

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



Dissertação

Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de *spray drying* utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana

Fernanda Weber Bordini

Pelotas, 2019.

Fernanda Weber Bordini

Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de spray drying utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos (área de conhecimento Microbiologia de Alimentos)

Orientadora: Prof. Dra. Simone Pieniz

Coorientador: Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva

Pelotas, 2019.

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

B729m Bordini, Fernanda Weber

Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de spray drying utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana / Fernanda Weber Bordini ; Simone Pieniz, orientadora ; Wladimir Padilha da Silva, coorientador. — Pelotas, 2019.

81 f. : il.

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

1. Atomização. 2. Bactéria ácido láctica. 3. Microcápsula. 4. Probiótico. I. Pieniz, Simone, orient. II. Silva, Wladimir Padilha da, coorient. III. Título.

CDD : 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Fernanda Weber Bordini

Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de *spray drying* utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana

Dissertação apresentada como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas.

Data da defesa: 22/02/2019

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Simone Pieniz (Orientadora)

Doutora em Microbiologia pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS

Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva (Co-orientador)

Doutora em Ciência de Alimentos pela Universidade de São Paulo

Prof.^a Dr.^a Ângela Maria Fiorentini

Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC

Dr.^a Juliana Marques

Doutora em Ciências pela Universidade Federal de Pelotas - UFPel

**Dedico este trabalho a minha família
e aos colegas desta jornada.**

Agradecimentos

À Deus por me conceder força e paz.

Ao meu noivo William Coelho, companheiro diário, detentor dos abraços e palavras necessárias em todos momentos, pelo incentivo e por acreditar em mim incansavelmente.

À minha parceira, colega e grande amiga Michele Rosolen, pela parceria e companhia diária, pelo incentivo e ajuda, por todos momentos convividos.

À minha família, especialmente minha avó (Alda Weber), mãe (Vera Weber) e dinda (Vânia Weber) que sempre me apoiaram e suportaram qualquer crise emocional, e ao meu pequeno afilhado (Davi Ney) que iluminou, alegrou e tornou a caminhada mais leve.

Aos professores Patrícia Diaz de Oliveira, Fabrício Conceição e Ângela Fiorentini, por acreditarem e confiarem neste trabalho.

Aos orientadores Simone Pieniz e Wladimir Padilha, pela oportunidade e pelos ensinamentos repassados.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas (DCTA) pela oportunidade.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento (CNPq) pela bolsa de mestrado concedida.

À todos aqueles que direta ou indiretamente colaboraram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

*“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”*
(Madre Tereza de Calcutá)

Resumo

BORDINI, Fernanda Weber. **Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de *spray drying* utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana.** 2019. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

É crescente a busca por novos alimentos probióticos, como bases lácteas e não-lácteas, com alta taxa de sobrevivência capazes de promover benefícios a saúde do consumidor. Para isto, o isolamento e a caracterização de micro-organismos tem sido amplamente estudado, assim como a busca por tecnologias capazes de armazenar e promover a proteção dessas células em condições adversas e, conseqüentemente, potencializar seus benefícios agregados. Como alternativa se utiliza a microencapsulação por *spray drying*, uma técnica de baixo custo que possibilita tanto a secagem, objetivando preservação, quanto a encapsulação para proteção a condições adversas. Diferentes materiais encapsulantes são utilizados e testados, a exemplo da pectina, do soro de queijo e da goma xantana. O objetivo deste estudo foi investigar o uso de soro de queijo associado a pectina e a xantana como agentes encapsulantes de *Pediococcus pentosaceus* P107 por *spray drying*. Para isto as células de *Pediococcus pentosaceus* P107 foram cultivadas em biorreator de bancada e após adicionadas aos materiais encapsulantes, soro de queijo, pectina e xantana. Todas soluções foram secas pelo equipamento *spray dryer* com temperatura de entrada de 100 °C, saída 68 °C com fluxo de alimentação em 250 mL/h. De acordo com os resultados a técnica eficiente na produção de três diferentes microcápsulas contendo *Pediococcus pentosaceus* P107, as quais promoveram diferentes níveis de proteção as células nos testes de armazenamento, passagem pelo trato gastrointestinal e tratamento térmico. Destaca-se a microcápsula de soro de queijo e xantana (WX) que forneceu proteção as células de *Pediococcus pentosaceus* P107 em alta viabilidade celular, e também melhor estabilidade ao armazenamento em -20 e 4 °C. Na temperatura de 25 °C a microcápsula de soro de queijo (W) e a célula livre apresentaram viabilidade durante o período de 110 dias, sendo encontradas contagens celulares acima do mínimo estabelecido para probióticos (>6 Log UFC.g⁻¹) em alimentos. Já para o teste de resistência térmica a microcápsula de soro de queijo e pectina (WP) se mostrou efetiva na proteção, apresentando alta viabilidade celular no tratamento térmico (72 °C/ 15 seg). Além disso todas microcápsulas apresentaram alta eficiência de encapsulação, acima de 90%. Conclui-se que a técnica e a escolha dos parâmetros foram eficientes na preservação das células de *Pediococcus pentosaceus* P107 e também foi claramente eficiente, em conjunto a escolha dos materiais de parede, em fornecer proteção adicional as células, por meio da microencapsulação, perante aos diferentes testes realizados. Estes resultados sugerem a aplicação deste micro-organismo microencapsulado em uma ampla faixa de temperatura, sendo esta uma característica positiva para o futuro uso deste micro-organismo com potencial probiótico.

