UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

ESCOLA DE ENGENHARIA DE LORENA

ALINE FRANCISCA DE SOUZA

**Estudo da viabilidade de microrganismos probióticos
encapsulados em matriz polimérica natural contendo
ingredientes prebióticos e fibras alimentares**

LORENA

2015

ALINE FRANCISCA DE SOUZA

Estudo da viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados
em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras
alimentares

Tese apresentada à Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo para
obtenção do título de Doutora em Ciências do
Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia
Industrial na área de Microbiologia Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha

Edição reimpressa e corrigida

LORENA - SP
Outubro, 2015

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema Automatizado
da Escola de Engenharia de Lorena,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

Souza, Aline Francisca de

Estudo da viabilidade de microrganismos
probióticos encapsulados em matriz polimérica natural
contendo ingredientes prebióticos e fibras
alimentares / Aline Francisca de Souza; orientador
Ismael Maciel de Mancilha - ed. reimp., corr. -
Lorena, 2015.
106 p.

Tese (Doutorado em Ciências - Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia Industrial na Área de
Microbiologia Aplicada) - Escola de Engenharia de
Lorena da Universidade de São Paulo. 2015
Orientador: Ismael Maciel de Mancilha

1. Lactobacilos. 2. Microencapsulação. 3.
Alimentos funcionais. 4. Prebiótico. 5. Probiótico. I.
Título. II. Mancilha, Ismael Maciel de, orient.

Dedico esta tese aos meus pais, Sonia e José Francisco de Souza, pelo incentivo, amor e carinho, ao meu marido Daniel pelo apoio constante e aos meus irmãos, Andréa, Alex e Eneida e sobrinhos Gabriel, Ellen e Guilherme pelo carinho, apoio e paciência de sempre.

AGRADECIMENTOS

A nosso Deus, pai e criador

Ao Departamento de Biotecnologia da Escola de Engenharia de Lorena, pela oportunidade de realização desta tese de doutorado

Ao Prof. Dr. Ismael Maciel de Mancilha, pela oportunidade, orientação, confiança, paciência, bondade, profissionalismo e amizade demonstrada ao longo destes dois anos de trabalho. Sou muito agradecida por ter me acolhido e permitido que fizesse parte do seu grupo de pesquisa.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Dra. Rita de Cassia Lacerda Brambilla Rodrigues pela disponibilização de equipamento para realização desse trabalho.

Aos docentes do Departamento de Biotecnologia pelos ensinamentos valiosos durante todo o curso.

Ao Paulo Roberto da Silva (Paulinho) pelo carinho, amizade e ajuda nos momentos difíceis.

Ao Isnaldi Rodrigues de Souza pelo carinho, amizade e ajuda no desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu amigo Juan Daniel pela presença constante, incentivo, apoio, conselhos indispensáveis e ajuda incondicional nas alegrias e principalmente nos momentos difíceis.

À minha amiga Ivy dos Santos Stone pelo apoio, carinho, colaboração, companheirismo e amizade em todos os momentos difíceis e pelas alegrias proporcionadas no dia-dia.

À Ana Elisa Stefani Vercelheze pela amizade, apoio, atenção e companheirismo, mesmo à distância, em todos os momentos solicitados.

Aos amigos Flavio Ferraz, Claudio Donato e Ludmila Fernández pela amizade, apoio, companheirismo, incentivos indispensáveis nos momentos difíceis durante o curso e pela alegria que sempre me proporcionaram dentro e fora do Laboratório de Probiótico.

Aos amigos Bruna Caroline e Bruno Guedes pela ajuda inesperada nos momentos difíceis, serei eternamente grata.

Aos amigos Dayelle Sâmila, Isabela Zeferino, Omar, Felipe Montoya, Germano Siqueira, Rafael Candido, Naila Ribeiro, Paula Esteves, Celso Santi, Victor Tabosa, Victor Santos, Moysés Freitas, Sarbina Martiniano, Rafael Phillipini e José Carlos pela amizade e alegrias no decorrer do doutorado.

A todos aqueles que, embora não citados, ajudaram a alcançar este objetivo

Muito obrigada!

BIOGRAFIA

Aline Francisca de Souza nasceu no dia 08 de junho de 1984, na cidade de Londrina/PR, mudou-se para o município de Floresta/PR com menos de um ano de idade, onde viveu até o ano de 2003.

Em 2004, aos 19 anos, ingressou no curso de Ciências Biológicas do Centro Universitário de Maringá – CESUMAR, onde teve oportunidade de realizar atividades em nível de iniciação científica no Laboratório de Microbiologia, iniciando suas pesquisas no campo de descontaminação de efluente hospitalar por ozonização. O Trabalho de Conclusão de Curso da graduação consistiu no desenvolvimento de estudos sobre o tema “*Biorremediação de efluente têxtil por fungos basidiomicetos*”.

Em 2008, ingressou no curso de pós-graduação, em nível de especialização, junto ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Biotecnologia, da Universidade Estadual de Londrina - UEL, onde desenvolveu o trabalho “*Aplicação de lacases produzidas por *Pcynoporus spp.* na descoloração de remazol brilliant blue*”.

Em 2009 ingressou no programa de mestrado em Biotecnologia na mesma instituição, estudando “*Estratégias de controle de contaminação de milho (*Zea mays*) por micotoxinas produzidas por *Fusarium sp.* e *Penicillium sp.* durante a pré e pós colheita*”.

No ano de 2011, dando continuidade a sua capacitação profissional na área de Biotecnologia, ingressou no Programa de Pós –Graduação em Biotecnologia Industrial em nível doutorado, na Escola de Engenharia de Lorena – EEL - USP, onde desenvolveu sua tese versando sobre a avaliação da viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras alimentares.

Atualmente, leciona a disciplina Bioquímica nos cursos de Biologia, Farmácia e Enfermagem da Faculdades Integradas Teresa D’avila em Lorena – SP.

RESUMO

SOUZA, A. F. **Estudo da viabilidade de microrganismos probióticos encapsulados em matriz polimérica natural contendo ingredientes prebióticos e fibras alimentares**. 2015. 106 p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2015.

A saúde e o bem estar estão diretamente relacionados com a alimentação saudável. O consumo de alimentos funcionais como fibras, ingredientes prebióticos e probióticos pode promover diversos benefícios para a saúde, como a melhoria do funcionamento do organismo e a prevenção de diversas doenças. Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o encapsulamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica natural constituída por alginato e farinhas de banana verde, maracujá, feijão branco, maçã e laranja. Para tanto, foi realizado planejamento fatorial 2^4 completo visando a identificação dos parâmetros que influenciam na eficiência do encapsulamento em diferentes matrizes poliméricas e na viabilidade celular do micro-organismo probiótico estudado. As variáveis independentes estudadas foram velocidade de agitação, volume de tween 80, alginato e farinhas funcionais. Os resultados demonstraram que a técnica de emulsificação utilizada apresentou alta eficiência de encapsulamento (acima de 80 %) das células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 nas diferentes matrizes poliméricas estudadas. A análise dos resultados mostrou que os principais parâmetros que afetaram a microencapsulação de *L. delbrueckii* UFV H2B20 foram a velocidade de agitação e a concentração de alginato. Em condições de fluido gástrico simulado (FGS), somente as microcápsulas constituídas de alginato e farinha de banana verde ou maracujá apresentaram sobrevivência média de 60,5 % e 41,0 %, respectivamente, após 30 minutos de exposição ao FGS, sendo selecionadas para os estudos posteriores. A adição de inulina à matriz polimérica contendo alginato e farinha de banana verde ou maracujá apresentou eficiência de encapsulamento acima de 80 %, porém não conferiu proteção às células quando expostas a condições de FGS. Verificou-se também que após 28 dias de armazenamento, a 4°C ou em sorvete a -18°C, a sobrevivência das células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 microencapsuladas em matriz contendo farinha de banana verde ou maracujá foi superior a 90 %. A adição de sacarose ou leite desnatado reconstituído na referida matriz não interferiu significativamente na proteção das células microencapsuladas quando armazenadas a 4° C ou em sorvete a -18°C. Estes resultados revelaram que as farinhas de banana verde e maracujá, quando associadas ao alginato de sódio, são promissoras para a microencapsulação de bactérias probióticas, nas condições do presente trabalho.

Palavras-chave: Lactobacilos, Microencapsulação, Alimentos Funcionais, Probióticos, Prebióticos.

ABSTRACT

SOUZA, A. F. **Study of the viability of probiotic microorganisms naturally encapsulated in polymeric matrix containing probiotics and dietary fiber ingredients**. 2015. 106 p. Thesis (Doctoral of Science). School of Engeneering of Lorena, University of São Paulo, Lorena, 2015.

Health and wellness are directly related to the consumption of healthy foods containing functional ingredients such as fibers, pre- and probiotics, which promote many health benefits, regarding body functions and prevention of several diseases. Therefore, this work aimed to study the encapsulation of *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20, by emulsification technique, in natural polymeric matrices composed of alginate and flours of pulp of unripe banana, passion fruit husk, integral white beans, bagasse of apple and orange. The experiments were undertaken based on a 2^4 factorial design in order to identify the parameters that affect the encapsulation efficiency in different polymer matrices and microorganisms viability, as well. It was studied the effect of stirring speed, and concentrations of Tween 80, sodium alginate and the mentioned functional flours. The results showed that the emulsification technique showed high encapsulation efficiency ($> 80\%$) of the *Lactobacillus* cells in the different polymer matrices evaluated. In addition, the main parameters that affected microencapsulation of *L. delbrueckii* UFV H2B20 included stirring speed and alginate concentration. Regarding the “simulated gastric fluid” (SGF) assays, microcapsules made of alginate, and flours of pulp of unripe banana or husk of passion fruit showed cell survival average than 60,5 % and 41,0 %, respectively, after 30 minutes of exposure to SGF, being selected for further studies. Although the addition of inulin to the polymeric matrix containing alginate and flour of unripe banana pulp or husk of passionfruit presented encapsulation efficiency higher than 80%, they did not show any protection effect to the cells when exposed to SGF. It was also showed, after 28 days of storage at 4 °C or in ice cream at -18 °C, that the cell survival of *L. delbrueckii* UFV H2B20 microencapsulated in matrices containing flours of unripe banana pulp or husk of passion fruit was higher than 90%. The addition of sucrose or reconstituted skim milk in these matrixes, as thermoprotector, did not interfere significantly in the protection of microencapsulated cells when stored at 4 °C or -18 °C. These results revealed that flours made of unripe banana pulp and husk of passion fruit, when combined with sodium alginate, represent a promising alternative for microencapsulation of probiotic bacteria under the conditions evaluated in this work.

Keywords: Lactobacillus, Microencapsulation, Functional foods, Probiotics, Prebiotics

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Critérios para seleção de ingredientes prebióticos.....	34
Figura 2. Benefícios fisiológicos relacionados ao consumo de alimentos funcionais que contém bactérias probióticas.	41
Figura 3. Trato gastrointestinal e suas características quanto ao ph e tempo de transito intestinal.	45
Figura 4. Representação esquemática de uma microcápsula contendo células encapsuladas.	48
Figura 5. Estrutura química do alginato.....	50
Figura 6. Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidades de ácido gulurônico em solução; (b) ligações entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através do cálcio.....	51
Figura 7. Formação de microcápsulas de alginato contendo células probióticas a partir da técnica de emulsificação.	54
Figura 8. Gráfico de pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de banana verde no encapsulamento da bactéria <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.....	67
Figura 9. Gráfico de pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de maracujá no encapsulamento da bactéria <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.	68
Figura 10. Gráfico de pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween alginato e farinha de feijão branco sobre o encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.....	70
Figura 11. Gráfico de pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de maçã no encapsulamento da bactéria <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.....	71
Figura 12. Gráfico de pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80 alginato e farinha de laranja no encapsulamento da bactéria <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.....	73
Figura 13. Morfologia das microcápsulas contendo <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20, obtidos a partir das condições propostas pelos ensaios 9 (a), 11 (b), 12 (c), 13 (d)	

e 16 (e) realizados com alginato e farinha de banana verde e dos ensaios 14 (f) e 16 (g e h) realizados com alginato e farinha de maracujá, observados em microscópio óptico com aumento de 40 vezes. 83

Figura 14. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica contendo alginato e farinha de banana verde (bv) ou maracujá (mj), armazenados em temperatura de refrigeração de 4°C (a), contendo leite em pó reconstituído(b) ou sacarose (c). 89

Figura 15. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica contendo alginato e farinha de banana verde (bv) ou maracujá (mj) em sorvete, armazenados a -18 °C (a), com leite em pó reconstituído (b) ou sacarose (c). 91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Ingredientes alimentares com propriedades funcionais na prevenção de doenças que podem ser prevenidas com o seu consumo diário.....	25
Tabela 2. Características das fibras e suas funções relacionadas ao trato gastrointestinal.....	30
Tabela 3. Classificação dos componentes das fibras alimentares baseados na sua solubilidade/fermentabilidade.....	31
Tabela 4. Micro-organismos utilizados em produtos probióticos.	37
Tabela 5. Vantagens e desvantagens de diferentes métodos utilizados em encapsulamento.....	53
Tabela 6. Planejamento fatorial 2 ⁴ para avaliação dos fatores envolvidos na formação das microcápsulas.....	57
Tabela 7. Eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em diferentes condições.	64
.....	74
Tabela 8. População de células viáveis de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em microcápsulas produzidas a partir de matriz polimérica contendo alginato e diferentes farinhas.....	74
Tabela 9. População de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde produzidas em diferentes condições, e submetidas ao fluído gástrico simulado (FGS), em diferentes tempos de incubação.	76
Tabela 10. População de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de maracujá produzidas em diferentes condições, e submetidas ao fluído gástrico simulado (FGS), em diferentes tempos de incubação.	78
Tabela 11. Eficiência de encapsulamento e viabilidade de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 utilizando alginato e farinhas de banana verde e maracujá.	85
Tabela 12. População de células de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 microencapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato, inulina e farinha de banana verde e maracujá, submetidos ao fgs em diferentes tempo de incubação.....	86

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	21
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	23
2.1 ALIMENTOS FUNCIONAIS	23
2.2 FIBRAS ALIMENTARES	26
2.3 PREBIÓTICOS	33
2.4 PROBIÓTICOS	36
2.5 SIMBIÓTICOS	37
2.6 MECANISMO DE AÇÃO DOS MICRO-ORGANISMOS PROBIÓTICOS	40
2.7 LACTOBACILOS	43
2.8 MICROENCAPSULAÇÃO DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	46
3. MATERIAL E MÉTODOS	55
3.1 MICRO-ORGANISMO	55
3.2 MATRIZES POLIMÉRICAS	55
3.3 MICROENCAPSULAÇÃO <i>L. DELBRUECKII</i> UFV H2B20 EM MATRIZ POLIMÉRICA DE ALGINATO CONTENDO INGREDIENTES PREBIÓTICOS E FIBRAS FUNCIONAIS	55
3.3.1 <i>Preparação de microcápsulas</i>	55
3.3.2 <i>Eficiência do encapsulamento</i>	58
3.3.3 <i>Determinação da morfologia das microcápsulas</i>	58
3.3.4 <i>Avaliação da sobrevivência de L. delbrueckii UFV H2B20 em fluído gástrico simulado</i>	58
3.3.5 <i>Avaliação do efeito da adição de Inulina na matriz polimérica sobre o encapsulamento de L. delbrueckii UFV H2B20</i>	59
3.3.6 <i>Determinação da viabilidade de L. delbrueckii UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato durante o armazenamento a 4 °C</i>	60
3.3.7 <i>Determinação da viabilidade L. delbrueckii UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato acrescida de substâncias termoprotetoras durante armazenamento a 4 °C</i>	60
3.3.8 <i>Determinação da viabilidade L. delbrueckii UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato acrescida de substâncias termoprotetoras durante armazenamento a - 18 °C</i>	61
3.4 <i>Análise estatística</i>	61
3.5 <i>Fluxograma dos experimentos realizados</i>	62

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	63
4.1 Avaliação da eficiência do encapsulamento em diferentes matrizes poliméricas	63
4.1.1 Avaliação da eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde	66
4.1.2 Avaliação da eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de casca maracujá.....	67
4.1.3 Avaliação da eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de feijão branco	69
4.1.4 Avaliação da eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de bagaço de maçã	70
4.1.5 Avaliação da eficiência de encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de bagaço de laranja	72
4.2 Avaliação da população das células viáveis microencapsuladas em diferentes condições.....	73
4.3 Avaliação da sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsulado em diferentes matrizes poliméricas e submetido ao fluido gástrico simulado.....	75
4.3.1 Avaliação da sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de banana verde submetido ao fluido gástrico simulado.....	75
4.3.2 Avaliação da sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de casca de maracujá submetido ao fluido gástrico simulado.....	77
4.3.3 Avaliação da sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de feijão branco, bagaço de maçã e bagaço de laranja e submetido ao fluido gástrico simulado.....	80
4.4 Caracterização morfológica das microcápsulas contendo <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20.....	82
4.5 Avaliação do efeito da adição de Inulina na matriz polimérica sobre o encapsulamento de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20	84
4.6 Avaliação da adição de substâncias termoprotetoras com relação a sobrevivência de <i>L. delbrueckii</i> UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas de alginato e farinhas de banana verde e bagaço de maracujá, armazenado a 4°C.....	88

<i>4.7 Avaliação da adição de substâncias termoprotetoras com relação a sobrevivência de L. delbrueckii UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinhas banana verde e casca de maracujá e incorporadas ao sorvete armazenado a -18 °C.....</i>	<i>90</i>
5. CONCLUSÕES.....	93
6. SUGESTÕES.....	94
REFERÊNCIAS	95

1. INTRODUÇÃO

A busca pela qualidade de vida e a relação entre alimentação balanceada e promoção de saúde, tem estimulado a procura por alimentos saudáveis. A alimentação saudável fornece fontes de micro e macro nutrientes necessários para o funcionamento adequado do organismo. Porém, nas últimas décadas, o alimento deixou de ter apenas a função nutricional básica e passou a ser considerado como fonte de proteção à saúde. Certos alimentos podem estimular o metabolismo, melhorando o funcionamento do organismo, prevenindo o surgimento de determinadas doenças e proporcionando o bem-estar aos indivíduos. Neste contexto, destacam-se os alimentos funcionais, classificados como alimentos naturais ou formulados, que contém em sua composição substâncias com capacidade de atuar no metabolismo humano, promovendo benefícios à saúde.

Na composição dos alimentos funcionais podem estar presentes ácidos graxos como ácido linoleico, ômega 3 e 6, e limonóides, fibras alimentares, probióticos, compostos fenólicos e carotenóides (VIDAL et al., 2012). Entre os alimentos com propriedades funcionais destacam-se a maçã, cevada, cenoura, berinjela e soja que contribuem para a redução dos níveis de colesterol; alho, beterraba, couves e soja que facilitam a destoxificação do organismo; ginseng, aveia e salsa atuam como anti-inflamatório, cebola e chá verde apresentam ação antimicrobiana (ANGELIS, 2001).

As fibras alimentares são constituídas por polissacarídeos e oligossacarídeos. O consumo de fibras alimentares pode contribuir para a redução do nível de colesterol sérico e da obesidade, prevenção de doenças cardiovasculares e câncer intestinal, além de estimular o funcionamento intestinal.

Probióticos podem ser definidos como micro-organismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro. O consumo de probióticos pode contribuir no tratamento de diarreia, estimulação do sistema imune, diminuição da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol sérico, prevenção contra o desenvolvimento de câncer intestinal, e estimulação do funcionamento do intestino.

Prebióticos são alimentos não digeríveis no trato gastrointestinal, que ao serem consumidos estimulam seletivamente o crescimento ou a atividade de

micro-organismos probióticos no trato gastrointestinal do hospedeiro. Denominam-se simbióticos a combinação de probióticos e prebióticos, onde o prebiótico estimula o desenvolvimento e atividade do probiótico, potencializando desta forma o efeito de ambos.

A sobrevivência dos micro-organismos probióticos pode ser afetada por diversos fatores, incluindo pH, temperatura, tempo de estocagem e exposição às condições adversas encontradas no trato gastrointestinal. A aplicação de uma barreira física que confere proteção contra essas condições adversas é uma opção valiosa para manter a viabilidade celular.

O empacotamento de células em uma matriz polimérica, visando protegê-las durante o processamento, armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal é definido como microencapsulação. É considerada uma alternativa promissora para aumentar a viabilidade dos micro-organismos probióticos. Um dos desafios a ser contornado no processo de microencapsulação é a escolha de uma matriz encapsulante adequada ao micro-organismo probiótico, que promova a manutenção da viabilidade celular durante o armazenamento e no trato gastrointestinal, bem como conferir biocompatibilidade e apresentar ausência de citotoxicidade ao hospedeiro e ao micro-organismo.

Uma das matrizes amplamente empregadas na microencapsulação de células é o alginato, caracterizada pelo baixo custo, ausência de toxicidade e facilidade de manipulação. A combinação de alginato com alimentos funcionais ou prebióticos para atuarem como matrizes poliméricas naturais na técnica de microencapsulação de probióticos, pode favorecer a sobrevivência do micro-organismo encapsulado, servindo como fonte de nutriente e proteção durante o armazenamento e consumo do alimento, além de aumentar o valor nutricional do produto.

Neste contexto, o presente trabalho teve como objetivo estudar o encapsulamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica natural, constituída por alginato combinado com farinhas de banana verde, maracujá, feijão branco, maçã e laranja, visando a sua aplicação industrial.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 Alimentos funcionais

O principal papel da dieta consiste em fornecer nutrientes suficientes para atender exigências metabólicas, dando ao consumidor uma sensação de satisfação e bem-estar. Porém, nas últimas décadas o alimento deixou de ser visto apenas como veículo de nutrientes essenciais para garantir o crescimento e desenvolvimento adequado, e passou a ser visto como uma ferramenta para promover o bem estar do indivíduo (GRANATO et al., 2010).

