de limão. Os autores estudaram a sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 em vários tipos de sucos de frutas: laranja, *grapefruit*, groselha, abacaxi, romã, *cranberry* e inclusive no suco de limão. Procuraram por um modelo para prever o comportamento deste probiótico frente o armazenamento, uma modelagem baseada nos fatores: pH (3,0 à 4,2), ácido cítrico (6 à 40 g/L) e ácido ascórbico (100 à 1000 mg/L). No caso do suco de limão, a sobrevivência de *L. plantarum* foi melhor do que o esperado, houve redução de 1,1 Log UFC.g⁻¹ em seis semanas de armazenamento, considerando-se o pH baixo (2,5) desta fruta. Relacionaram este fato às elevadas concentrações de ácidos orgânicos e, com a presença de pectina, comum no caso dos citrinos (1,9 g/L de fibra dietética). A diferença de viabilidade pode estar relacionada com os diferentes probióticos avaliados e com o tipo do produto, suco de limão e polpa de limão.

A avaliação da sobrevivência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado nas polpas durante armazenamento por 28 dias à temperatura de refrigeração e

congelamento estão apresentados nas Figuras 42 e 43, para a polpa de melão e abacate respectivamente.

Para a polpa de melão adicionada de MSLs houve redução de 1,51 e 1,31 ciclos logarítmicos na contagem da população, para as temperaturas de 4°C e -20°C, respectivamente, já quando adicionado dos micro-organismos livres a redução foi de 2,44 e 2,96 ciclos logarítmicos para as temperaturas de refrigeração e congelamento, respectivamente.

No caso da polpa de abacate armazenada a 4°C houve redução de 0,85 e 2,86 ciclos logarítmicos para as polpas adicionados de MSLs e do micro-organismo livre, respectivamente. E, para temperatura de -20°C a redução foi de 1,16 ciclos logarítmicos quando houve adição de MSLs e de 2,68 ciclos logarítmicos para a polpa com micro-organismos livres.

Figura 42. Avaliação da viabilidade de *L. acidophilus* livre e microencapsulado em polpa de melão durante armazenamento por 28 dias à temperatura de refrigeração e congelamento. Símbolos: ▨ Melão+MSLs (4°C), ▩ Melão+La livre (4°C), ▤ Melão+MSLs (-20°C) e ▥ Melão+La livre (-20°C).

Figura 43. Avaliação da sobrevivência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado em polpa de abacate durante armazenamento por 28 dias à temperatura de refrigeração e congelamento. Símbolos: □ Abacate+MSLs (4°C), ▨ Abacate +La livre (4°C), ▩ Abacate +MSLs (-20°C) e ▤ Abacate +La livre (-20°C).

Observa-se na Tabela 29 que independentemente da fruta estudada a adição de MSL possibilitou maior sobrevivência ao *L. acidophilus* nos polpas em relação à adição dos micro-organismos livres e que o abacate apresentou contagens de micro-organismos sempre superiores as do melão. Pode-se com essas evidências considerar que a matriz proporcionada pelo abacate concedeu um meio mais favorável à bactéria, possivelmente porque era a menos ácida. Além disso, alguns componentes intrínsecos do fruto podem ter agido de forma protetora, tais como compostos fenólicos e lipídios. Adicionalmente, a polpa de abacate era a mais viscosa das três avaliadas, logo era o que permitia menor mobilidade para os íons H^+ , além de menor possibilidade de difusão destes íons para o interior das MLSs.

Tabela 29. Contagens médias* de células viáveis dos tratamentos para o desdobramento dos fatores fruta (abacate ou melão) e tipo de micro-organismo (livre ou microencapsulado).

FRUTA	Forma de incorporação	
	MSL	Livre
Abacate	7,35 A a	6,95 B a
Melão	7,04 A b	6,39 B b

Erro padrão: 0,05187 (erro padrão constante: experimento balanceado). *Médias de quadrados mínimos; Log (UFC g-1). Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre a adição de MSL ou micro-organismos livres. Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre a fruta abacate ou melão.

Os resultados presentes na Tabela 30 evidenciam que a polpa adicionada de MSLs possibilitou maior viabilidade em relação à adicionada de micro-organismos livres, a partir do sétimo dia de estocagem, e continuou superior até o final dos 28 dias de estocagem estudados.

Tabela 30. Médias* das contagens de células viáveis, Log_{10} (UFC.g-1) de *L. acidophilus*, associadas ao desdobramento da interação dupla dos fatores: tipo de adição, se com MSL ou micro-organismos livres, e dias de estocagem.

Dias	Forma de incorporação	
	MSL	Livre
0	7,72 A a	7,92A a
3	7,39 A bc	7,19 A b
7	7,47 A ab	7,05 B b
14	7,17 A cd	6.28 B c
21	6,94 A d	6.38 B c
28	6,51 A e	5.20 B d

Erro padrão: 0.08984 (erro padrão constante: experimento balanceado).

*Médias de quadrados mínimos

Médias seguidas de letras maiúsculas iguais na mesma linha não apresentam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre a adição de MSL ou micro-organismos livres de micro-organismos livres. Médias seguidas de letras minúsculas iguais na mesma coluna não apresentam diferença significativa ($p \leq 0.05$) entre os dias de estabilidade estudados.

O fato da incorporação das MSLs no abacate representar o sistema com a melhor resposta de sobrevivência de *L. acidophilus* está relacionado primeiramente com o próprio efeito protetor das micropartículas criando um microambiente favorável para as bactérias. Adicionalmente, a natureza lipídica do abacate proporcionou uma polpa, estabilizando o sistema. Além disso, o alto teor de lipídios na polpa deste fruto pode estar associado à manutenção de células viáveis, já que estes ácidos graxos monoinsaturados, em maior quantidade o ácido oleico, além do fitosterol β -sitosterol presentes nesta polpa parecem exercer alguma proteção aos micro-organismos probióticos, isso porque a manutenção de células viáveis foi

observada mesmo quando os micro-organismos foram adicionados em sua forma livre em relação à polpa de melão.

A veiculação de micro-organismos probióticos em micropartículas sólido-lipídicas pode representar uma ferramenta em potencial e uma alternativa em relação a sistemas de liberação poliméricos. O aumento da viabilidade de micro organismos em matrizes lipídicas tem sido reportado (HOU et al., 2003; PICOT; LACROIX, 2003; LAHTINEN et al., 2007; PEDROSO et al., 2012). Hou e colaboradores (2003) encapsularam *Lactobacillus delbrueckii* ssp em emulsão de óleo de sésamo artificial, observaram que em comparação com as células livres as bactérias encapsuladas apresentaram um aumento de aproximadamente 10^4 vezes na taxa de sobrevivência em condições simuladas de pH gástrico ácido ou sais biliares, assim, pensaram na emulsão como efetiva biocápsula para encapsulação de bactérias ácido lácticas em produtos de laticínio.

Outra inferência sobre o caráter protetor das micropartículas em produtos de fruta também foi observado por Ying e colaboradores (2013), que estudaram a resistência de *L. rhamnosus* GG (LGG) microencapsulados quando veiculados em suco de maçã. Diferentemente da utilização de matrizes lipídicas, aplicaram como encapsulante a proteína isolada de soro de leite (WPI), WPI combinado com amido resistente modificado (ARM), ou somente ARM. Concluíram que as matrizes com a presença de WPI conferiram melhor desempenho no meio ácido do suco, já que proporcionaram um microambiente tamponado dentro da partícula, formando um colóide hidratado que protegeu o micro-organismo, portanto isolou o LGG do pH baixo do meio.

Outro estudo também confirmou que os probióticos microencapsulados possuem maior estabilidade durante o armazenamento em suco de fruta. Este trabalho analisou o efeito do recobrimento em multi camadas de grânulos de alginato na sobrevivência de *Lactobacillus plantarum* microencapsulados, durante a estocagem em suco de romã a 4 °C, além de estudar a resposta em solução gástrica simulada. Foram analisados micro-organismos livres, ou cápsulas com recobrimento simples ou duplo de quitosana. Verificou-se que a concentração de células viáveis após seis semanas de estocagem foi superior a 5,5 Log CFU/mL para as micropartículas com recobrimento simples e duplo, porém para as células livres após quatro semanas de estocagem nenhuma célula viável foi detectada (NUALKAEKUL et al., 2012).

Rodrigues e colaboradores (2012) estudaram a sobrevivência e viabilidade de *Lactobacillus paracasei* L26 em suco de laranja e pêssego, pH 3,7 e 2,9 respectivamente, durante estocagem durante 50 dias a 5°C, avaliando-se a potencialidade do uso de micropartículas de alginato com recobrimento duplo de quitosana ou sulfato de dextrano para a proteção do probiótico. Em ambos sucos *L. paracasei* demonstraram boa estabilidade apesar dos valores de pH baixo, e a microencapsulação com ou sem duplo recobrimento foi efetiva na proteção já que manteve aproximadamente 9 log UFC/g após os 50 dias de estocagem.

Tendo-se em comum a utilização de frutas na composição da matriz, estes estudos demonstram resultados coerentes com a estabilidade observada nos polpas de melão e abacate onde as MSLs promoveram maior proteção ao probiótico.

4.5 CONCLUSÃO

Os resultados que permearam este estudo demonstram que a inclusão de MSLs simbióticas viabiliza a obtenção de polpas de frutas probióticas, como no caso do abacate e melão. Este sistema ainda maximiza a estabilidade deste ingrediente do ponto de vista de sobrevivência de *L. acidophilus* quando comparado à mesma polpa adicionada do micro-organismo livre durante armazenamento nas temperaturas de refrigeração e congelamento. Este desempenho justifica a microencapsulação de componentes bioativos como alternativa à viabilidade e estabilidade de novos produtos funcionais. Deve-se ainda considerar o efeito protetor da própria matriz, no caso investigar como os elementos constituintes destas frutas, ácidos graxos e compostos fenólicos, por exemplo, podem agir de forma positiva na estabilidade e viabilidade do probiótico. Perspectivas como o emprego destas polpas em matrizes finais, por exemplo, iogurte, e subsequentemente avaliação da estabilidade e desempenho durante incubação nos fluidos gastrointestinais são válidas para complementação do estudo.

4.6 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

COTTER, P.D.; HILL, C. Surviving the Acid Test: Responses of Gram-Positive Bacteria to Low Ph. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, v.67, n.03, p. 429-453, 2003.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p.435-443, 1997.

DING, W. K., SHAH, N. P. Survival of free and 445 microencapsulated probiotic bacteria in orange and apple juices. **International Food Research Journal**, v. 15, p. 219-232, 2008.

FÁVARO-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.

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, G.; FARIA, J. F.; SHAH, N. P. Probiotic dairy products as functional foods. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-470, 2010.

GROSSO, C. R. F., FAVARO-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.

HOU, R.C.W.; LIN, M.Y.; WANG, M.C.; TZEN, J.T.C. Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 2, p. 424-428, 2003.

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. 500-505, 2007.

MADUREIRA, A.R.; AMORIM, M.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.E.; MALCATA, F.X. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, n.1, p. 465-470, 2011.

MANDAL, S.; HATI, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, R.; SINGH, S. Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. **Journal of Food Processing and Preservation**, p.1-7, 2012.

MANOJLOVIĆ, V.; NEDOVIĆ, V.A.; KAILASAPHATY, K.; ZUIDAM, N.J. Encapsulation of Probiotics for use in Food Products. In: ZUIDAM, N.J.; NEDOVIĆ, V.A. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. 2010. Springer Science+Business Media, LLC, p. 269-272.

MARCATTI; B.; HABITANTE, A.M.Q.B.; SOBRAL, P.J.A.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Minas-type fresh cheese developed from buffalo milk with addition of *L. acidophilus*. **Scientia Agricola**, v.66, n.4, p.481-485, 2009.

MILES, A.A.; MISRA, S.S.; IRWIN, J.O. The estimation of the bactericidal power of the blood. **Journal of Hygiene**, v. 38, p. 732-749, 1938.

NUALKAEKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 111-117, 2011.

NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M.T.; KHUTORYANSKIY, V.V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1281-1287, 2012.

OKURO, P.K.; THOMAZINI, M.; BALIEIRO, J.C.C.; LIBERAL, R.D.C.O.; FÁVARO-TRINDADE, C.S. Encapsulating of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v.53, p. 96-103, 2013.

OLIVEIRA, A. C., MORETTI T. S., BOSCHINI C., BALIERO J. C. C., FREITAS L. A. P., 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, p. 685-693, 2007.

PEDROSO, D.L.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; FAVARO-TRINDADE, C.S. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, p.127-132, 2012.

PICOT, A., LACROIX, C. Effects of micronization on viability and thermotolerance of probiotic freeze-dried cultures. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 455-462, 2003.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; ROCHA-SANTOS, T.; FREITAS, A.C. Storage stability of *Lactobacillus paracasei* as free cells or encapsulated in alginate-based microcapsules in low pH fruit juices. **Food and Bioprocess Technology**, v.5, p.2748–2757, 2012.

SAARELA, M.; ALAKOMI, H.L.; MÄTTÖ, J.; AHONEN, A.M.; TYNKKYNNEN, S. Acid tolerant mutants of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* with improved stability in fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, p. 1012-1018, 2011.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. Resistance of Microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to Processing Treatments and Simulated Gut Conditions. **Food Bioprocess Technology**, v. 3, p. 586-593, 2010.

SAS Institute Inc., SAS OnlineDoc, v. 9.1.3, Cary, North Carolina: SAS Institute Inc., 2005.

SENAKA RANADHEERA, C.; EVANS, C.A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S.K. In vitro analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics. **Food Research International**, v. 49, p. 619-625, 2012.

SHABALA, L.; MCMEEKIN, T.; BUDDE, B. B.; SIEGUMFELDT, H. *Listeria innocua* and *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *Bulgaricus* employ different strategies to cope with acid stress. **International Journal of Food Microbiology**, v. 110, p. 1-7, 2006.

SHAH, N.P.; DING, W.K.; FALLOURD, M.J.; LEYER, G. Improving the Stability of Probiotic Bacteria in Model Fruit Juices Using Vitamins and Antioxidants. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 5, p. 278-282, 2010.

SHOJI, A.S. OLIVEIRA, A.C.; BALIEIRO, J.C.C.; FREITAS, O.; THOMAZINI, M.; HEINEMANN, R.J.B.; OKURO, P.K., FAVARO-TRINDADE, C.S. Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. **Food and Bioprocess Technology**, v. 91, p. 83-88, 2013.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance- a review. **Appetite**, v. 51, p. 456-467, 2008.

SOHAIL, A.; TURNER, M.S.; PRABAWATI, E.K.; COOMBES, A.G.A.; BHANDARI, B. Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, p. 162-166, 2012.

TALWALKAR, A., MILLER, C.W., KAILASAPATHY, K., NGUYEN, M.H. Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. **International Journal of Food Science and Technology**, v.39, p.605-611, 2004.

TEIXEIRA, P.C., CASTRO, M.H., MALCATA, F.X., KIRBY, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. bulgaricus following spray-drying. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p.1025-1031, 1995.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I. MARCO, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v.136, p. 364-367, 2010.