Palavras-chave: atomização; bactéria ácido láctica; microcápsula; probiótico;

Abstract

BORDINI, Fernanda Weber. **Microencapsulation and preservation of *Pediococcus pentosaceus* P107 by spray drying technique**. 2019. 81f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

There is a growing search for new probiotic foods, such as dairy and non dairy bases, with a high survival rate capable of promoting health benefits for consumers. For this, the isolation and characterization of microorganisms has been widely studied, as well as the search for technologies able to store and promote the protection of these cells in adverse conditions and, consequently, to potentiate their added benefits. As an alternative microencapsulation is used by spray drying, a low cost technique that allows both drying, aiming preservation, and encapsulation to protect against adverse conditions. Different encapsulating materials are used and tested, such as pectin, whey and xanthan gum. The objective of this study was to investigate the use of pectin associated whey and xanthan as encapsulating agents of *Pediococcus pentosaceus* P107 by spray drying. For this the cells of *Pediococcus pentosaceus* P107 were cultured in bench bioreactor and after addition to the encapsulating materials, whey, pectin and xanthan were added. All solutions were dried by the spray dryer equipment with inlet temperature of 100 ° C, outlet 68 ° C with feed flow in 250 mL / h. According to the results the efficient technique in the production of three different microcapsules containing *Pediococcus pentosaceus* P107, which promoted different levels of protection the cells in the tests of storage, passage through the gastrointestinal tract and heat treatment. Of note is the whey and xanthan (WX) microcapsule that provided protection to *Pediococcus pentosaceus* P107 cells in high cell viability, and also improved storage stability at -20 and 4 ° C. At the temperature of 25 ° C the whey microcapsule (W) and the free cell presented viability during the period of 110 days, being found cell counts above the minimum established for probiotics ($> 6 \text{ Log CFU.g}^{-1}$) in food. As for the thermal resistance test, the microcapsule of whey and pectin (WP) was effective in the protection, presenting high cellular viability in the heat treatment (72 ° C / 15 sec). In addition, all microcapsules showed high encapsulation efficiency, above 90%. It was concluded that the technique and the choice of the parameters were efficient in the preservation of *Pediococcus pentosaceus* P107 cells and it was also clearly efficient, together with the choice of wall materials, to provide additional protection to the cells through microencapsulation, performed. These results suggest the application of this microencapsulated microorganism over a wide temperature range, which is a positive feature for the future use of this microorganism with probiotic potential.

Keywords: atomization; bacteria lactic acid; microcapsule; probiotic;

Lista de Figuras

Figura 1	Processo de secagem por pulverização (<i>spray drying</i>).....	25
Figura 2	Processo de extrusão.....	30
Figura 3	Estrutura química da molécula de pectina.....	32
Figura 4	Unidade estrutural de goma xantana.....	34
Figura 1	Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 livre (a,b), microencapsulado com soro de queijo W (c,d), com soro de queijo e goma xantana WX (e,f), e com soro de queijo e pectina WP (g,h) aos 7 dias de armazenamento a -20 °C.....	47
Figura 2	Viabilidade de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 livre e microencapsulado durante 110 dias de armazenamento nas temperaturas de congelamento, -20 °C, (a), refrigeração, 4 °C, (b) e ambiente, 25 °C, (c).....	54
Figura 3	Viabilidade de microcápsulas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 em até 7 dias de armazenamento a -20 °C durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado. (a) fluido gástrico pH 2,0 por 60 min, (b) fluido gástrico pH 2,5 por 60 min, (c) fluido gástrico pH 3,0 por 60 min, (d) fluido intestinal com 0,5% de sais biliares e sem sais biliares, ambos por 4 h.....	59
Figura 4	Viabilidade de microcápsulas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 com 7 dias de armazenamento a -20 °C durante exposição ao TGI simulado. (a) fluido gástrico pH 2.0 por 30 min, (b) fluido gástrico pH 2.5 por 120 min, (c) fluido gástrico pH 3.0 por 120 min.....	80
Figura 5	Viabilidade de microcápsulas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 com 7 dias de armazenamento a -20 °C durante exposição ao TGI simulado. (a) fluido	

gástrico pH 2.0 por 30 min, (b) fluído gástrico pH 2.5 por 120 min, (c) fluído gástrico
pH 3.0 por 120 min..... 81

Lista de Tabelas

Tabela 1	Características de microcápsulas de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107.....	46
Tabela 2	Teste de rompimento das microcápsulas utilizando diferentes soluções e tempos de análise.....	50
Tabela 3	Viabilidade de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 livre e microencapsulado antes e após <i>spray drying</i>	51
Tabela 4	Viabilidade <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 livre e microencapsulado submetido ao tratamento térmico.....	61