De acordo com Ibañes e Cifuentes (2012), nas duas últimas décadas do século 20, o desenvolvimento econômico, cultural e científico contribuiu fortemente para a mudança no estilo de vida e nos hábitos alimentares das pessoas. Em países desenvolvidos, dietas altamente calóricas e desequilibradas têm substituído dietas mais tradicionais, como a dieta mediterrânea, considerada um patrimônio cultural pela UNESCO em 2012. Segundo os autores, a má alimentação, aliada à diminuição da atividade física, contribuíram para o aumento da incidência de doenças cardiovasculares, diabetes e obesidades. Além disso, o aumento da expectativa de vida, e a incidência de Alzheimer ou Parkinson têm alertado os países desenvolvidos quanto aos custos associados a doenças, que podem aumentar exponencialmente em um futuro próximo. As soluções a serem aplicadas para melhorar a saúde da população, incluem aconselhamento dietético ou conscientização sobre o consumo de alimentos específicos capazes de promover a saúde, como os alimentos funcionais.

A comprovação da relação entre a alimentação e a saúde, e o alerta sobre os efeitos negativos do consumo excessivo de alimentos com altos teores de gorduras e açúcares, iniciou-se na década de 60 (RAUD, 2008). Segundo o mesmo autor, na década de 80 surgiram os alimentos *diet* e *light* que foram inseridos no mercado de consumo com sucesso. Entretanto, a exigência quanto à qualidade dos alimentos aumentou, e iniciou-se a busca por alimentos que promovessem benefícios à saúde, surgindo assim os alimentos funcionais.

Os alimentos funcionais podem ser definidos como alimentos comuns, com componentes fisiologicamente ativos que promovem benefícios para a saúde além da nutrição básica, estando relacionados à redução do risco da

manifestação de certas doenças (CARRARA et al. 2009). O alimento funcional, além de possuir efeitos nutricionais adequados, afeta benéficamente uma ou mais funções no organismo, sendo relevante para o bem estar e saúde, bem como para a redução do risco de doenças, porém não podem ser considerados medicamentos, uma vez que os princípios responsáveis pelos efeitos benéficos não são extraídos do alimento (ZERAiKi et al., 2009).

O conceito de alimento funcional foi sugerido pela primeira vez em 1984 por cientistas japoneses que estudaram as relações entre nutrição, satisfação sensorial, fortificação e modulação do sistema fisiológico. Foi a partir do interesse dos japoneses em alimentos funcionais que iniciou-se a consciência para a necessidade de tais produtos na Europa e Estados Unidos, com a finalidade de reduzir os custos dos cuidados com a saúde da população (SIRO et al., 2008). Moraes e Colla (2006) relataram que o outro fator que contribuiu para o desenvolvimento dos alimentos funcionais foi o aumento da consciência dos consumidores, que visando a melhoria da qualidade de vida, começaram a optar por hábitos saudáveis.

De acordo com Ibañes e Cifuentes (2012), o Ministério da Saúde, Trabalho e Previdência Social do Japão, estabeleceu normas legais para a aprovação de 'alimentos para uso especificados na área da saúde' (*Foods for Specified Health Uses* - FOSHU) em 1991. Nos Estados Unidos, a aprovação dos alimentos funcionais foi regulamentada pela *Food and Drug Administration* (FDA), incluindo vários produtos, como suplementos dietéticos, alimentos medicinais e aditivos alimentares. Enquanto que na Europa, após o apoio da Comissão Européia sobre o estudo científico dos alimentos funcionais, sua definição foi modificada, sendo considerado funcional apenas o alimento que em conjunto com a função nutricional, apresente efeitos benéficos sobre uma ou mais funções do organismo humano, ou que atue nas condições físicas gerais, diminuindo o risco da evolução de doenças.

No Brasil, a definição de propriedade funcional em alimentos foi realizada pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), nas resoluções ANVISA, nº 18 e 19 de 30/04/99. Foram estabelecidos que alimentos ou ingredientes com propriedades funcionais, devem apresentar além da função nutricional básica, efeitos metabólicos e/ou fisiológicos benéficos à saúde. De acordo com a ANVISA (1999), os alimentos funcionais atuam na manutenção geral da saúde e na

prevenção dos riscos de doenças, sendo seguro para o consumo sem a supervisão médica. Assim, o consumo desses alimentos deve reduzir o risco de doenças e não devem ser referidos como alimentos para tratamento ou a cura de doenças. A Tabela 1 apresenta alguns alimentos considerados funcionais e as doenças que podem ser prevenidas pelo seu consumo diário.

Tabela 1. Ingredientes alimentares com propriedades funcionais na prevenção de doenças que podem ser prevenidas com o seu consumo diário.

Ingrediente alimentar	Prevenção
Ácido graxo ômega 3, extrato de gengibre e colágeno	Artrite
Ácido gama aminobutírico, pectina	Hipertensão
Boro, cálcio, fosfopeptídios de caseína	Osteoporose
β -caroteno, extratos de alho, esteróides, compostos fenólicos, <i>Plantago psyllium</i>	Doenças coronarianas
Fibra de soja, bactérias probióticas, pectina	Redução do colesterol
Licopeno, frutas e verduras contendo anti-oxidantes	Alteração do dano oxidativo
Alho, chá verde, bactérias probióticas, <i>Plantago psyllium</i>	Câncer
Bactérias probióticas, zinco	Infecções

Fonte: Adaptado de SANDERS et al. (1998).

De acordo com Makinen-Aakula (2006), os alimentos funcionais podem ser classificados em três grandes grupos. O primeiro grupo atuaria na melhoria da saúde do consumidor, como exemplo, nas funções regulares do estômago e cólon, como os prebióticos, ingredientes alimentares não digeríveis que atuam de forma benéfica nos hospedeiros, estimulando o crescimento de bactérias benéficas, e probióticos. O segundo grupo compreende os alimentos funcionais que atuariam em problemas relacionados à saúde já existentes, como nível de colesterol sanguíneo elevado ou hipertensão arterial. Um terceiro grupo seria constituído por alimentos que facilitariam a vida do consumidor, como alimentos sem lactose e sem glúten.

Entre os alimentos que auxiliam o funcionamento intestinal estão os micro-organismos probióticos, carboidratos não digeríveis, como as fibras alimentares, prebióticos e compostos bioativos, como os compostos fenólicos (PUUPPONEN-

PIMIA et al., 2002). De acordo com os autores, esses alimentos desempenham papel importante na fermentação intestinal, influenciando a composição da microbiota, consequentemente contribuindo para efeitos locais e sistêmicos em humanos.

Em geral, os alimentos funcionais têm sido desenvolvidos em praticamente todos os tipos de alimentos. Os principais alimentos funcionais são probióticos, prebióticos, bebida funcional não alcoólica enriquecida, cereais funcionais, carnes contendo antioxidantes e ovos com baixos níveis de colesterol. O enriquecimento do alimento pode ser realizado com vitaminas, ômega-3, inulina, soja, cálcio e antioxidantes (SIRO et al., 2008). Segundo O'Sullivan et al (1992), os produtos de origem láctica contendo micro-organismos probióticos que estão no mercado são sorvetes, manteiga, iogurte, leite em pó e sobremesas congeladas. No entanto, a forma mais comum de administração de probióticos é por meio de produtos lácteos fermentados (OUWEHAND et al., 2002).

2.2 Fibras alimentares

Tradicionalmente, fibras alimentares são definidas como as porções das plantas resistentes à ação das enzimas digestivas de humanos, incluindo polissacarídeos e lignina (ANDERSON et al., 2009). O termo “fibra alimentar” foi utilizado inicialmente por Hipsleu (1953), relacionando-as com constituintes da parede celular da planta que não são digeríveis (DHINGRA; MICHAEL; RAIPUT, 2012). As fibras têm sido consumidas por séculos, sendo reconhecidos os seus benefícios para a saúde humana (DHINGRA; MICHAEL; RAIPUT, 2012).

As fibras alimentares são substâncias com alta massa molecular e podem ser encontradas em grãos como arroz, trigo, aveia, ervilha e feijão (MORAES; COLLA, 2006). O feijão (*Phaseolus vulgaris*) também contém flavonóides que atuam no nível de colesterol sanguíneo, osteoporose, na ação anticarcinogênica e função antioxidante (VIZZOTO et al., 2010).

Estudos realizados por Luján et al. (2008) demonstraram que o feijão branco (ouro branco) apresenta melhores qualidades proteicas, potencial para controle de colesterol e triacilgliceróis sanguíneos, quando comparado ao feijão marrom (RBS radiante), preto (diamante preto). Enquanto que as variedades de

feijão marrom e preto contribuem para a redução da glicemia e controle dos lipídeos sanguíneos.

Pereira et al. (2011) relataram que as diversas variedades de feijão podem atuar como alimentos funcionais, devido a sua ação na diminuição dos riscos de doenças cardiovasculares, redução do índice glicêmico em diabéticos, aumento da saciedade, prevenção de câncer e redução da absorção de carboidratos da dieta, contribuindo no tratamento de obesidade e diabetes.

Laranja (*Citrus sinensis*) contém carotenoides como a luteína e os limonóides que podem contribuir para a preservação da função visual e prevenção do câncer de cólon, além da função antioxidante (VIZZOTO et al., 2010). Estudos realizados por Ruviano et al. (2009) demonstraram que a casca da laranja apresenta 11,04 g de fibra/100 g de alimento, sendo considerada como fonte de fibra alimentar.

O Brasil é um dos três maiores produtores de frutas, que são cultivadas numa área de aproximadamente 2,2 milhões de hectares (PELEGRINE; ANDRADE; NUNES, 2015). A laranja está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo (ALEXANDRINO et al., 2007). De acordo com IBGE (2015), a produção de laranja no ano de 2014 foi de 14,8 milhões de toneladas, para o ano de 2015, está prevista a produção de 13,7 milhões de toneladas, sendo o Estado de São Paulo o responsável pela maior parte da produção brasileira.

A utilização da fruta para produção de suco pode chegar a 96 % da produção em países produtores como Brasil e Estados Unidos, gerando grande quantidade de resíduos (ALEXANDRINO et al., 2007). Os resíduos correspondem a cerca de 50 % da massa da fruta, com umidade de aproximadamente 82 %, que são utilizados principalmente como complemento na ração animal, porém vários estudos tem sido propostos para a utilização desses resíduos, como a obtenção de fertilizantes orgânicos, pectinas, óleos essenciais, compostos antioxidantes, substratos para obtenção de proteínas microbianas, ácidos orgânicos, etanol e enzimas (REZZADORI; BENEDETTI, 2009).

Maracujá é o nome popular de várias espécies do gênero *Passiflora*, porém no Brasil, o maracujá-azedo ou amarelo (*P. edulis* flavicarpa) é o mais cultivado e comercializado pela qualidade de seus frutos. Diversos estudos relatam a presença de substâncias polifenólicas, ácidos graxos poli-insaturados e fibras na

casca, semente e fruto, indicando o maracujá como alimento funcional. A presença dos polifenóis, principalmente flavonoides, proporciona ao maracujá a ação antioxidante (ZERAİK et al (2009).

A produção de maracujá no Brasil em 2012 foi de 776 mil toneladas, sendo os principais produtores a região nordeste e sudoeste, respectivamente (IBGE, 2012). Segundo Zeraik et al (2009), os subprodutos provenientes do processamento do suco de maracujá correspondem a cerca de 65 a 70% da massa do fruto. Esse subproduto apresenta alto valor nutricional, podendo ser utilizado no consumo humano e animal. A casca contém niacina (vitamina B3), ferro, cálcio, e fósforo, e é rica em fibras solúveis como a pectina, que contribui para a prevenção de doenças cardiovasculares e gastrointestinais, câncer de cólon, diabetes e obesidade.

A maçã (*Malus domestica*) é caracterizada pela presença de substâncias pécicas, proteínas, dextrinas, amidos insolúveis e compostos fenólicos (DEMIATE et al., 2003). A análise físico química da farinha de bagaço de maçã realizada por Coelho e Wosiacki (2011) demonstrou a presença de 43 % de fibras em base seca, incluindo pectinas. Entre os compostos fenólicos estão a quercetina e cianidina que atuam na redução de formação de coágulos sanguíneos, além de apresentarem ação anti-inflamatória, antioxidante e anticancerígena (LIMA et al., 2015).

O Brasil ocupa a 11ª posição como produtor de maçã (MARIN et al. 2015). A produção de maçã no Brasil em 2012 foi de 38 mil toneladas de fruta, sendo a região sul responsável por 99 % da produção (IBGE, 2012). O resíduo agroindustrial proveniente do processamento da maçã corresponde a 94,5 % de cascas e polpas, 4,4 % de sementes e 1,1 % de centros. O adequado processamento do bagaço (desidratação) pode contribuir para a utilização dessa matéria-prima como fonte de pectinas, considerado produto de alto valor agregado (COELHO; WOSIACKI, 2011).

A banana (*Musa paradisiaca L*) representa a quarta fonte de energia depois de milho, arroz e trigo. Apresenta alta concentração de amido, proteína e minerais, como potássio, fósforo, magnésio, cobre, manganês e zinco, sendo um importante componente na alimentação no mundo (BORGES et al., 2009). De acordo com Ramos et al (2009), apenas um fruto pode suprir cerca de 25 % da ingestão diária recomendada de ácido ascórbico e fornecer quantidades

significativas de vitamina A e B, potássio e sódio, enquanto que a banana verde apresenta alto teor de amido (55 a 93 % do teor de sólidos totais).

Os frutos verdes da banana são ricos em flavonóides e amido resistente que ao serem consumidos, podem atuar na proteção da mucosa gástrica e como fibra alimentar, respectivamente (RAMOS et al., 2009). A polpa da banana verde apresenta uma forte adstringência devido à presença de compostos fenólicos solúveis, como os taninos. Ao amadurecer, ocorre polimerização desses compostos e diminuição da adstringência, aumento da doçura e redução da acidez. As farinhas de bananas, consideradas alimentos funcionais, podem ser obtidas por secagem natural ou artificial da banana verde ou semiverde. Quando processadas podem ser utilizadas na produção de pães e alimentos infantis (BORGES et al., 2009).

Segundo Schneeman (1998), a natureza química dos componentes das fibras é importante para a compreensão do seu papel no funcionamento do trato gastrointestinal e seu benefício relacionado à saúde. Essas características estão apresentadas na Tabela 2.

As recomendações de inclusão de fibra alimentar na dieta variam de acordo com a idade, o sexo e o consumo energético, sendo a quantidade adequada em torno de 14 g de fibra para cada 1.000 kcal ingeridas. Assim, uma ingestão adequada de fibras para homens e mulheres com idades entre 19 e 50 anos representa 38 g/dia e 25 g/dia, respectivamente (INSTITUTO DE MEDICINA, 2005). Dhingra, Michael e Raiput (2012) sugerem o consumo entre 20 g/dia e 35 g/dia de fibra alimentar para adultos saudáveis.

Estudos revelam que o consumo adequado de fibras pode reduzir o risco do desenvolvimento de doenças como arterial coronariana, acidente vascular cerebral, hipertensão arterial, diabetes mellitus, desordens gastrointestinais, como também atuar na melhoria dos níveis dos lipídeos séricos, no funcionamento do sistema imune e auxiliar na redução do peso corporal (BERNAUD; RODRIGUES, 2013).

As fibras alimentares não são hidrolisadas e absorvidas no estômago e intestino delgado (BURTON-FREEMAN, 2000). No intestino grosso, as fibras atuam como substratos para a microbiota intestinal (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002). Os carboidratos não digeríveis são possíveis prebióticos, e portanto, benéficos para a saúde dos consumidores (GRIZARD; BARTHOMIEU, 1999).

Tabela 2. Características das fibras e suas funções relacionadas ao trato gastrointestinal.

Características	Mudanças no intestino delgado	Implicações
Capacidade de retenção de água	<ul style="list-style-type: none"> - Aumento do volume da fase aquosa contida no intestino; - Diluição dos compostos. 	-Retarda a digestão e absorção de carboidratos e lipídeos;
Aumento da massa intestinal	<ul style="list-style-type: none"> - Expande a fase sólida; - Afeta a mistura do conteúdo gástrico. 	-Promove absorção de nutrientes no intestino distal;
Aumento da viscosidade	<ul style="list-style-type: none"> - Retarda a entrada do conteúdo gástrico; - Altera a mistura e difusão. 	-Reduz o nível de colesterol e atua no funcionamento da resposta glicêmica;
Absorção de compostos	<ul style="list-style-type: none"> - Aumenta a excreção de ácidos biliares ou outros compostos ligados. 	Reduz o colesterol plasmático.

Fonte: (SCHNEEMAN, 1998).

Anita e Abraham (1997) relataram que as fibras alimentares podem ser classificadas em duas categorias, sendo a primeira insolúvel em água, portanto, com baixa fermentabilidade por micro-organismos, tais como celulose, hemicelulose e lignina. A segunda categoria inclui as fibras solúveis em água e consequentemente apresentam maior fermentabilidade, como exemplo a pectina, gomas e mucilagens. Puupponen-Pimia et al. (2002) relataram que as fibras solúveis geralmente são fermentadas rapidamente, enquanto que as fibras insolúveis são lenta e parcialmente fermentadas. A classificação das fibras alimentares baseadas na sua solubilidade e fermentabilidade estão apresentadas na Tabela 3.

A celulose é um biopolímero resistente e insolúvel em água (NELSON; COX, 2010). É considerado um polissacarídeo linear, constituído por unidades de celobiose unidas entre si por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4), com grau de

polimerização de até 15.000 unidades de D-glicose (KUHAD; SING, 1993). Sua principal função nas plantas é como componente estrutural (GOLDSTEIN, 1981).

Tabela 3. Classificação das fibras alimentares baseados na sua solubilidade/fermentabilidade.

Fibras	Componentes da fibra	Descrição	Fontes
Insolúveis em água com baixa fermentabilidade	Celulose	Componentes estruturais de parede celular de plantas. São insolúveis em condições alcalinas, porém solúveis em condições ácidas.	Legumes, beterrabas e diversos farelos
	Hemicelulose	A hemicelulose contida na parede celular contém ligações glicosídicas tipo β -1.4.	Grãos de cereais
	Lignina	Componente da parede celular, porém não é um carboidrato. É um polímero formado por um complexo fenil-propano, que resiste à degradação bacteriana.	Plantas lenhosas
Solúvel em água, com boa fermentabilidade	Pectina	Componente da parede celular primária, apresentando como componente principal o ácido D-galacturônico. Geralmente formam gel em soluções aquosas.	Frutas, vegetais, legumes, beterraba e batata.
	Gomas	Secretada por células especializadas em locais que sofreram injúrias na planta. Aplicada na indústria farmacêutica e alimentícia	Leguminosas com sementes, (alfarroba), extratos de algas marinhas (carragena e alginato), ou gomas microbianas, (xantana e gelana).
	Mucilagens	Sintetizada por plantas para evitar a dessecação do endosperma das sementes Utilizada na indústria de alimentos como estabilizante.	Os extratos de plantas (goma arábica, goma karaya, goma adraganta)

Fonte: Adaptado de Dhingra, Michael e Raiput (2012).

A hemicelulose é um heteropolímero linear, com ramificações laterais, constituído principalmente por moléculas D-xilose, L-arabinose (pentoses),

glicose, manose, galactose (hexoses) e diferentes radicais de ácidos orgânicos, como ácido acético, glucurônico e galacturônico. Sua estrutura, geralmente unida por ligações glicosídicas do tipo β (1 $\rightarrow$ 4), apresenta grau de polimerização inferior a 200 unidades (KUHAD et al., 1993; SUURNÄKKI et al., 1997; SAHA et al., 2005). Esse heteropolímero pode ser encontrado associado à celulose e à lignina em todas as camadas da parede celular de vegetais, atuando como tecido de reserva e sustentação (FENGEL; WENEGER, 1989). A sua composição e estrutura pode variar de acordo com a espécie vegetal ou com a forma de manejo que o vegetal foi submetido (KUHAD; SINGH, 1993; SAHA, 2003).

A lignina é uma macromolécula polifenólica amorfa, composta principalmente por polímeros de fenil-propano com alto grau de irregularidade, constituída por unidades de *p*-hidroxifenil, guaiacil e siringil, formados pela polimerização de álcool trans-*p*-coumaril, álcool coniferil e álcool trans-sinapil, que proporciona rigidez e baixa reatividade às fibras vegetais (KNAUF; MONIRUZZAMAN, 2004).

Pereira et al. (2013) definiram gomas como substâncias incolores, inodoras, insípidas e não tóxicas, que quando dissolvidas em solventes apropriados podem formar soluções altamente viscosas ou até mesmo géis, sendo constituídas principalmente por polissacarídeos (glicanas) e seus derivados. Segundo os autores, as gomas apresentam diversas aplicações industriais, dependendo das suas propriedades físico-químicas, podem fornecer custos inferiores aos polímeros sintéticos. São frequentemente utilizadas como espessantes, emulsificantes, gelificantes e agentes estabilizantes.

A mucilagem é uma substância gomosa encontrada nos vegetais, constituída por água, pectinas, açúcares e ácidos orgânicos. Esse composto constitui as fibras presentes em cereais, legumes, verduras e frutas. Devido à sua viscosidade, a mucilagem é utilizada como espessante na indústria alimentícia e estabilizante na indústria farmacêutica (FONSECA 2006).