YING D.Y.; SCHWANDER, S.; WEERAKKODY, R.; SANGUANSRI, L.; GANTENBEIN-DEMARCHIC, C.; AUGUSTIN, M.A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein and resistant starch matrices: Probiotic survival in fruit juice. **Journal of Functional Foods**, v.5; p. 98-105, 2013.

YOON, K.Y.; WOODAMS, E.E.; HANG, Y.D. Probiotication of tomato juice by lactic acid bacteria. **Journal of Microbiology**, v. 42, p. 315-318, 2004.

5 CONCLUSÃO GERAL

As micropartículas sólido lipídicas simbióticas mostraram-se efetivas na microencapsulação de micro-organismos probióticos e componentes prebióticos conferindo proteção aos micro-organismos durante a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal e em temperaturas reduzidas, manutenção de células viáveis por períodos estendidos. No sorvete, as MSLs não melhoram a viabilidade de *L. acidophilus* quando comparados aos micro-organismos livres no produto, porém quando uma MSL com menor atividade de água foi produzida e incorporada em polpas de abacate e melão, as MSLs foram significativamente efetivas no aumento da viabilidade do probiótico em relação as polpas com micro-organismos adicionados em sua forma livre durante o armazenamento. Estes resultados levam a exposição do potencial de carreadores lipídicos na proteção de porbióticos, possibilitando e liberação em local e contagem adequados.

6 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

Estudar diferentes concentrações de probióticos e prebióticos na formulação de micropartículas sólido-lipídicas;

Explorar novos materiais lipídicos como agentes carreadores;

Ampliar os ensaios de digestibilidade , simulação à passagem pelos fluidos gástricos e intestinais, explorando novos protocolos;

Investigação da manutenção das moléculas efetoras após o processo de microencapsulação por spray chilling, já que a sobrevivência das células não necessariamente traduz a integridade destas moléculas que atuam na funcionalidade do micro-organismo;

Aplicação das MSLs em novos produtos, com diferentes características.

7 APÊNDICE

APÊNDICE A. Modelo de ficha utilizado na análise sensorial das amostras de sorvete de morango.

Nome: _____ Data: ____/____/____ **Ficha** _____

Você está recebendo uma amostra de **SORVETE DE MORANGO**. Por favor, avalie o produto e marque na escala o quanto você gostou ou desgostou das seguintes características:

Número da amostra _____

		Nota	
ESCALA 1-Desgostei muitíssimo 2-Desgostei muito 3-Desgostei moderadamente 4-Desgostei ligeiramente 5-Nem gostei/nem desgostei 6-Gostei ligeiramente 7-Gostei regularmente 8-Gostei muito 9-Gostei muitíssimo	AROMA		Comentários:
	COR		Comentários:
	TEXTURA		Comentários:
	SABOR		Comentários:
	ACEITABILIDADE GERAL		Comentários:

APÊNDICE B –Termo de consentimento livre e esclarecido utilizado na análise sensorial.

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Consentimento formal de participação no projeto de pesquisa: **"Avaliação sensorial de sorvete com adição de micropartículas sólido-lipídicas carregadoras de probiótico e prebiótico"**.

Nome: _____

Endereço: _____

Cidade: _____ CEP: _____ FONE: _____

Justificativa: Estudos têm relatado o efeito sinérgico entre micro-organismos probióticos e componentes prebióticos. A possibilidade de atuação positiva no equilíbrio da microbiota intestinal tem impulsionado o consumo de produtos funcionais. Na maioria dos estudos, os probióticos têm sido veiculados em alimentos lácteos, porém a estabilidade destes micro-organismos nos alimentos é geralmente baixa, por isso a microencapsulação pode ser uma técnica aplicada para contornar esta limitação, visto suas funções protetivas, de liberação controlada e possibilidade de redução de efeitos sensoriais indesejáveis. Este trabalho busca desenvolver uma matriz lipídica carregadora de prebióticos e probióticos, visando a obtenção de um ingrediente funcional para aplicação em matrizes alimentícias.

Objetivos do projeto: o objetivo deste trabalho é desenvolver uma matriz lipídica simbiótica para aplicação em alimentos.

Procedimentos:

A análise onde seres humanos avaliam diversos atributos de qualidade de alimentos é chamada de análise sensorial. Os procedimentos para execução da análise sensorial nesta pesquisa serão os seguintes:

- Sessenta provadores farão a avaliação sensorial dos produtos.
- Serão testadas as amostras de sorvete com adição das micropartículas sólido lipídicas simbióticas.
- O provador deverá avaliar (olhar, provar) os produtos e responder às perguntas solicitadas na Ficha de Avaliação Sensorial.
- A duração do teste para cada pessoa será de aproximadamente 10 minutos.

Outras informações:

- O provador pode se recusar a continuar com a avaliação sensorial a qualquer momento, sem penalização alguma e sem prejuízo ao seu cuidado.
- Os provadores não terão qualquer tipo de **despesas em decorrência da participação nesta pesquisa**.
- **Não há possibilidade de risco** em função da participação nesta pesquisa, uma vez que todos os ingredientes utilizados nos produtos são inteiramente seguros e serão de boa qualidade e procedência e o processo de fabricação será realizado de acordo com as normas de Boas Práticas de Fabricação.
- Em função do exposto no item anterior, não há **previsão de indenização em decorrência da participação neste projeto**.
- Os testes para avaliação sensorial dos sorvetes, nos quais os provadores experimentarão os produtos desenvolvidos **serão acompanhados** pelo pesquisador proponente (Paula K. Okuro).
- Quaisquer outros esclarecimentos poderão ser solicitados antes, durante e após a pesquisa.

Eu, _____, RG _____, CPF _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo **"Avaliação sensorial de**

sorvete com adição de micropartículas sólido-lipídicas carregadoras de probiótico e prebiótico".

Tenho pleno conhecimento da justificativa, objetivos, benefícios esperados e dos procedimentos a serem executados, bem como da possibilidade de receber esclarecimentos sempre que considerar necessário. Será mantido sigilo quanto à identificação de minha pessoa e zelo a minha privacidade. Ao mesmo tempo assumo o compromisso de seguir as recomendações estabelecidas pelos pesquisadores.

Eu li e entendi todas as informações contidas neste documento.

Pesquisador responsável: Paula Kiyomi Okuro - Eng. de Alimentos – FZEA – USP. Contato: paula.okuro@usp.br Cel: 14 8146-6615

Pirassununga, ____ de _____ de _____.

Assinatura: _____

APÊNDICE C. Artigos publicados.

Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability

Paula K. Okuro^{*}, Marcelo Thomazini, Júlio C.C. Balieiro, Roberta D.C.O. Liberal, Carmen S. Fávoro-Trindade

Universidade de São Paulo, Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Pirassununga-SP, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 14 January 2013

Accepted 29 March 2013

Available online 6 April 2013

Keywords:

Probiotics

Microencapsulation

Encapsulation

Spray-chilling

Spray-cooling

Structural evaluation

Fat

ABSTRACT

The aims of this study were to produce and evaluate solid lipid microparticles (SLM) in which *Lactobacillus acidophilus* (La), a probiotic, was co-encapsulated with a prebiotics, either inulin (Inu) or polydextrose (Poly) using spray chilling technology. Morphological, chemical, and thermal characterisation of SLMs were conducted, along with survival assays to evaluate the resistance of the probiotic to the microencapsulation process, its resistance to exposure to simulated gastric fluids (SGF) and simulated intestinal fluids (SIF), and its stability throughout storage for 120 days at -18 , 7 and 22 °C in a vacuum or with controlled relative humidity. Cell viability was not affected by the spray-chilling process. All of the microcapsules produced in the present study increased the survival rate of La exposed to SGF and SIF compared to that of free probiotic cells. Promising results were obtained when these microcapsules were stored refrigerated and frozen with a controlled relative humidity. This study indicated that combined spray chilling process, combined with the addition of a prebiotic component, specifically polydextrose is an interesting technology for the protection, delivery and improve stability of probiotics, which increases the potential of symbiotic SLMs. Scaling up the spray chilling technique will allow efficient encapsulation of probiotics in a lipid matrix.

© 2013 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Probiotics are endowed with the ability to modulate of the intestinal microbiota, and the presence of prebiotics, ingredients that are selectively fermentable, exert a beneficial effect on the growth and/or activity of bacteria in the colon (Gibson, Probert, Van Loo, Rastall, & Roberfroid, 2004; McCartney & Gibson, 2006; Roberfroid, 2007; Wells, Saulnier, & Gibson, 2008). There is a synergistic relationship between probiotics and prebiotics in which the prebiotics are consumed by probiotics as sources of carbon and energy, favouring their colonisation of the intestinal tract over colonisation by pathogenic microorganisms (Vernazza, Rabi, & Gibson, 2006; Homayouni, Azizi, Ehsani, Yarmand, & Razavi, 2008).

Microencapsulation has emerged as an alternative for protection of probiotics, providing a particular and convenient micro-environment for the encapsulated microorganism, enhancing their viability (Anal & Singh, 2007; Favaro-Trindade & Grosso, 2000; Rodrigues et al., 2011; Shah & Ravula, 2000; Sohail, Turner, Coombes, Bostrom, & Bhandari, 2011), and enabling controlled release of cells in the intestinal tract (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012; Favaro-Trindade, Heinemann, & Pedrosa, 2011; Mandal, Puniya, &

Singh, 2006; Oliveira et al., 2007a; Shoji et al., 2013). The choices of the method and materials are essential for an effective probiotic encapsulation strategy, and the use of gentle techniques, such as cold-induced gelation described by Nag, Han, and Singh (2011), as well as the appropriate materials, such as gastro-resistant polymers, biopolymers, and stearic acid (hydrophilic retardants), among others, are essential for efficient microencapsulation (Kanmani et al., 2011; Pimentel-González, Camposmontiel, Lobato-Calleros, Pedrosa-Islas, & Vernoncarte, 2009).

Spray chilling is a microencapsulation technique that is based on the addition of the bioactive component to the molten carrier via dissolution, emulsion or dispersion. The mixture is passed through an atomizer nozzle, and when the nebulised material contacts an atmosphere refrigerated below the melting point of the matrix material (cold air chamber or liquid nitrogen), heat exchange occurs and the vehicle solidifies, creating solid lipid microparticles (SLMs) (Ilić et al., 2009).

Packaging probiotic microorganisms within solid lipid microparticles may protect them and is an interesting alternative to other conveyance systems, such as polymers and polysaccharides, because the microparticles will deliver the bioactive compound at approximately the melting point of the carrier material. SLMs produced with lipid materials are easily digested by the lipases in the intestines, releasing the probiotic in the vicinity of the intestines where they are required. The viability of microorganisms within lipid matrices was

^{*} Corresponding author. Tel.: +55 19 3565 4282.

E-mail address: paula.okuro@usp.br (P.K. Okuro).

reported to be greater than that of free microorganisms (Lahtinen, Ouwehand, Salminen, Forssell, & Myllärinen, 2007; Pedroso, Thomazini, Heinemann, & Favaro-Trindade, 2012; Picot & Lacroix, 2003).

Encapsulation with lipid matrices is promising because lipids are likely to stabilise probiotics. Mandal, Hati, Puniya, Singh, and Singh (2012) found that number of viable free *Lactobacillus casei* NCDC 298 and *Lactobacillus casei* NCDC 298 encapsulated in a milk chocolate matrix did not differ during up to 60 days of storage under refrigerated conditions. They attributed this result to the high total solids in this matrix, including the fats and suggested that the fats had the ability to protect the probiotic cells. Hou, Lin, Wang, and Tzen (2003) encapsulated *Lactobacillus delbrueckii* ssp. in an artificial emulsion of sesame oil and observed that encapsulated bacteria performed better under simulated gastrointestinal conditions than did free cells. They concluded that the emulsion was an effective biocapsule for dairy products and Lahtinen et al. (2007) suggested that lipid matrix may protect the cells by blocking H⁺ ions.

Pedroso et al. (2012) produced SLMs containing *B. lactis* and *L. acidophilus* using the spray chilling method. While analyzing the SLMs, they observed that encapsulated *L. acidophilus* cells were resistant to simulated gastric and intestinal fluids and that they had a shelf life of 30 and 60 days of storage at 37 °C and 7 °C, respectively. Therefore, the aims of this study were to produce solid lipid microparticles containing *L. acidophilus* and a prebiotic compound, to evaluate the ability of inulin and polydextrose to increase the viability of the probiotic throughout 120 days of storage at different temperatures, and to investigate probiotic survival in simulated gastric and intestinal fluids.

2. Materials and methods

2.1. Materials

A lipid carrier consisting of the fats obtained upon interesterification of fully hydrogenated palm and palm-kernel oil (GPPI) was used. The fats were kindly provided by Vigor (São Caetano do Sul, Brazil), their melting point is 43.34 °C.

A culture of *Lactobacillus acidophilus* (LAC-04) kindly provided by Danisco (Cotia, Brazil) was used as the active material. The prebiotics co-incorporated in the microparticles were inulin (Raftiline® ST, Beneo Orafi, Tienen, Belgium) and polydextrose (Litesse®, Danisco, Cotia, São Paulo, Brazil), which were kindly provided by Clariant (Suzano, Brazil) and Danisco (Cotia, Brazil), respectively.

2.2. Methods

2.2.1. Preparation of bacterial cell inoculum

The *L. acidophilus* culture was activated in sterilised MRS broth at 37 °C for 18 h. An aliquot of this culture was transferred to MRS broth and incubated for other 18 h at 37 °C in jars using an anaerobiosis system (Anaerobac, Probac, São Paulo-Brazil). This culture was centrifuged at 2400 g for 9 min at 4 ± 3 °C. The washed cells were resuspended in 2% sodium citrate at a concentration of approximately 10⁹–10¹⁰ CFU/mL.

2.2.2. *L. acidophilus* cell counts

The number of viable La cells was determined using the pour plate technique, with MRS agar plates (DeMan Rogosa and Sharp) obtained from Acumedia (Indaiatuba, São Paulo, Brazil), according to the method described by Grosso and Favaro-Trindade (2004), with the modification suggested by Pedroso et al. (2012). One gram of SLMs was placed in 9 mL of 2% sodium citrate warmed at 52 ± 1 °C to completely dissolve the lipid matrix. The released cells were serially diluted in tubes containing warm 2% sodium citrate. Microaerophilic conditions were produced in anaerobiosis jars using the anaerobiosis generator systems. The jars were incubated at 37 °C ± 1 °C for 72 h.

2.2.3. Preparation of solid lipid microparticles (SLM)

SLMs were produced according to the method described by Chambi, Alvim, Barrera-Arellano, and Grosso (2008), with some modifications. The inoculum (4%) was mixed with the prebiotic (3%), and the molten carrier was added. Suspensions of the mixtures (probiotic + prebiotic + lipid matrix) or (probiotic + lipid matrix) were produced using an Ultra-Turrax IKA® T-25 homogeniser (IKA, Staufen, Germany) at 7000 rpm for 60 s. The suspensions were atomised using a spray chiller (Labmaq, Ribeirão Preto, Brazil) equipped with a double fluid atomiser (Ø = 1.2 mm) and a cold chamber at 15 ± 2 °C (environmental variables: temperature and humidity), at a pressure of 5 bar.