Sumário

1	Introdução.....	15
2	Objetivos.....	17
	2.1 Objetivo Geral.....	17
	2.2 Objetivos Específicos.....	17
3	Revisão da literatura.....	18
	3.1 Bactérias ácido lácticas.....	18
	3.1.1 Probióticos.....	19
	3.1.2 Gênero <i>Pediococcus</i>	19
	3.2 Métodos de preservação de micro-organismos.....	22
	3.2.1 Repique contínuo.....	22
	3.2.2 Congelamento comum e criopreservação.....	22
	3.2.3 Liofilização (<i>freeze drying</i>).....	23
	3.2.4 Secagem por pulverização (<i>spray drying</i>).....	24
	3.3 Métodos de encapsulação.....	26
	3.3.1 Secagem por pulverização (<i>spray drying</i>).....	27
	3.3.2 Extrusão.....	28
	3.3.3 Liofilização (<i>freeze drying</i>).....	29
	3.3.4 Secagem por congelamento (<i>spray freeze drying</i>).....	29
	3.4 Materiais encapsulantes.....	30
	3.4.1 Soro de queijo.....	30
	3.4.2 Pectina.....	31
	3.4.3 Goma xantana.....	32
4	Manuscrito 1 – Microencapsulação e preservação de <i>Pediococcus pentosaceus</i> P107 por <i>spray drying</i> utilizando soro de queijo combinado a pectina e xantana.....	35
5	Considerações finais.....	68
	Referências.....	69
	Apêndices.....	78

1. Introdução

Os probióticos são micro-organismos vivos que quando administrados em quantidade adequadas são capazes de promover benefícios ao hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2001). A maioria dos probióticos pertence ao grupo de bactérias ácido lácticas (BAL), caracterizados por serem Gram-positivo, catalase negativa e geralmente considerados seguros para o uso em alimentos (DORES; SILVA, 2017).

Dentre as BAL com potencial probiótico, *Pediococcus pentosaceus* se destaca por ser uma bactéria encontrada na microbiota natural de mamíferos (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2001), porém já isolado de diversos produtos lácteos como leite, queijos e iogurte, e não lácteos como a exemplo do polén, do sorgo e do bambu fermentados (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; ELENA; MICHELA, 2013; BELHADJ et al., 2014). Esta espécie tem sido muito utilizada como cultura iniciadora e bioconservante de alimentos devido a sua participação na fermentação e também utilizado como suplemento probiótico. Seu potencial probiótico já foi investigado anteriormente e comprovado por alguns estudos (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009; VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017), porém, ainda assim, sua viabilidade pode ser prejudicada durante o armazenamento das células, no processamento do alimento e até mesmo pela passagem no trato gastrointestinal no momento da ingestão do alimento.

A secagem das células microbianas é muito utilizada para manter a viabilidade destas sem a necessidade de reativação constante, reduzindo riscos de contaminações e/ou possíveis mutações. O processo de secagem consiste na desidratação dessa célula, baixando o nível de atividade de água e levando ao processo de anidrobiose, onde a célula permanece com seu metabolismo praticamente inativo até que ocorra a reidratação (BELKIN et al., 2006). Visando proteção, a microencapsulação de probióticos vem sendo aplicada, a fim de promover um “empacotamento” do micro-organismo, protegendo-o de condições adversas, como armazenamento e passagem gastrintestinal (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018).

Uma técnica utilizada tanto para secagem como para microencapsulação é a de *spray drying*, um método amplamente utilizado na indústria de alimentos e de baixo custo. Seu processo baseia-se no contato de uma solução líquida com o ar em altas temperaturas dentro de uma câmara de secagem, promovendo assim a evaporação do solvente e geração do pó. Porém, o uso de altas temperaturas, 120 a 180 °C, pode ser prejudicial a célula bacteriana (MARTÍN et al., 2015; ECKERT, 2017).

Um dos mais importantes fatores que contribuem para eficiência do processo é a escolha do material de parede, que de acordo com os estudos atuais variam de polissacarídeos, proteínas e lipídeos (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; KAVITAKE et al., 2018). Dentre os materiais proteicos destaca-se o soro de queijo, um subproduto lácteo de alto valor nutritivo e baixo custo (ECKERT et al., 2017). A capacidade tamponante de suas proteínas pode por exemplo, retardar o processo de pós acidificação em iogurtes, que é extremamente prejudicial as bactérias ali presentes (KALIN, 2007; SHOKRI et al., 2015).

Outro material de parede utilizado é a pectina, um polissacarídeo abundante em frutos, com capacidade espessante muito utilizado como aditivo na indústria alimentícia e como material de revestimento na indústria farmacêutica. Esta característica associada a sua insolubilidade no trato digestório humano promove proteção a alguns probióticos (GEREZ et al., 2012; MARTÍN et al., 2015). Nessa mesma linha temos a goma xantana, outro polissacarídeo produzido por cepas de *Xanthomonas*, considerado um biopolímero natural (LAGOUEYTE; PAQUIN, 1998). Este material possui capacidade espessante e apresenta resistência a temperatura elevada, bem como alta viscosidade em baixas concentrações, sendo seu uso autorizado como aditivo alimentar pela Food and Drug Administration dos Estados Unidos (FDA) (SANTOS; CASAS; GO, 2000).