A pectina é uma fibra solúvel, encontrada na parede celular primária de células vegetais, onde atua como elemento estrutural (ENDRESS; FISHER, 2001). Pode ser caracterizada como um polissacarídeo linear, cuja composição varia de acordo com o tipo de planta e as condições submetidas durante o seu isolamento (SRIAMORNSAK, 2003). Como fibra solúvel, em soluções aquosas apresenta alta viscosidade ou pode formar géis. Segundo Fietz e Salgado (1999),

a pectina pode apresentar vários graus de metoxilação e diferentes massas moleculares. Na indústria de alimentos, a pectina é utilizada em compotas, geleias, alimentos congelados e em alimentos de baixa caloria, como gordura e/ou substituto do açúcar (THAKUR; SINGH; HANDA,1997). Pode ser encontrada nas paredes celulares da maioria das plantas, na polpa de maçã e na casca de laranja.

Sendra et al. (2009) avaliaram o efeito de fibras de bagaço de limão e laranja, sobre o crescimento e sobrevivência das bactérias probióticas *Bifidobacterium bifidum* CECT 870, *L. casei* CECT 475 e *L. acidophilus* CECT 903 em leite fermentado, durante 40 dias de armazenamento, a 4°C. Os resultados demonstraram que a presença de fibras cítricas em leites fermentados contribuiu para o crescimento bacteriano e a sobrevivência das bactérias probióticas *L. acidophilus* CECT 903 e *L. casei* CECT 475. Por outro lado, *B. bifidum* CECT 8701 apresentou menor taxa de sobrevivência. Os autores relataram que os leites fermentados enriquecidos com fibras cítricas são potenciais veículos para uma variedade de probióticos comerciais.

A avaliação do efeito da adição de farinhas de maçã, banana e maracujá, subprodutos obtidos de uma fabrica de polpa de frutas, na viabilidade de micro-organismos e na acidificação de iogurtes desnatados foi realizada por Santo et al. (2012). Os experimentos foram realizados a partir de uma co-fermentação contendo uma cultura-mãe constituída por *B. animalis* subsp. *lactis* HN019, *B. animalis* subsp. *lactis* BI04 e *L. acidophilus* L10, durante o período de 28 dias, armazenados a 4°C. As farinhas de maçã, banana e maracujá, demonstraram capacidade de aumentar o conteúdo de ácidos orgânicos de cadeia curta e poli-insaturados dos iogurtes desnatados, em comparação com os respectivos controles. O resultados demonstraram que os subprodutos obtidos do processamento de polpa de maçã, banana e maracujá apresentam potencial para o desenvolvimento de um novo produto de alto valor nutricional, como o iogurtes probióticos.

2.3 Prebióticos

Prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis no intestino delgado, que quando ingeridos, afetam benéficamente o hospedeiro, por

estimularem seletivamente o crescimento e/ou a atividade de um ou um número limitado de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro (GIBSON; ROBERFROID, 1995). De acordo com Saad (2006) os prebióticos podem atuar na inibição da multiplicação de patógenos, proporcionando benefícios adicionais à saúde do hospedeiro. Assim, esses produtos alimentares apresentam grande potencial para manutenção equilibrada da microbiota intestinal, visando a saúde e o bem estar do consumidor (GIBSON et al., 2004a). A definição de prebióticos foi o primeiro passo para a avaliação da importância da interação entre carboidratos e a microbiota intestinal (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002).

Diversos alimentos compostos por oligossacarídeos e polissacarídeos, incluindo fibras dietéticas, foram considerados prebióticos, mas nem todos esses carboidratos são prebióticos (GINSON et al., 2004). Para que um ingrediente alimentar seja classificado como prebiótico, deve obedecer alguns critérios, como ser resistente à digestão, absorção, ser fermentado pela microbiota intestinal, contribuindo seletivamente para a colonização do trato gastrointestinal, como mostrado na Figura 1 (GIBSON. ROBERFROID, 1995).

Figura 1. Critérios para seleção de ingredientes prebióticos

Fonte: Otles (2013).

O efeito biológico do prebiótico depende principalmente da sua influência sobre a composição da microbiota intestinal. Entretanto, alguns efeitos podem ocorrer devido à própria estrutura e pela ação direta do prebiótico, como a inibição da adesão de agentes patogênicos pelo revestimento das células epiteliais gastrointestinais (LAPARRA; SANZ, 2009). Outros possíveis efeitos benéficos dos prebióticos ao hospedeiro incluem o controle do trânsito intestinal, redução do risco de aterosclerose, osteoporose, obesidade, diabetes do tipo 2, câncer, infecções e alergias (LAPARRA; SANZ, 2009).

Alguns polissacarídeos não amiláceos, como celulose, dextrina, pectinas, β -glucanas, ceras e lignina, podem atuar na modulação do tempo do trânsito no intestino. Esses compostos, encontrados em cereais e nozes, são parcialmente susceptíveis à fermentação bacteriana, particularmente *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LAPARRA et al., 2010).

Segundo Alexiou et al (2008), a inulina e a oligofrutose são carboidratos não digeríveis, não sendo hidrolisados ou digeridos no trato gastrointestinal humano. Os galactooligosacarídeos (GOS) e a inulina são os prebióticos mais comumente comercializados na Europa (LAPARRA; SANZ, 2009), caracterizados como fibras dietéticas na maioria dos países (ALEXIOU et al., 2008).

A inulina é uma frutana composta por unidades (2 a 150) de β -D-frutofuranosil, com grau de polimerização igual ou superior a 10 (SAAD, 2006). Esse carboidrato pode ser encontrado naturalmente na cebola, espargos, trigo, alcachofra (LAPARRA; SANZ, 2009). De acordo com Alexiou et al. (2008), o consumo de inulina contribui para a fermentação e a estimulação do crescimento bacteriano, melhorando o funcionamento intestinal. O mecanismo desse efeito está relacionado com o aumento da biomassa bacteriana no cólon, resultando no aumento do bolo fecal e estímulo da contração peristáltica intestinal, aumentando a produção e facilitando a excreção das fezes.

Laparra e Sanz (2009) relataram que a inulina pode atuar na modulação da microbiota intestinal, prevenção da adesão e colonização de patógenos, indução de efeitos anti-inflamatórios, modulação do intestino e regulação de alterações no metabolismo da glicose. A maioria desses efeitos ocorrem devido à sua resistência às enzimas digestivas de mamíferos e a sua capacidade para estimular o crescimento de bactérias benéficas, como *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, no cólon, aumentando a produção de ácidos de cadeia curta. Segundo Alexiou et al.

(2008), a maior parte dos ácidos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) produzidos pelo metabolismo bacteriano, são utilizados rapidamente pela microbiota do cólon ou absorvidos pela mucosa, sendo apenas uma pequena fração excretada nas fezes.

2.4 Probióticos

A palavra “probiótico” é derivada do grego e significa “para a vida” (O’SULLIVAN et al., 1992, HAVENAAR; VELD, 1996). De acordo com Fuller (1989) e O’ Sullivan et al. (1992), a palavra probiótico foi originalmente utilizada por Lilly e Stillwell em 1964, relacionando-a a substâncias produzidas por micro-organismos que estimulam o crescimento de outro micro-organismo. Em 1971, Sperti definiu probióticos como extratos de tecidos que auxiliam no crescimento microbiano. Posteriormente, Parker (1974) descreveu probióticos como sendo organismos e substâncias que contribuem para o equilíbrio da microbiota intestinal. Porém, essa definição foi considerada muito ampla, uma vez que a palavra “substância” poderia incluir suplementos químicos, como antibióticos. Assim, o significado de probióticos foi modificado para “Micro-organismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, melhorando o equilíbrio intestinal” (FULLER, 1989). Entretanto, o conceito aceito internacionalmente define probióticos como micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO, 2001).

Segundo Havenaar e Veld (1996), Elie Metchnikoff (1845-1916) propôs a hipótese da produção de toxinas pela microbiota intestinal, o qual resultaria em uma auto intoxicação. Os tecidos danificados por estas toxinas seriam atacados por macrófagos do sistema imune, e por consequência, aceleraria o processo de envelhecimento do indivíduo. Metchnikoff foi o primeiro a sugerir que o consumo de bactérias ácido lácticas poderia reduzir as reações patológicas provocadas pela presença de micro-organismos da microbiota endógena e aumentaria a expectativa de vida das pessoas. Os autores relataram que as palestras e publicações de Metchnikoff levaram as pessoas a aumentarem o consumo de leite fermentado na Europa e América do Norte durante as duas primeiras décadas do século 20

Elie Metchnikoff recebeu Prêmio Nobel de Medicina no ano de 1908, em reconhecimento ao seu trabalho inovador em imunologia (MENDES; LEITÃO, 2008). A partir desses conhecimentos, a indústria alimentícia cresceu e se desenvolveu em torno da utilização de probióticos na alimentação e suplementos alimentares para humanos e animais (SANDER, 2003).

Entre os micro-organismos com propriedades probióticas estão as bactérias lácticas, como *Lactobacilos*, *Bifidobactérias* e *Enterococos*. Durante as últimas décadas, outras espécies e até leveduras foram descritas como potenciais probióticos (OUWEHAND et al., 2002), como demonstrado na Tabela 4.

Tabela 4. Micro-organismos utilizados em produtos probióticos.

Espécies de <i>Lactobacillus</i>	Espécies de <i>Bifidobacterium</i>	Outros
<i>L. acidophilus</i>	<i>B. adolescentes</i>	<i>Escherichia coli</i>
<i>L. brevis</i>	<i>B. bifidum</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>cremoris</i>
<i>L. casei</i>	<i>B. breve</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>Dextranum</i>
<i>L. crispatus</i>	<i>B. infantis</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i>
<i>L. delbrueckii</i> subsp. <i>Bulgaricus</i>	<i>B. lactis</i>	<i>Propionibacterium bacillus</i>
<i>L. fermentum</i>	<i>B. longum</i>	<i>Saccharomyces boulardii</i>
<i>L. helveticus</i>		<i>Streptococcus lactis</i> subsp. <i>Thermophulus</i>
<i>L. plantarum</i>		
<i>L. paracasei</i>		
<i>L. reuteri</i>		
<i>L. rhamnosus</i>		
<i>L. salivarius</i>		

Fonte: Adaptado de O'Sullivan et al (1992) e Ouwehand et al.(2002).

2.5 Simbióticos

Alimentos que contêm a combinação de prebióticos e probióticos são denominados simbióticos. A palavra simbiótico faz alusão à sinergia, devido a

esse fato, deve ser reservada para prebióticos que favorecem seletivamente o desenvolvimento de probiótico (SCHREZENMEIR; VRESE, 2001).

A prévia adaptação entre o probiótico e o prebiótico antes do consumo pode favorecer a interação entre probiótico e o prebiótico, sendo que em alguns casos pode resultar em vantagens competitivas para o probiótico, se for consumido juntamente com o prebiótico. O efeito simbiótico pode ser direcionado às diferentes regiões alvo do trato gastrointestinal, intestino delgado e grosso (SAAD 2006; PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002)

A avaliação do consumo de *B. lactis*, amido resistente e a combinação de *B. lactis* e amido resistente (simbiótico) no desenvolvimento de câncer colorretal em ratos foi realizada por Leu et al. (2010). Durante 26 semanas um grupo de ratos foi alimentado com amido resistente na concentração de 100 g/Kg de alimento, o segundo grupo foi alimentado com *B. lactis* na concentração de 1% de *B. lactis* liofilizado na concentração celular de 1×10^{11} UFC/g, o terceiro grupo foi alimentado com a combinação de amido resistente e *B. lactis* (simbiótico), nas concentrações de 1% de *B. lactis* liofilizado na concentração celular de 1×10^{11} UFC/g e 100 g/Kg de alimento. Durante o período de tratamento, o câncer colorretal foi induzido por injeções subcutâneas de azoximetano. Os resultados demonstraram que o consumo do simbiótico contribuiu para a redução do desenvolvimento de câncer colorretal (18,3 %), em relação ao controle (53,3 %). Enquanto que o amido resistente como prebiótico demonstrou tendência à proteção contra o câncer colorretal, e o probiótico não apresentou nenhuma proteção (LEU et al., 2010).

Araújo et al. (2010) desenvolveram um queijo tipo cotagge contendo simbiótico, constituído por *Lactobacillus delbrueckii* e inulina. O queijo tipo cotagge foi produzido de acordo com a metodologia patenteada (PI0701749-9). Durante a produção foram adicionados 8 % de inulina e 10^8 UFC/g de *L. delbrueckii*, o queijo foi embalado e armazenado a 5 °C. Os testes de resistência ao trato gastrointestinal *in vitro* foram realizados em valores de pH de 2,5, 3,5 e 7,0, a 37° C, durante 4 h. O pH ácido representou as condições estomacais, enquanto que o pH 7,0 foi selecionado como controle. As amostras foram coletadas a cada 60 minutos para posterior análise. O efeito dos sais biliares foi avaliado nas concentrações de 0 %, 0,5 % e 1,0 %, a 37 °C, durante 4 h. As amostras foram coletadas a cada 30 minutos para posterior análise. Os

resultados demonstraram a redução da viabilidade celular de 10^8 UFC/g para 10^7 UFC/g, após 4h, em pH 2,5. Por outro lado, quando submetido ao pH 3,5, por 4 horas a viabilidade celular não foi alterada. A exposição aos sais biliares reduziu a viabilidade celular para 10^6 UFC/g em ambas as concentrações de 0,5 % e 1,0 %. De acordo com os autores, a resistência do micro-organismo ao baixo pH pode estar relacionada à interação simbiótica entre o *Lactobacillus delbrueckii* e a inulina.

A análise de duas formulações de sorvete funcional, sendo um sabor frutas e outro baunilha foi realizada por Di Criscio et al. (2010). Para cada sabor de sorvete foram produzidas três formulações, sendo a primeira com *Lactobacillus casei*, a segunda com *Lactobacillus rhamnosus* e a terceira sem a adição do probiótico, que foi denominada controle. No sorvete de baunilha foram produzidas formulações mais duas formulações, uma contendo prebiótico (inulina) e outra simbiótico (*L. casei* ou *L. rhamnosus* e inulina). Foram avaliados a viabilidade celular, resistência aos sais biliares e as características sensoriais dos sorvetes, após 16 semanas de armazenamento. Em sorvetes contendo probióticos, após a produção a concentração das bactérias lácticas variou entre 6,5 e 6,9 log UFC/g, essa viabilidade não reduziu significativamente durante o período de armazenamento. Após exposição a 1 % sais biliares, a viabilidade celular reduziu para a faixa de 1,5 e 2,4 log UFC/g. No sorvete contendo prebiótico, foram observados que concentrações de 5 % e 10 % de inulina modificaram a textura do sorvete, enquanto que a concentração de 2,5 % não afetou significativamente o produto. Na produção do sorvete simbiótico foi observada a concentração de 6,5-6,9 log UFC/g após a produção, sendo que não houve redução significativa da viabilidade celular após o período de armazenamento. A exposição a 1 % de sais biliares reduziu a concentração de micro-organismos viáveis para 2, 0-2,6 UFC/g. A presença de inulina (3 %) do sorvete simbiótico não afetou as características sensoriais do produto.

Cardarelli et al (2007) avaliaram o efeito da adição de *Lactobacillus paracasei* subsp LBC 82 e a combinação de *L. paracasei* subsp LBC 82 e inulina (5 %) na produção de mousse de chocolate funcional. Foram avaliados a viabilidade celular, a textura e as características sensoriais durante o período de armazenamento de 28 dias, a 4 °C. A formulação contendo probiótico resultou em

um mousse de chocolate mais consistente, sendo que essa característica foi intensificada na formulação contendo simbiótico. A viabilidade de *L. paracasei* manteve-se constante durante o armazenamento ($\sim 7 \log$ UFC/g), em ambas formulações. Após sete dias de armazenamento não foram verificadas alterações significativas quanto às características sensoriais e textura das duas formulações. Após 14 dias a formulação contendo simbiótico apresentou alterações nas propriedades sensoriais, foram observados elevado sabor, maior intensidade de cor, aroma e textura. Segundo os autores, as alterações nas características sensoriais do produto final ocorreram devido à presença de inulina (CARDARELLI et al., 2007).

2.6 Mecanismo de ação dos micro-organismos probióticos

Segundo Penna et al. (2000), no trato gastrointestinal existem aproximadamente 10^{11} células viáveis/g de conteúdo, constituídos por cerca de 400 espécies diferentes, que conferem funções benéficas para o hospedeiro. A microbiota indígena estabelecida pode inibir a colonização de micro-organismos endógenos, porém, em alguns casos as espécies patogênicas são capazes de colonizar o corpo, como em casos de baixa resistência imunológica do organismo do hospedeiro (HAVENAAR; VELD, 1996). Assim, a administração de micro-organismos probióticos ou prebióticos pode restaurar o equilíbrio das funções gastrointestinais (PENNA et al. 2000).

Além da inibição do crescimento de micro-organismos patogênicos, os probióticos podem contribuir como o aumento da tolerância à lactose, a redução dos níveis de colesterol, a atividade anticarcinogênica e a estimulação do sistema imune (O' SULLIVAN et al., 1992). Os efeitos benéficos relacionados ao consumo de alimentos funcionais estão representados na Figura 2.

De acordo com Salimen et al. (1998), a presença de probióticos na microbiota intestinal impede a adesão de bactérias patogênicas no trato gastrointestinal, influencia a permeabilidade intestinal e estimula o sistema imune. Probióticos podem atuar na síntese de vitaminas, principalmente do complexo B e uma quantidade significativa de vitamina K, porém em quantidades insuficientes para satisfazer as necessidades diárias do corpo (DENIPOTE; TRINDADE; BURINI, 2010).

Estudos tem demonstrado que bactérias lácticas podem inibir o crescimento *in vitro* de diversos agentes patogênicos entéricos, como *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Clostridium perfringens* e *Clostridium difficile* (FIORAMONTI; THEODOROU; BUENO, 2003). Essa inibição pode ocorrer devido à competição por locais de adesão e de nutrientes, denominada exclusão competitiva, e possivelmente, a produção de substâncias antimicrobianas (OUWEHAND et al., 2002).

Figura 2. Benefícios fisiológicos relacionados ao consumo de alimentos funcionais que contém bactérias probióticas.

Fonte: Granato et al. (2010).

Koop-Hoolihan (2001) relata evidências de que bactérias probióticas podem estimular a resposta imune específica e não específica em experimentos *in vitro* e em modelos animais e humanos. Esses efeitos são mediados pela ativação de macrófagos, aumentando os níveis de citocinas, e das células de defesa “Natural Killer” e/ou aumento dos níveis de imunoglobulinas. Segundo Havenaar e Velt (1992), os micro-organismos probióticos podem penetrar na barreira do epitélio intestinal e ativar as células do sistema imune a produzir células *helper* que atuam na ativação dos macrófagos e células supressoras, além de estimular a diferenciação dos linfócitos. Perdigon et al. (1995) relatam que as bactérias probióticas podem atuar na proteção contra infecções entéricas, bem como inibir

o crescimento de carcinoma intestinal pelo aumento da atividade de IgA, células T e macrófagos.

A partir da fermentação as bactérias lácticas produzem ácidos orgânicos de cadeia curta como acetato, propionato, butirato e outros produtos finais de fermentação importantes como lactato, succinato, etanol, valerato e caproato. Alguns gases também podem ser liberados como o hidrogênio, dióxido de carbono e metano. Os compostos produzidos a partir da fermentação reduzem o pH e inibem o crescimento de micro-organismos patogênicos (SALIMEN et al., 1998). De acordo com Cliver e Marth et al. (1990) a inibição de micro-organismos patogênicos pode ser atribuída à presença de ácidos na forma não dissociada, que ao atravessarem a membrana celular, reduzem a sua permeabilidade, inibem a fosforilação oxidativa a partir do sistema de transporte de elétrons e acidificam o conteúdo celular. A adesão do probiótico ao receptor local da mucosa também contribui para a prevenção de patógenos enterotóxicos gram-negativos (NESSER et al, 2000).

Experimentos realizados por Canani et al. (2007) demonstraram que micro-organismos probióticos podem atuar no tratamento de diarreia aguda em crianças. Testes realizados com 571 crianças italianas entre três e 36 meses de idade, mostraram que o consumo de um *pool* de micro-organismos probióticos, contendo *L. delbrueckii var bulgaricus*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *B.bifidum*, ou somente *L. rhamnosus* GG (10^9 UFC/dose) podem reduzir significativamente a duração dos sintomas dessa patologia. Os resultados indicaram que os micro-organismos probióticos utilizados são eficazes na redução da gravidade e na duração da diarreia aguda em crianças.

Segundo Seksik e Marteau (2004), o consumo probióticos reduz a concentração de patógenos intestinais, conseqüentemente contribui para a diminuição da liberação de citocinas pró-inflamatórias e o aumento de citocinas anti-inflamatória, contribuindo com a permeabilidade intestinal.

A intolerância a lactose está relacionada à redução da produção de β -galactosidase. Estudos demonstraram que o consumo de bactérias lácticas pode contribuir para a redução dessa intolerância, pela presença da enzima β -galactosidase presente no metabolismo bacteriano. Após a ingestão, as bactérias lácticas do leite fermentado sofrem lise celular no intestino delgado, liberando a enzima β -galactosidase, que contribui para a hidrólise da lactose. As propriedades

viscosas de leites fermentados, em comparação ao leite puro, proporcionam o retardamento do fluxo intestinal, contribuindo também para a degradação da lactose (OUWEHAND; SALMINEN; ISOLAURI, 2002).

Os alimentos fermentados por bactérias probióticas podem diminuir o nível de colesterol sérico pela redução da sua absorção intestinal e pela presença de colesterol endógeno (HAVENAAR; VELD, 1996). A redução do nível de colesterol sérico está relacionada com a capacidade das bactérias lácticas de desconjugar ácidos biliares pelas enzimas hidrolases de sais biliares (GILLULAND; SPECK, 1977). De acordo com Brown e Goldstein (1979), a desconjugação de sais biliares, impedem a reabsorção pelo organismo do colesterol, sendo assim uma importante via para a sua eliminação.