Three formulations were produced: F1 (La without prebiotic), F2 (La + Inu), and F3 (La + Poly).

2.2.4. SLM characterisation

2.2.4.1. Microscopy. The morphologies of the SLMs were analysed using scanning electron microscopy (SEM). The SLMs were placed on pieces of double-faced carbon tape (Ted Pella, Inc., Redding-USA) that were fixed on aluminum stubs. Images were captured at a voltage of 5 kV and current of 1.750 mA. To analyse the internal morphologies of SLMs, they were frozen with liquid N₂ and sectioned. For confocal microscopy, the samples were examined using a Zeiss LSM 780-NLO confocal system with an Axio Observer Z.1 microscope (Carl Zeiss AG, Germany) and a 63x/1.4 NA oil plan apochromatic DIC objective lens. Images in a 1024 × 1024 format were captured using 605 nm laser lines for excitation, with pinholes set to 1 airy unit for each channel. The bacteria were stained with SYTO 9, a component of the LIVE/DEADs BacLight bacterial viability kit (Molecular Probes, Eugene, Oregon USA).

2.2.4.2. Particle size. A Shimadzu Sald-201V particle size analyser (Kyoto, Japan) that employs laser diffraction was used to determine the sizes and size distributions of the SLMs. The SLMs were dispersed in ethyl alcohol (Synth, Brazil) and stabilised for 5 min before the assay.

2.2.4.3. Differential scanning calorimetry (DSC). Differential scanning calorimetry was conducted using a DSC M2010 system (TA Instruments, Newcastle, USA). Approximately 10 mg of each sample (GPPI/SLM) was placed in an aluminum capsule and gradually heated (10 °C/min) to temperatures between −50 and 100 °C in an inert atmosphere (45 mL/min of N₂). An empty capsule was used as the reference. The data were analysed using Universal Analysis 2000 version 3.9^a (TA Instruments) (Favaro-Trindade, Santana, Monterrey-Quintero, Trindade, & Netto, 2010).

2.2.4.4. Fourier transform infrared (FTIR) spectroscopy. The pure ingredients and the SLMs were characterised by FTIR spectroscopy in the 4000 to 600 cm^{−1} region using a Perkin Elmer FTIR spectrometer (Massachusetts/USA) and Spectrum One version 5.3.1 software. The probiotic sample was suspended in 2% sodium citrate.

2.2.4.5. X-ray powder diffraction. The individual components and microparticles were analysed using the X-ray powder diffraction technique. An AXS Analytical X-Ray Systems Siemens D 5005 (Germany) diffractometer with Cu K alpha radiation (λ = 1.54056 Å) was used with the voltage was 40 kV and current set at 40 mA. The scanning angle ranged from 3 to 90° of 2θ, 2°/min and 0.033°/s.

2.2.5. Viability of encapsulated microorganisms during storage

For the stability studies, the microparticles were stored at three different temperatures (−18, 7, and 22 °C) in a vacuum or with the relative humidity controlled with lithium chloride (LiCl), as described by Heidebach, Forst, and Kulozik (2010). The SLMs were stored in

hermetically sealed glass flasks or in open flasks in hermetically sealed containers containing LiCl, and later on stored in a BOD that was set at the three temperatures. The number of viable cells was counted after 7, 30, 60, 90, and 120 days of storage.

2.2.6. *In vitro* evaluation of gastric and intestinal fluids

The *in vitro* resistance of free and microencapsulated microorganisms to simulated gastric fluid (SGF) and simulated intestinal fluid (SIF) was evaluated using the methods described by Gbassi, Vandamme, Ennahar, and Marchioni (2009). The SGF was composed of 9 g/L of sodium chloride (Synth, Diadema, Brazil) and 3 g/L of porcine stomach pepsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) in distilled water and was adjusted with HCl to pH 1.8. The SIF was prepared with 9 g/L of sodium chloride (Synth, Diadema, Brazil), 10 g/L of pancreatin, the same amount of bovine pancreas trypsin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), and 3 g/L of bile salts (Oxgall, Difco, Hampshire, UK) suspended in distilled water. The pH was adjusted to 6.5 with sodium hydroxide (Synth, Diadema, Brazil). The microorganisms were counted after 0, 60, and 120 min in SGF, and after 0, 90, and 180 min in SIF.

2.2.7. Statistical analysis

A completely randomised design (CRD) using a $3 \times 2 \times 3 \times 6$ factorial treatment combination was adopted to evaluate the variable-dependent numbers of viable *L. acidophilus* cells determined in the stability assays according to the prebiotic (without prebiotic or with inulin or polydextrose), the type of storage (vacuum or relative humidity), the temperature (-18 , 7 or 22 °C), and the length of storage (0, 7, 30, 60, 90 or 120 days). Because this statistical model showed significant effects for the quadruple interactions, developments were assessed using Tukey's test within each prebiotic/type of storage/temperature combination, prebiotic/temperature/length of storage, type of storage/temperature/length of storage and prebiotic/type of storage/length of storage combination. All of the tests were performed using Statistical Analysis System© software (SAS, 2005), and the PROC MIXED procedure.

3. Results and discussion

3.1. SLM characterisation

The images captured using scanning electron microscopy, such as Fig. 1, demonstrated the spherical shape of the SLMs obtained by spray chilling, and showed that they have a relatively smooth continuous surface, without pronounced cracks or pores. Additionally, because solvent did not have to be evaporated as in the spray drying technique,

the structures were not hollow, but completely packed, as shown in Fig. 1(A).

The images obtained using confocal microscopy, such as Fig. 1(B), showed the bacteria immobilised in the lipid carrier, appearing either green or red. The live microorganisms are green and dead ones are red. Moreover, these bacilli displayed their characteristic shape. The main inconvenience of these microparticles is that microorganisms appear to be dispersed throughout them and may be at the surface, where they should be susceptible to the adverse conditions of the environment. The inclusion of inulin or polydextrose did not affect the morphology of the SLMs; this observation is in agreement with that of Fritzen-Freire et al. (2012), who microencapsulated bifidobacteria in the presence of prebiotics-inulin, oligofructose, and oligofructose-enriched inulin- using spray drying technology.

3.2. Particle size

One peculiarity of the encapsulation of probiotic microorganisms is their relatively large size, typically $1\text{--}4\text{ }\mu\text{m}$, which limits the encapsulation for relatively small particles (Anal & Singh, 2007). Moreover, very large particles may negatively affect organoleptic characteristics (Hansen, Allan-Wojtas, Jin, & Paulson, 2002). However, Chandramoulia, Kailasapathy, Peirisb, and Jonesb (2004) observed that the greater the diameter of the capsule, the greater the viability of *Lactobacillus* spp., in simulated gastric conditions. Table 1 presents mean diameters and diameters corresponding to the accumulated distribution of 10, 50 and 90%, which represents the average particle diameter considering that 10% of total particles, 50% of total particles, and 90% of total of the particles. The span value $((d(0.9) - d(0.1))/d(0.5))$ is a measurement of the width of size distribution (Ilić et al., 2009). The values for the three types of microparticles were not significantly different ($p < 0.05$). Therefore, it is possible to conclude that the prebiotics used in the production of these microparticles did not affect their size. According to the span values, the width of microparticle distribution was not changed by the presence of inulin or polydextrose.

3.3. DSC

Table 2 shows the onset and maximum temperatures, as well as the enthalpy for the fat, microorganism inoculum, and the SLMs.

The enthalpy values for the lipid carrier and the three types of SLMs were relatively similar, 123.4 J/g and 118.9; 111.0 and 123.0 J/g, respectively. Silva et al. (2011) studied solid-lipid nanoparticles charged with risperidone and found that the enthalpy values were lower for all of the formulations compared to that of the encapsulating agent (Imwitor®

Fig. 1. Scanning electron microscopy image (A) of the microparticles containing *L. acidophilus* (500 $\times$ magnification) and confocal microscopy image (B) of SLMs containing *L. acidophilus* that were prepared by spray-chilling; the bacteria are stained with SYTO9 (500 $\times$ magnification). The arrow points to internal morphology of SLM, matrix type.

Table 1

Effect of different formulations on the particle size distribution of the microparticles (average $\pm$ SD; n = 3).

Formulation	D(4,3)* (μ m)	D(0,1)** (μ m)	D(0,5)*** (μ m)	D(0,9)**** (μ m)	SPAN
F1	65.2 $\pm$ 8.1 ^a	38.2 $\pm$ 11.6	70.0 $\pm$ 3.7	99.7 $\pm$ 0.4	0.879 $\pm$ 0.198
F2	63.7 $\pm$ 5.1 ^a	37.4 $\pm$ 5.6	68.9 $\pm$ 2.5	99.9 $\pm$ 1.3	0.886 $\pm$ 0.099
F3	66.1 $\pm$ 3.9 ^a	41.8 $\pm$ 6.3	70.0 $\pm$ 1.7	98.0 $\pm$ 3.9	0.848 $\pm$ 0.148

F1: *L. acidophilus*; F2: *L. acidophilus* + inulin; F3: *L. acidophilus* + polydextrose.

900K). However, in the study of Silva et al. (2011), nanocapsules were produced by first adding surfactants to obtain pre-emulsions and then using two different techniques ultrasound (US) and high-pressure homogenisation (HPH). The melting temperatures of the formulations were very similar to each other and slightly higher than the melting temperature of pure fat, which is 43.7 °C. In fact, the melting temperatures for the formulations were expected to be similar because the lipid matrix used was the same for all of the formulations. Neither the inoculum, or the inoculum and the prebiotic, interact with the lipid matrix of the SLMs and, therefore, they did not change the polymorphic behavior of the mixtures used to produce them.

As for the possibility of melting, prematurely, the melting temperatures observed for the formulations were between 47.27 and 47.58 °C, which would make them physically stable at room temperature and in the mouth.

3.4. X-ray powder diffraction

Additional information on the solid state structures of SLMs was obtained using X-ray powder diffraction. Fig. 2 shows the diffraction profiles of the three formulations tested, when they were freshly prepared and after 90 days of storage. Because with the SLM have a lipid matrix, a trend for polymorphic reorganisation should be considered for more energetically favourable levels, and this behavior may lead to the expulsion of the bioactive ingredient when it attains a more crystalline arrangement (Gamboa, Gonçalves, & Grosso, 2011; Jennings, Thünemann, & Gohla, 2000; Müller, Radtke, & Wissing, 2002a, 2002b; Schubert & Müller-Goymann, 2005). Fig. 2 shows that the refractograms had similar shapes, independently of the formulations or the period of storage. The diffraction patterns of the SLMs are very similar to each other, indicating that no polymorphic changes occurred during storage. The behavior of lipid material observed in this study was similar to that reported in the literature, which is generally associated with a polymorphic β form that is characteristic of triacylglycerol and fatty acids (Gamboa et al., 2011).

3.5. FTIR

The FTIR assay detected possible interactions between the encapsulated materials and the carrier. Fig. 3 shows peaks of interest esterified palm and palm-kernel oil at 1738, 2851, and 2919 cm^{-1} in the 5(B) spectrum. These peaks are associated with the presence of carbonylated

Table 2

DSC parameters for the encapsulating matrix, bioactive material (inoculum) and formulations prepared with *L. acidophilus* with or without addition of a prebiotic.

Sample	Peak (°C)	OnSet (°C)	Enthalpy (J/g)
Fat	43.34	32.28	123.4
Inoculum	47.82	47.24	2.89
F1	47.43	39.29	118.9
F2	47.27	34.98	111.0
F3	47.58	34.52	123.0

F1: *L. acidophilus*; F2: *L. acidophilus* + inulin; F3: *L. acidophilus* + polydextrose.

Fig. 2. X-ray diffraction patterns of F1-0 day (A), F1-90 days (B), F2-0 day (C), F2-90 days (D), F3-0 day (E) and F3-90 days (F).

compounds, more precisely, the vibration of COOH groups, and the peak at 1738 cm^{-1} is related to C=O vibration. Passerini, Albertini, Perissutti, and Rodriguez (2006) used the lipid matrix Gelucire 50/13 to encapsulate a drug (Praziquantel), and observed a large band in the 3650–3100 cm^{-1} region that was related to the vibration of the O–H bonds in the COOH groups.

The infrared spectrum of inulin 3 (C-solid line) demonstrated the polysaccharide nature of the C–O–C bond that is characteristic of carbohydrates between 1200 and 900 cm^{-1} , which confirmed that the monomers had bound to one another to form polymers. The band for the O–H bond in the monosaccharide structure is observed between 3600 and 3000 cm^{-1} . An angular deformation of the bond at 1639 cm^{-1} is also observed. Asymmetric stretching of the CH_2 group is observed between 2900 and 2950 cm^{-1} (Silverstein, Webster, & Kiemle, 2006).

The spectrum for polydextrose 3(C-broken line) displays a pronounced vibration related to C–O–C glycosidic bond (1202–927 cm^{-1}), C=O stretching vibration of aldehyde (1659 cm^{-1}), O–H stretching vibrations (3640–2978 cm^{-1}) and a C–H stretching vibration at 2946 cm^{-1} (Mickova, Copikova, & Synytsya, 2007).

Analysis of the infrared spectra of the SLMs, shown in Fig. 3(D,E,F), revealed that none of the peaks characteristic of the encapsulated material (prebiotic and probiotic) or the carrier were changed, suggesting the absence of significant interactions.

3.6. Resistance to encapsulation by spray chilling

Table 3 shows the values pertaining of resistance to the production process in all the formulations. Based on these results, the microorganisms are highly resistant to the spray chilling process, that is, atomisation and cooling of the molten mixture to maintain the viability of the *L. acidophilus* cells, both in the mixture with molten carrier and in the SLMs. It is conceivable that spray chilling had very little effect on cellular integrity. A similar behavior was reported by Pedroso et al. (2012), who employed the same encapsulation process. Ultraturrax homogenisation, as well as the exposure to heat when the cells were added to the molten fat, did not seem to have had strong impact on cell survival, considering the initial count of the microorganisms in the inoculum and their dilution at 4 g/100 mL in the molten mixture.

Fig. 3. FT-IR spectra of *L. acidophilus* (A), palm oil and palm-kernel oil (GPPI) (B), Inulin (solid line) and polydextrose (broken line) (C), F1(D), F2(E) and F3 (F).

Table 3

Resistance of *L. acidophilus* to the spray-chilling process.

Formulation	Viable cells (count in log ₁₀ cfu g ⁻¹)		
	Inoculum	Suspension ^a	SLMs ^b
F1	10.46 ± 0.30	8.67 ± 0.31	8.34 ± 0.38
F2		8.53 ± 0.34	8.29 ± 0.27
F3		8.57 ± 0.26	8.32 ± 0.09

F1: *L. acidophilus*; F2: *L. acidophilus* + inulin; F3: *L. acidophilus* + polydextrose.

^a Before atomisation.

^b After the spray-chilling process.