A maioria dos alimentos probióticos são de bases lácteas e devem ser armazenados por médio período de tempo (35 dias) sob temperatura de refrigeração, sugerindo a necessidade da busca por novas aplicações destes micro-organismos em diferentes matrizes, possibilitando, o armazenamento a longo prazo, sem necessidade de refrigeração, aumentando assim, a gama de alimentos funcionais não dependentes de refrigeração bem como sua disponibilidade de acesso.

2. Objetivos

2.1 Objetivo Geral

Investigar o uso de soro de queijo associado a pectina e goma xantana como agentes encapsulantes de *Pediococcus pentosaceus* P107 por *spray drying*.

2.2 Objetivos Específicos

- Cultivar *Pediococcus pentosaceus* P107 em condições favoráveis a obtenção de alta viabilidade celular;
- Secar as células livres de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de *spray drying*;
- Microencapsular *Pediococcus pentosaceus* P107 com três diferentes materiais encapsulantes, soro de queijo livre e associado a pectina e goma xantana;
- Avaliar a eficiência de encapsulação, rendimento e redução logarítmica antes e após o processo para as células livres e microencapsuladas;
- Analisar o método de rompimento das microcápsulas com tampão Fosfato-salino (PBS) e solução ácida;
- Avaliar as microcápsulas quanto ao teste de armazenamento por 100 dias nas temperaturas de -20, 4 e 25 °C;
- Avaliar as microcápsulas quanto ao potencial probiótico por meio do trato gastrointestinal simulado;
- Avaliar as microcápsulas quanto ao teste de tratamento térmico;
- Caracterizar as microcápsulas quanto a atividade de água, umidade e morfologia através de microscopia eletrônica de varredura;

3 Revisão da literatura

3.1 Bactérias ácido lácticas

Bactérias ácido lácticas (BAL) são um grupo de micro-organismos Gram positivos, devido a composição da sua parede celular que apresenta uma espessa camada de peptideoglicanos, catalase negativa, ou seja, não apresenta a enzima catalase, a qual promove a quebra do peróxido de hidrogênio em água e oxigênio. Podem ter morfologia de cocos ou bacilos, não são formadores de esporos e são geralmente consideradas seguras para o uso em alimentos (ZHANG; LIN; ZHONG, 2015; DORES; SILVA, 2017).

São pertencentes a este grupo 11 gêneros, *Propionibacterium*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Lactobacillus*, *Streptococcus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Vagococcus*, *Leuconostoc* e *Weissella* (KAVITAKE et al., 2018).

As BAL são assim denominadas, por produzirem o ácido láctico como principal produto de seu metabolismo, a partir da degradação de carboidratos, como por exemplo, a lactose. Podem ser classificadas em homofermentativas, quando produzem apenas o ácido láctico, ou heterofermentativas, quando além do ácido láctico são capazes de produzir outros produtos como ácido acético, dióxido de carbono e etanol (JAY, 2000).

Estes micro-organismos estão presentes na microbiota natural do trato gastrointestinal (TGI), principalmente, no intestino de mamíferos. São capazes de promover benefícios ao hospedeiro. Dentre os benefícios, destaca-se a colonização da microbiota, criando um ambiente de equilíbrio, onde sua adesão a parede intestinal cria uma barreira contra patógenos e também propicia a modulação do sistema imune, além da prevenção ou até mesmo tratamento de algumas doenças, como intolerância a lactose e tumores intestinais (DELCENSERIE et al., 2008; ZHANG; LIN; ZHONG, 2015).

Na indústria de alimentos algumas cepas comerciais de BAL são amplamente utilizadas na fermentação de produtos lácteos, como iogurtes, queijos, leites fermentados entre outros produtos não lácteos como vegetais e embutidos cárneos, promovendo características sensoriais desejáveis e aumento na conservação dos mesmos (DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

Porém, a descoberta de isolados com potencial para aplicação em alimentos, vem sendo muito estudado, pois embora as cepas comerciais apresentem um

padrão de qualidade na fermentação dos produtos, existe uma procura por novas características como texturas, flavor e sabores, que proporcionem novos produtos ou melhora nas características sensoriais dos já existentes, além dos benefícios que podem conferir ao consumidor. Estes benefícios podem ser atribuídos, por exemplo, quanto ao alimento, na produção de exopolissacarídeos que é apreciado para o espessamento de iogurtes, por exemplo. Assim como cepas que apresentem a produção de algum ácido ou gás que contribua para um determinado produto. Além disso, micro-organismos probióticos, produtores de compostos bioativos que promovam benefícios a saúde, prevenindo ou auxiliando no tratamento de doenças e que possam oferecer equilíbrio a microbiota intestinal quando capazes de coloniza-lo, são indicados para aplicação em alimentos (LEITE et al., 2015; DOMINGOS-LOPES et al., 2017).