Testes realizados por Lee et al. (2009) *in vitro* e *in vivo* utilizando ratos, demonstraram que *Bifidobacteria longum* SPM1207 pode reduzir significativamente os níveis de colesterol total e LDL sérico e promover um pequeno aumento do colesterol HDL, como também reduzir as atividades de enzimas que podem causar lesão intestinal. De acordo com os autores, o consumo diário de *Bifidobacterium longum* SPM1207 pode contribuir para a redução dos níveis de colesterol, como também prevenir câncer intestinal e a prisão de ventre.

Quanto ao câncer de cólon, os mecanismos pelos quais as bactérias probióticas podem inibir o seu aparecimento, ainda é pouco esclarecido. Rafter (2003) descreve que não há nenhuma evidência experimental direta relacionada a supressão de câncer em seres humanos, como resultado do consumo de culturas probióticas. Evidências indiretas, baseadas em estudos de laboratório relatam mecanismos pelos quais as bactérias probióticas podem inibir o câncer de cólon. A inibição pode estar relacionada ao estímulo da resposta imune do hospedeiro, degradação de compostos com potencial carcinogênico, alterações quantitativas e qualitativas na microbiota intestinal e produção de compostos antimutagênicos.

2.7 Lactobacilos

Lactobacillus são bactérias gram-positivas, não formadoras de esporos, encontrados em forma de bacilos ou cocobacilos. São bactérias estritamente

fermentativas, aero-tolerantes ou anaeróbicas, acidúricas ou acidofílicas, com necessidades nutricionais que incluem carboidratos, aminoácidos, peptídeos, ésteres de ácidos graxos, sais, derivados de ácidos nucleicos e vitaminas. Podem ser encontradas em plantas, em mucosas de animais, nas fezes e habitats artificiais como efluentes e alimentos em decomposição (HAMMES; VOGEL, 1995).

Lactobacillus acidophilus UFV H2B20 foi isolado na Universidade Federal de Viçosa, MG, por Santos (1984), a partir de fezes de recém nascidos. O sequenciamento genético de *Lactobacillus acidophilus* UFV H2B20 e testes de hibridização DNA-DNA realizados por Magalhães et al. (2008), permitiu a reclassificação dessa espécie, passando a ser denominado *L. delbrueckii* UFV H2B20 (MAGALHÃES et al., 2008). Após o isolamento, vários estudos demonstraram o seu potencial probiótico (NEUMANN et al., 1998; MOURA et al., 2001; FIGUEIREDO et al., 2004; ARAUJO et al., 2010; SANTOS et al., 2011).

Para proporcionar benefício à saúde humana, é necessário que o micro-organismo probiótico apresente algumas características. O micro-organismo deve apresentar boas propriedades tecnológicas para que possa ser cultivado e incorporado em produtos alimentícios sem perder a viabilidade e funcionalidade e não alterar as propriedades sensoriais dos alimentos (PUUPPONEN-PIMIA et al., 2002). Outras características importantes relacionadas ao probiótico são a resistência ao baixo pH e aos sais biliares, adesão à mucosa intestinal, considerada importante para a modulação imune (OUWEHAND et al., 2002). As diferentes condições de pH do trato gastrointestinal, bem como o tempo de transito do alimento podem ser observadas na Figura 3.

Moura et al. (2001) avaliaram a capacidade de inibição do crescimento de *Salmonella entérica* subsp. *enterica* ser. *Typhimurium* por *L. delbrueckii* UFV-H2B20 *in vivo* em ratos comuns e gnotobióticos. Os animais foram tratados com doses diárias de 0,1 mL por via intragastrica contendo 10^9 UFC/mL de *L. delbrueckii* UFV-H2B20. Após sete dias, os animais foram infectados por 0,2 mL de 10^2 e 10^5 UFC/mL de *Salmonella entérica* subsp. *enterica* ser. *Typhimurium* pela veia caudal. Os ratos tratados com o probiótico apresentaram maior tempo de sobrevivência, porém não foi observada a redução do patógeno nas fezes. Desta forma, o efeito protetor de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 pode ter ocorrido pela competição por locais de adesão na mucosa intestinal entre o probiótico e o

micro-organismo patogênico ou pela estimulação da resposta imune não específica.

Figura 3. Trato gastrointestinal e suas características quanto ao pH e tempo de transito intestinal.

	Região	pH	Tempo de transito
O	Esôfago	~7,0	10 a 14 segundos
A	Estômago	1,0 2, 5	~1,3 horas
B	Intestino proximal	6,15 – 7,35	3,2 +/- 1,6 horas
C	Intestino distal	6,80 – 7,88	
D	Cólon Ascendente	5,26 – 6,72	Alta variabilidade, dependente da evacuação do intestino
E	Cólon descentente	5,20 – 7,02	

Fonte: Cook et al. (2012).

Figueiredo et al. (2004) avaliaram a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 em leite não fermentado, visando a obtenção de leite funcional. Os testes foram realizados em diferentes concentrações (10^5 , 10^6 e 10^8 UFC/mL) e temperaturas (6, 8, 10 e 12 °C). Foram determinados a viabilidade das células, pH e concentrações de ácido láctico, ácido acético e galactose. Os melhores resultados foram obtidos com leite esterilizado contendo 10^6 UFC/mL de *L. delbrueckii* UFV H2B20 a 10°C., sendo que essa condição permitiu a manutenção das células viáveis e o pH próximo de 6,5 por um período de 12 dias.

Santos et al. (2011) avaliaram o efeito de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 sobre a infecção por *Listeria monocytogenes* em ratos gnotobióticos com 21 dias de vida. Após a administração oral de *L. monocytogenes* e *L. delbrueckii* UFV-H2B20, foram avaliadas as respostas imunológicas durante o período de 25 dias. A presença de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 estimulou o sistema imune, promoveu a produção de citocinas pró-inflamatórias, óxido nítrico e preveniu a lesão hepática quando comparados ao controle, após cinco dias de infecção.

Leandro et al. (2014) avaliaram cepas de *L. delbrueckii* UFV-H2B20, obtidas a partir de mutação com acridina laranja e etil metanol sulfonato, quanto a tolerância ao congelamento e o efeito de substâncias crioprotetoras como sacarose 32 %, glutamato monossódico 10% e leite desnatado reconstituído a 10%) na sua viabilidade. A utilização dos crioprotetores aumentou a viabilidade do probiótico durante 15 dias de estocagem a -20°C em relação ao controle. Não foram verificadas possíveis alterações nos efeitos probióticos dos mutantes obtidos a partir de *L. delbrueckii* UFV-H2B20.

Leandro et al. (2013) avaliaram a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 em formulações distintas de sorvete, sendo o primeiro livre de gordura, a segunda com baixo teor de gordura e a terceira com alto teor de gordura. Após o armazenamento (40 dias), a -16°C, foram analisadas a viabilidade celular em condições ácidas (pH 3,0, 37°C por 3h) e na presença e ausência de 0,3% de sais biliares. Os resultados demonstraram que após 40 dias de armazenamento, o número de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 nos sorvetes não foi afetado significativamente. Quando o micro-organismo foi exposto ao baixo pH na presença e ausência de sais biliares, a viabilidade celular não apresentou diferenças significativas, quando comparadas ao controle.

2.8 Microencapsulação de bactérias probióticas

Para proporcionar os efeitos benéficos à saúde do hospedeiro, o micro-organismo probiótico deve manter a viabilidade em seu local de ação. Porém, durante a passagem pelo sistema gastrointestinal com baixo pH e elevadas concentrações de sais biliares ocorre uma considerável perda de viabilidade celular dos micro-organismos probióticos (BURGAIN et al., 2011).

A redução da viabilidade celular de micro-organismos probióticos após a passagem pelo sistema gastrointestinal pode ser minimizada pela utilização da técnica de encapsulação em uma matriz polimérica. (COOK et al., 2012). A encapsulação pode ser definida como uma tecnologia de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos, onde o conteúdo encapsulado pode ser liberado em taxas controladas sob influência de condições específicas (ANAL; SINGH, 2007). As cápsulas formadas podem ser classificadas de acordo com o tamanho em três principais categorias, sendo elas as macrocápsulas, quando apresentam tamanho superior a 5000 μm , microcápsulas quando apresentam tamanho entre 0,2 μm a 5000 μm e nanocápsulas quando o tamanho é inferior à 0,2 μm (AZEREDO, 2005).

Gouin (2004) relata que a microencapsulação foi utilizada no passado para mascarar o sabor desagradável de determinados produtos. Entretanto, nas ultimas décadas, a capacidade de liberação controlada dos encapsulados tem sido voltada para melhorar a eficácia de aditivos alimentares e garantir a dosagem ideal, em locais específicos do organismo.

A encapsulação tem como objetivo estabelecer uma barreira seletiva entre o micro-organismo e o ambiente externo, estabilizar o material interno, controlar as reações de oxidação, permitir a liberação controlada ou prolongada dos materiais encapsulados, mascarar sabores, cores ou odores e estender a vida útil (ANAL; INGH, 2007). Essa técnica também protege as células das condições adversas do estômago, mantendo sua integridade até a chegada ao intestino (BRUN-GRAEPPI et al., 2011).

Segundo Azeredo (2005), o processo de encapsulação pode formar microcápsulas ou microesferas. Quando o material encapsulado permanece exposto na superfície da membrana semipermeável, é denominado microesferas. Por outro lado, quando o material encapsulado permanece somente na parte interna da membrana semipermeável, denomina-se microcápsulas.

Quando células são encapsuladas, o processo de encapsulamento isola fisicamente a massa celular do ambiente externo, tendo como finalidade manter a integridade celular no interior de uma barreira com permeabilidade desejada, conforme mostrado na Figura 4 (BRUN-GRAEPPI et al., 2011).

A biocompatibilidade é uma propriedade importante a ser considerada durante a aplicação da técnica de microencapsulação. Essa característica está

relacionada com a interação entre o material utilizado e o metabolismo do hospedeiro e entre o material utilizado e as células encapsuladas. Desta forma, o polímero utilizado não deve apresentar citotoxicidade ou ação antimicrobiana, para que o hospedeiro e os micro-organismos não sejam afetados (COOK et al., 2012).

Figura 4. Representação esquemática de uma microcápsula contendo células encapsuladas.

Fonte: Brun-Graeppi et al. (2011).

Segundo Ebewele (2000), polímeros são definidos quimicamente como moléculas constituídas por diversas unidades estruturais, denominadas monômeros, repetidas ao longo de uma cadeia, cuja origem pode ser natural ou sintética. Quando o polímero apresenta apenas uma única unidade estrutural de repetição, é denominado homopolímero. Por outro lado, quando constituído pela repetição de duas ou mais unidades estruturais ao longo de sua cadeia, é denominado copolímero. Entre os polímeros utilizados na microencapsulação de bactérias estão a gelatina, carregana, amido resistente, alginato e quitosana (BURGAIN et al., 2011; COOK et al., 2012; HUQ et al. 2013).

A gelatina é caracterizada como um material biocompatível e com ausência de toxicidade. Pode ser obtida a partir da hidrólise parcial do colágeno derivado do tecido epitelial, tecido conjuntivo e ossos de animais, como ruminantes e suínos. A composição química da gelatina é formada principalmente por sequências repetitivas de três aminoácidos, sendo eles a glicina, prolina e hidroxiprolina. Outros aminoácidos como glutamina, alanina, arginina, asparagina

e lisina também podem estar presentes na estrutura química (BRUN-GRAEPP, 2011). A gelatina é um gel termorreversível, utilizado em encapsulação de probióticos na forma pura ou combinada com outros compostos, como goma xantana (BURGAIN et al., 2011).

A carregana é um polissacarídeo extraído de algas marinhas, comumente utilizado como aditivo em alimentos. O processo de gelificação de k-carregana depende diretamente da mudança de temperatura, devendo ser utilizado entre 40 e 50 °C. As microcápsulas são formadas a partir do gotejamento do polímero em uma solução contendo potássio, como o cloreto de potássio (MENEZES et al., 2013). As cápsulas formadas são capazes de manter a viabilidade celular, porém são frágeis e não resistem às condições severas.

O amido é formado por dois polissacarídeos, a amilose e amilopectina, ambos constituídos por unidades de glicose unidas por ligações glicosídicas. A amilose é um polímero linear de D-glicopirranose unido por ligações glicosídicas do tipo α (1 $\rightarrow$ 4), enquanto que a amilopectina é um polímero ramificado unido por ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 4) e ramificações com ligações do tipo α (1 $\rightarrow$ 6). O amido resistente é o amido que resiste à hidrólise realizada por enzimas pancreáticas (amilases) no intestino delgado. Desta forma, pode atingir o cólon, local onde será degradado por bactérias intestinais (BURGAIN et al., 2011). Walter et al. (2005) definem amido resistente como uma fração do polímero de amido que não fornecerá glicose ao organismo, mas que será fermentada no intestino grosso para produzir gases e ácidos orgânicos de cadeia curta. Devido a essa característica, o efeito do consumo do amido resistente em alguns casos, é comparado ao consumo de fibras alimentares.

O alginato, um polissacarídeo linear, formado por ligações β -(1 – 4) de ácido-D-manurônico (M) e resíduos de ácido-L-gulurônico (G) unidos por ligações α (1 – 4), derivados de algas marrons (*Macrocystis pyrifera* e *Ascophyllum nodosum*), é considerado um adequado polímero para a microencapsulação bacteriana (Figura 5) (BURGAIN et al., 2011).

Entre suas características podemos destacar as condições de gelificação leve, o grau GRAS (*Generally Recognized As Safe*), e ausência de toxicidade. Devido à presença de grupos de ácido carboxílico em ambos os monômeros, alginato carrega uma carga negativa acima do seu pKa, que ao entrar em contato com metais bivalentes (como cálcio, cádmio ou zinco), forma uma estrutura

conhecida como “caixa de ovo”, retendo células ou moléculas de interesse dentro da estrutura tridimensional formada, conforme demonstrado na Figura 6 (COOK et al., 2012). Esse polímero tem sido amplamente utilizado no encapsulamento de micro-organismos probióticos, devido à sua simplicidade de manipulação, ausência de toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo (BURGAIN et al., 2011).

Figura 5. Estrutura química do alginato.

Fonte: Cook et al. (2012).

Segundo Brun-Graeppi et al. (2011), as propriedades mecânicas das partículas de alginato dependem de vários parâmetros, como o conteúdo de resíduos de ácido-L-gulurônico e a massa molecular das cadeias de alginato. Elevadas concentrações de resíduos de ácido-L-gulurônico proporcionam a formação de um polímero mais resistente, quando comparado à presença de resíduos de ácido D-manurônico. A concentração de alginato e de cátions geleificantes também podem desempenhar um papel importante sobre as propriedades mecânicas das partículas. O cálcio é o cátion amplamente utilizado no processo de gelificação, sendo as partículas de gel de alginato comumente formadas a partir do gotejamento de uma solução de cloreto de cálcio. Por outro lado, as partículas de alginato de cálcio são sensíveis a agentes quelantes, como fosfato e citrato, na presença de sódio e magnésio. Em solução fisiológica, esses compostos podem realizar uma substituição iônica nas cápsulas de alginato,

resultando o aumento da pressão osmótica sobre as partículas, conduzindo inevitavelmente ao aumento do tamanho dos poros, a desestabilização e ruptura do gel.

Figura 6. Formação do gel de alginato de cálcio: (a) homopolímeros de unidades de ácido gulurônico em solução; (b) ligações entre as cadeias homopoliméricas através dos íons cálcio situados entre os grupos com carga negativa; (c) formação da rede de gel com cadeias homopoliméricas unidas através do cálcio.

Fonte: Kawaguti e Sato (2008).

A quitosana é um heteropolímero composto principalmente por unidades repetidas de 2-amino-2-desoxi- β -D-glicopiranosose e uma pequena quantidade de resíduos de 2-acetamido-2-desoxi- β -D-glicopiranosose (HUQ et al., 2013). A quitosana pode ser polymerizada pela formação de ligações cruzadas na presença de ânions e poliânions. Porém, esse polímero não contribui com a manutenção da viabilidade celular em técnicas de encapsulação, sendo preferencialmente utilizado como um revestimento, mas não como principal componente da cápsula. O encapsulamento de bactérias probióticas com alginato e revestimento de

quitosana oferece proteção em testes de fluido gástrico simulado. No entanto, a quitosana apresenta algumas desvantagens, como ação inibitória sobre o crescimento de *Lactobacillus* (BURGAIN et al., 2011).

Muitas tecnologias têm sido propostas para a produção de micropartículas, tais como a gelificação, métodos de emulsão, extrusão, pulverização e secagem de leito fluido. A combinação de dois métodos, também tem sido frequentemente utilizada (BRUN-GRAEPPI et al., 2011). As vantagens e desvantagens dos métodos de microencapsulação são apresentados na Tabela 5.

Em pequena escala, a técnica de extrusão é realizada a partir de uma solução hidrocolóide colocada dentro de uma seringa e em seguida extrudida através da agulha, permitindo que as gotículas formadas ao cair em uma solução com cátions divalentes, formem partículas geleificadas. O tamanho das partículas depende do diâmetro da agulha, do fluxo, viscosidade da solução, altura do gotejamento, concentração do polímero e da temperatura (BRUN-GRAEPPI et al., 2011).

A extrusão é um método simples e de baixo custo, aplicada em condições amenas, que não causa danos às células probióticas, proporcionando alta viabilidade celular nas microcápsulas formadas e não envolve solventes nocivos. A desvantagem deste método é a dificuldade da aplicação em grande escala de produção, devido à lenta formação das microesferas (BURGAIN, et al., 2011).

O método por pulverização ou secagem por atomização é uma tecnologia bem estabelecida, simples e de baixo custo (DZIEZAK, 1988). Segundo Rathore et al. (2013), essa técnica é comumente utilizada para a microencapsulação de probióticos e envolve a atomização de uma suspensão de células microbianas em uma solução polimérica, para posterior secagem com ar quente, seguido de uma rápida evaporação da água. O produto encapsulado final é obtido em estado sólido e desidratado. Entre os parâmetros que afetam a produção dos encapsulados estão a fluxo de alimentação e a temperatura do ar. Altas temperaturas podem afetar a viabilidade celular e modificar a viscosidade do polímero utilizado, comprometendo a pulverização homogênea do polímero.

Menezes et al. (2013) relatam que a técnica de pulverização confere grande perda de viabilidade celular após algumas semanas de armazenamento das microcápsulas formadas. Isso ocorre devido ao estresse imposto pela temperatura de processamento e as mudanças bruscas da fase de secagem, que

em conjunto, causam danos às proteínas de membranas celulares do micro-organismo. Porém, a utilização de termoprotetores antes da secagem, como a trealose, leite desengordurado e prebióticos, podem contribuir com a manutenção da viabilidade celular.

Tabela 5. Vantagens e desvantagens de diferentes métodos utilizados em encapsulamento.

Método	Parâmetros importantes	Vantagens	Desvantagens
Leito fluidizado	Concentração da solução de alimentação, viscosidade, fluxo de ar, temperatura e umidade	Aplicável a uma grande variedade de polímeros	Dificuldade de alcançar revestimento uniforme e completo de pequenas partículas
Extrusão seguido de gelificação	O diâmetro da agulha, taxa de fluxo, viscosidade da solução, concentração do polímero e temperatura	Várias tecnologias têm sido desenvolvidas para diminuir o tamanho, melhorar rendimento e homogeneidade	Limitado a soluções de baixa viscosidade
Pulverização	Entrada de ar, temperatura de saída de ar, concentração da solução de alimentação, solubilidade do polímero e forma de cristalização do polímero	Tecnologia simples e bem estabelecida, custo baixo	Aplicável a uma gama limitada de polímero
Emulsificação seguido de gelificação	Velocidade de agitação, viscosidade da solução, concentração de polímero, temperatura, solubilidade do polímero e solubilidade do agente gelificante	Facilmente aplicado em grande escala	Obtenção de partículas apresentando grandes diâmetros (de centenas de micrômetros para milímetros) com grande distribuição de tamanho

Fonte: (BRUN-GRAEPPI et al., 2011).

Uma emulsão é um sistema de duas fases, constituído por pequenas quantidades de uma substância dispersa em outra (BRUN-GRAEPPI et al., 2011). De acordo com Huq et al. (2013), na técnica de emulsificação utiliza-se um polímero, denominado fase dispersante, contendo um pequeno volume de

células. O polímero é adicionado a um grande volume de óleo vegetal, denominado fase contínua, e homogeneizado por agitação até a formação de uma emulsão (Figura 7). Alguns agentes emulsificantes podem ser utilizados nessa técnica, proporcionando a formação de grânulos com diâmetros menores, devido à diminuição da tensão interfacial entre as duas fases água e óleo. Entre os emulsificantes comumente utilizados estão o Tween 80 e o Lauril Sulfato. As cápsulas são formadas a partir da adição de cloreto de cálcio, que torna o polímero insolúvel em água, devido às ligações cruzadas formadas com o gel. A velocidade da agitação e o tipo emulsificante são fatores determinantes no tamanho da partícula.

Figura 7. Formação de microcápsulas de alginato contendo células probióticas a partir da técnica de emulsificação.

Fonte: Heidebach et al. (2015).

Microcápsulas de leite desnatado reconstituído e inulina, contendo *Bífidobacterium* BB-12, foram adicionados ao iogurte. Foram avaliados a viabilidade do probiótico e o efeito da adição de microcápsulas nas propriedades químicas e reológicas do iogurte, no período de 90 dias de armazenamento, a -18 °C. O micro-organismo encapsulado manteve viabilidade celular durante o período de armazenamento (~7 log UFC/g). As microcápsulas produzidas a partir de inulina apresentaram maior estabilidade. Esse experimento demonstra que a aplicação de probióticos encapsulados contribui para a manutenção da viabilidade das células bacterianas durante o período de armazenamento (PINTO et al., 2012).