3.7. Resistance to gastrointestinal fluids

In the present study, microencapsulation protected La from simulated gastrointestinal conditions (Fig. 4). The free cells count reached the limit of the method (10^{-2} CFU/g) by 210 min in the assay, demonstrating that the cells were susceptible to the simulated conditions. Although free viable cells were not detectable after 210 min, approximately 60% of the La cells in the SLMs produced with or without a prebiotic were found to be viable. There was a reduction of 2.99; 2.79; 2.84 log cycles for formulations F1, F2, and F3, respectively, by 300 min of treatment.

Light microscopy (Fig. 4) showed that the SLMs were intact, well-defined spheres at the start of the simulated gastrointestinal conditions assays. The most significant disintegration of SLMs occurred when they were exposed to simulated intestinal fluid (SIF), where the presence of pancreatin, trypsin, and bile salts, together with increased pH (6.5), created conditions favourable for the rupture/disintegration of SLMs, due to their lipid content.

The release of the active components (bacteria and prebiotics) was correlated with a more drastic reduction in the viable cell count because probiotics that are not protected in the SLMs are more susceptible to external conditions.

SGF-treatment did not significantly reduce ($p \leq 0.05$) the viable cell count associated with the SLMs containing polydextrose (60 to 120 min) or the SLMs lacking a prebiotic (0 to 60 min), but a significant reduction in cell viability was observed for all of the SLMs that passed from SGF to SIF and for those incubated in intestinal fluid (120 to 210 min and 210 to 300 min). At the end of the experiment, the cell counts for the F2 and F3 formulations and for the F1 and F2 formulations were not significantly different, whereas the cells in the F2 and F3 formulations demonstrated better resistance to the fluids than did those in the F1 formulation. These results showed that the F2 and F3 formulations could be used to improve the resistance of La to the simulated gastrointestinal conditions.

There was a reduction of 2.19, 1.75 and 1.73 log cycles for F1, F2, and F3, respectively. There was a significant reduction in viable cells counts when probiotics were exposed to bile salts. The antimicrobial nature of bile salts is related to its detergent property, which dissolves microorganism membranes, and its amphiphilic nature makes it strongly inhibitory for the gastrointestinal tract (Madureira, Amorim, Gomes, Pintado, & Malcata, 2011; Senaka Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2012).

Kim et al. (2008) observed similar results. They reported a 3 log-cycle reduction in viable cells when microparticles of *L. acidophilus* ATCC 43121 microencapsulated with sodium alginate were exposed to artificial gastric juices at pH 1.2 and 1.5. Other studies also found better survival for encapsulated *L. acidophilus* than for free cells when they were exposed to simulated gastric and intestinal solutions (Favaro-Trindade & Grosso, 2002; Kim et al., 2008; Sabikhi, Babu, Thompson, & Kapila, 2010).

3.8. Viability

High relative humidity negatively affects the viability of microorganisms in capsules during storage because the increase in water

activity of the immobilised probiotic microorganisms and thereby improve their stability during storage. A determinate number of viable probiotic cells must be consumed (10^6 – 10^7 CFU/g) for them to play a significant role when they eventually reach the intestine (Sabikhi et al., 2010; Talwalkar, Miller, Kailasapathy, & Nguyen, 2004).

Viable cell counts for each prebiotic-storage condition- temperature combination were affected by duration of storage; values denoted with different lowercase letters within the rows are significantly different (Tukey test: $p \leq 0.05$). Viable cell counts for each prebiotic-storage condition-duration of storage combination were affected by the storage temperature; values denoted with different capital letters within the columns are significantly different (Tukey test: $p \leq 0.05$).
NS: no surviving cells.

Table 5Effects of the storage parameters on the stability of microencapsulated *L. acidophilus* throughout 120 days of storage.

Preb	Storage conditions	T (°C)	Viable cells (log cfu g ⁻¹)											
			0 days			7 days			30 days			60 days		
WP	UR (11%)	−18	8.381 ± 0.640	a	A	7.513 ± 0.107	b	A	7.028 ± 0.158	b	A	5.639 ± 0.142	c	A
Inu	UR (11%)	−18	8.194 ± 0.444	b	A	7.815 ± 0.268	b	A	6.751 ± 0.121	b	A	6.432 ± 0.193	b	A
Poly	UR (11%)	−18	8.964 ± 0.331	a	A	8.472 ± 0.545	a	A	7.979 ± 0.393	a	A	7.618 ± 0.192	a	A
WP	UR (11%)	7	8.381 ± 0.640	ab	A	7.155 ± 0.295	b	A	5.021 ± 0.829	c	A	4.529 ± 0.824	b	A
Inu	UR (11%)	7	8.194 ± 0.444	b	A	6.993 ± 0.090	b	A	6.361 ± 0.175	b	A	4.843 ± 0.146	b	A
Poly	UR (11%)	7	8.964 ± 0.331	a	A	8.314 ± 0.225	a	A	7.491 ± 0.370	a	A	7.397 ± 0.199	a	A
WP	UR (11%)	22	8.381 ± 0.640	ab	A	4.233 ± 0.487	c	A	3.470 ± 0.723	c	A	2.314 ± 0.160	c	A
Inu	UR (11%)	22	8.194 ± 0.444	b	A	6.249 ± 0.083	b	A	5.079 ± 0.197	b	A	4.554 ± 0.149	b	A
Poly	UR (11%)	22	8.964 ± 0.331	a	A	8.111 ± 0.407	a	A	6.915 ± 0.853	a	A	6.009 ± 0.724	a	A
WP	Vácuo	−18	8.381 ± 0.640	ab	A	7.519 ± 0.372	a	A	6.725 ± 0.172	b	A	5.830 ± 0.082	b	A
Inu	Vácuo	−18	8.194 ± 0.444	b	A	7.746 ± 0.265	a	A	7.121 ± 0.059	ab	A	5.654 ± 0.097	b	B
Poly	Vácuo	−18	8.964 ± 0.331	a	A	7.975 ± 0.273	a	A	7.523 ± 0.118	a	A	6.895 ± 0.170	a	B
WP	Vácuo	7	8.381 ± 0.640	ab	A	4.993 ± 0.090	b	B	2.941 ± 0.650	a	B	2.000 ± 0.990	a	B
Inu	Vácuo	7	8.194 ± 0.444	b	A	4.992 ± 0.450	b	B	2.464 ± 1.415	a	B	0.956 ± 1.105	b	B
Poly	Vácuo	7	8.964 ± 0.331	a	A	6.006 ± 0.963	a	B	2.386 ± 1.370	a	B	NS	NS	NS
WP	Vácuo	22	8.381 ± 0.640	ab	A	3.709 ± 0.176	a	A	2.319 ± 0.584	a	B	1.724 ± 0.345	a	A
Inu	Vácuo	22	8.194 ± 0.444	b	A	3.759 ± 0.153	a	B	1.737 ± 0.744	a	B	NS	NS	NS
Poly	Vácuo	22	8.964 ± 0.331	a	A	4.330 ± 0.402	a	B	2.007 ± 1.259	a	B	NS	NS	NS

Viable cell counts for each storage conditions–temperature–duration of storage combinations were affected by prebiotic; values denoted with different lowercase letters within the rows are significantly different (Tukey test: $p \leq 0.05$). Viable cell counts for each prebiotic–temperature–duration of storage combination were affected by the storage condition; values denoted with different capital letters within the columns are significantly different (Tukey test: $p \leq 0.05$).

NS: no surviving cells.

In the present study, according to the results presented in Tables 4 and 5, the F3 formulation stored in UR at -18°C and 7°C for 120 days would provide the number of viable cells required, and they presented a logarithmic cycle reduction of 1.967 and 2.152, respectively. The good results obtained for low temperature storage may be explained by the microorganisms being maintained in a latent state and to the low temperature preventing crystal rearrangements in the lipid matrix and thus expulsion of the bioactive component (Pedroso et al., 2012).

In a previous study, *L. acidophilus* retained greater viability at a storage temperature of 7°C (120 days), as observed in this study for the F3 formulation, although in the previous study, the microcapsules were produced by complex coacervation and were dehydrated by the spouted bed method (Oliveira et al., 2007b).

The effects of adding inulin or polydextrose on the survival of La are presented in Table 5. The data show that the presence of polydextrose increased cell viability ($p \leq 0.05$) compared with the presence of inulin or no prebiotic during storage with controlled relative humidity at -18 , 7 and 22°C . The cell viability values for F1, F2 and F3 formulations stored under vacuum for 30 days at 7 or 22°C were not significantly different, whereas the cell viability after frozen storage for 30 to 120 days was significantly greater for the F3 formulation.

For all the formulations tested, it was observed that storage at the lowest temperature studied led to the best cell viability, as shown in Table 4. There is a consensus that temperatures close to 0°C improve the rates of cell viability because lower temperatures reduce the rates of chemical reactions that are detrimental to the microorganisms, such as fatty acid oxidation (Corcoran, Ross, Fitzgerald, & Stanton, 2004; Teixeira et al., 1995).

For F1, the storage at freezing temperature (-18°C) showed the best rate of viable cells, with counts greater than 6 log cycles, both under vacuum and controlled relative humidity up to 30 days. However, for the other temperatures analysed, stability was inadequate, once there was a great reduction in the number of viable cells in 7 days, except for relative humidity at 7°C , whose counts decreased in 30 days, this result is possibly related to greater metabolic activity of the microorganisms when stored at 7 and 37°C . High temperatures can lead to production of metabolic acids and bacteriocins, and/or the loss of substrates, which would explain the inactivation of the viable cells in the microparticles during storage.

F2 showed the best performance at -18°C , under controlled relative humidity, with satisfactory counts up to 90 days; up to 30 days when stored under controlled relative humidity at 7°C ; and under vacuum at -18°C . Finally, F3 seemed to present the best responses in viability during storage in controlled relative humidity (11%), where counts over 10^6 were recorded up to 120 days at -18°C and 7°C , and up to 60 days at 22°C , whereas under vacuum counts remained acceptable for 90 days at -18°C .

It is known that not only temperature, but also relative humidity, is determinant for probiotic survival during storage. Moreover, the Aw values are balanced at room relative humidity. Thus, storage at high relative humidity increases the water concentration, which is detrimental to the survival of probiotics. On the other hand, at very low relative humidity, removal of water from the cells may increase the possibility of damage. Therefore, intermediate relative humidity levels, between 7 and 11%, were reported to be the ideal values for bacterial survival (Castro, Teixeira, & Kirby, 1995).

Pedroso et al. showed that microencapsulated *L. acidophilus* had a shelf life of 30 and 60 days at 7 and 37°C , respectively. Although this study used the same encapsulation process and lipid matrix they used, they did not add prebiotic components or store the microcapsules with a controlled relative humidity, which explains the lower stability observed in their study. The presence of a prebiotic and the controlled storage conditions improved the stability of *L. acidophilus*.

4. Conclusions

Symbiotic solid lipid microparticles are potential vehicles of probiotic microorganisms and prebiotic compounds. The symbiotic SLM-based systems could protect to *L. acidophilus* cells from the effects of gastric and intestinal fluids and release them in the intestines during fat digestion.

SLMs improve the viability of *L. acidophilus* during storage at freezing or refrigeration temperatures with controlled relative humidity (11%). The best formulation studied combined *L. acidophilus* and polydextrose because this system maintained the viability of the stored microorganisms viable for 120 days.

The SLMs produced in this study are an interesting vehicle that can be applied by the food industry, given their specific morphology and insoluble nature. Issues remain to be investigated, such as the effects of different levels of prebiotics on the morphology of SLMs

and the probiotic cell viability as well as the effect of other lipid matrices that may prolong probiotic cell viability during storage, thereby favouring the application of SLMs in food products.

Acknowledgements

The authors thank FAPESP for the financial support (Process 09/11713-2) and the scholarship that was granted (Process 10/13026-0).