3.1.1 Probióticos

Probióticos são definidos como “micro-organismos vivos que promovem benefícios a saúde do hospedeiro se consumidos em quantidades adequadas” (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2001). Para que os benefícios a saúde sejam obtidos, é necessário que o produto apresente concentração mínima para consumo, variando conforme o órgão de orientação. A exemplo, a FAO (2002) recomenda um mínimo de 6 log Unidades Formadoras de Colônia (UFC) por grama de alimento diariamente, já a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) recomenda uma concentração maior de 8 ou 9 log UFC na porção de 100g de produto pronto para consumo (ANVISA, 2008).

Dentre os micro-organismos que apresentam características probióticas tem-se algumas leveduras e principalmente bactérias, dentre elas as BAL (BURGAIN et al., 2011; ECKERT et al., 2017). Os principais gêneros de bactérias com potencial probiótico de maior aplicação em produtos alimentícios são *Lactobacillus*, *Bifidobacterium* e *Enterococcus* (ANVISA, 2008), os quais são resistentes as condições ácidas do trato gastrointestinal (TGI) e as enzimas presentes neste, podendo se aderir a parede intestinal.

3.1.2 Gênero *Pediococcus*

O gênero *Pediococcus* spp. pertence ao grupo de BAL e da família *Lactobacillaceae*, fazendo parte as seguintes espécies: *P. acidilactici*, *P. pentosaceus*, *P. damnosus*, *P. parvulus*, *P. inopinatus*, *P. halophilus*, *P. dextrinicus*, e *P. urinaeequi*. As espécies pertencentes a este gênero apresentam morfologia de cocos, dispostas em tetraedros, porém é possível encontrar pares em cultivo líquido. Dentre estas espécies as principais estirpes utilizadas na fermentação de alimentos são *P. acidilactici*, *P. pentosaceus* e *P. halophilus* (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009).

A estirpe *Pediococcus pentosaceus*, assim como as demais, é comumente encontrado na microbiota (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2002; PORTO et al., 2017), no entanto, já foi isolado de inúmeros produtos fermentados e não fermentados, como leites, queijos, bambu, sorgo e massa fermentada (Ildy) da Índia (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; ELENA; MICHELA, 2013; BELHADJ et al., 2014).

Pediococcus pentosaceus é utilizado como cultura iniciadora na fermentação de produtos vegetais, salsichas e alguns produtos cárneos, como salame, além de promover a fermentação dos produtos e aumentar sua vida útil, por meio da acidificação. Além disso, algumas cepas são utilizadas para bioconservação, devido a produção de peptídeos antimicrobianos que inibem a multiplicação de patógenos e micro-organismos deteriorantes. Além disso, é utilizado como suplemento probiótico para animais e humanos (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009; VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017).

A bacteriocina produzida por alguns micro-organismos desta estirpe é a pediocina, pertencente a classe II de peptídeos antimicrobianos produzidos por BAL, sendo não-antibióticos, estável ao calor e não modificados, com tamanho inferior a 5 kDa. Atualmente apenas a nisina, bacteriocina produzida por *Lactococcus lactis* pode ser comercialmente utilizada, porém cresce o interesse na identificação e caracterização de novos peptídeos antimicrobianos, principalmente os considerados “antiliesteriais” como é o caso da pediocina (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009; PORTO et al., 2017).

Também é crescente estudos que demonstram a capacidade probiótica de *Pediococcus pentosaceus*, desde a capacidade de aderência às células epiteliais

intestinais, bem como a resistência a passagem gástrica e intestinal e aspectos de segurança para aplicação em alimentos (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; PORTO et al., 2017).

Lv et al. (2014) estudaram a influência de *Pediococcus pentosaceus* LI05 em ratos com insuficiência hepática induzida, ao administrarem uma suspensão de aproximadamente $9,10 \text{ Log UFC.mL}^{-1}$ foi administrada diariamente por oito dias constataram redução dos níveis de diversos marcadores, como alalina amino-transferase, bilirrubinas totais e também promoveu a diminuição das anomalias histológicas. Além disso, apresentou aumento nos níveis de Interferon gama (INF- γ) indicando a influência na resposta imune inata e adaptativa contra a infecção. Masuda et al. (2010) também administraram *Pediococcus pentosaceus* Sn26 isolado de vegetais, em camundongos com diarreia alérgica, a qual é induzida pelo aumento das Imunoglobulinas E (IgE), e verificaram diminuição da resposta alérgica, bem como dos sintomas relacionados a diarreia.