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Micro-organismo

Foi utilizada a cepa *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2B20 cedida pelo Departamento de Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa-Viçosa-MG. A cultura foi mantida a 4°C em Agar Man-Rogosa-Sharp (MRS), composto por peptona (10 g/L), extrato de carne (8 g/L), extrato de levedura (4 g/L), glicose (20 g/L), fosfato dipotássio (2 g/L), acetato de sódio trihidratado (5 g/L), citrato triamônico (2 g/L), sulfato de magnésio heptahidratado (0,2 g/L), sulfato de manganês (0,05 g/L), ágar (15 g/L) e Tween 80 (1 mL/L).

Para o desenvolvimento dos ensaios, a referida cepa foi reativada por repique em caldo MRS, esterilizado a 121 °C por 15 min, e incubada a 37 °C por 24h, seguido de centrifugação a 10 000 x g/30 minutos. O sobrenadante foi descartado e o *pellet* ressuspendido em solução salina (0,9 % NaCl). A concentração celular foi determinada após diluições sucessivas desta suspensão de células por *pour plate* em Agar MRS, por incubação a 37 °C por 48 h e o resultado foi expresso em UFC/mL.

3.2 Matrizes poliméricas

Os materiais utilizados como matrizes poliméricas consistiram de alginato de sódio extraído de algas marrons (Sigma – Aldrich), Inulina (Sigma – Aldrich) e farinhas de banana verde, casca de maracujá, bagaço de maçã, feijão branco e bagaço de laranja, obtidas do comércio local, cuja matéria prima é fornecida pela empresa Armazem Santa Filomena, Localizada na cidade de São Paulo – SP (<http://www.armazemsantafilomena.com.br/produto>).

3.3 Microencapsulação *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica de alginato contendo ingredientes prebióticos e fibras funcionais

3.3.1 Preparação de microcápsulas

As microcápsulas foram produzidas pelo método de emulsificação em óleo de soja e gelificação ionotrópica do alginato, de acordo com a metodologia proposta por Rivaldi (2012). Foi acrescido ao alginato as respectivas farinhas de banana verde, maracujá, laranja, maçã e feijão branco, em conformidade com o delineamento experimental constituído de um planejamento fatorial 2^4 completo, conforme representado na Tabela 6. Todos os materiais foram esterilizados a 121 °C por 15 min.

À 100 mL da solução de polímero de alginato previamente solubilizado à 70 °C, nas concentrações de 3,0, 3,5 e 4,0 %, foi adicionado, individualmente, 0,25, 0,50 ou 0,75 g das respectivas farinhas (maracujá, feijão branco, banana verde, maçã ou laranja) e uma suspensão celular contendo até 3×10^9 UFC/mL.

Para a produção das microcápsulas, uma aliquota de 10 mL da referida suspensão polimérica foram gotejados em 100 mL de óleo de soja comestível, contendo Tween 80, nos volumes de 0,1, 0,5 e 0,9 mL.

A mistura foi então homogeneizada (500, 1000 e 1500 rpm) em copo becker de 200 mL com auxílio de um agitador mecânico com rotor tipo impelidor naval, com propulsor de três lâminas, até a formação de uma emulsão. Em seguida, 50 mL de solução de CaCl_2 (2,0%, m/v) foram adicionados rapidamente, pela parede do frasco. A emulsão formada foi transferida para frasco de decantação onde permaneceu em repouso por 20 min para separação das microcápsulas. A fase oleosa foi drenada e as micropartículas lavadas com 500 mL de solução esterilizada de NaCl 1,0%. As microcápsulas foram armazenadas em refrigeração a 4° C para posterior análise.

Tabela 6. Planejamento fatorial 2^4 para avaliação dos fatores envolvidos na formação das microcápsulas.

Planejamento Codificado					Planejamento decodificado			
Ensaio	X ₁	X ₂	X ₃	X ₄	Agitação (rpm)	Tween (mL)	Farinha* (%)	Alginato (%)
1.	-1	-1	-1	-1	500	0,1	0,25	3,0
2.	1	-1	-1	-1	1500	0,1	0,25	3,0
3.	-1	1	-1	-1	500	0,9	0,25	3,0
4.	1	1	-1	-1	1500	0,9	0,25	3,0
5.	-1	-1	1	-1	500	0,1	0,75	3,0
6.	1	-1	1	-1	1500	0,1	0,75	3,0
7.	-1	1	1	-1	500	0,9	0,75	3,0
8.	1	1	1	-1	1500	0,9	0,75	3,0
9.	-1	-1	-1	1	500	0,1	0,25	4,0
10.	1	-1	-1	1	1500	0,1	0,25	4,0
11.	-1	1	-1	1	500	0,9	0,25	4,0
12.	1	1	-1	1	1500	0,9	0,25	4,0
13.	-1	-1	1	1	500	0,1	0,75	4,0
14.	1	-1	1	1	1500	0,1	0,75	4,0
15.	-1	1	1	1	500	0,9	0,75	4,0
16.	1	1	1	1	1500	0,9	0,75	4,0
17.	0	0	0	0	1000	0,5	0,50	3,5
18.	0	0	0	0	1000	0,5	0,50	3,5
19.	0	0	0	0	1000	0,5	0,50	3,5
20.	0	0	0	0	1000	0,5	0,50	3,5

*Farinha de banana verde, maracujá, maçã, feijão branco ou laranja.

3.3.2 Eficiência do encapsulamento

A eficiência de encapsulamento foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Rivaldi (2012). Foi considerada a razão entre a concentração de células viáveis encapsuladas e a concentração inicial de células adicionadas à matriz polimérica para o encapsulamento. Para tanto, 0,1 g de microcápsulas foi solubilizado em tubos contendo 10 mL de citrato de sódio 0,1M, submetidos a agitação em vortex por 5 ciclos de 1 min com intervalos de 1 min entre ciclos.

Alíquotas de 1 mL foram devidamente diluídas e inoculadas em Agar MRS pelo método de *pour plate*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e a população de bactérias expressa em UFC/g de microcápsulas

A eficiência do encapsulamento foi determinada por meio da seguinte fórmula:

$$E (\%) = (N/N_0) \times 100$$

onde:

N: UFC presente em 0,1 g de microcápsula

No: UFC presente em 0,1 g de mistura polimérica antes do encapsulamento

3.3.3 Determinação da morfologia das microcápsulas

A determinação da morfologia das microcápsulas de alginato foi realizada por observação em microscópio óptico (Opton) com aumento de 40 vezes.

3.3.4 Avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em fluido gástrico simulado

A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 na forma livre e encapsulada em alginato e avaliada em solução de fluido gástrico simulado (FGS) contendo 0,9 g/L de cloreto de sódio, 3,0 g/L de pepsina purificada (≥ 400 U/mg, P-7125-SIGMA-ALDRICH) e pH ajustado para 2,00, utilizando ácido clorídrico concentrado, de acordo com o procedimento adaptado de Chavarri et al.(2010).

Em 10 mL de FGS contidos em tubo tipo Falcon, foram adicionados 0,5 g de microcápsulas contendo 10^8 UFC/g de *L. delbrueckii* UFV H2B20 ou 0,2 mL de suspensão de células (3×10^9 UFC/mL). As microcápsulas e as células livres foram incubadas a 37 °C a 50 rpm e amostras de 1 mL foram coletadas nos tempos de 30, 60, 90 e 120 minutos, solubilizadas em tubos contendo 10 mL de citrato de sódio 0,1M e submetidas a agitação em vortex por 5 ciclos de 1 min com intervalos de 1 min entre ciclos.

Alíquotas de 1 mL foram devidamente diluídas e inoculadas em Agar MRS pelo método de *pour plate*, seguido de incubação a 37 °C por 48 h, sendo a população de células expressa em UFC/g ou mL.

3.3.5 Avaliação do efeito da adição de Inulina na matriz polimérica sobre o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20

Após a determinação dos melhores parâmetros para o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 cujas microcápsulas foram devidamente avaliadas na presença de fluido gástrico simulado, novos experimentos foram realizados com vistas a otimizar o processo. Para tanto, avaliou-se o efeito da adição de inulina (5 %) na matriz polimérica contendo alginato (4,0%), acrescida das respectivas farinhas (0,25 e 0,75%) e a cepa probiótica, proveniente de uma suspensão contendo 3×10^9 UFC/mL.

Para a produção das microcápsulas, uma alíquota de 10 mL da suspensão polimérica de alginato contendo inulina, farinhas e células probióticas foi gotejada em 100 mL óleo de soja comestível, contendo Tween 80, (0,1 e 0,9 mL).

A mistura obtida foi devidamente homogeneizada (500 e 1500 rpm) em copo becker de 200 mL com auxílio de um agitador mecânico e rotor tipo impelidor naval, com propulsor de três lâminas, até formação de uma emulsão. Em seguida, adicionou-se, rapidamente, 50 mL de solução de CaCl_2 (2,0%, m/v), pela parede do frasco. A emulsão formada foi transferida para um balão de decantação onde permaneceu em repouso por 20 min para separação das microcápsulas. A fase oleosa foi drenada e as micropartículas lavadas com 500 mL de solução esterilizada de NaCl 1,0%, sendo as cápsulas armazenadas por três dias a 4° C para posterior avaliação da eficiência de encapsulamento viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2B20 na presença de solução de fluido

gástrico simulado (FGS) de acordo com o procedimento adaptado de Chavarri et al. (2010), conforme descrito nos itens 3.3.2 e 3.3.4.

3.3.6 Determinação da viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato durante o armazenamento a 4 °C

A viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado e células livres em tubos Falcon (50 mL) esterilizados, foi avaliada durante o armazenamento à 4 °C. A cada 7 dias, durante 30 dias, foram coletadas amostras de 0,2 g de microcápsulas para determinação da viabilidade celular. Para tanto, as amostras coletadas foram solubilizadas em tubos de ensaio contendo 10 mL de citrato de sódio 0,1M e submetidas a agitação em vortex por 5 ciclos de 1 min com intervalos de 1 min entre ciclos. Alíquotas de 1 mL foram devidamente diluídas e inoculadas em Agar MRS utilizando-se o método de *pour plate*. As placas foram incubadas a 37 °C por 48 h e a população de bactérias expressa em UFC/g de microcápsulas.

3.3.7 Determinação da viabilidade *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato acrescida de substâncias termoprotetoras durante armazenamento a 4 °C

O efeito de substâncias termoprotetoras sobre a viabilidade das células *L. delbrueckii* UFV H2B20 microencapsuladas e armazenadas a 4°C foi determinada em conformidade com a metodologia adaptada de Leandro et al. (2014). Para tanto, em 2 g de microcápsulas acondicionadas em tubos Falcon de 50 mL, foi adicionado 1 mL de solução de sacarose a 32 % (p/v) ou 1 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10 %, sendo o teste controle preparado sem a adição das referidas soluções.

A cada 7 dias, durante 28 dias, foram coletadas amostras de 0,2 g de microcápsulas para determinação da viabilidade celular, conforme metodologia previamente descrita no item 3.3.6.

3.3.8 Determinação da viabilidade *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato acrescida de substâncias termoprotetoras durante armazenamento a - 18 °C

Este teste foi realizado para se avaliar a viabilidade de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica contendo alginato acrescida de substâncias termoprotetoras em sorvete, de acordo com a metodologia adaptada de Leandro et al. (2014). Para tanto, em tubos Falcon de 50 mL foram pesados 4 g de sorvete da marca Kibon ®, sabor creme, acrescido de 0,5 g de microcápsulas contendo 6×10^7 UFC/g de *L. delbrueckii* UFV H2B20 e 2 mL de solução de sacarose a 32 % (p/v) ou 2 mL de leite desnatado reconstituído (LDR) a 10 %. O teste controle consistiu no mesmo procedimento sem a adição das substâncias termoprotetoras. Os sorvetes foram estocados a 4 °C e a cada 7 dias, durante 30 dias, foram coletadas amostras de 0,2 g de microcápsulas para determinação da viabilidade celular, conforme metodologia previamente descrita no item 3.3.6.

3.4 Análise estatística

Os resultados dos experimentos foram analisados estatisticamente por meio do programa *Statistica 5*, considerando o nível de 10% de significância. Os resultados da análise de variância (ANOVA) obtidos, foram analisados qualitativamente e expressos em gráficos de Pareto, visando a avaliação dos efeitos das variáveis sobre as respostas em estudo.

3.5 Fluxograma dos experimentos realizados

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Avaliação da eficiência do encapsulamento em diferentes matrizes poliméricas

A eficiência do encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 pela técnica de emulsificação em diferentes matrizes poliméricas, constituídas por alginato e farinhas de polpa e casca de banana verde, casca de maracujá, feijão branco, bagaço de maçã e bagaço de laranja foram avaliadas utilizando-se a técnica de planejamento fatorial completo 2⁴. Os resultados da eficiência de encapsulamento estão apresentados na Tabela 7.

Os resultados permitem observar que a técnica de emulsificação promoveu alta eficiência no encapsulamento (> 78,4 %) de *L. delbrueckii* UFV H2B20 nos diferentes tipos de matrizes poliméricas. Os melhores resultados foram semelhantes para os cinco tipos de matrizes testadas, variando entre 95 % e 98 %. Por outro lado o encapsulamento realizado em matriz polimérica sem a adição de farinhas (controle), constituída por 3,5 % de alginato, 0,5 mL de Tween 80 e velocidade de agitação de 1000 rpm, apresentou uma eficiência de encapsulamento inferior (84,3 %). Deste modo, a eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matrizes poliméricas de alginato com a adição das diferentes farinhas foi 11% a 14% maior, quando comparada ao controle.

A maior eficiência de encapsulamento (98,6 %) foi observada no resultado obtido a partir das condições propostas no ensaio 15, com 0,75 % de farinha, 4,0 % de alginato, e 0,9 mL de Tween 80, com velocidade de agitação de 500 rpm. A segunda maior eficiência (96,6 %) foi observada em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de maçã, de acordo com as condições propostas no ensaio 13 (4,0 % de alginato, 0,75 % de farinha, em 0,1 mL de Tween 80 e velocidade de agitação de 500 rpm). Os resultados da eficiência de encapsulamento em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde (95,1%), farinha de feijão branco (95,9 %) e farinha de laranja (95,5 %) foram semelhantes, embora tenham sido observados em diferentes condições. Em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde, a maior eficiência foi observada nas condições propostas no ensaio 11, produzida a partir de 0,25 % de farinha, 4,0 % de alginato, em 0,9 mL de Tween 80 e velocidade

Tabela 7. Eficiência de encapsulamento de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 em diferentes condições.

Tratamentos	Parâmetros				Eficiência do encapsulamento (%)				
	Agitação (RPM)	Tween (mL)	Farinha* (%)	Alginato (%)	Farinha de banana verde	Farinha de Maracujá	Farinha de Feijão branco	Farinha de maçã	Farinha de laranja
1.	500	0,1	0,25	3,0	89,6	86,7	93,0	90,4	95,3
2.	1500	0,1	0,25	3,0	89,9	85,3	93,6	91,9	90,5
3.	500	0,9	0,25	3,0	90,8	83,3	95,9	86,2	91,2
4.	1500	0,9	0,25	3,0	88,5	85,2	94,4	95,1	92,9
5.	500	0,1	0,75	3,0	89,7	85,3	95,9	89,1	95,5
6.	1500	0,1	0,75	3,0	87,2	84,6	95,1	88,9	95,0
7.	500	0,9	0,75	3,0	90,8	85,1	95,9	92,7	95,5
8.	1500	0,9	0,75	3,0	87,8	83,0	93,9	90,7	95,6
9.	500	0,1	0,25	4,0	86,7	83,7	93,3	95,1	92,1
10.	1500	0,1	0,25	4,0	84,6	85,9	90,0	95,7	89,9
11.	500	0,9	0,25	4,0	95,1	87,4	95,7	95,2	91,3
12.	1500	0,9	0,25	4,0	87,0	85,9	91,1	95,2	86,5
13.	500	0,1	0,75	4,0	86,3	91,5	93,5	96,6	92,9
14.	1500	0,1	0,75	4,0	87,9	86,8	93,0	87,5	96,5
15.	500	0,9	0,75	4,0	86,9	98,6	93,2	93,3	95,0
16.	1500	0,9	0,75	4,0	87,9	90,1	95,3	95,9	91,2
17.	1000	0,5	0,5	3,5	85,5	87,4	87,6	78,4	85,7
18.	1000	0,5	0,5	3,5	90,5	85,4	88,9	90,4	80,3
19.	1000	0,5	0,5	3,5	87,4	89,5	82,7	82,1	89,9
20.	1000	0,5	0,5	3,5	88,4	80,2	83,8	84,1	86,7

Fonte: Arquivo do autor

de agitação de 500 rpm. Em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de feijão branco, a maior eficiência foi obtida a partir das condições descritas nos ensaios 3 e 7, realizados com 3,0 % de alginato, 0,9 mL de Tween 80, velocidade de agitação de 500 rpm e 0,25 e 0,75 % de farinha, respectivamente. Quando realizado encapsulamento em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de laranja, o melhor valor de eficiência foi obtido a partir das condições propostas no ensaio 14, correspondendo a 4,0 % de alginato, 0,75 % de farinha, 0,1 mL de Tween 80 e velocidade de agitação de 1500 rpm.

As peculiaridades das farinhas de banana verde, maracujá, feijão branco, maçã e laranja e o estudo exploratório relacionado a eficiência de encapsulamento estão discutidos nos itens 4.1.1 a 4.1.5. Esta discussão está aliada às análises qualitativas referentes aos resultados obtidos com o auxílio do planejamento experimental completo 2⁴. Ressalta-se que somente as análises qualitativas foram consideradas, uma vez que nenhuma das variáveis ou interação entre as variáveis estudadas foi significativa ao nível de 10% de significância, para nenhuma das cinco matrizes avaliadas.

Os resultados obtidos neste trabalho são semelhantes aos observados por Mokarram et al. (2009) e Song et al. (2013). Mokarram et al. (2009) realizaram a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 e *Lactobacillus rhamnosus* PTCC1637, pela técnica de emulsificação, utilizando matriz polimérica constituída por alginato na concentração de 1,8 %, e 0,5 % de Tween 80, com velocidade de agitação de 900 rpm, onde foi obtida a eficiência de 99,8 %. Song et al. (2013) obtiveram 80 % de eficiência de encapsulamento da levedura Y235 em matriz polimérica constituída por 1,5 % de alginato, e 0,5 % de Span 85 como emulsificante, com velocidade de agitação de 200 rpm.

Segundo Song et al. (2013), a viabilidade celular após o encapsulamento é um parâmetro de grande importância para a produção de microcápsulas contendo células probióticas. No presente trabalho a alta eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 (> de 78 %), demonstrou que a técnica de emulsificação foi eficiente na produção das microcápsulas e as condições utilizadas nos diferentes ensaios não afetaram a integridade das células.

Desta forma, para a verificação da influencia dos parâmetros avaliados sobre o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20, foi realizada análise de

variância (ANOVA) da eficiência de encapsulamento, obtida a partir das diferentes condições.

4.1.1 Avaliação da eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde

A banana (*Musa paradisiaca* L) é uma fruta que apresenta alto valor nutricional (BORGES et al., 2009). Nos frutos verdes são encontrados flavonóides e amido resistente e, quando consumidos, são capazes de atuar na proteção da mucosa gástrica (RAMOS et al., 2009). O amido resistente tem sido amplamente estudado devido à sua característica prebiótica. Pesquisas têm sido realizadas visando o desenvolvimento de microcápsulas contendo micro-organismos probióticos e amido resistente, a fim de aumentar a sobrevivência das células probiótica durante o armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (HOMAYONI et al., 2008; LEU et al., 2010; CHAVEZ, 2012). O desenvolvimento desses trabalhos motivaram a avaliação da farinha de banana verde e alginato como matriz encapsulante para *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20.

Segundo Haaland (1989), o gráfico de Pareto contribui para o entendimento dos efeitos relativos aos fatores experimentais, independentemente de sua significância estatística. A Figura 8 apresenta os valores referentes à análise comparativa dos efeitos dos fatores sobre a eficiência de encapsulamento em matriz composta por alginato e farinha de banana verde. Os resultados permitem observar que a agitação foi a variável mais significativa, desempenhando um efeito negativo, seguida da variável volume de tween 80, com efeito positivo. Desta forma, baixa velocidade de agitação aliada à alta volume de tween 80, proporcionou melhores resultados de eficiência de encapsulamento.

A velocidade de agitação, assim como a concentração de emulsificante, são fatores determinantes para se estabelecer o diâmetro dos grânulos (HUQ et al., 2013). Segundo Capela et al. (2007), altas velocidades, pressão e o tipo de rotor podem afetar significativamente a viabilidade celular durante o processo de encapsulamento, principalmente devido à presença de forças de cisalhamento que podem promover o rompimento de células probióticas. Segundo Huq et al.

(2013) a presença de agentes emulsificantes diminui a tensão interfacial entre as duas fases água e óleo, além de proporcionar a formação de grânulos com diâmetros menores. Neste contexto, os resultados obtidos a partir da técnica de emulsificação na produção de cápsulas de farinha de banana verde e alginato, com homogeneização em rotor tipo impelidor naval, com propulsor de três lâminas, indicam que as condições experimentais, constituídos de 0,9 mL de Tween 80 e velocidade de agitação de 500 rpm, proporcionaram melhores resultados quanto à eficiência de encapsulamento da cepa probiótica utilizada.

Figura 8. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de banana verde no encapsulamento da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Fonte: Arquivo do autor.