References

- Anal, A. K., & Singh, H. (2007). Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, 18(5), 240–251.
- Castro, H. P., Teixeira, P. M., & Kirby, R. (1995). Storage of lyophilized cultures of *Lactobacillus bulgaricus* under different relative humidities and atmospheres. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 44, 172–176.
- Chambi, H. N. M., Alvim, I. D., Barrera-Arellano, D., & Grosso, C. R. F. (2008). Solid lipid micro-particles containing water-soluble compounds of different molecular mass: production, characterization and release profiles. *Food Research International*, 41, 229–236.
- Chandramouli, V., Kailasapathy, K., Peiris, P., & Jones, M. (2004). An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. *Journal of Microbiological Methods*, 56, 27–35.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67.
- Corcoran, B. M., Ross, R. P., Fitzgerald, G. F., & Stanton, C. (2004). Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. *Journal of Applied Microbiology*, 96, 1024–1039.
- Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2000). The effect of the immobilization of *L. acidophilus* and *B. lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. *Michwissenschaft*, 55, 496–499.
- Favaro-Trindade, C. S., & Grosso, C. R. F. (2002). Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the values of stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, 19(4), 485–494.
- Favaro-Trindade, C. S., Heinemann, R. J. B., & Pedrosa, D. L. (2011). Developments in probiotic encapsulation. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 6, 1–8.
- Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., & Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloids*, 24, 336–340.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45, 306–312.
- Gamboa, O. D., Gonçalves, L. G., & Grosso, C. F. (2011). Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method. *Procedia Food Science*, 1, 1732–1739.
- Gbassi, G. K., Vandamme, T., Ennahar, S., & Marchioni, E. (2009). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp. in an alginate matrix coated with whey proteins. *International Journal of Food Microbiology*, 129, 103–105.
- Gibson, G. R., Probert, H. M., Van Loo, J., Rastall, R. A., & Roberfroid, M. B. (2004). Dietary modulation of the human colonic microbiota: updating the concept of prebiotics. *Nutrition Research Reviews*, 17(2), 259–275.
- Grosso, C. R. F., & Favaro-Trindade, C. S. (2004). Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and immobilized *B. lactis* in yoghurt. *Brazilian Journal of Microbiology*, 35, 151–156.
- Hansen, L. T., Allan-Wojtas, P. M., Jin, L. A., & Paulson, A. T. (2002). Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, 19, 35–45.
- Heidebach, T., Forst, P., & Kulozik, U. (2010). Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. *Journal of Food Engineering*, 98, 309–316.
- Homayouni, A., Azizi, A., Ehsani, M. R., Yarmand, M. S., & Razavi, S. H. (2008). Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of synbiotic ice cream. *Food Chemistry*, 111, 50–55.
- Hou, R. C. W., Lin, M. Y., Wang, M. C., & Tzen, J. T. C. (2003). Increase of viability of entrapped cells of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *Bulgaricus* in artificial sesame oil emulsions. *Journal of Dairy Science*, 86(2), 424–428.
- Ilić, I., Dreu, R., Burjak, M., Homar, M., Kerč, J., & Srčić, S. (2009). Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology. *International Journal of Pharmaceutics*, 381, 176–183.
- Jenning, V., Thünnemann, A. F., & Gohla, S. H. (2000). Characterisation of a novel solid lipid nanoparticle carrier system based on binary mixtures of liquid and solid lipids. *International Journal of Pharmaceutics*, 199, 167–177.
- Kanmani, P., Kumar, R. S., Yuvaraj, N., Paari, K. A., Pattukumar, V., & Arul, V. (2011). Cryopreservation and microencapsulation of a probiotic in alginate chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. *Biotechnology and Bioengineering*, 16(6), 1106–1114.
- Kim, S. J., Cho, S. Y., Kim, S. H., Song, O. J., Shin, S., Cha, D. S., et al. (2008). Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. *LWT - Food Science and Technology*, 41, 493–500.
- Lahtinen, S. J., Ouwehand, A. C., Salminen, S. J., Forsell, P., & Myllärinen, P. (2007). Effect of starch and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains. *Letters in Applied Microbiology*, 44, 500–505.
- Madureira, A. R., Amorim, M., Gomes, A. M., Pintado, M. E., & Malcata, F. X. (2011). Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 44(1), 465–470.
- Mandal, S., Hati, S., Puniya, A. K., Singh, R., & Singh, S. (2012). Development of synbiotic milk chocolate using encapsulated *Lactobacillus casei* NCDC 298. *Journal of Food Processing and Preservation*, 1–7.
- Mandal, S., Puniya, A. K., & Singh, K. (2006). Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. *International Dairy Journal*, 16, 1190–1195.
- McCartney, A. L., & Gibson, G. R. (2006). The normal microbiota of the human gastrointestinal tract: history of analysis, succession, and dietary influences. In A. C. Ouwehand, & E. E. Vaughan (Eds.), *Gastrointestinal Microbiology* (pp. 51–73). New York: Taylor and Francis.
- Mickova, K., Copikova, J., & Synytsya, A. (2007). Determination of polydextrose as a fat replacer in butter. *Czechoslovak Journal of Food Sciences*, 25, 25–31.
- Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002b). Solid lipid nanoparticles (SLN) and nanostructured lipid carriers (NLC) in cosmetic and dermatological preparations. *Advanced Drug Delivery Reviews*, 54(1), 131–155.
- Müller, R. H., Radtke, M., & Wissing, S. A. (2002a). Nanostructured lipid matrices for improved microencapsulation of drugs. *International Journal of Pharmaceutics*, 242, 121–128.
- Nag, A., Han, K. S., & Singh, H. (2011). Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. *International Dairy Journal*, 21, 247–253.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Balieiro, J. C. C., Freitas, L. A. P., Freitas, O., et al. (2007). Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying. *Drying Technology*, 25, 1687–1693.
- Oliveira, A. C., Moretti, T. S., Boschini, C., Balieiro, J. C. C., Freitas, O., & Favaro-Trindade, C. S. (2007). Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 24, 685–693.
- Passerini, N., Albertini, B., Perissutti, B., & Rodriguez, L. (2006). Evaluation of melt granulation and ultrasonic spray congealing as techniques to enhance the dissolution of praziquantel. *International Journal of Pharmaceutics*, 318, 92–102.
- Pedrosa, D. L., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., & Favaro-Trindade, C. S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, 26, 127–132.
- Picot, A., & Lacroix, C. (2003). Production of multiphase water-insoluble microcapsules for cell microencapsulation using an emulsification/spray-drying technology. *Journal of Food Science*, 68(9), 2693–2700.
- Pimentel-González, D. J., Camposmontiel, R. G., Lobato-Calleros, C., Pedrosa-Isas, R., & Vernoncarte, J. (2009). Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. *Food Research International*, 42(2), 292–297.
- Roberfroid, M. B. (2007). Inulin-type fructans: functional food ingredients. *The Journal of Nutrition*, 137(11), 2493–2502.
- Rodrigues, D., Sousa, S., Rocha-Santos, T., Silva, J. P., Sousa Lobo, J. M., Costa, P., et al. (2011). Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, 21, 869–876.
- Sabikhi, L., Babu, R., Thompson, D. K., & Kapila, S. (2010). Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. *Food and Bioprocess Technology*, 3, 586–593.
- SAS Institute Inc. (2005). *SAS OnlineDoc*, v. 9.1.3. Cary, North Carolina: SAS Institute Inc.
- Schubert, M. A., & Müller-Goymann, C. (2005). Characterisation of surfacemodified solid lipid nanoparticles (SLN): influence of lecithin and nonionic emulsifier. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 61, 77–86.
- Senaka Ranadheera, C., Evans, C. A., Adams, M. C., & Baines, S. K. (2012). *In vitro* analysis of gastrointestinal tolerance and intestinal cell adhesion of probiotics. *Food Research International*, 49, 619–625.
- Shah, N. P., & Ravula, R. R. (2000). Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. *Australian Journal of Dairy Technology*, 55, 127–131.
- Shoji, A. S., Oliveira, A. C., Balieiro, J. C. C., Freitas, O., Thomazini, M., Heinemann, R. J. B., et al. (2013). Viability of *L. acidophilus* microcapsules and their application to buffalo milk yoghurt. *Food and Bioprocess Technology*, 91, 83–88.
- Silva, A. C., González-Mira, E., García, M. L., Egea, M. A., Fonseca, J., Silva, R., et al. (2011). Preparation, characterization and biocompatibility studies on risperidone-loaded solid lipid nanoparticles (SLN): high pressure homogenization versus ultrasound. *Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces*, 86, 158–165.
- Silverstein, R. M., Webster, F. X., & Kiemle, D. J. (2006). *Identificação espectrométrica de compostos orgânicos* (7th ed.). Rio de Janeiro: LTC.
- Sohail, A., Turner, M. S., Coombes, A., Bostrom, T., & Bhandari, B. (2011). Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. *International Journal of Food Microbiology*, 145, 162–168.
- Talwalkar, A., Miller, C. W., Kailasapathy, K., & Nguyen, M. H. (2004). Effect of packaging materials and dissolved oxygen on the survival of probiotic bacteria in yoghurt. *International Journal of Food Science and Technology*, 39, 605–611.
- Teixeira, P. C., Castro, M. H., Malcata, F. X., & Kirby, R. M. (1995). Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray-drying. *Journal of Dairy Science*, 78, 1025–1031.
- Vernazza, C. L., Rabi, B. A., & Gibson, G. R. (2006). Human colonic microbiology and the role of dietary intervention: Introduction to prebiotics. *Prebiotics: Development and application* (pp. 1–28). Chichester: John Wiley & Sons Press.
- Wells, A. L., Saulnier, D. M. A., & Gibson, G. R. (2008). Gastrointestinal microflora and interactions with gut flora. In G. R. Gibson, & M. B. Roberfroid (Eds.), *Handbook of Prebiotics* (pp. 14–38). New York: CRC Press.

Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients

*Paula Kiyomi Okuro, Fernando Eustáquio de Matos Junior and
Carmen Sílvia Favaro-Trindade**

University of São Paulo, College of Animal Science and Food Engineering,
Av. Duque de Caxias Norte, 225, CEP 13635 900 Pirassununga, SP, Brazil

Received: August 16, 2012

Accepted: March 29, 2013

Summary

Spray chilling technology (also known as spray cooling and spray congealing technology) has been widely studied and used in the pharmaceutical field. In the food industry, this technique is gaining interest and can become useful because functional food formulations can be developed. Spray chilling is a fat-based system, which involves the addition of the component of interest to a molten lipid carrier, and the resulting mixture is fed through an atomiser nozzle. When the nebulised material is put into contact with the environment, which is cooled below the melting point of the matrix material, the vehicle solidifies (due to heat exchange between the molten material and cold air), and solid lipid microparticles are formed at the same time. This technology is fat based, and lipid carriers, such as wax and oil (*e.g.* palm oil, beeswax, cocoa butter, and kernel oil) can be used. This encapsulation technique can potentially change the functionality, reduce the hygroscopicity, mask taste or odour, change solubility, and provide physical protection in addition to allowing the controlled release of these ingredients. This low-cost technology is relatively simple to apply and scale up, and it does not require the use of organic solvents and the application of high temperatures in the process. Therefore, spray chilling encapsulation may facilitate the development and production of functional and enriched foods as it may solve some technological problems associated with the use of certain ingredients, such as those that have high reactivity and low stability.

Key words: spray cooling, spray congealing, nutrient microencapsulation, solid lipid microparticles (SLMs), bioactive compounds

Introduction

The use of encapsulation technology has increased in the last 10 years to address some limitations in the use of medicines, food ingredients, cosmetics, veterinary products and hygiene products. The most popular techniques used to develop microparticles are spray coating, coacervation, solvent evaporation, ionic gelation, liposomes, spray drying and spray chilling (also known as spray cooling and spray congealing).

Spray chilling technology consists of making a solution dispersion or emulsion containing the active ingre-

dient and a molten carrier, which is then atomised into a chamber where cold air or liquid nitrogen is injected. In the case of emulsions, spray chilling technology can be applied to a water-in-fat emulsion in the presence of an emulsifier, such as soy lecithin (1–4). Under these conditions, the carrier instantly solidifies, forming spherical particles, and the solubility of these particles depends on the hydrophilic/lipophilic nature of the carriers. These particles can be as small as a microparticle depending mainly on the device used for the atomisation process. To meet food industry requirements, carriers must be food grade. Lipophilic materials that present a melting

*Corresponding author; Phone: ++55 19 3565 4139; Fax: ++55 19 3565 4284; E-mail: carmenft@usp.br

point higher than room temperature are mostly used, thus yielding solid lipid microparticles (SLMs). The most recommended carriers for the development of particles by means of spray chilling are fatty acids, alcohols, triacylglycerols and waxes.

Spray chilling is a convenient technique for the encapsulation of food ingredients because it is a low-cost continuous process, and it is easy to scale up. Moreover, spray chilling does not require organic solvents, such as alcohols or ether, and it does not require application of high temperatures, which should be considered when thermosensitive ingredients, such as ω -3 fatty acids, enzymes and probiotics, need to be encapsulated. However, spray chilling encapsulation presents some technological disadvantages, such as low encapsulation efficiency and the possibility of expulsion of the active ingredient during storage. Another disadvantage of spray chilling encapsulation is related to the hydrophobic character of the particles, which can make some applications difficult.

There is no consensus in the literature regarding the nomenclature of the spray chilling encapsulation technique, which can be considered synonymous with spray cooling (5,6) and spray congealing (7–10). There is often overlapping of terms in technical and scientific literature. The terms spray chilling and spray cooling are normally used when taking into consideration the melting point of the carrier. Herein, spray chilling is the process that uses carriers with a melting point between 32 and 42 °C for the production of spray particles, and spray cooling is the encapsulation process in which the carrier has a melting point between 45 and 122 °C (11–14). The term spray congealing is employed indiscriminately when molten carriers are used regardless of their melting temperature (15,16). However, this impasse or the lack of consensus regarding the right terminology does not obscure the real importance of this encapsulation technology.

Currently, many publications are available in the literature describing the preparation of lipid particles by spray chilling for different purposes as follows: flavour and odour masking, production of ingredients with increased stability, protection and controlled release of probiotics, and encapsulation of bioactive proteins and peptides. However, most studies are from the pharmaceutical field, and there has not been an article published regarding the compilation of such data for the food industry. Based on these considerations, the purpose of the present article is to highlight the importance of spray chilling encapsulation in food fields.

Spray Chilling Technology

In general, the spray chilling process can be divided into two steps. The first step consists of adding the bioactive compound to the carrier material, which is usually a lipophilic compound, to be encapsulated. This incorporation process can be performed by dissolving or mechanically dispersing the material into the encapsulating matrix (the latter is the most widely applied method). The use of an emulsion is also a method to incorporate some hydrophilic bioactive agents (2–4). The second

step consists of atomisation of the molten material, which is typically carried out by a heated atomising nozzle to maintain a proper temperature, thus avoiding solidification of the feeding material. When this material is atomised in contact with a refrigerated chamber (due to the injection of cold air or liquid N₂), a heat transfer occurs between the molten material and the cold air, thus leading to solidification of the carrier and the formation of particles (5).

The residence time of droplets in the spray cooling chamber is relatively short (only a few seconds). The particles are collected in a container located below the cooling chamber, and fine particles are transported by air into a cyclone where they are collected in another container (Fig. 1).

Fig. 1. Scheme of spray chilling equipment

The preparation of particles using this method has been applied in various sectors, including pharmaceutical, cosmetic, agricultural, veterinary and food industry (1). The application of spray chilling encapsulation process has also been reported for the production of both food ingredients and several drugs (17).

Numerous applications of SLMs obtained by spray chilling have been investigated, such as odour and taste masking (18,19); protection of the active ingredient against detrimental conditions, such as pH, enzyme activity, moisture, oxygen and light; optimisation of the dissolution of poorly soluble drugs; modulating the release kinetics of active compounds; and improvement of flow properties, handling, appearance and other purposes (8).

If lipids are used as the carrier material, the final product is insoluble in water and there is usually controlled release of its contents by utilising the melting point of the carrier (20) or by digestion of the carrier in the intestine. The proper selection of the carrier is crucial because the encapsulation process can modify its properties, such as reduce its hygroscopicity and/or increase its chemical/physical stability (18).

The atomisation of the molten mixture (carrier plus active ingredient) and the solidification process are con-

sidered critical steps. The atomisation process is related to the disintegration of the molten mixture into small particles (21), and the solidification process is associated with the processing of the molten material into a solid (obtained by cooling). From the operational standpoint, insufficient cooling leads to agglomeration of the droplets and/or adhesion of these droplets on the surface of the chamber, thus negatively affecting the morphology, process and other properties of the microparticles.

Spray chilling is similar to spray drying, which is a widely studied and widespread technology. However, there is a difference between these processes in terms of direction of energy flow. With regard to spray drying, the energy is applied to the droplet forcing the solvent evaporation. In spray-chilling encapsulation, however, the energy is removed from the droplet forcing the solidification of the carrier (5). The spray-chilling technique may be considered to be a merger between the hot melt technology (coating or agglomeration) and the spray drying technique. Table 1 (5,8,10,14,22–25) presents several differences between these techniques (spray chilling and spray drying).

The initial spray chilling configuration is similar to the spray drying configuration, but there is no solvent evaporation. A conventional spray dryer (when there is input of hot air) can also be used as a spray cooler (when there is input of cold air). The apparatus consists of two main parts: a cooling chamber and an atomiser. For an efficient process, it is recommended that the molten mixture dispersion presents a narrow melting temperature range, so the particles can also be solidified during the spraying process (26).

Both spray drying and spray chilling techniques do not produce reservoir-type microcapsules, but instead they produce matrix-type microspheres. However, spray chilling produces dense and massive microspheres, and spray drying generally produces hollow microspheres (Fig. 2).