É comum observar infecções pós-operatórias devidas a translocação intestinal bacteriana. Rayes et al. (2005) realizaram um teste clínico com 66 pacientes transplantados de fígado, os quais foram divididos em dois grupos, os que receberam apenas prebióticos e os que receberam prebióticos e suspensão de *Pediococcus pentosaceus* LMG – P20608 ($10^{10} \text{ UFC.mL}^{-1}$) diariamente, ambos por 14 dias. Para o grupo que recebeu o composto simbiótico, com probiótico e prebiótico, a incidência de infecção teve redução de 3%. Já o grupo que recebeu apenas prebiótico teve um aumento de 48% de infecção pós-operatória. Outro estudo, dividiu 80 pacientes com pancreato-duodectomia com preservação do piloro, o tratamento foi o mesmo apenas os dias de administração foram diminuídos para oito. Os resultados novamente se mostraram promissores com o grupo que recebeu o simbiótico, onde apenas 12,5% tiveram infecção, quando comparado aos 40% dos que receberam apenas o prebiótico (RAYES et al., 2007).

Damodharan et al. (2015) estudaram a influência da administração de *Pediococcus pentosaceus* KID7 em camundongos com hipercolesterolemia induzida, uma dose diária de $3.10^8 \text{ UFC.mL}^{-1}$, por 32 dias foi capaz de reduzir em 19,8% o colesterol total sérico e 35,5% do colesterol de baixa densidade (LDL).

Seja por meio da aderência com as células epiteliais ou até mesmo a produção de bacteriocina, vitaminas entre outros compostos *Pediococcus* spp. apresenta inúmeros benefícios já descritos e outros ainda em descoberta, e seu uso vai desde a transformação de matéria prima em alimentos até os benefícios mais específicos na saúde humana.

3.2 Métodos de preservação de micro-organismos

A preservação tem como objetivo manter a viabilidade dos micro-organismos por maior período de tempo. Em nível de pesquisa propicia a continuidade dos estudos com o isolado/cepa, ou em nível industrial, quando armazenadas para uso rotineiro, aumentando a vida de útil do micro-organismo.

Considerando este contexto, alguns métodos de preservação são descritos a seguir.

3.2.1 Repique contínuo

Um método considerado para curto prazo que consiste na repicagem em meio de cultivo adequado, seguido do crescimento nas condições de tempo e temperatura adequadas e, após armazenamento na temperatura de refrigeração de 5 a 8 °C, buscando a redução do metabolismo microbiano. Vale salientar que deve-se evitar o consumo total de substrato ou desidratação do meio (BARKER, 2002; ROMEIRO, 2006; GREEN, 2008). Murray (2003) sugere que para minimizar os problemas referentes a desidratação, os isolados devem ser mantidos em tubos de vidro fechados e selados com parafina, em ambientes protegidos da luz e de variações na temperatura.

As principais vantagens do repique contínuo são facilidade, baixo custo e o fato de não necessitar de reativação dos micro-organismos, reduzindo desta forma, a injúria celular. Porém, o método apresenta grande risco de contaminação pela manipulação constante das culturas, possíveis mutações, e necessita de espaço físico considerável para armazenamento (COSTA; FERREIRA, 1991; ROMEIRO, 2006).

3.2.2 Congelamento e criopreservação

O congelamento também é um método de curto prazo que consiste no congelamento de 4 até -20 °C, sendo um dos métodos mais baratos e simples, além de oferecer viabilidade celular com segurança ao micro-organismo de três meses até 2 anos, já que o seu metabolismo é bastante reduzido (CEFAR, 2006). Porém, uma desvantagem é a formação de cristais de gelo no interior da célula bacteriana, ocasionando em perda de viabilidade celular (TORTORA, 2012). Além da instabilidade na faixa de temperatura devido a manipulação ou simplicidade do equipamento utilizado (ROMEIRO, 2006; VIEIRA; BORSOI, 2007).

Outro método de congelamento é a criopreservação, que consiste no congelamento a temperaturas muito baixas, de -20 a -80 °C, das células em conjunto com um crioprotetor, sendo o glicerol o mais utilizado, pois é capaz de recobrir a célula bacteriana e promover proteção contra baixas temperaturas (OLIVEIRA et al., 2007). O glicerol pertence ao grupo de crioprotetores intracelulares, sendo capaz de se ligar a água e reduzir a formação de cristais de gelo e a acumulação de solutos intra e extracelular (OLIVEIRA et al., 2007; COSTA et al., 2009). Porém, ressalta-se que em altas concentrações o crioprotetor pode ser tóxico, reduzindo assim, a viabilidade celular, sendo indicado como ideal a concentração entre 10 e 15% (HUBÁLEK, 2003; CASTRO et al., 2011).

3.2.3 Liofilização

A liofilização ou *freezer drying* é uma técnica de longo prazo, utilizada tanto para secagem de células como para encapsulação (MARTÍN et al., 2015). Na secagem, o processo consiste em secar amostras pré-congeladas e viáveis, sendo que a rápida desidratação promove o processo de anidrobiose celular, pausando seu metabolismo. É considerado um método eficiente e utilizado extensivamente, visto a duração das células as quais podem ser armazenadas por um período de até 20 anos (CANHOS, 2004; PASSADOR et al., 2010).

O processo é composto por três etapas. A primeira etapa é realizada anterior ao processo em si, que é o congelamento da amostra com crioprotetor, que pode ser glicerol, leite desnatado, entre outros, seguida de duas desidratações a vácuo. Devido a remoção de água intracelular por sublimação durante o processo, ocorre uma redução na formação de cristais de gelo (DE PAOLI, 2005; MORGAN et al., 2006).