4.1.2 Avaliação da eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de casca maracujá

O maracujá-azedo ou amarelo (*P. edulis* fo. *Flavicarpa*) é caracterizado pela presença de substâncias polifenólicas, ácidos graxos poli-insaturados,

niacina, ferro, cálcio, fósforo e fibras solúveis como a pectina (ZERAÍK et al. (2009). A pectina é um polissacarídeo não amiláceo que pode atuar na modulação do trânsito intestinal, sendo parcialmente susceptível a fermentação bacteriana, particularmente por *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* (LAPARRA et al., 2010). Estudos realizados por Olano-Martin, Gibson e Rastall (2002) demonstraram que a pectina apresenta potencial prebiótico. Neste contexto, a eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica contendo alginato e farinha de maracujá foi estudada.

Os resultados da Figura 9 permitem observar que a variável independente com maior influência sobre a eficiência de encapsulação foi a concentração de alginato (X_3), seguida da interação entre as duas variáveis concentração de farinha de maracujá e de alginato (X_3X_4), ambas com efeito positivo. Portanto a maior concentração de alginato (4,0 %), ou associado à maior concentração de farinha de maracujá (0,75 %), proporcionou maior eficiência de encapsulamento da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20

Figura 9. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de maracujá no encapsulamento da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Fonte: Arquivo do autor.

Os resultados obtidos nesse estudo são similares aos reportados por Chandramouli et al., (2002) e Sacchetin e Moraes (2010). Segundo Chandramouli et al., (2002), a concentração do alginato afeta diretamente a forma e estrutura das microcápsulas produzidas. Altas concentrações de alginato aumentam o número de sítios de ligações do íon cálcio, resultando em um gel mais denso. Sacchetin e Moraes (2010) relataram que baixas concentrações de alginato favorecem a redução do tamanho das partículas e diminuem a resistência mecânica e a estabilidade das microcápsulas em condições encontradas no trato gastrointestinal. No presente trabalho, as maiores concentrações de alginato e farinha de maracujá podem ter favorecido a formação de microcápsulas com estrutura mais resistente, proporcionando maior eficiência de encapsulamento (mínimo de 86,8 %) e proteção ao micro-organismo encapsulado.

4.1.3 Avaliação da eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de feijão branco

O feijão (*Phaseolus vulgaris*) é a principal leguminosa com alto teor de proteínas consumida no Brasil. Seus grãos apresentam entre 20 a 35 % de proteína, dependendo do manejo da cultura e do cultivar (TOLEDO et al. 2008). Quando consumido cru, a digestibilidade do feijão está entre 25 e 60 %, e apresenta em sua composição polifenóis, fitatos e pectina (DONADEL; PRUDENCIO-FERREIRA 2010), sendo que diversas variedades de feijão podem atuar como alimentos funcionais (PEREIRA et al., 2011). As características nutricionais e a presença de pectina motivaram o estudo da farinha de feijão branco como matriz encapsulante de *L. delbrueckii* UFV H2B20.

A Figura 10 mostra que as variáveis concentração de alginato e velocidade de agitação exerceram maior influência sobre a eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de feijão branco, quando comparadas com as demais variáveis e suas respectivas interações. Uma vez que o efeito destas variáveis foi negativo, o ideal é que estejam fixadas no nível baixo (3,0 % de alginato e

velocidade de agitação de 500 rpm), com o intuito de aumentar a eficiência do encapsulamento.

Figura 10. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80 alginato e farinha de feijão branco sobre o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20

Fonte: Arquivo do autor.

Os resultados demonstram que altas velocidades de agitação e concentração de alginato podem promover baixos valores de eficiência de encapsulamento, em matriz polimérica constituída por farinha de feijão branco e alginato. Assim, melhores resultados podem ser obtidos com 3,0 % de alginato e velocidade de agitação de 500 rpm sobre o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20.

4.1.4 Avaliação da eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de bagaço de maçã

A maçã (*Malus domestica*) é caracterizada pela presença de substâncias pécicas, proteínas, dextrinas, amidos insolúveis e compostos fenólicos

(DEMIATE et al., 2003), sendo observado altas concentração de pectina, principalmente na casca (FERTONANI et al., 2006), característica que contribuiu para a escolha da farinha de maçã como parte constituinte da matriz encapsulante da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Na Figura 11, observa-se que a concentração de alginato (X_4) foi a variável mais influente sobre a eficiência de encapsulamento, e exerceu um efeito positivo, indicando que a maior concentração de alginato (4,0 %) proporciona melhor eficiência de encapsulamento. A variável agitação apresentou a menor influência no processo, também exercendo um efeito positivo (melhor condição 1500 rpm). Em contrapartida, a interação entre as variáveis agitação e concentração de alginato exerceu influencia na eficiência de encapsulamento, apresentando um efeito negativo, indicando que matriz polimérica constituída por 3,0 % de alginato, aliada à velocidade de agitação de 500 rpm, proporcionam melhor eficiência de encapsulamento.

Figura 11. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80, alginato e farinha de maçã no encapsulamento da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20

Fonte: Arquivo do autor.

4.1.5 Avaliação da eficiência de encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de bagaço_de laranja

A laranja (*Citrus sinensis*) está entre as frutas mais produzidas e consumidas no mundo (ALEXANDRINO et al., 2007). No Brasil, o Estado de São Paulo é considerado o maior produtor de laranja (IBGE, 2015), que apresenta altas concentrações de pectina (23,6%) (BORTILUZZI; MARANGONI, 2006), podendo, portanto, ser utilizada como ingrediente prebiótico. Desta forma, a farinha de laranja foi avaliada como ingrediente da matriz encapsulante para formação de microcápsulas contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20.

De acordo com o gráfico de Pareto mostrado na Figura 12, a concentração de farinha de laranja foi a variável mais significativa na eficiência de encapsulamento, apresentando efeito positivo, indicando que maior concentração de farinha (0,75 %) proporciona melhor eficiência de encapsulamento. Por outro lado a variável concentração de alginato e agitação, a segunda e terceira variável mais significativa, exerceram efeito negativo no processo (3,0 % de alginato e velocidade de agitação de 500 rpm). Com excessão a interação entre as variáveis agitação e farinha de laranja, observa-se que as demais interações exerceram uma influência muito baixa no processo.

Os resultados apresentados na Tabela 7 permitem notar que as diferentes condições avaliadas para produção de microcápsulas constituídas por matriz polimérica de alginato e farinhas de banana verde, maracujá, feijão branco, maçã e laranja, mostraram diferentes comportamentos quanto à eficiência do encapsulamento. Desta forma, estudos posteriores visando a otimização das condições avaliadas, poderão contribuir para a obtenção de microcápsulas de alginato contendo farinhas funcionais, com maiores eficiências de encapsulamento.

Figura 12. Gráfico de Pareto representando o efeito das variáveis independentes agitação, volume de tween 80 alginato e farinha de laranja no encapsulamento da bactéria *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Fonte: Arquivo do autor.

4.2 Avaliação da população das células viáveis microencapsuladas em diferentes condições

A Tabela 8 mostra a concentração de células viáveis após o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em diferentes matrizes poliméricas. Observa-se que as concentrações celulares nas microcápsulas constituídas por alginato e farinhas de banana verde e feijão branco foram maiores que 8 log UFC/g após o microencapsulação, enquanto que nos ensaios utilizando farinha de maracujá, maçã e laranja, a concentração celular foi maior que 7 log UFC/g.

A concentração mínima de bactérias probióticas em alimentos para proporcionar benefícios ao hospedeiro tem sido considerada 10^8 - 10^9 UFC/g de produto. Segundo Boylston et al (2004), essa concentração pode ser obtida a partir do consumo diário de 100 g de um produto que contenha 10 % de

Tabela 8. População de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em microcápsulas produzidas a partir de matriz polimérica contendo alginato e diferentes farinhas.

Tratamentos	Parâmetros				Células viáveis (log UFC/g)				
	Agitação (RPM)	Tween (mL)	Farinha* (%)	Alginato (%)	Farinha de banana verde	Farinha de Maracujá	Farinha de Feijão branco	Farinha de maçã	Farinha de laranja
1.	500	0,1	0,25	3,0	8,3	8,5	8,6	8,6	9,3
2.	1500	0,1	0,25	3,0	8,3	8,4	8,7	8,7	8,8
3.	500	0,9	0,25	3,0	8,4	8,2	8,9	8,2	8,9
4.	1500	0,9	0,25	3,0	8,2	8,4	8,8	9,2	9,1
5.	500	0,1	0,75	3,0	8,3	8,3	9,1	8,6	9,3
6.	1500	0,1	0,75	3,0	8,1	8,2	9,1	8,6	9,2
7.	500	0,9	0,75	3,0	8,4	8,3	9,0	9,0	9,3
8.	1500	0,9	0,75	3,0	8,2	8,0	8,8	8,8	9,1
9.	500	0,1	0,25	4,0	8,2	8,1	8,5	9,4	8,9
10.	1500	0,1	0,25	4,0	8,0	8,3	8,2	9,5	8,7
11.	500	0,9	0,25	4,0	9,0	8,5	8,9	9,3	8,9
12.	1500	0,9	0,25	4,0	8,2	8,3	8,3	9,3	8,4
13.	500	0,1	0,75	4,0	8,2	8,5	9,3	9,0	8,8
14.	1500	0,1	0,75	4,0	8,3	8,1	9,3	8,1	9,1
15.	500	0,9	0,75	4,0	8,2	9,2	9,3	9,0	9,0
16.	1500	0,9	0,75	4,0	8,3	8,4	9,0	8,9	8,6
17.	1000	0,5	0,5	3,5	8,1	8,5	8,6	7,7	8,0
18.	1000	0,5	0,5	3,5	8,6	8,3	8,7	8,9	7,5
19.	1000	0,5	0,5	3,5	8,3	8,7	8,1	8,1	8,4
20.	1000	0,5	0,5	3,5	8,4	7,8	8,2	8,3	8,1

Fonte: Arquivo do autor.

microcápsulas. Portanto, a concentração celular obtida nas condições de encapsulamento avaliadas, contendo no mínimo 7,5 log UFC/g atendem ao preconizado na legislação brasileira.

4.3 Avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em diferentes matrizes poliméricas e submetido ao fluido gástrico simulado

Para se observar os efeitos benéficos no hospedeiro, o micro-organismo probiótico deve ser capaz de sobreviver à exposição ao fluido gástrico intestinal de seres humanos e atingir o intestino grosso em quantidades elevadas o suficiente para que ocorra sua colonização e proliferação (LI et al. 2011). Neste contexto, a técnica de microencapsulação pode promover proteção contra as condições adversas encontradas no trato gastrointestinal.

O efeito de proteção conferido pela microcápsula é atribuído à criação de uma barreira física, que é atingido por meio da formação de um microambiente para as células probióticas em uma matriz polimérica (HEIDEBACH; FORST; KULOZIK, 2009). Assim, o objetivo dessa etapa foi avaliar a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica constituída por alginato e diferentes farinhas funcionais, após a exposição as condições simuladas do trato gastrointestinal.

4.3.1 Avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de banana verde submetido ao fluido gástrico simulado

Os resultados da avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulada em matriz polimérica contendo farinha de banana verde e alginato, após a exposição ao fluido gástrico simulado (FGS), encontram-se na Tabela 9.

Os dados permitem observar que após 30 minutos de exposição ao FGS, a cepa probiótica encapsulada nas diferentes condições descritas nos ensaios 3 a 6 e 8 a 20 apresentou resistência, com taxa de sobrevivência média de 60,5 % (> Log 8 UFC/g). Após 60 minutos de exposição, *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado nas condições propostas pelos ensaios 3, 4, 6, 8 a 13 e 16 apresentou taxa de sobrevivência acima de 0,0004 %, (~Log 4 UFC/g), enquanto

Tabela 9. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde produzidas em diferentes condições, e submetidas ao fluido gástrico simulado (FGS), em diferentes tempos de incubação.

Tratamentos	Parâmetros				Células viáveis								
	Agitação (RPM)	Tween (mL)	Farinha* (%)	Alginato (%)	Tempo inicial	30 min		60 min		90 min		120 min	
					log UFC/g	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)
1.	500	0,1	0,25	3,0	8,2	0	0	0	0	0	0	0	0
2.	1500	0,1	0,25	3,0	8,3	0	0	0	0	0	0	0	0
3.	500	0,9	0,25	3,0	8,3	8,0	41,66	4,3	0,008	0	0	0	0
4.	1500	0,9	0,25	3,0	8,4	8,1	93,33	4,9	0,053	0	0	0	0
5.	500	0,1	0,75	3,0	8,3	8,2	77,20	0	0	0	0	0	0
6.	1500	0,1	0,75	3,0	8,6	8,0	76,92	4,6	0,030	0	0	0	0
7.	500	0,9	0,75	3,0	8,4	0	0	0	0	0	0	0	0
8.	1500	0,9	0,75	3,0	8,3	8,0	62,50	4,6	0,026	0	0	0	0
9.	500	0,1	0,25	4,0	8,2	8,1	75,00	4,1	0,025	3,4	0,0010	2,3	0,00012
10.	1500	0,1	0,25	4,0	8,4	8,0	37,03	4,3	0,007	0	0	0	0
11.	500	0,9	0,25	4,0	9,0	8,2	18,00	4,6	0,004	3,6	0,0004	2,3	0,00002
12.	1500	0,9	0,25	4,0	8,3	8,1	70,00	4,3	0,010	3,3	0,0010	0	0
13.	500	0,1	0,75	4,0	8,2	8,1	94,44	4,3	0,013	3,1	0,0009	0	0
14.	1500	0,1	0,75	4,0	8,4	8,3	74,07	0	0	0	0	0	0
15.	500	0,9	0,75	4,0	8,2	8,2	94,11	0	0	0	0	0	0
16.	1500	0,9	0,75	4,0	8,3	8,2	80,95	4,5	0,019	3,9	0,0038	0	0
17.	1000	0,5	0,5	3,5	8,4	8,1	92,30	0	0	0	0	0	0
18.	1000	0,5	0,5	3,5	8,5	8,2	80,00	0	0	0	0	0	0
19.	1000	0,5	0,5	3,5	8,3	8,1	60,00	0	0	0	0	0	0
20.	1000	0,5	0,5	3,5	8,1	8,1	83,33	0	0	0	0	0	0

S*: Porcentagem de sobrevivência com relação ao valor real de UFC/g.

Fonte: Arquivo do autor.

que nas demais condições avaliadas, não foi detectado sobrevivência do micro-organismo. Após 90 minutos de exposição ao FGS, *L. delbrueckii* UFV H2B20 demonstrou resistência apenas quando encapsulado nas condições propostas pelos ensaios 9, 11, 12, 13 e 16, com sobrevivência mínima de 0,0004 % (Log 3,1 UFC/g). Após 120 minutos, *L. delbrueckii* UFVH2B20 encapsulado apenas nas condições dos ensaios 9 e 11 apresentou resistência ao FGS, com sobrevivência mínima de 0,00002%, que corresponde à Log de 2,3 UFC/g.

De acordo com Cook et al (2012), após a ingestão, a célula probiótica encapsulado passa rapidamente pelo esôfago (10-14 segundos) e atinge o estômago, onde ocorre maior perda da viabilidade celular devido aos baixos valores de pH. Os valores de pH e o tempo de transito no estômago é muito variável entre os indivíduos, dependendo de fatores como intervalo entre as refeições e a idade. O pH estomacal tem sido relatado entre 1,0 e 2,5, enquanto que o tempo de esvaziamento gástrico é altamente variável, variando entre 5 e 120 minutos. Corá et al. (2006), relataram que o tempo de esvaziamento gástrico pode variar entre 30 a 130 minutos, enquanto que Schwarz et al. (2002) descreveram que o tempo médio de esvaziamento gástrico em humanos ocorre em 30 minutos.

Ao considerar o tempo de esvaziamento gástrico de 30 minutos, as microcápsulas constituídas por matriz polimérica contendo alginato, farinha de banana verde e *L. delbrueckii* UFV H2B20, produzidas em diferentes condições, apresentaram resistência ao FGS, com sobrevivência média de 60,5 %. Estes resultados demonstram que as diferentes condições de encapsulamento avaliadas promoveram a formação de microcápsulas com efeito protetor à cepa probiótica.

4.3.2 Avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de casca de maracujá submetido ao fluido gástrico simulado

A sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica constituídas por alginato e farinha de maracujá, produzidas de acordo com as condições propostas pelo planejamento fatorial 2⁴ completo, após a exposição ao FGS, é mostrada na Tabela 10.

Tabela 10. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de maracujá produzidas em diferentes condições, e submetidas ao fluido gástrico simulado (FGS), em diferentes tempos de incubação.

Tratamentos	Parâmetros				Células viáveis								
	Agitação (RPM)	Tween (mL)	Farinha* (%)	Alginato (%)	Tempo inicial	30 min		60 min		90 min		120 min	
					log UFC/g	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)
1.	500	0,1	0,25	3,0	8,5	6,6	1,17	0	0	0	0	0	0
2.	1500	0,1	0,25	3,0	8,4	8,1	52,0	0	0	0	0	0	0
3.	500	0,9	0,25	3,0	8,2	7,7	34,3	0	0	0	0	0	0
4.	1500	0,9	0,25	3,0	8,4	7,3	7,9	0	0	0	0	0	0
5.	500	0,1	0,75	3,0	8,3	7,9	46,3	0	0	0	0	0	0
6.	1500	0,1	0,75	3,0	8,2	7,9	58,1	4,6	0,025	0	0	0	0
7.	500	0,9	0,75	3,0	8,2	8,1	77,7	0	0	0	0	0	0
8.	1500	0,9	0,75	3,0	8,1	8,0	61,8	4,3	0,018	0	0	0	0
9.	500	0,1	0,25	4,0	8,1	7,9	66,9	4,3	0,015	0	0	0	0
10.	1500	0,1	0,25	4,0	8,3	8,1	66,6	4,3	0,009	0	0	0	0
11.	500	0,9	0,25	4,0	8,4	8,1	46,6	0	0	0	0	0	0
12.	1500	0,9	0,25	4,0	8,3	7,4	12,3	0	0	0	0	0	0
13.	500	0,1	0,75	4,0	8,5	7,8	20,6	0	0	0	0	0	0
14.	1500	0,1	0,75	4,0	8,2	7,8	56,6	4,5	0,029	3,6	0,0033	2,6	0,0003
15.	500	0,9	0,75	4,0	9,2	8,0	73,3	0	0	0	0	0	0
16.	1500	0,9	0,75	4,0	8,4	8,2	62,5	4,7	0,025	3,3	0,0008	0	0
17.	1000	0,5	0,5	3,5	8,5	8,0	33,3	0	0	0	0	0	0
18.	1000	0,5	0,5	3,5	8,3	7,9	37,6	0	0	0	0	0	0
19.	1000	0,5	0,5	3,5	8,1	7,7	11,2	0	0	0	0	0	0
20.	1000	0,5	0,5	3,5	8,2	7,5	58,3	0	0	0	0	0	0

S*: Porcentagem de sobrevivência com relação ao valor real de UFC/g.

Fonte: Arquivo do autor.

Nota-se que após 30 minutos de exposição ao FGS, *L. delbrueckii* UFV H2B20 apresentou média de resistência de todas as condições de encapsulamento de 41,0 % ($> \text{Log } 7 \text{ UFC/g}$), com a maior porcentagem de sobrevivência no resultado obtido a partir das condições de encapsulamento do ensaio 7, com 77,7 % de sobrevivência, enquanto que a menor porcentagem de sobrevivência (1,12 %) foi obtida nas condições propostas pelo ensaio 1. Após 60 minutos de exposição, somente nas condições de encapsulamento descritas nos ensaios 6, 8, 9, 10 14 e 16 foi verificada a sobrevivência mínima de 0,015 % de *L. delbrueckii* UFV H2B20, com Log de $> 4,3 \text{ UFC/g}$, enquanto que a cepa probiótica encapsulada nas demais condições não resistiu ao FGS. Após 90 minutos de exposição ao FGS, *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado nas condições dos ensaios 14 e 16 apresentaram taxa de sobrevivência de 0,0033 % e 0,0008 %, que correspondem à Log de 3,6 e 3,3 UFC/g, respectivamente, sendo que as demais condições de encapsulamento não protegeram a cepa probiótica. Após 120 minutos de exposição ao FGS, apenas na condição de encapsulamento descrito no ensaio 14 foi detectada a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20, correspondente a 0,0003 % de células viáveis (log 2,6 UFC/g).

De acordo com Corá et al. (2006) e Schwarz et al. (2002) o tempo de esvaziamento gástrico pode ocorrer em 30 minutos, portanto no presente trabalho, as microcápsulas constituídas por diferentes concentrações de alginato e farinha de maracujá, agitação e volume de tween, apresentaram efeito protetor à cepa probiótica, promovendo a sobrevivência média de 41 % de *L. delbrueckii* UFV H2B20 após 30 minutos de exposição ao FGS.

Nas microcápsulas produzidas a partir de alginato e farinha de banana verde, os dados da Tabela 9 permitem observar que a cepa probiótica encapsulada nas condições propostas pelos ensaios 9, 11, 12, 13 e 16 apresentou resistência celular após 90 minutos de exposição ao FGS (sobrevivência $> 0,0001\%$). Enquanto que *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica constituída por alginato e farinha de maracujá (Tabela 10), as condições propostas pelos ensaios 14 e 16 proporcionaram resistência (sobrevivência $> 0,0008 \%$) a *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Os ensaios 9, 11, 12, 13, 14 e 16, constituídos por matriz polimérica de alginato e farinha de banana verde e maracujá, que permitiu uma sobrevivência mínima de 0,0001%, após 90 minutos de exposição ao FGS, foram produzidos a

partir de 4,0 % de alginato, fato que pode ter favorecido a resistência ao FGS, uma vez que altas concentrações de alginato aumentam o número de sítios de ligação ao íon cálcio, resultando em um gel mais denso (CHANDRAMOULI et al., 2004). Por outro lado, *L. delbrueckii* UFV encapsulado nas condições dos ensaios 1 a 8, e 17 a 20, a partir das respectivas matrizes poliméricas constituídas por 3,0 e 3,5 % de alginato, não resistiram após 90 minutos de exposição ao FGS. Essa redução do número de células pode estar relacionada com a menor concentração de alginato observada nesses ensaios, que pode ter influenciado negativamente na resistência mecânica das microcápsulas, afetando consequentemente a estabilidade em condições gastrointestinais (SACCHETIN; MORAES, 2010).