There are also similarities between the SLMs obtained by the spray chilling technology and by the spray coating technology. These methods can both be fat based, and the physical nature of these processes is similar because they have the same release mechanisms that differ from the spray drying regarding the functionality of par-

Table 1. Differences between spray chilling and spray drying techniques

	Spray drying	Spray chilling	Ref.
Energy flow	energy applied in the droplet forcing evaporation of the medium	energy removed from the droplet forcing the solidification of the medium	(5)
Equipment	feeding tubes without heating	heated feeding tubes (to avoid solidification)	(8)
Flow in the chamber	hot air	cold air or liquid N ₂	(8)
Particle size	5–150 μm	20–200 μm	(14)
Dissolution mechanism	dissolution	diffusion, heating, lipases and bile salts (GI tract)	(22)
Particle morphology	geometric particle with porous and irregular surface due to solvent evaporation	dense, spherical and smooth surface (no effects of solvent evaporation)	(23)
Carrier	water-soluble polymers	waxes, fatty acids, water-soluble polymers and water-insoluble monomers	(24)
Food ingredients	vitamins, flavours, starter cultures, carotenoids, oils, fats, enzymes and acidulants	iron sulphate, vitamins, minerals, acidulants, enzymes and probiotics	(25)
Process steps	dispersing or dissolving the active compound in aqueous solution coating, atomisation, dehydration	dispersing or dissolving the active compound in the molten lipid mixture, atomisation, cooling	(10)
Load/%	5–50	10–20	(10)

Fig. 2. Differences between particles produced by spray drying and spray chilling: a) micrograph of a fractured particle produced by spray chilling, b) micrograph of a fractured particle produced by spray drying

ticles. Both processes can be used to produce SLMs at low temperatures. However, while spray chilling is used to produce SLMs, spray coating is used for recovering particles. Thus, spray coating has the advantage of producing reservoir-type microcapsules. During the spray coating process, the particles are kept in suspension in a chamber while the coating solution is nebulised over them. When molten lipid matrices are used as coatings, the chamber is kept at low temperatures for promoting solidification of the lipid while recovering the particles.

A wide variety of materials, including lipid material, can be used for the coating of particles by spray coating and spray chilling (23). The use of lipids during spray coating leads to SLM features similar to those obtained by spray chilling, including the release mechanism. As the spray coating technique allows the thickness of the coating layer to be adjusted, the control of the release speed of the bioactive compound can be modulated with more accuracy, thus obtaining a desired release profile. Another advantage of the spray-coating over the spray-chilling technique is the amount of active material that can be used for encapsulation. Currently, spray chillers have a limitation of the maximum amount of active material in the feed. Several spray adaptations were studied using pneumatic atomising nozzle to obtain microspheres with 30 % solid active ingredients and 50 % liquid active ingredients (10).

Both the spray chilling and spray coating techniques have the possibility of microencapsulation of thermolabile ingredients, including enzymes and microorganisms, but it is necessary to pay attention to the thermal behaviour of the core and the carrier. Lower melting points and temperatures reached in the cooling chamber result in greater chances of success in obtaining particles without compromising the stability of the active material during the encapsulation process.

Spray coating technology presents some advantages when compared to spray chilling. One of them is the possibility of adjusting the lipid coating thickness by adjusting some process parameters. The spray coating technique also allows multilayer coating with hydrophobic or hydrophilic coats, which enables greater flexibility in the applications of these microparticles in relation to SLMs obtained by spray chilling when incorporated in other products. In addition, there are differences in the structure of the particles obtained by spray chilling and spray coating. In spray chilling, microparticles are matrix-type particles in which the bioactive component is dispersed throughout the volume of the microparticles or microspheres. In spray coating, SLMs are reservoir-type microparticles or microcapsules in which the active ingredient is enclosed by a layer or multiple layers. Thus, in the SLMs produced by spray coating, the bioactive ingredients are better protected compared to the microparticles obtained by spray chilling because in the SLMs produced by spray chilling, part of the bioactive component is dispersed on the surface of the particle.

Process Variables

The following main variables should be strictly monitored in the spray chilling process: melting point of the matrix used, temperature of the molten material during

processing, chamber temperature, atomising air temperature, atomising air pressure, and feeding flow of the molten mixture (8). Table 2 (2,8,10,28,29) summarises several operation conditions of the spray chilling process.

The following conditions are critical to obtain uniform particles: low viscosity and high speed atomisation. Das and Gupta (30) studied the micropelletisation technique using modified spray congealing technology with a cross-linked gelatin matrix, and they suggested that the ideal viscosity for this system is approx. 0.024 Pa·s at 55 °C.

The spray chilling performance depends strictly on the spray atomisation efficiency of the molten mixture. The efficiency of the atomisation process, in turn, is directly associated with different types of devices that can perform the atomisation. These devices (atomisers) may be pressure nozzles, centrifugal atomisers, rotary atomisers, dual fluid atomisers or ultrasonic atomisers (5). The devices are shown in Fig. 3 (31). All available atomisers have similar characteristics, and they all are inadequate when spraying mixtures that have high viscosity. The feeding and pressure conditions employed in the process can exert effects on the homogeneous distribution of the particles. Albertini *et al.* (10) described this limiting profile assuming the difficulty of atomising a mixture containing active ingredients in a mass fraction exceeding 30 %. However, these authors suggested that by altering the design of the atomiser, there is a possibility of overcoming the threshold feeding up to 50 % (by mass).

Some studies have been conducted to investigate the effects of process parameters on particle features. Maschke *et al.* (9) found that by increasing the atomisation pressure from 5 to 6 bar, there is a decrease in the size of particles obtained by spray chilling. Viscosity is another important variable that influences the particle size, and it can be regulated by monitoring the temperature or by the type and amount of dispersed solids. Low viscosity (due to high temperature) results in smaller particle sizes (9), while higher viscosity (for example, due to the addition of solids) results in larger particle sizes (10).

The molten mixture, which is the feed stream, presents a characteristic curve of solidification. When the atomised droplets come into contact with the cooled medium, the material cools to a temperature of solidification. Thereafter, the temperature remains constant during the heat release of the product, and stable SLMs are then formed. Some products that have a variety of fatty acids, such as hydrogenated palm kernel oil, do not have a well-defined solidification point. The phase change may occur in a temperature range, or, depending on the condition of the molten material, the product may migrate to an amorphous form without releasing the solidification heat because a non-crystal formation occurs. The atomised material passes through three stages of cooling: liquid cooling, solidification and particle cooling. The temperature of the droplets decreases as they come into contact with cold air. When the solidification temperature is reached, the droplets will gradually solidify. As the freshly solidified particles have a higher temperature than the environment, they continue losing heat until room temperature is reached.

Table 2. Some operating conditions of spray chilling processes

Nozzle	Chamber	Temperature gradient (molten mixture → air chamber)	Liquid spray rate	Bioactive component/carrier	Air pressure	Ref.
Dual fluid nozzle	15 cm diameter 60 cm length	70 °C → 0–5 °C	6.0 to 23.4 mL/min	Glimepiride/Gelucire 50/13R	1.09 and 1.59 bar	(8)
Dual fluid atomiser (0.7 mm)	–	65 °C → 10 °C	force of gravity	α -tocopherol/interesterified fat with fully hydrogenated soybean oil	0.25 MPa	(28)
Wide pneumatic nozzle (4.5 mm)	1.80 m in height and 75 cm in diameter	80 to 100 °C* → (25±1) °C	by both the force of gravity and the effect of Venturi	propafenone hydrochloride and vitamin E/carnauba wax, cetearyl and stearyl alcohols	1–3 bar depending on the desired particle size	(10)
Ultrasonic atomiser	–	70 °C → room temperature	–	verapamil HCl/microcrystalline wax, stearyl alcohol and mixtures of the two	–	(29)
Dual fluid (0.7 mm)	–	48 °C → 10 °C	force of gravity	<i>B. lactis</i> and <i>L. acidophilus</i> /interesterified fat with palm and palm kernel oil	0.98 kPa	(2)
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 °C → (13±2) °C	40 mL/min	lycopene/interesterified fats and refined vegetable oils	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 to 80 °C → (15±2) °C	45 mL/min	soy protein hydrolysate/interesterified fats and refined vegetable oils	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	(52±2) °C → (15±2) °C	60 mL/min	probiotic/interesterified fat with palm oil and palm-kernel oil	5 bar	**
Dual fluid	20 cm diameter 54 cm length	60 °C → (13±2) °C	60 mL/min	ascorbic acid/interesterified fat with palm and palm kernel oil	5 bar	**

*carriers were heated to 10 °C above the melting point

**studies of microencapsulation by spray chilling from our group (unpublished)

Fig. 3. Pressure nozzle and rotary nozzle, respectively. Reprinted from: GEA Process Engineering Inc. (31)

Another important approach is to control the temperature of the lipid material during solidification because it prevents the polymorphism of fats, which directly impacts the release profile of the active material/bioactive compound. The lipid matrix can crystallise in different ways depending on different reasons related to the cooling process. For example, rapid cooling results in a lipid

compound preferably in the unstable α form, and slow cooling tends to lead to the formation of the β form (32).

Currently, several studies have investigated the performance and improvement of spray chillers, including the use of pneumatic atomising nozzles (10), compact ultrasound atomisers (33), and ultrasonic atomisers, to disperse the atomised particles (34).

Ilić *et al.* (8) studied the influence of several parameters on the obtained particle size when using the spray chilling microencapsulation process. By varying the atomising pressure and liquid feed rate, they reported that the microparticle median sizes ranged from 58 to 278 μm and that the total process yields range from 81 to 96 %. An increased liquid feed rate was found to increase microparticle size, and higher atomising pressures were found to decrease the microparticle size. These authors concluded that the dominant process parameter regarding microparticle size is achieved by monitoring the atomising pressure in relation to the feed rate.

Morphological Characteristics of Particles

Regarding the physical structure, particles produced by spray chilling are typically matrix-type particles, where

the active ingredient is dissolved or dispersed throughout the volume of the particle and not just in its centre. As this is not a reservoir-type system, where the bioactive compound is fully covered by the carrier, these particles cannot be denominated as microcapsules but are instead denominated as microspheres or microparticles (for those produced on the micrometre scale). Fig. 4 shows particles or microspheres produced by the spray chilling technique.

Fig. 4. Micrograph obtained by scanning electron microscopy (SEM) of particles produced by spray chilling using palm oil as a carrier (500× magnification)

In general, the particles produced by spray chilling are micrometric and impermeable to water (but not resistant to water). The particles have a spherical form, which facilitates their flow, and the active ingredient is normally distributed uniformly within the entire particle volume (8). These are several essential qualities for a suitable incorporation of the material due to the reduction of surface tension between the microparticle hydrophobic surface and the aqueous environment to which it is added, thus allowing the flow of particles in the food matrix (26). Because the process does not involve solvent evaporation, which is commonly observed in other techniques such as spray drying, the particles produced by spray chilling are usually dense and not porous, and they tend to be mechanically resistant and remain intact upon agitation (26).

The particle size depends on both formulating and operating parameters. Formulating parameters include the size and concentration of the active ingredient as well as the viscosity of the feed. The operating parameters consist of the configuration of the atomisation device and working conditions (*i.e.* disk configuration, disk rotational speed, air nozzle pressure, and temperature). An additional coating may be applied to microparticles obtained by spray chilling, using spray coating technology, to ensure a complete coverage of the particle and to eliminate undesirable interactions during embedding and storage (26).

Regarding the equipment operational configuration, there is a specific height to be used to obtain a suitable fall of particles, and such a parameter depends on the required particle size and melting characteristics of the material (14).

Carriers and Additives Used in Food/Feed Encapsulation

Lipids are interesting alternatives to be used as coating materials due to their ability to assume a variety of morphological states, such as emulsions, liposomes and SLMs (35). Several characteristics of a suitable carrier should be taken into consideration prior to the process as follows: regulatory acceptability for use in foods; stability under typical process conditions; ease of atomisation; and moderate melting temperature, which is aimed at minimising the degradation of the filling component (36). A proper selection of the carrier is important because it may change some properties of the encapsulated material, such as control of the release profile, masking of unpleasant taste, reduction of gastrointestinal irritation, and increased viability in some media (2,9,37–39).

The use of surfactants directly impacts the stability of SLMs. The choice of the surfactant agent depends on the compound to be encapsulated and also on the application of the final product. The surfactant should not provide undesirable characteristics to the final product (40,41).

The particle release profile can also be influenced by changes in lipid matrices, concentration of surfactant (such as soy lecithin) and by some production parameters (42). These surfactants are added to provide greater stability to the capsule as they aid in effective connection between the active ingredient and the matrix. Several researchers have analysed the incorporation of lecithin in the lipid matrix to optimise the incorporation of the active ingredient, and they showed that the encapsulation efficiency increases linearly with increasing concentration of lecithin (up to a certain percentage). This effect was attributed to the development of micelles in the middle of the lipid matrix, which contributes to an additional incorporation of the active ingredient (43).

Release Mechanism

Microencapsulation enables controlled release of the active ingredient. In response to specific stimuli, the particle releases its active ingredient in a specific environment. The release mechanisms of bioactive compound from solid lipid microparticles in the intestine can be associated with the presence of digestive enzymes, particularly pancreatic lipase and bile salts (which act as detergents). Another possible release mechanism is through the increase of the temperature above the melting point of the carrier.

The particle type, geometry and composition define the release mechanism of the active ingredient. The processes that employ hydrophilic carriers generally trigger a more rapid release of the active ingredient in relation to those agents that have a lipid carrier (fats and waxes), thus retarding the release of the active compound (44). The release of active ingredients from particles obtained by spray chilling can occur *via* erosion and leaching of the matrix. Depending on the type and concentration, some surfactants can dramatically affect the dissolution rate of the matrix.

With regard to SLMs, the release rate can be activated by enzymatic degradation or temperature. When activated by enzymes, lipids are degraded by the action of lipases in the digestive system. When activated by temperature, the active ingredient is released in response to the temperature change affecting the physical state and release rate of the bioactive compound. In this context, two distinct concepts should be noted: (i) temperature sensitivity, which is an important characteristic that needs to be taken into consideration for those materials that expand or collapse when a critical temperature is reached, and (ii) activation by fusion, which is related to the melting of the carrier, such as those made of modified lipid or wax, in response to the increasing temperature (45).

With respect to vitamins, which are potentially oxidisable compounds, the microencapsulation process can also increase their chemical stability and improve the masking of possible off-flavours or odours. In this case, the vitamin must be released after ingestion or directly in the stomach or intestines. For this purpose, hydrophobic materials are employed, although cellulose derivatives and cross-linked proteins can also promote enteral release (46).

The concept of release after ingestion, which reflects the actual digestion mechanism of the carrier, is connected with the condition of microparticles containing probiotics. These microorganisms are beneficial to the host's health. However, to be effective, the probiotic strain must remain alive after passing through the stomach because acidic medium and the presence of oxygen are harmful to the microorganism (47–49). Therefore, the timing associated with the fact that lipid digestion (carrier) effectively takes place in the intestine where the probiotic strain must act reflects the efficiency and the basic condition to apply this technique.

In the SLM, not the entire bioactive ingredient is effectively encapsulated as it remains on the particle surface. This condition leads to a high initial release of this bioactive compound and is followed by the osmotic diffusion (even if in a small amount) in the matrix. Mechanical breakdowns and melting of the lipid matrix elements also release the bioactive compound (6). Additionally, other factors influence the release kinetics, such as osmotic force, slow diffusion rate of water through the imperfections of the capsule, and mechanical disruption (6).

Zaky *et al.* (50) studied the factors that impact the release kinetics of protein in triglyceride microparticles prepared by spray congealing. These authors investigated the effect of the protein particle size, morphology and distribution in the release of the encapsulated microparticles by confocal laser scanning microscopy (CLSM). The results showed that water entered and dissolved the protein, which led to the formation of water-filled pores allowing the diffusion of the active ingredient in the outside part of the matrix. The penetration of water and release of protein are strongly correlated, showing the importance of more realistic three-dimensional analysis to study the distribution of the protein within the particle.