Os materiais liofilizados devem ser armazenamento em frascos bem vedados e sob controle de umidade, luz, oxigênio e principalmente em baixas temperaturas (MORGAN et al., 2006). A viabilidade celular pode diminuir durante a estocagem, variando conforme a morfologia celular do micro-organismo. Micro-organismos Gram-positivos apresentam menor redução de viabilidade se comparada aos Gram-negativos, devido a composição celular diferenciada (MIYAMOTO et al., 2008).

Esta técnica oferece alta estabilidade ao material utilizado, necessita pouco espaço de armazenamento, apresenta baixas taxas de mutação e contaminação. Porém, depende de equipamentos onerosos e custo financeiros e de tempo nos processos de preparação da amostra (ZAMORA; CARRETERO; PARÉS, 2006; MIYAMOTO et al., 2008).

3.2.4 Secagem por pulverização (*spray drying*)

A técnica de *spray drying* consiste na secagem de uma solução líquida a altas temperaturas. A solução a ser seca deve estar homogênea ou dissolvida em solução aquosa, sendo então atomizada com uma corrente de ar quente dentro da câmara de secagem, promovendo a evaporação do solvente, solidificando rapidamente as gotículas e originando o pó que é recolhido no ciclone, como ilustrado na Figura 1 (NUNES; MARQUES; HOLKEM, 2015).

O método é utilizado para vários fins, como na indústria láctea para a secagem de leite em pó, na pesquisa acadêmica e indústria farmacêutica é utilizado para microencapsulação de produtos, micro-organismos, compostos bioativos, entre outros materiais (MORGAN et al., 2006).

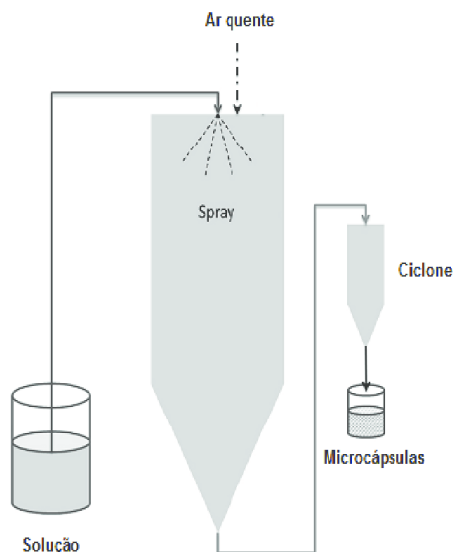


Figura 1. Processo de secagem por pulverização (*spray drying*).

Fonte: Nunes et al., 2015 (adaptado de Estevinho et al., 2013)

Estudos recentes têm sido desenvolvidos a fim de analisar a possibilidade de preservar probióticos por este método, visto seu baixo custo e alto rendimento (DEMONSD, et al., 2000; GARDINER et al., 2000; MORGAN et al., 2006). O principal motivo da pesquisa nessa área é o armazenamento a temperatura ambiente, diminuindo assim os cuidados e gastos necessários em outros processos, como por exemplo, a liofilização (MORGAN et al., 2006).

Como desvantagem do uso desta técnica, temos o emprego de altas temperaturas, podendo ser extremamente prejudicial a célula do micro-organismo (MARTÍN et al., 2015; ECKERT et al., 2017). No entanto, é possível minimizar os efeitos negativos deste processo com algumas ações, como a escolha correta do meio de cultivo celular, visto que estudos demonstram que o uso adequado de um meio de cultura, proporciona o acúmulo de solutos compatíveis, como aminoácidos e carboidratos na tentativa de compensar a redução de atividade de água e pressão osmótica durante o processo, diminuindo assim os danos à célula (HUANG et al., 2017). Outro fator importante são os parâmetros do equipamentos, como temperatura de saída e entrada, velocidade de passagem da amostra e pressão do ar (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015; SHOKRI et al., 2015; ECKERT et al., 2017; LIAO et al., 2017).

Um estudo desenvolvido por Ferreira et al. (2017) comparou dois métodos de secagem, *spray drying* e *freeze drying*, na preservação de *L. plantarum*, e

encontraram em seus resultados que a secagem por atomização (*spray drying*) proporcionou maior viabilidade celular logo após o processo e, da mesma forma, durante o armazenamento a 4 °C. Um possível fator determinante seria o congelamento necessário durante o pré-processamento do processo de liofilização (*freeze drying*), pois pode originar cristais de gelo, levando a desnaturação proteica e lesões na membrana celular (GIULIO et al., 2005). A etapa de congelamento não é necessária nas células destinadas a secagem por atomização.

Os resultados da secagem por atomização são dependentes da característica da cepa a ser preservada. Gardiner et al. (2000) realizaram a secagem de duas cepas probióticas (*Lactobacillus paracasei* NFBC 338 e *Lactobacillus salivarius* UCC 118) pela técnica de *spray drying* e armazenaram a 4 °C por 2 meses. *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 manteve contagens de células constantes durante o período, porém *Lactobacillus salivarius* UCC 118 apresentou perda de pelo menos 1 ciclo logarítmico. Silva et al. (2002) mostraram a influência da temperatura de saída na sobrevivência de cepas de *Lactobacillus*, demonstrando a importância dos ajustes e otimização dos parâmetros de secagem.