4.3.3 Avaliação da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica de alginato e farinha de feijão branco, bagaço de maçã e bagaço de laranja e submetido ao fluido gástrico simulado

Ao avaliar a resistência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinha de feijão branco, maçã e laranja, produzidas em diferentes condições, de acordo com o planejamento 2⁴ completo, não foi observada a presença de células viáveis após a exposição de 30 minutos ao FGS. Essa redução total das células viáveis demonstra que as condições aplicadas para a produção das respectivas microcápsulas, não contribuíram para a formação de um ambiente com efeito protetor para o micro-organismo probiótico.

A avaliação de sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em diferentes matrizes poliméricas, após a exposição ao FGS, obtida no presente trabalho foi inferior aos resultados reportados por Ding e Shah (2009), Sultana et al. (2000), Kim et al., (2009), Li et al., (2010) e Chavarri et al. (2010). Experimentos realizados por Ding e Shah (2009) demonstraram a sobrevivência de 70 % das células de *L. rhamnosus*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracase* após 30 minutos de exposição ao FGS. A sobrevivência de 55 % das células foi observada após 60 minutos, enquanto que em 90 e 120 minutos a sobrevivência foi de 45 e 35 %, respectivamente. Kim et al. (2008) relataram sobrevivência de 85 % das células de *L. acidophilus* ATCC 43121, contidas em microcápsulas de alginato, após a exposição ao FGS por 60 minutos. Após 120

minutos foi observada a sobrevivência de aproximadamente 65 % das células. Experimentos realizados por Li et al. (2010) demonstraram que a exposição de *L. casei*, encapsuladas em matriz polimérica de alginato e alginato com quitosana, ao FGS, não afetou acentuadamente a viabilidade celular após 120 minutos, com taxa de sobrevivência acima de 90 %. A exposição de *B. bifidum*, e *L. gasseri*, encapsuladas em matriz polimérica contendo alginato ao FGS, por 120 minutos, proporcionou a sobrevivência de 85 % de células (CHAVARRI et al. (2010).

Sandoval-Castilha et al. (2010) relataram que o alginato pode formar complexos com a pectina, melhorando a estabilidade química das microcápsulas e consequentemente a eficácia do encapsulamento. Entretanto, a interação entre alginato e pectina presente nas farinhas de maçã, feijão branco e laranja no presente trabalho, não favoreceu a estabilidade química das microcápsulas contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20 quando submetidas ao FGS. Esta observação pode ter contribuído para eliminação total de células viáveis após 30 minutos de exposição ao FGS, quando comparado aos resultados obtidos com farinhas de banana verde e maracujá.

Ao avaliar a sobrevivência de células livres de *L. delbrueckii* UFV H2B20 expostas ao FGS, observou-se a eliminação total de células viáveis após 30 minutos de exposição, ressaltando o caráter protetor das microcápsulas. Resultados semelhantes foram obtidos por Ding e Shah (2009), Chavarri et al. (2010) e Li et al. (2010). A exposição de *L. rhamnosus*, *B. longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* BI-O4, e *B. lactis* Bi-07 por 30, minutos ao FGS, resultou na sobrevivência de 90 % das células, enquanto que após 120 minutos de exposição a sobrevivência das células foi de aproximadamente 30 % células (DING; SHAH, 2009). Por outro lado, não houve sobrevivência de células livres de *L. gasseri* e *B. bifidum* após a exposição ao FGS por 60 e 120 minutos, respectivamente, conforme relatado por Chavarri et al. (2010). Estes estudos indicam que a sobrevivência de cepas probióticas após a exposição ao FGS, depende não somente da matriz encapsulante, como também da espécie de micro-organismo avaliada. No presente trabalho, os resultados demonstraram que *L. delbrueckii* UFV H2B20 é uma bactéria sensível ao FGS.

Nos ensaios realizados com as diferentes matrizes encapsulantes, foram observados diferentes graus de proteção sobre as células probióticas.

Microcápsulas constituídas por matriz polimérica contendo farinha de banana verde e maracujá promoveram proteção à cepa probiótica após 30 minutos de exposição ao FGS, proporcionando sobrevivência média de 60,5 % e 41 %, respectivamente, enquanto que as matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinha de feijão branco, maçã laranja, e as células livres, não sobreviveram ao FGS. Os resultados sugerem que as farinhas de banana verde e maracujá podem constituir a matriz polimérica de microcápsulas de alginato, proporcionando efeito protetor ao micro-organismo probiótico.

4.4 Caracterização morfológica das microcápsulas contendo L. delbrueckii UFV H2B20

As microcápsulas produzidas a partir das condições estabelecidas nos ensaios 9, 11, 12, 13 e 16, constituídas por matriz encapsulante de alginato e farinha de banana verde, bem como as microcápsulas obtidas a partir das condições propostas pelos ensaios 14 e 16, constituídas por alginato e farinha de maracujá e que apresentaram sobrevivência após 90 minutos ($> 0,004$ %) de exposição ao FGS (Tabela 9 e 10), foram selecionadas para avaliação quanto à morfologia e manutenção da viabilidade celular após período de armazenamento a 4° C e – 18°C.

As microcápsulas constituídas por alginato e farinha de banana verde e maracujá, caracterizadas morfológicamente, estão apresentadas na Figura 13. Os resultados permitem observar microcápsulas com formatos esféricos ou ovais. Características morfológicas semelhantes foram observadas por Song et al. (2013), onde as microcápsulas de alginato e quitosana foram produzidas pela técnica de emulsificação e gelificação com adição de cloreto de cálcio. Segundo os autores, o formato desigual das cápsulas pode ocorrer pela adição e distribuição desuniforme de cloreto de cálcio. Sultana et al. (2000) observaram a formação de microcápsulas com formatos esféricos e elípticos, em alginato e amido resistente, produzidas pela técnica de emulsificação.

Dentre os parâmetros que podem afetar a forma e o tamanho das microcápsulas produzidas por emulsão estão a concentração do alginato, agente gelificante, tipo de equipamento usado na formação da emulsão, taxa de agitação

Figura 13. Morfologia das microcápsulas contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20, obtidos a partir das condições propostas pelos ensaios 9 (a), 11 (b), 12 (c), 13 (d) e 16 (e) realizados com alginato e farinha de banana verde e dos ensaios 14 (f) e 16 (g e H) realizados com alginato e farinha de maracujá, observados em microscópio óptico com aumento de 40 vezes.

Fonte: Arquivo do autor.

empregada, temperatura, tipo e concentração do agente emulsificante e a proporção entre a fase aquosa e não aquosa (SACCHETIN et al., 2010). A Figura 13 apresenta as microcápsulas 13A, 13B e 13D que representam aquelas microcápsulas produzidas a partir das condições propostas pelos ensaios 9, 11 e 13 respectivamente, com velocidade de agitação de 500 rpm, e as microcápsulas representadas nas 13C e 13E, produzidas a partir das condições propostas pelos ensaios 12 e 16, com velocidade de agitação de 1500 rpm, utilizando farinha de banana verde. As Figuras 13F e 13G/13H, correspondem as microcápsulas produzidas a partir das condições propostas pelos ensaios 14 e 16 contendo alginato e farinha de maracujá, produzidos sob velocidade de agitação de 1500 rpm.

Os resultados permitem observar que as microcápsulas produzidas sob velocidade de agitação de 1500 rpm (13C, 13E, 13F e 13G) apresentaram formatos distorcidos e desuniformes, comparado as microcápsulas produzidas sob velocidade de agitação de 500 rpm (13A, 13B, 13D). De acordo com Gbassi e Vandamme (2012), a velocidade de agitação é parâmetro importante a ser avaliado, pois afeta o tamanho e a forma das gotículas formadas. Segundo Capela et al. (2007), o tipo de rotor pode afetar significativamente a célula bacteriana, influenciando na viabilidade celular durante o processo de encapsulamento, principalmente devido à presença de forças de cisalhamento que podem promover o rompimento de celular. A alteração na célula bacteriana pode ser melhor observada na Figura 13H, que representa a microcápsula produzida a partir de matriz polimérica constituída por alginato e farinha de maracujá, sob velocidade de agitação de 1500 rpm, obtidos a partir da técnica de emulsificação com homogeneização em rotor tipo impelidor naval, com propulsor de três lâminas, com a formação das microcápsulas com formato alongado.

4.5 Avaliação do efeito da adição de Inulina na matriz polimérica sobre o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20

A inulina é um carboidrato insolúvel, encontrado naturalmente em alguns alimentos como cebola, espargos, trigo, alcachofra e considerado como prebiótico (LAPARRA; SANZ, 2009). O consumo de inulina contribui com a fermentação e a estimulação do crescimento bacteriano, melhorando o funcionamento intestinal

(ALEXIOU et al.,2008). Os benefícios proporcionados pela inulina ao micro-organismo probiótico estimulou o estudo da avaliação da adição desse prebiótico à matriz polimérica constituída por alginato e farinha de banana verde e maracujá, visando melhorar o encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20.

Para a realização do experimento foram selecionadas as microcápsulas que promoveram melhor proteção à cepa probiótica, após 90 minutos de exposição ao FGS. Desta forma foram escolhidos as microcápsulas produzidas a partir das condições estabelecidas nos ensaios 9, 11, 12, 13 e 16 contendo alginato e farinha de banana verde, e aquelas produzidas a partir das condições propostas nos ensaios 14 e 16, contendo alginato e farinha de maracujá. Os resultados da eficiência do encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 nas respectivas matrizes poliméricas, são mostrados na Tabela 11.

Tabela 11. Eficiência de encapsulamento e viabilidade de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 utilizando alginato e farinhas de banana verde e maracujá.

Tratamento	Parâmetros				Encapsulamento			
					Farinha de banana verde		Farinha de maracujá	
	RPM	Tween (mL)	Farinha (%)	Alginato (%)	E (%)	Células viáveis (log UFC/g)	E (%)	Células viáveis (log UFC/g)
9	500	0,1	0,25	4,0	84,3	7,8	-	-
11	500	0,9	0,25	4,0	85,4	7,9	-	-
12	1500	0,9	0,25	4,0	83,2	7,7	-	-
13	500	0,1	0,75	4,0	82,1	7,6	-	-
14	1500	0,1	0,75	4,0	-	-	81,0	7,7
16	1500	0,9	0,75	4,0	87,5	8,1	83,1	7,9

Fonte: Arquivo do autor.

Os resultados permitem observar que a eficiência de encapsulamento das condições avaliadas foi superior a 81 %. Os resultados obtidos destes experimentos foram inferiores aos resultados obtidos inicialmente a partir da

matriz polimérica contendo apenas alginato e farinha de banana verde ou maracujá (> 83 %), sem adição de inulina, apresentados nas Tabelas 7.

Os resultados obtidos no presente trabalho são inferiores aos obtidos por Sultana et al. (2000) que produziram microcápsulas em matriz polimérica contendo 2,0 % de alginato e 2,0 % de amido resistente, pela técnica de emulsificação. Sultana et al. (2000) demonstraram que a eficiência de encapsulamento de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. em matriz polimérica constituída por alginato e amido resistente foi 25 % superior à células encapsuladas com matriz polimérica constituída apenas por alginato. Segundo os autores, a alta eficiência do encapsulamento na presença de prebiótico pode estar relacionada à interação sinérgica entre o micro-organismo probiótico e o prebiótico, que confere proteção a cepa probióticas no processo de encapsulamento, característica que não foi evidenciada no presente trabalho.

Os resultados da avaliação da sobrevivência após a exposição ao FGS de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matriz polimérica constituída por alginato, inulina e farinha de banana verde ou maracujá, são mostrados na Tabela 12.

Nota-se que após a exposição ao FGS por 30 minutos, sobreviveram 0,0583 % e 0,0001 % das células da cepa probiótica presentes nas microcápsulas produzidas a partir de 2,0 % de inulina, 4,0 % de alginato e 0,25 % de farinha de banana verde, com agitação de 500 rpm. As demais condições avaliadas não apresentaram sobrevivência após 30 minutos de exposição ao FGS. Estes resultados demonstraram que a adição da inulina às referidas matrizes poliméricas reduziu o efeito protetor das microcápsulas, quando comparado com os resultados sem a presença de inulina reportados nas Tabelas 9 e 10, que promoveram sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 média de 60,5 % e 41,0 % respectivamente, após 30 minutos de exposição ao FGS.

Os resultados obtidos no presente trabalho são inferiores aos obtidos por Nazzarro et al. (2009), Brinques et al., (2009) e Sandoval-Castilha et al. (2010). Segundo Nazzarro et al. (2009), microcápsulas contendo *L. acidophilus* DSM 20079, produzidas a partir de matriz polimérica constituída por alginato, inulina e xantana, promoveram a sobrevivência de 91,6 % de células, após 180 minutos de exposição ao FGS. O encapsulamento em matriz polimérica contendo 2,0 % de alginato e 2,0 % de pectina, realizado por Brinques e Ayub (2009), promoveu a

sobrevivência de 65 % da viabilidade celular de *L. plantarum* após 120 minutos de exposição ao FGS. Sandoval-Castilha et al (2010) relataram que a exposição de microcápsulas produzidas a partir de matriz polimérica construídas por alginato e pectina, promoveu a sobrevivência de 90 % de células de *L. casei*, após 180 minutos de exposição ao FGS. No presente trabalho, devido à baixa sobrevivência celular após a exposição ao FGS, não foram realizados testes de armazenamento a 4 °C e - 18 °C incorporado em sorvete, com as microcápsulas contendo inulina.

Tabela 12. População de células de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 microencapsuladas em matriz polimérica constituída por alginato, inulina e farinha de banana verde e maracujá, submetidos ao FGS em diferentes tempo de incubação.

Células viáveis									
Tratamento	Tempo inicial	30min		60min		90min		120min	
		log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)	log UFC/g	S* (%)
Farinha de banana verde									
9	7,77	4,54	0,0583	0	0	0	0	0	0
11	7,87	2,00	0,0001	0	0	0	0	0	0
12	7,74	0	0	0	0	0	0	0	0
13	7,65	0	0	0	0	0	0	0	0
16	8,17	0	0	0	0	0	0	0	0
Farinha de Maracujá									
14	7,72	0	0	0	0	0	0	0	0
16	7,84	0	0	0	0	0	0	0	0

*S: Porcentagem de sobrevivência.

Fonte: Arquivo do autor.

4.6 Avaliação da adição de substâncias termoprotetoras com relação a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas de alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá, armazenado a 4°C.

A resistência dos micro-organismos probióticos às condições de armazenagem a baixas temperaturas, representa um fator preponderante para a seleção da matriz encapsulamente, visando assegurar maior viabilidade celular durante o período de estocagem. Diversos agentes crioprotetores podem contribuir com manutenção da viabilidade celular, destacando-se o glicerol (10%), leite desnatado (10 %), inositol (10 %), sacarose (10 - 12 %), rafinose (5 %) e trealose (10 %) conforme preconizadas por Alcarde e Basso (1997). Experimentos realizados por Leandro et al. (2014) demonstraram que a adição de crioprotetores como sacarose 32 %, glutamato monossódico 10% e leite desnatado reconstituído a 10%, podem aumentar a viabilidade de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 durante o período de armazenamento. Os resultados obtidos por Leandro et al (2014) impulsionaram a avaliação da viabilidade celular de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinhas de banana verde e maracujá, acrescidas de substâncias termoprotetoras durante o período de armazenamento. Para tanto, foram produzidas microcápsulas de acordo com as condições estabelecidas nos ensaios 9, 11, 12, 13 e 15 (farinha de banana verde e alginato) e 14 e 16 (farinha de maracujá e alginato), que apresentaram sobrevivência mínima de 0,0001 % e 0,0008 %, respectivamente, após 90 minutos de exposição ao FGS (Tabela 14 e 15).

Os resultados da sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV-H2B20 contido em microcápsulas de alginato e farinha de banana verde e maracujá, armazenado em meio contendo 10 % de leite reconstituído e 32 % de sacarose, após 28 dias de armazenamento a 4°C, são mostrados na Figura 14.

Os resultados permitem observar que após o período de armazenamento, as microcápsulas estocadas sem a adição de crioprotetores apresentaram sobrevivência superior à 89 %. Por outro lado, a adição de leite em pó reconstituído ou sacarose, promoveu uma taxa de sobrevivência acima de 98 %. Os resultados demonstraram que a adição de leite desnatado reconstituído a

Figura 14. População de células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsuladas em matriz polimérica contendo alginato e farinha de banana verde (BV) ou casca de maracujá (MJ), armazenados em temperatura de refrigeração de 4°C (A), contendo leite em pó reconstituído(B) ou sacarose (C).

10 % ou sacarose a 32 % promoveram o aumento de 9 % de células viáveis de *L. delbrueckii* UFV H2B20, após o período de armazenamento.

Os resultados obtidos neste trabalho foram superiores aos obtidos por Hou et al. (2003) e Brinques e Ayub (2009). Hou et al. (2003) verificaram a redução de 15 % das células viáveis de *L. delbrueckii ssp. bulgaricus* após 16 dias de armazenamento, a 4 °C, enquanto que experimentos realizados por Brinques e Ayub (2009) demonstraram a redução de 45 % das células viáveis de *L. plantarum* encapsulado em matriz polimérica contendo 2,0 % de alginato e 2,0 % de pectina, após 38 dias de armazenamento a 4° C.

4.7 Avaliação da adição de substâncias termoprotetoras com relação a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinhas banana verde e casca de maracujá e incorporadas ao sorvete armazenado a -18 °C

A sobrevivência da cepa probiótica encapsulada, durante o período de armazenamento, é um fator fundamental para a promoção do efeito benéfico ao consumidor. Assim, este estudo teve o objetivo de avaliar a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em matrizes poliméricas contendo farinha de banana verde e maracujá, incorporadas em sorvete industrializado, com e sem a presença de substâncias termoprotetoras, produzidas a partir das condições propostas pelo ensaio 9, 11, 13, 14 e 16, e, por 28 dias, à -18 ° C, cujos resultados são mostrados na Figura 15.

Os resultados permitem observar que a sobrevivência *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulados nas respectivas matrizes e incorporados ao sorvete, foi acima de 96,0 %, após 28 dias de armazenamento. Quando leite reconstituído (10,0%) e sacarose (32,0 %) foi adicionado ao sorvete, contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20 encapsulado em microcápsulas de alginato e farinha de banana verde ou maracujá, a taxa de sobrevivência foi detectada acima de 93,0 %, sendo 3,0 % inferior aos resultados obtidos sem a presença de substâncias crioprotetoras.

Os resultados obtidos no presente trabalho são superiores aos observados por Sultana et al. (2000) e Homayouni et al. (1998) e inferiores aos observados por Pinto et al. (2012). Experimentos realizados por Sultana et al. (2000)

Figura 15. População de células de *L. delbrueckii* encapsuladas em matriz polimérica contendo alginato e farinha de banana verde (BV) ou casca de maracujá (MJ) em sorvete, armazenados a -18 °C (A), com leite em pó reconstituído (B) ou sacarose (C).

Fonte: Arquivo do autor.

demonstraram que o armazenamento de *L. acidophilus* 2401 e *B. infantis* 1912, encapsulados em matriz polimérica contendo 2,0 % de alginato, 2,0 % de amido resistente e glicerol como substância termoprotetora, permitiu a sobrevivência de 71,4 % das células. O armazenamento de microcápsulas contendo *L. casei* e *B. lactis*, constituídas por 2,0 % de alginato e 2,0 % de amido resistentes, incorporadas em sorvete e armazenadas a -20 °C, promoveram a sobrevivência Mínima de 85 % das células (HOMAYOUNI, et al., 2008). Por outro lado, experimentos realizados por Pinto et al. (2012), demonstraram que microcápsulas que continham 10 % de leite desnatado reconstituído e 10 % de inulina incorporadas ao iogurte, contribuíram para a manutenção de 100 % de *Bífidobacterium* BB-12, durante o período de armazenamento de 30 dias, a -18 °C.

No presente estudo, a cepa probiótica encapsulada e incorporadas em sorvete contendo substâncias termoprotetoras, apresentaram taxa de sobrevivência 3 % inferior, quando comparado com o armazenamento das microcápsulas nas mesmas condições, porém sem a presença dessas substâncias termoprotetoras, durante o período de armazenamento (28 dias), a -18°C. Desta forma, os resultados demonstraram o baixo efeito protetor de leite desnatado reconstituído (10,0 %) e sacarose (32,0 %) em sorvete contendo *L. delbrueckii* UFV H2B20, encapsulados em microcápsulas de alginato e farinhas de banana verde e maracujá.

5. CONCLUSÕES

O encapsulamento de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em matrizes poliméricas constituídas por alginato e farinhas de banana verde, casca de maracujá, feijão branco, bagaço de maçã e bagaço de laranja pela técnica de emulsificação, apresentou uma eficiência de encapsulamento superior a 78,0 %.

Após 30 minutos de exposição ao fluido gástrico simulado, somente as microcápsulas constituídas por matrizes poliméricas de alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá, apresentaram sobrevivência média de 60,5 % e 41,0% respectivamente.