Furthermore, SLMs have the advantage of lipids being easily digested in the intestine by lipases causing the

release of active compounds in the vicinity of their site of action. Thus, it would be interesting to encapsulate probiotics, prebiotics, some proteins, peptides, iron, ω -3 fatty acids, vitamins, antioxidants and many other compounds.

Advantages of the Process

Currently, the use of spray chilling has increased due to the numerous advantages associated with the technological process, such as speed, performance, and relatively low cost. Once this technique does not require the use of water or organic solvents, the elimination of residual solvents will not be required. Moreover, it is a fast, safe and reproducible physical process because it is associated with an easy adjustment of particle size (51).

In the last two decades, spray chilling has been considered to be an environmentally friendly technique compared to other procedures, such as spray drying. Spray chilling also reduces energy use and time of operation (52). Another positive aspect is the ease to scale up the production because this technique can be operated continuously with the elimination of some manufacturing steps (53).

Other advantages of spray chilling include the use of low temperature in the process, thus not requiring heat. Moreover, there is usually controlled release of the SLM contents around the melting point of the carrier and by digestion of the carrier in the intestine. The SLMs are almost perfect spheres, which are structures that give free-flowing powders.

Disadvantages of the Process

Although SLMs present some advantages, some of the technological disadvantages are as follows: low encapsulation capacity of the active material; possibility of expulsion of the active ingredient by the matrix during the particle shelf life; and the degradation of lipid carrier applied for the dispersion development, which may affect the active ingredient material, thereby influencing its stability and/or its release profile (54).

Another limitation to be considered is the proper choice of the material to be encapsulated. The encapsulated material should be stable at the carrier melting temperature. For many thermolabile or unstable food ingredients, the degradation temperature is recurrently low, thereby reducing the possibilities of using a suitable carrier. The use of molten mixtures should also be considered, which requires operational attention to avoid agglomeration and solidification of such materials in the production line, thus impairing the efficiency of the atomisation process.

The method has a drawback related to fast cooling rates that sometimes crystallise the lipid matrix into a polymorphic form (unstable α arrangement), which leads to the development of disordered chains and/or undesirable orientation, thus promoting lower barrier properties due to the tendency of more stable arrangements resulting in the release of the active ingredient (32,53).

Other possible disadvantages include the effect of particles on food texture, which depends on the particle

size, as well as the possibility of particles to float in liquid systems. In addition, SLMs prepared by spray chilling are insoluble in water due to the lipid carrier, which can limit or not allow some applications. Moreover, the matrix structure of the particles obtained by spray chilling leads to the dispersion of the part of the active material that is not protected on the surface of the particles.

Encapsulation of Functional Ingredients by Spray Chilling

Microencapsulation has been widely used in various industrial applications. However, even though microencapsulation by spray chilling has been thoroughly studied in the last years, especially in the pharmaceutical and veterinary production, it has just a few food-based industrial applications. Although the use of encapsulation is fairly new in the food field, the interest in spray chilling technology has grown significantly. This interest grows as the need arises to develop alternatives for new applications. In this regard, the encapsulation of food ingredients that present functional properties has been studied more vigorously.

A common characteristic of many functional ingredients is that they are subjected to rapid inactivation or degradation (55). Thus, the incorporation of bioactive ingredients in foods presents many challenges, especially with respect to their stability during processing and storage and the need to prevent undesirable interactions with the food matrix (56). Encapsulation technology arises in this context as a viable alternative to ensure that the functional ingredient may be active in the body, that is, it must be delivered to the site of action at a relevant concentration for a sufficiently long period of time to do its work. Furthermore, by encapsulating the active ingredient into a food matrix, the loss of food quality is avoided, thus ensuring the product's intrinsic characteristics (57).

Although rarely studied by food researchers, spray chilling has several advantages that make it an important alternative for encapsulation of functional ingredients. The process is fast, simple and relatively inexpensive. Moreover, spray chilling can be applied to different types of functional ingredients, such as vitamins, minerals, antioxidant compounds, proteins, protein hydrolysates and probiotic microorganisms.

The use of lipid material as a carrier together with the use of low temperatures and the absence of organic solvents during the process are some of the advantages that have encouraged researchers to explore the microencapsulation of food ingredients by means of spray chilling to overcome technological limitations in their use. The process has been tested for different purposes, including the development of controlled release systems and protection of food ingredients against adverse environmental conditions, such as the presence of light, oxygen or unfavourable pH. Furthermore, the process has been tested for taste masking and encapsulation of flavour ingredients, such as peptides and proteins, with therapeutic potential.

Encapsulation of Probiotic Microorganisms

Although the first reports involving studies with probiotics are not recent, the incorporation of these microorganisms in foods is still considered a challenge to the industry. Probiotics represent one of the most important classes of functional ingredients and are defined as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer a health benefit to the host (58).

To be able to present prophylactic or therapeutic functions, probiotic microorganisms need to have their functional structures preserved until they reach their site of action in a high enough quantity to be capable of positively influencing the local microbiota (55). However, a number of factors may compromise the functionality and/or the viability of probiotic microorganisms. These factors are related to the technological processes used for food production, the physicochemical characteristics of the food matrix to which the probiotic is added and its passage through the gastrointestinal tract until its arrival in the intestine, which is its primary site of action (59).

Microencapsulation is a promising alternative to overcome the problems related to the vulnerability of probiotic cells to adverse factors, including the presence of oxygen and acidic media (60,61). Various techniques have been used for the encapsulation of probiotics, and each technique presents particular advantages and disadvantages. Among the available techniques, the following are highlighted: extrusion, atomisation or spray drying, emulsion, coacervation, spray coating and immobilisation in fat or starch granules (62).

The spray chilling technique has several advantages in the encapsulation of probiotic microorganisms. The absence of organic solvents during the encapsulation process is one of these advantages. The use of these organic chemicals is necessary in other techniques and may be toxic/lethal to the probiotic strains, which compromises not only the viability but also their functionality.

With spray chilling, it is possible to develop SLMs only by using the lipid matrix and a probiotic culture without using any further substance. Furthermore, spray chilling does not require the application of high temperatures to produce the microparticles that contain probiotics, which differs from the spray drying and extrusion techniques. However, there is the need to melt the lipid matrix. It is possible to use fats with a low melting point, which prevents the microorganism from being affected by the temperature. Another good aspect of the spray chilling technique is related to the release mechanism of the active ingredient. If the matrix is composed of fats, the release of the bacteria occurs directly in the intestine as a result of the action of lipases present in the intestinal lumen.

Pedroso *et al.* (2) encapsulated probiotics by spray chilling using interesterified palm fat and palm kernel, and they found that the SLMs provided protection for *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* against the simulated gastric and intestinal fluids. Moreover, they obtained promising results for viability during storage when refrigerator and freezer storage temperatures were applied.

Pedroso *et al.* (3) also reported that the encapsulation of *B. lactis* and *L. acidophilus* in cocoa fat by spray chilling provides protection and cell viability. Although *in vivo* gastrointestinal studies demonstrate protection, the viability during storage of SLMs is low. This study indicated that spray chilling using fat as a carrier is an innovative technology for the protection, application and delivery of probiotics. The use of spray chilling favours the microencapsulation of bacteria mainly because it does not employ high temperatures or toxic solvents in the process.

Encapsulation of Vitamins and Minerals

Vitamins may be added to food products to enhance their nutritional value or to act as additives, such as antioxidants or colouring agents added to cured products. Herein, essential minerals are usually added to foods to enhance their nutritional value. The nutrients in these foods may be hampered by the low stability of vitamins or by their ability to interact with other food compounds, thus promoting undesirable changes to the food chemical and sensory properties. Iron is a classic example because its bioavailability is severely affected by interactions with food compounds (*e.g.* tannins, phytates and polyphenols), and iron may also act as a catalyst for the oxidation of fats and vitamins (56). Microencapsulation has been studied as an alternative to add these nutrients to foods. Once more, the choice of the encapsulation technique is a limiting factor because the vitamin content and chemical stability can be negatively affected by several factors related to the microencapsulation processes. Some technological features related to spray chilling, such as not using organic solvents and high temperatures, have stimulated further studies involving the encapsulation of these nutrients.

To develop a stable salt for the fortification of iodine, iron and vitamin A, Zimmermann *et al.* (63) applied the spray chilling technique to package potassium iodate, micronised ferric pyrophosphate, and retinyl palmitate into microcapsules (mean particle size of 100 μm) using hydrogenated palm oil as a carrier. The purpose of microencapsulation was to ensure iron bioavailability to prevent colour changes and to ensure the chemical stability of iodine and vitamin A. The microparticles were used in a randomised, double-blind trial that evaluated the bioavailability of these nutrients and the nutritional deficit in the studied population. The results showed that iron, vitamin A and iodate are highly stable when added to salt, and its use for a six-month period is efficacious in reducing the prevalence of iron, iodine, and vitamin A deficiencies in the studied population.

The addition of vitamin E to foods represents an interesting strategy to ensure its adequate daily intake. However, the addition of vitamin E into foods may be difficult due to its chemical instability, that is, it slowly undergoes oxidation by atmospheric oxygen by means of a reaction catalysed by light and heat in the presence of metals. Based on this consideration, Gamboa *et al.* (28) used the spray chilling technique to encapsulate α -tocopherol using interesterified fat with no *trans* isomer fatty acids prepared with fully hydrogenated soybean oil and soybean oil in the ratio of 70:30 by mass, respectively.

The results showed values for the encapsulation efficiency above 90 %, and high levels of retention of the active agent were attained. Thus, the α -tocopherol encapsulation by spray chilling was successful.

Vitamin C is another important nutrient for food companies. This vitamin is widely used by the industry to supplement foods or to act as an antioxidant agent. However, the stability of vitamin C is considerably reduced when it is added to solutions due to the influence of temperature, pH, and presence of oxygen and metal ions (64). In a study performed by our research group (unpublished data), ascorbic acid was encapsulated by spray chilling using interesterified fat and palm kernel oil as a carrier. The results showed that the stability of ascorbic acid was substantially higher compared to free ascorbic acid. By measuring the instrumental colour, it was possible to observe a significant colour change in free ascorbic acid stored at 22 and 37 °C. This effect was associated with the development of compounds resulting from the degradation of ascorbic acid. In contrast, the colour change observed in the encapsulated ascorbic acid stored under similar conditions was considerably smaller, thereby confirming that spray chilling is a useful alternative to enhance the chemical stability of ascorbic acid.

Zoet *et al.* (65) patented microencapsulation of fat-soluble vitamins (*e.g.* vitamin D) by a spray cooling/chilling process. The process included making a homogeneous solution of a fat-soluble vitamin with the fatty phase preferably being a hydrogenated vegetable oil, such as palm kernel oil, cotton seed oil, sesame seed oil, palm oil, carnauba wax or beeswax. These authors suggested that the carrier should have a melting point in the range from 45 to 90 °C, and their invention relates to the use of microencapsulated fat-soluble vitamins, which was defined herein before as an ingredient in animal feed.

Encapsulation of Proteins and Protein Hydrolysates

The application of hydrolysed proteins that have a specific biological activity for the development of functional foods is of great interest for industrial purposes. However, the bitterness of hydrolysates and their low structural stability may limit the use of these ingredients in food products. Additionally, some protein hydrolysates are hygroscopic and reactive (66). In this case, encapsulation can be useful for masking the bitter taste and preventing the high reactivity of protein hydrolysates, which may cause undesirable changes in food. Although scientific studies are limited in the literature, the spray chilling technique has been mainly studied for masking the taste of antibiotics (38).

Taste masking is often cited in the literature as one of the main purposes of drug/food microencapsulation. However, spray chilling has not been explored for this purpose by food companies, and only few studies have explored the application of spray chilling microencapsulation in the production of drugs. Yajima *et al.* (38) reported the microencapsulation of clarithromycin, which is a macrolide antibiotic that has a strong bitter flavour.

These authors found that when clarithromycin was micro-encapsulated using glyceryl monostearate and amino-alkyl methacrylate copolymer, the drug did not dissolve in the mouth but instead was released immediately in the intestinal tract, resulting not only in taste masking but also offering a high bioavailability.

Another application of spray chilling that has not been fully explored is the microencapsulation of proteins and peptides. Although the use of these components in pharmaceutical formulations has experienced rapid growth since 1980 with the advent of recombinant DNA technology, the development of delivery systems is still considered challenging due to difficulties in maintaining the stability of proteins (67).

The choice of the technique for encapsulation is limited by the need for maintaining the integrity and bioactivity of the protein, and the use of high temperatures and organic solvents are two factors that can be directly linked with protein denaturation (68). Taking this into consideration, the use of spray chilling can be advantageous because the process does not require the use of organic solvents or elevated temperatures. Moreover, carriers that have a high biocompatibility, such as triacylglycerides, are used in formulations for parenteral delivery (9). Several publications have addressed the use of microencapsulation for the development of controlled release systems for peptides and proteins of high therapeutic potential, including lactase (69), somatostatin (70), insulin (9), growth hormone (71) and casein hydrolysate (72). Recently, a study conducted by Maschke *et al.* (9) showed positive results regarding the stability of insulin towards the spray chilling microencapsulation process. Using glycerol tripalmitate as the carrier, these authors demonstrated that it is possible to obtain spherical microcapsules with different protein fractions (0.5, 1 and 2 %) with particle sizes between 182.2 and 315 µm, and their experimental results also showed that insulin is released for at least 28 days, indicating a possible release for up to six months.

Di Sabatino *et al.* (73) produced lipid-based particulate systems by a spray congealing technique using bovine serum albumin as the model protein, and they reported that the solvent-free drug encapsulation process can be successfully employed to obtain particles with high (10–20 % by mass) protein loading without altering its structure.

Despite the therapeutic potential of some peptides, proteins and protein hydrolysates, their low structural stability (especially for proteins), bitter taste (of some peptides and hydrolysates), hygroscopicity, allergenicity and reactivity represent obstacles for their use with the aim to produce functional foods. In addition, some of these products should not be digested before they reach the gut because digestion can destroy their therapeutic effect. Consequently, the use of these protein hydrolysates is challenging for both food industries and researchers. Microencapsulation by spray chilling technology may be an alternative for reducing these problems. As this process does not require the use of organic or aqueous solvents and high temperatures, it could be suitable for protection and production of protein delivery systems.

Conclusions

Although spray chilling encapsulation is not a new method, it is exploited to a lesser extent compared to spray drying encapsulation, especially in the food science field. In the last 10 years, however, mainly in the veterinary and pharmaceutical fields, there has been a significant increase of published papers involving spray chilling microencapsulation. Many recent research articles have aimed at understanding the process variables of spray chilling encapsulation and to propose changes in the equipment and/or procedures, as well as to propose new carriers in order to improve the process performance in relation to the development of microparticles. It is likely that with the increase of successful reports on spray chilling encapsulation, more researchers will be interested in using this technique, thus enabling further studies and new applications in various technological fields.