A adição de inulina à matriz polimérica contendo alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá, não promoveu efeito protetor as células quando expostas ao FGS.

Em condições de armazenagem a 4°C, a sobrevivência das células de *L. delbrueckii* UFV H2B20 microencapsuladas em matriz contendo farinhas de banana verde e casca de maracujá, foi superior a 89,0 %, enquanto que a -18°C, quando incorporadas ao sorvete, foi superior a 96,0 %.

A adição de sacarose ou leite desnatado reconstituído como agentes termoprotetores promoveu aumento de 9 % na sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em microcápsulas de alginato e farinhas de banana verde ou casca de maracujá armazenadas à 4 °C, enquanto que em microcápsulas incorporadas ao sorvete, e armazenadas à -18°C, a presença de substâncias termoprotetoras reduziu a sobrevivência de *L. delbrueckii* UFV H2B20 em 3,0 % em relação ao controle.

As farinhas de banana verde e maracujá são matérias primas promissoras para constituírem matrizes poliméricas contendo alginato e células probióticas, porém novos estudos são necessários para a otimização dos parâmetros de encapsulamento.

6. SUGESTÕES

Avaliar o efeito de diferentes surfactantes na produção de microcápsulas de alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá, contendo micro-organismos probióticos, utilizando a técnica de emulsificação.

Avaliar a adição de diferentes farinhas com propriedades probióticas como constituintes da matriz polimérica na produção de microcápsulas de alginato contendo micro-organismos probióticos.

Otimizar a produção de microcápsulas de alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá pela técnica de emulsificação, por meio de planejamentos fatoriais, utilizando as variáveis volume de surfactante, velocidade de agitação, concentração de alginato e das farinhas de banana verde e casca de maracujá.

Avaliar o armazenamento das microcápsulas contendo células probióticas em diferentes temperaturas por um período de tempo superior a 90 dias.

Realizar análise sensorial de alimentos contendo microcápsulas constituídas de alginato e farinhas de banana verde e casca de maracujá.

REFERÊNCIAS

ALCARDE, A.R.; BASSO, L.C.. Efeito da trealose na manutenção da viabilidade de células de leveduras desidratadas por liofilização. **Scientia Agricola** v.54, p. 189-194, 1997.

ALEXANDRINO, M. A, FARIA, H. G.; SOUZA, C. G. M.; PERALTA, R.. M.; Aproveitamento do resíduo de laranja para a produção de enzimas lignocelulolíticas por *Pleurotus ostreatus* (Jack:Fr). **Ciência e tecnologia de Alimentos**, v. 27, p. 364-368, 2007.

ALEXIOU H.; FRANCK, A. Prebiotic inulin-type fructans: nutritional benefits beyond dietary fibre source, **Nutrition Bulletin**, v. 33, p. 227–233, 2008.

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

ANDERSON, J. W.; BAIRD, PAT.; DAVIS JR, R. D.; FERRERI, S.; KNUDTON, M.; KORAYM, A.; WATERS, V.; WILLIAMS, C. L. Health benefits of dietary fiber. **Nutrition Reviews**, v. 67, p.188–205,2009.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução nº 18. Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, Abril de 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. ANVISA - Agencia Nacional de Vigilância Sanitária. IX- Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. **Diário Oficial da Republica Federativa do Brasil**, Brasília, Julho de 2008

ARAUJO, E. A.; CARVALHO, F. A.; LEANDRO, E. S.; FURTADO, M. M.; MORAES, C. Development of a symbiotic cottage cheese added with *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 and inulin. **Journal of functional food**, v. 2, p. 85-89, 2010.

BERNAUD, F. S. R.; RODRIGUES, T. C. Fibra alimentar – Ingestão adequada e efeitos sobre a saúde do metabolismo. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia e Metabologia**, p. 397, 49-05, 2013.

BORGES, A. M.; PEREIRA, J.; LUCENA, E. M. P. Caracterização da farinha de banana verde. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 333-339, 2009.

BORTOLUZZI, R. C.; MARANGONI, C. Caracterização da fibra dietética obtida da extração do suco de laranja. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v.8, p.61-66, 2006.

BOYLSTON, T. D.; VINDEROLA, C. G.; GHODDUSI, H. B.; REINHEIMER, J. A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v. 24, p. 375-387, 2004.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 103, 123–128, 2011.

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

BURTON-FREEMAN, B. Dietary fiber and energy regulation. IN: SYMPOSIUM: DIETARY COMPOSITION AND OBESITY: DO WE NEED TO LOOK BEYOND DIETARY FAT? 2000, p. 272, 275.

BRUN-GRAEPPI, A. K. A. S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; MERTEN, O.-W. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers, **Journal of Controlled Release**, v. 149, p. 209–224, 2011.

CANANI, R. B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO MI, A. F.; PASSARIELLO, A.; DE MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhoea in children: randomised clinical trial of five different preparations. **BMJ**, v.18, p.335-340, 2007.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Research International**, v.40, p.1261-1269, 2007.

CARDARELLI, H.; ALEGRO, L. C.; ALEGRO, J. H.; CASTRO, I. SAAD, S. Effect of inulin and *Lactobacillus paracasei* on sensory and instrumental texture properties of functional chocolate mousse. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 88, p.1318–1324, 2008.

CARRARA, C. L.; ESTEVES, A. P.; GOMES, T. G.; GUERRA, L. L. Uso da semente de linhaça como nutracêutico para prevenção e tratamento da aterosclerose. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.6, p. 1-9, 2009.

CHANDRAMOULI, V; KAILASAPATHY, K; PEIRIS, P; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. In simulated gastric conditions, **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27-35, 2002.

CHAVARRI, M.; Marañón, I.; Ares, R.; Ibáñez, F. C.; MARZO, F.; Villarán, M. C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185–189, 2010.

COELHO, L. M.; WOSIACKI, G. Avaliação sensorial de produtos panificados com adição de farinha de bagaço de maçã. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 582-588, 2010.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; DIMITRIS, C.; KHUTORVANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56–67, 2012.

DEMIATE, I.; LARA, P. S. B.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Propriedades físicas, químicas e funcionais de amido de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 24, p. 299-306, 2003.

DI CRISCIO, T.; FRATIANNI, I.; 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, 2010.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage, **Journal of food science**, v. 74, p.53-61, 2009.

DZIEZAK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients, **Food Technology**, v. 42, p. 136-151, 1988.

DONADEL, M.E.; PRUDENCIO-FERREIRA, S.H. Propriedades funcionais de concentrado protéico de feijão envelhecido. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.19, p.1-15, 1999.

DENIPOTE, F. G.; TRINDADE, E. B. S. M.; BURIN, R. C. Probiotics and prebiotics in primary care for colon cancer, **Arquivos de gastroenterologia**, v. 47, p. 93-98, 2010.

DHINGRA, D.; MICHAEL, M.; RAJPUT, H.; PATIL, R. T. Dietary fibre in foods: A Review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 49, p. 255-266, 2012.

EBEWELE, R.O. **Polymer science and technology**. Boca Raton: CRC Press, 2000, 483 p.

FENGEL, D.; WENEGER, G. **Wood: chemistry, ultraestructure, reactions**. Berlin: Walter de Gruyter, 1989. 610 p.

FERTONANI, H. C. R.; SCABIO, A.; SCHEMIN, M. H. C.; CARNEIRO, E. B. B.; NOGUEIRA, A.; WOSIACKI, G. Influência da concentração de ácidos no processo de extração e na qualidade de pectina de bagaço de maçã. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 27, p. 599-612, 2006.

FIGUEIREDO, H. M.; PASSOS, F. J. V.; MORAES, C. A.; PASSOS, F. M. L.; TEIXEIRA, M. A.. Produção de leite não-fermentado contendo *Lactobacillus acidophilus* UFV H2b20 isolado no Brasil. Brazilian. **Journal Food and Technology**. n.169, p. 139-144, 2004.

FONSECA, Ellem Waleska Nascimento da Utilização da mucilagem de inhame (*Dioscorea* spp) como melhorador na produção de pão de forma. 79 p. Dissertação (Mestrado em Ciências de Alimentos) – Universidade Federal de Lavras : UFLA, 2006.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, p. 365–378, 1989.

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T. Probiotic Encapsulation technology: from microencapsulation to release into the gut. **Pharmaceutics**, v. 4, p. 149-163, 2012.

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

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

GOLDSTEIN, I. S. **Organic chemicals from biomass**. Boca Raton: CRC Press, 1981, 309 p.

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

GRANATO, D.; BRANCO, G. F.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F.; SHAH, N. P. Probiotic Dairy Products as Functional Foods. Comprehensive Reviews, **Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 455-457, 2010.

GRIZARD, D.; BARTHOMEUF, C. Non-digestible oligosaccharides used as prebiotic agents: mode of production and beneficial effects on animal and human health. **Reprodução e Nutrição**, v. 39, p. 563-588, 1999.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker, 1989.

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.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, M. J.H. Probiotics: a general view. In: WOOD, B.J.B. Lactic acid bacteria in health and disease. **The Lactic Acid Bacteria**, v. 1, p. 151-170, 1992.

HEYMAN, M. MENARD, S. Probiotic microorganisms: how they affect intestinal pathophysiology. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 59, p. 1151–1165, 2002.

HOU, R. C. W.; LIN, M. Y.; WANG, M. M. C.; TZE, 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, p. 424-428, 2003.

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.

HUQ, T.; KHAN, R. A.; RIEDL, B.; LACROIX, M. Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system. Encapsulation of Probiotic Bacteria in Biopolymeric System, **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 909-916, 2013.

IBAÑES, E.; CIFUENTES., A. Benefits of using algae as natural sources of functional ingredients, **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, p. 703–709, 2013.

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

KAWAGUTI, H. Y.; SATO, H. H. Produção de isomaltulose, um substituto da sacarose, utilizando Glicosiltransferase microbiana. **Química Nova**, v. 31, p. 134-143, 2008.

KNAUF, M.; MONIRUZZAMAN, M. Lignocellulosic biomass processing a perspective. **International Sugar Journal**, v. 106, n. 1263, p. 147-156, 2004.

KUHAD, R.C.; SINGH, A. Lignocellulose biotechnology: curent and future prospects. **Critical Reviews in Biotechnology**, v.13, p.151-173, 1993.

LAPARRA, J. M.; SANZ, Y. Interactions of gut microbiota with functional food components and nutraceuticals. **Pharmacological Research**, v. 61, p. 219–225, 2009.

LEANDRO, E. S.; ARAUJO, E. A.; CONÇEIÇÃO, 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.

LEANDRO, E. S.; CONCEIÇÃO, L. L.; CARVALHO, A. F.; COSTA, M. D.; MORAES, C. A. Isolamento de mutantes de *Lactobacillus delbrueckii* UFV H2B20 com tolerância acentuada ao congelamento e efeito de substâncias crioprotetoras na sua viabilidade durante a estocagem. **Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos - CEPPA**, v. 32, n. 1, p. 11-18, 2014.

LEE, D.K.; JANG S.; BAEK EH, K. M.J.; LEE K.S.; SHIN, H.S.; CHUNG, M.J.; KIM, J.E.; LEE, K. O.; HA N, J. Lactic acid bacteria affect serum cholesterol levels, harmful fecal enzyme activity, and fecal water content. **Lipids Health**, v. 8, p. 21-28, 2009.

LEU, R. K. L.; HU, Y.; BROWN, I, L. RICHARD.; WOODMAN, J.;YOUNG, G. Synbiotic intervention of Bifidobacterium lactis and resistant starch protects against colorectal cancer development in rats. **Carcinogenesis**, v..31, p.246–251, 2010.

LI, X. Y.; CHEN, G.; SUN, Z. W.; PARK, H. J.; CHA, D. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in Lactobacillus casei ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479–1485, 2011.

LUJAN, D. L. B.; LEONEL, A. J.; BASSINELLO, P. Z. COSTA, N. M. B. Variedades de feijão e seus efeitos na qualidade protéica, na glicemia e nos lipídios sanguíneos em ratos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 142-149, 2008.

MAKINEN-AAKULA, M. Trends in functional foods dairy market. IN: FUNCTIONAL FOOD NET MEETING. 2006.

MARTEAU P¹, LEPAGE P, MANGIN I, SUAUA A, DORÉ J, POCHART P, SEKSIK P. Review article: gut flora and inflammatory bowel disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v.20, p. 18-23, 2004.

MENEZES, C. R.; BARIN, J. S.; CHICOSKI, A. J.; ZEPKA, L. Q.; JACOB-LOPES, E.; FRIES, L. L. M.; TERRA, N. N. Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v. 43, p. 1309-1316, 2013.

MOKARAM, R. R.; MORTAZAVI, M. B.; NAJAFI, H.; SHAHODO, G. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Research International**, v. 42, p.1040–1045, 2009.

MORAES, F. P.; COLLA, L. M. Alimentos funcionais e nutracêuticos: definições, legislação e benefícios à saúde. **Revista Eletrônica de Farmácia**, v.3, p. 109-122, 2006.

MOURA, L. N.; NEUMANN, E.; VIEIRA, L. Q.; NICOLI, J. R. Protection by *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2B20 against experimental oral Infection with *Salmonella enterica subsp. enterica* ser. *Typhimurium* in Gnotobiotic and conventional mice. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 32, p. 66-69, 2001.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 319-323, 2009.

NELSON, D. L. COX, M. M. **Princípios de bioquímica de Lehninger**. 5. ed. Porto Alegre: Artimed, 2011.

NEUMANN, E.; OLIVEIRA, M.A.P.; CABRAL, C. M.; MOURA, L.N.; NICOLI, J.R.; VIEIRA, E.C; CARA, D. C; PODOPRIGORA, G.I.; VIEIRA, L.Q. Monoassociation with *Lactobacillus acidophilus* UFV-H2b20 stimulates the immune defense mechanisms of germfree mice. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, p. 1565-1573, 1998.

OLANO-MARTIN, E.; GIBSON, G.R.; RASTALL, R.A. Comparison of the in vitro bifidogenic properties of pectins and pectic-oligosaccharides. **Journal of Applied Microbiology**, v. 93, p. 505–511, 2002.

O'SULLIVAN, M. G.; THORNTON, G. C. O'SULLIOVAN, G. C.; COLLINS, J. K. Probiotic bacteria: myth or reality? **Food Science e Technology**, v. 31, p.309-314, 1992.

OUWEHAND, A. C., SALMINEN, S. ISOLAURI, E. Probiotics: an overview of beneficial effects. **Antonie van Leeuwenhoek**, v. 82, p. 279–289, 2002.

PELEGRINE, D. H. G.; ANDRADE, M. S.; NUNES, S. H. Elaboração de geleias a partir de misturas binárias compostas pelas polpas de laranja e acerola. **Ciência e Natura**, v.37, p. 124 – 129, 2015.

PENNA, F. G. C. E. ; LOURES, B. M. ; CARVALHO, A. R. ; PIMENTA, J. R. ; FIGUEIREDO, P. C. P. ; PERET FILHO, L. A. ; PENNA, F. J. ; NICOLI, J. R. ; BARBOSA, F. H. F. ; MORAES, C. A. . Ausência de efeito do *Lactobacillus delbrueckii* H2B20 na prevenção de diarreia em crianças hospitalizadas por curto período. **Pediatrics**, v. 31, p. 76-80, 2009.

PERDIGÓN, G. et al. Immune system stimulation by probiotics. **Journal of Dairy Science**, Savoy, v.78, n.7, p.1597-1606, 1995.

PEREIRA, L. L. S.; SANTOS, C. D.; SATIRO, L. C.; MARCUSSI, S.; PEREIRA, C. A.; SOUZA, S. P. Ação inibitória e estabilidade do extrato de farinha de feijão branco sobre enzimas digestivas na presença de fluido gástrico simulado. **Revista Brasileira de Farmácia**, v. 92, p. 367-372, 2011.

PEREIRA, W. J.; SILVA FILHO, R. R.; PEREIRA JUNIOR, M. A.; BATISTA, K. A.; DI-MEDEIROS, M. C.; FERNANDES, K. F. Uso de goma de angico em substituição ao ágar em meio de cultura. **Revista de Biotecnologia e Ciência**, v. 2, 2013.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; MUNOZ, I. B.; BARRETO, P. L. M.; PRUDENCIO, 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, p. 563–569, 2012.

PUUPPONEN-PIMIA, R.; AURA, A. M.; OKSMAN-CALDENTY, K. M.; SAARELA, MYLLARINEN, P. M. R.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; POUTANEN, K. Development of Functional ingredients for gut health. **Trends in Food Science e Technology**. v. 13 p. 3–11, 2002.

RIVALDI, J.D. **Crescimento e caracterização enzimática de bactérias probióticas em meio contendo glicerol e seu encapsulamento em matriz polimérica natural**. 2012. 170p. Tese (Doutorado em Ciências). Escola de Engenharia de Lorena, Universidade de São Paulo, Lorena, 2012.

SAHA, B.C. Hemicellulose Bioconversion. **Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology**, v.30, p.279-291, 2003.

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

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

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

SACCHETIN, P. S. C.; MORAES, A. M.; LEAL, C. A. G.; FIGUEIREDO, H. C. P. Produção de micropartículas de alginato contendo *Flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Química Nova**, v. 33, p. 263-268, 2010.

SANDERS, M.E. Summary of conclusions from a consensus panel of experts on health attributes of lactic cultures: Significance to fluid milk products containing cultures. **Journal of Dairy Science**, v.76, p.1819-828, 1993.

SCHNEEMAN, B. Dietary fiber and gastrointestinal function. **Nutrition Research**, v. 18, p. 625-632, 1998.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H.S.; ALVAREZ-RAMIREZ, J., - VERNON-CARTER, E.J. Textural properties of alginate-pectin beds and suvivability of entrapped Lb. casei in simulated gastrointesinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v.43, p.111-117, 2010.

SANTO, A. P. E.; PEREGO, P.; CONVERTI, A.; OLIVEIRA, M. Influence of food matrices on probiotic viability: A review focusing on the fruity. **Food Science and Technology**, v. 22, p. 377-385, 2012.

SANTOS, L. M.; SANTOS, M. M.; SILVA, H. P. S.; ARANTES, R. M. E.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, L. Q. Monoassociation with probiotic *Lactobacillus delbrueckii* UFV-H2b20 stimulates the immune system and protects germfree mice against *Listeria monocytogenes* infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 200, p. 29-38, 2011.

SCHREZENMEIR, J.; VRESE, M. Probiotics, prebiotics and synbiotics – approaching a definition. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, p. 361s-364s, 2001.

SENDRA, E.; FAYOS, P.; LARIO, Y.; LOPEZ, J. F.; BARBERA, E. S.; ALVAREZ, J. P. Incorporation of citrus fibers in fermented milk containing probiotic bactéria. **Food Microbiology**, v. 25, p. 13–21, 2008

SIRÓ, I.; KAPOLNA, E.; KAPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance—A review. **Appetite**, v.51, p. 456–467, 2008.

SONG, H.; YUA, C. W.; GAOA, M.; LIU, X.; MA. X. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. **Carbohydrate Polymers**, v. 96, p.181– 189, 2013.

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

SUURNÄKKI, A.; TENKANEN, M.; BUCHERT, J.; VIHKARI, L. Hemicellulases in the Bleaching of Chemical Pulp. In: Scheper. Eds. **Advances in Biochemical Engineering/Biotechnology**, 1997, p. 262-284.

RAMOS, P. D.; LEONEL, M.; LEONEL, S. Amido resistente em farinhas de banana verde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.20, p. 479-483, 2009.

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

RAUD, C. Os alimentos funcionais: a nova fronteira da indústria alimentar análise das estratégias da danone e da nestlé no mercado brasileiro de iogurtes. **Revista de sociologia e política**, v. 16, p. 85-100, 2008.

REZZADORI, K. BENEDETTI, S. Proposições para valorização de resíduos do processamento do suco de laranja. 2nd INTERNATIONAL WORKSHOP | ADVANCES IN CLEANER PRODUCTION, 2009. Disponível em <<http://www.advancesincleanerproduction.net/second/files/sessoes/6a/4/K.%20Rezzadori%20-%20Resumo%20Exp%20-%206A-4.pdf>> Acesso em 18 maio 2015.

RAMOS, D. P.; LEONEL, M.; LEONEL, S. Amido resistente em farinhas de banana verde. **Alimentos e Nutrição Araraquara**, v.20, p. 479-483, 2009.

RIAZ, Q. U. A.; MASUD, T. Recent trends and applications of encapsulating materials for probiotic stability, **Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 231-244, 2011.

RUVIARO, L. NOVELLO, D.; ALMEIDA, J. M.; Quintiliano, d. M. Análise sensorial de sobremesa acrescida a farelo de casca e bagaço de laranja entre universitários de Guarapuava (PR). **Revista Salus**, v.2, p. 41-50, 2008.

TOLEDO, T. C. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S. G.; Avaliação química e nutricional do feijão carioca (*Phaseolus vulgaris* L.) cozido por diferentes métodos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, p. 355-360, 2008.

VIZZOTO, M.; KROLOW, A. C.; TEIXEIRA, F. C. Alimentos funcionais: conceitos básicos. **Embrapa Clima Temperado**, 2010. 20 p.

ZHANG, A., YANG, S. Propionic acid production from glycerol by metabolically engineered *Propionibacterium acidpropionici*. **Process Biochemistry**, v.44, p.1346-1351, 2009.

ZHAO, Y-N.; CHEN, G.; YAO, S-J. Microbial production of 1,3-propanediol from glycerol by encapsulated *Klebsiella pneumoniae*. **Biochemistry Engineering Journal**, v.32, p.93-99, 2006.

ZERAIK, M. L.; PEREIRA, C. A. M.; ZUIN, G. V.; YARIWAKE, J. H. Maracujá: um alimento funcional? **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 20, p. 459-471, 2010.