This technique represents an excellent alternative for encapsulation of various food ingredients with the possibility of providing controlled release, taste and aroma masking as well as conferring a remarkable stability for different compounds. In addition to the above-mentioned applications, the use of spray chilling technique has a potential to address many other limitations in the food industry, such as the reduction in the volatility of flavourings and the hygroscopicity of powders, without excessively increasing the commercial value of food ingredients once it becomes a low-cost technique.

References

1. H.N.M. Chambi, I.D. Alvim, D. Barrera-Arellano, C.R.F. Grosso, Solid lipid microparticles containing water-soluble compounds of different molecular mass: Production, characterization and release profiles, *Food Res. Int.* 41 (2008) 229–236.
2. D.L. Pedroso, M. Thomazini, R.J.B. Heinemann, C.S. Favaro-Trindade, Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling, *Int. Dairy J.* 26 (2012) 127–132.
3. D.L. Pedroso, M. Dogensky, M. Thomazini, R.J.B. Heinemann, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology, *Braz. J. Microbiol.* (in press).
4. M.D.M.M. Ribeiro, D.B. Arellano, C.R.F. Grosso, The effect of adding oleic acid in the production of stearic acid lipid microparticles with a hydrophilic core by a spray-cooling process, *Food Res. Int.* 47 (2012) 38–44.
5. M.J. Killeen, The process of spray drying and spray congealing, *Pharm. Eng.* 13 (1993) 56–64.
6. S. Gouin, Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends, *Trends Food Sci. Tech.* 15 (2004) 330–347.
7. C. Thies: A Survey of Microencapsulation Processes. In: *Microencapsulation: Methods and Industrial Applications*, S. Benita (Ed.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (1996) pp. 1–20.
8. I. Ilić, R. Dreu, M. Burjak, M. Homar, J. Kerč, S. Srčič, Microparticle size control and glimepiride microencapsulation using spray congealing technology, *Int. J. Pharm.* 378 (2009) 176–183.

9. A. Maschke, C. Becker, D. Eyrich, J. Kiermaier, T. Blunk, A. Göpferich, Development of a spray congealing process for the preparation of insulin-loaded lipid microparticles and characterization thereof, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 65 (2007) 175–187.
10. B. Albertini, N. Passerini, F. Pattarino, L. Rodriguez, New spray congealing atomizer for the microencapsulation of highly concentrated solid and liquid substances, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 69 (2008) 348–357.
11. L.S. Jackson, K. Lee, Microencapsulation in the food industry, *Lebensmitt. Wiss. Technol.* 24 (1991) 289–297.
12. S.J. Risch: Encapsulation: Overview of Uses and Techniques. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, S.J. Risch, G.A. Reineccius (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, USA (1995) pp. 2–7.
13. K.G.H. Desai, H.J. Park, Preparation of cross-linked chitosan microspheres by spray drying: Effect of cross-linking agent on the properties of spray dried microspheres, *J. Microencapsul.* 22 (2005) 377–395.
14. N.J. Zuidam, E. Shimoni: Overview of Microencapsulates for Use in Food Products or Processes and Methods to Make Them. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 5–11.
15. B. Albertini, N. Passerini, M. Di Sabatino, D. Monti, S. Burgalassi, P. Chetoni, L. Rodriguez, Poloxamer 407 microspheres for orotransmucosal drug delivery. Part I: Formulation, manufacturing and characterization, *Int. J. Pharm.* 399 (2010) 71–79.
16. A. Samad, M. Tariq, M.I. Alam, M.S. Akhter: Microsphere: A Novel Drug Delivery System. In: *Colloids in Drug Delivery*, M. Fanun (Ed.), CRC Press, Boca Raton, FL, USA (2010) pp. 455–478.
17. B.F. Gibbs, S. Kermasha, I. Alli, C.N. Mulligan, Encapsulation in the food industry: A review, *Int. J. Food Sci. Nutr.* 50 (1999) 213–224.
18. Y. Akiyama, M. Yoshioka, H. Horibe, S. Hirai, N. Kitamori, H. Toguchi, Novel oral controlled-release microspheres using polyglycerol esters of fatty acids, *J. Contr. Release*, 26 (1993) 1–10.
19. T. Yajima, N. Umeki, S. Itai, Optimum spray congealing conditions for masking the bitter taste of clarithromycin in wax matrix, *Chem. Pharm. Bull.* 47 (1999) 220–225.
20. G.V. Barbosa-Cánovas, E. Ortega-Rivas, P. Juliano, H. Yan: Food Powders. In: *Current Topics on Bioprocess in Food Industry*, C. Larroche, A. Pandey, C.G. Dussap (Eds.), Springer-Verlag, New York, NY, USA (2008) pp. 232–241.
21. X.D. Liu, T. Atarashi, T. Furuta, H. Yoshii, S. Aishima, M. Ohkawara, P. Linko, Microencapsulation of emulsified hydrophobic flavours by spray drying, *Drying Technol.* 19 (2001) 1361–1374.
22. N.J. Zuidam, E. Heinrich: Encapsulation of Aroma. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 129–132.
23. I. Ghebre-Sellassie, A. Knoch: Pelletization Techniques. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, Vol. 11, J. Swarbrick, J.C. Boylan (Eds.), Marcel Dekker, New York, NY, USA (2006) pp. 369–394.
24. A.K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 240–251.
25. C. Wandrey, A. Bartkowiak, S.E. Harding: Materials for Encapsulation. In: *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*, N.J. Zuidam, V.A. Nedović (Eds.), Springer, New York, NY, USA (2010) pp. 83–87.
26. J.M. Lakkis: Encapsulation and Controlled Release in Bakery Applications. In: *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*, J.M. Lakkis (Ed.), Blackwell Publishing, Ames, IA, USA (2007) pp. 116–177.
27. S.R.L. Werner, J.R. Jones, A.H.J. Paterson, R.H. Archer, D.L. Pearce, Air-suspension coating in the food industry: Part II – Micro-level process approach, *Powder Technol.* 171 (2007) 34–45.
28. O.D. Gamboa, L.G. Gonçalves, C.F. Grosso, Microencapsulation of tocopherols in lipid matrix by spray chilling method, *Procedia Food Sci.* 1 (2011) 1732–1739.
29. N. Passerini, B. Perissutti, B. Albertini, D. Voinovich, M. Moneghini, L. Rodriguez, Controlled release of verapamil hydrochloride from waxy microparticles prepared by spray congealing, *J. Contr. Release*, 88 (2003) 263–275.
30. S.K. Das, B.K. Gupta, Optimization of controlled drug release through micropelletization, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 14 (1988) 1673–1697.
31. Gea Process Engineering Inc., Maryland, Columbia, MD, USA (<http://www.niroinc.com/technologies/atomizers.asp>).
32. T. Eldem, P. Speiser, H. Altorfer, Polymorphic behavior of sprayed lipid micropellets and its evaluation by differential scanning calorimetry and scanning electron microscopy, *Pharm. Res.* 8 (1991) 178–184.
33. A. Fini, L. Rodriguez, C. Cavallari, B. Albertini, N. Passerini, Ultrasound-compacted and spray-congealed indomethacin/polyethylene glycol systems, *Int. J. Pharm.* 247 (2002) 11–22.
34. L. Rodriguez, N. Passerini, C. Cavallari, M. Cini, P. Sancin, A. Fini, Description and preliminary evaluation of a new ultrasonic atomiser for spray-congealing processes, *Int. J. Pharm.* 183 (1999) 133–143.
35. A.J. Leonel, H.N.M. Chambi, D. Barrera-Arellano, H.O. Pastore, C.R.F. Grosso, Production and characterization of lipid microparticles produced by spray cooling encapsulating a low molar mass hydrophilic compound, *Ciênc. Tecnol. Aliment.* 30 (2010) 276–281.
36. A.S. Achanta, P.S. Adusumilli, K.W. James, C.T. Rhodes, Development of hot melt coating methods, *Drug Dev. Ind. Pharm.* 23 (1997) 441–449.
37. N. Passerini, B. Perissutti, M. Moneghini, D. Voinovich, B. Albertini, C. Cavallari, L. Rodriguez, Characterization of carbamazepine-Gelucire 50/13 microparticles prepared by a spray-congealing process using ultrasounds, *J. Pharm. Sci.* 91 (2002) 699–707.
38. T. Yajima, A. Nogata, M. Demachi, N. Umeki, S. Itai, N. Yunoki, M. Nemoto, Particle design for taste-masking using a spray-congealing technique, *Chem. Pharm. Bull.* 44 (1996) 187–191.
39. U.N. Wanasundara, F. Shahidi, Storage stability of microencapsulated seal blubber oil, *J. Food Lipids*, 2 (1995) 73–86.
40. W. Mehnert, K. Mäder, Solid lipid nanoparticles: Production, characterization and applications, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 47 (2001) 165–196.
41. B.D. Kim, K. Na, H.K. Choi, Preparation and characterization of solid lipid nanoparticles (SLN) made of cacao butter and curdlan, *Eur. J. Pharm. Sci.* 24 (2005) 199–205.
42. S.A. Wissing, O. Kayser, R.H. Müller, Solid lipid nanoparticles for parenteral drug delivery, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 56 (2004) 1257–1272.
43. M.A. Schubert, M. Harms, C.C. Müller-Goymann, Structural investigations on lipid nanoparticles containing high amounts of lecithin, *Eur. J. Pharm. Sci.* 27 (2006) 226–236.
44. C. Whorton: Factors Influencing Volatile Release from Encapsulation Matrices. In: *Encapsulation and Controlled Release of Food Ingredients*, S.J. Risch, G.A. Reineccius (Eds.), American Chemical Society, Washington, DC, USA (1995) pp. 134–142.
45. F. Depypere, K. Dewettinck, F. Ronsse, J. Pieters, Food powder microencapsulation: Principles, problems and opportunities, *Appl. Biotechnol. Food Sci. Pol.* 1 (2003) 75–94.

46. C.S. Brazel, Microencapsulation: Offering solutions for the food industry, *Cereal Foods World*, 44 (1999) 388–390.
47. C.S. Fávoro-Trindade, C.R.F. Grosso, Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile, *J. Microencapsul.* 19 (2002) 485–494.
48. A.C. Oliveira, T.S. Moretti, C. Boschini, J.C.C. Baliero, O. Freitas, C.S. Favaro-Trindade, Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying, *J. Microencapsul.* 24 (2007) 673–681.
49. A.C. Oliveira, T.S. Moretti, C. Boschini, J.C.C. Baliero, O. Freitas, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spouted-bed drying, *Drying Technol.* 25 (2007) 1687–1693.
50. A. Zaky, A. Elbakry, A. Ehmer, M. Breunig, A. Goepferich, The mechanism of protein release from triglyceride microspheres, *J. Controll. Release*, 147 (2010) 202–210.
51. B. Albertini, N. Passerini, M.L. González-Rodríguez, B. Perissutti, L. Rodríguez, Effect of Aerosil® on the properties of lipid controlled release microparticles, *J. Controll. Release*, 100 (2004) 233–246.
52. N. Passerini, S. Qi, B. Albertini, M. Grassi, L. Rodríguez, D.Q. Craig, Solid lipid microparticles produced by spray congealing: Influence of the atomizer on microparticle characteristics and mathematical modeling of the drug release, *J. Pharm. Sci.* 99 (2010) 916–931.
53. M. Emås, H. Nyqvist, Methods of studying aging and stabilization of spray-congealed solid dispersions with carnauba wax. 1. Microcalorimetric investigation, *Int. J. Pharm.* 197 (2000) 117–127.
54. R. Turton, X.X. Cheng: Cooling Processes and Congealing. In: *Encyclopedia of Pharmaceutical Technology*, J. Swarbrick (Ed.), Informa Healthcare, New York, NY, USA (2007) pp. 761–773.
55. P. De Vos, M.M. Faas, M. Spasojevic, J. Sikkema, Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components, *Int. Dairy J.* 20 (2010) 292–302.
56. C.P. Champagne, P. Fustier, Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods, *Curr. Opin. Biotechnol.* 18 (2007) 184–190.
57. S.S. Kuang, J.C. Oliveira, A.M. Crean, Microencapsulation as a tool for incorporating bioactive ingredients into food, *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* 50 (2010) 951–968.
58. Probiotics in Food: Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation, *FAO Food and Nutrition*, 85, Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization, Rome, Italy (2006) (<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512e/a0512e00.pdf>).
59. I. Jankovic, W. Sybesma, P. Phothirath, E. Ananta, A. Mercenier, Application of probiotics in food products – Challenges and new approaches, *Curr. Opin. Biotechnol.* 21 (2010) 175–181.
60. C.R.F. Grosso, C.S. Fávoro-Trindade, Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yoghurt, *Braz. J. Microbiol.* 35 (2004) 151–156.
61. R. Vidhyalakshmi, R. Bhakayaraj, R.S. Subhasree, Encapsulation 'The future of probiotics' - A review, *Adv. Biol. Res.* 3 (2009) 96–103.
62. C.S. Favaro-Trindade, R.J.B. Heinemann, D.L. Pedroso, Developments in probiotic encapsulation, *CAB Rev.* 6 (2011) 1–8.
63. M.B. Zimmermann, R. Wegmüller, C. Zeder, N. Chaouki, T. Torresani, The effects of vitamin A deficiency and vitamin A supplementation on thyroid function in goitrous children, *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 89 (2004) 5441–5447.
64. M.S. Uddin, M.N.A. Hawlader, H.J. Zhu, Microencapsulation of ascorbic acid: Effect of process variables on product characteristics, *J. Microencapsul.* 18 (2001) 199–209.
65. F.D. Zoet, J. Grandia, M. Sibeijn, Encapsulated fat soluble vitamin. *NL patent 050668* (2011).
66. C.S. Favaro-Trindade, A.S. Santana, E.S. Monterrey-Quintero, M.A. Trindade, F.M. Netto, The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate, *Food Hydrocolloids*, 24 (2010) 336–340.
67. U. Bilati, E. Allémann, E. Doelker, Strategic approaches for overcoming peptide and protein instability within biodegradable nano- and microparticles, *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 59 (2005) 375–388.
68. H. Sah, Stabilization of proteins against methylene chloride/water interface-induced denaturation and aggregation, *J. Controll. Release*, 58 (1999) 143–151.
69. A. Dashevsky, Protein loss by the microencapsulation of an enzyme (lactase) in alginate beads, *Int. J. Pharm.* 161 (1998) 1–5.
70. H. Reithmeier, J. Herrmann, A. Göpferich, Development and characterization of lipid microparticles as a drug carrier for somatostatin, *Int. J. Pharm.* 218 (2001) 133–143.
71. H.H. Kwak, W.S. Shim, M.K. Choi, M.K. Son, Y.J. Kim, H.C. Yang *et al.*, Development of a sustained-release recombinant human growth hormone formulation, *J. Controll. Release*, 137 (2009) 160–165.
72. D.V. Mendanha, S.E.M. Ortiz, C.S. Favaro-Trindade, A. Mouri, E.S. Monterrey-Quintero, M. Thomazini, Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin, *Food Res. Int.* 42 (2009) 1099–1104.
73. M. Di Sabatino, B. Albertini, V.L. Kett, N. Passerini, Spray congealed lipid microparticles with high protein loading: Preparation and solid state characterisation, *Eur. J. Pharm. Sci.* 46 (2012) 346–356.