Larena, Melgarejo e De Cal (2003) compararam três métodos de secagem, *spray drying*, *freeze drying* e secagem em leito fluidizado para as células de *Penicillium oxalicum*, e encontraram apenas 20% de viabilidade celular quando seco por *spray drying* e 100% nos outros dois métodos. Estes achados reforçam a ideia de que as características de cada micro-organismo determinam sua sobrevivência a diferentes métodos.

Muitos estudos têm utilizado algum meio protetor para secagem por atomização. No entanto, o uso do meio protetor não é de uso obrigatório, como na liofilização, processo este que não necessita de congelamento prévio. Este fato também pode interferir na capacidade de sobrevivência do micro-organismo, bem como implicar nos custos do processo LARENA; MELGAREJO; DE CAL, 2003; MORGAN et al., 2006; FERREIRA et al., 2017).

3.3 Encapsulamento de probióticos

Para proteger e potencializar todos os benefícios já citados exercidos pelos probióticos, surge a encapsulação. Uma técnica que possibilita o “empacotamento” do objeto de proteção (YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). Embora a resistência dos probióticos a condições gastrintestinais seja conhecida, essas células precisam

sobreviver ao tratamento do alimento em que estão inseridos, bem como a vida de útil do mesmo, e ainda, permanecer viáveis após passar pelas condições gástricas e intestinais, para prover seus benefícios ao consumidor (KAILASAPATHY, 2002; KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). A imobilização ou aprisionamento é um recurso biotecnológico muito utilizado, pois é capaz de fixar as células em alguma superfície, bem como conter seus metabólitos. Por outro lado o encapsulamento que garante a estabilização das células, promover maior viabilidade e estabilidade, possibilitando o armazenamento e manuseio dessas culturas e liberação controlada destas células (KAILASAPATHY, 2002).

3.3.1 Métodos de encapsulamento

Existem muitos métodos de encapsulamento descritos na literatura com a mesma finalidade, de proteger algum objeto de proteção, porém, com características distintas de tamanho, de material utilizado, de custo, entre outros.

3.3.1.1 Secagem por pulverização (*spray drying*)

A técnica de *spray drying* como referido no item anterior 3.2.4 é um método utilizado tanto para secagem de micro-organismos visando a preservação como para microencapsulação. O princípio de aplicação da técnica é o mesmo, consistindo na injeção de um material em estado líquido a ser encapsulado, o qual passará por uma câmara de secagem, onde o ar quente é distribuído, promovendo a rápida evaporação do solvente utilizado, geralmente a água. O pó oriundo da desidratação é encaminhando para o ciclone e, por fim, coletado, resultando em microcápsulas de tamanho nano ou micrométrico (VILLENA et al., 2009; NUNES; MARQUES; HOLKEM, 2015).

Aliado a isso, diversos materiais encapsulantes, cepas de micro-organismos e parâmetros do equipamento são avaliados buscando a otimização do processo (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; PINTO et al., 2015; ECKERT et al., 2017; HUANG et al., 2017; LIAO et al., 2017).

O principal fator avaliado neste processo é a eficiência de encapsulação (EE) a qual analisa a perda na viabilidade dos micro-organismos durante o processo,

seguido da análise do tempo de armazenamento, posterior passagem pelas condições gastrintestinais simuladas, tratamento térmico e testes com adição de microcápsulas em diferentes matrizes alimentares (FRITZEN-FREIRE et al., 2013; MARTÍN et al., 2015; PINTO et al., 2015; ECKERT et al., 2017).

Ranadheera et al. (2015) microencapsularam três micro-organismos pela técnica de *spray drying*, avaliando seu armazenamento em duas temperaturas distintas (4 e 30 °C) e encontraram redução considerável da viabilidade a 30 °C para todos micro-organismos avaliados. Já Shokri et al. (2015) microencapsularam *Bifidobacterium bifidum* por *spray drying* e avaliaram a influência dos fatores ambientais, em diferentes valores de temperatura de entrada e saída e velocidade do ar do equipamento de secagem, além da concentração do material encapsulante (maltodextrina), os autores verificaram que as melhores condições foram: temperatura de entrada do ar a 111,15 °C, pressão do ar em 4,5 bar e 6% de maltodextrina com material encapsulante.

Maciel et al. (2014) microencapsularam um probiótico (*Lactobacillus acidophilus* La-5) pela mesma técnica citada nos estudos acima e avaliaram a eficiência de encapsulação, armazenamento e passagem gástrica, comprovando a proteção das células. O estudo desenvolvido por Ilha et al. (2015) os quais isolaram *Lactobacillus paracasei* de uva fermentada e microencapsularam o mesmo por *spray drying* com diferentes materiais de parede, avaliando sua resistência ao trato gastrintestinal simulado e ao calor, obtiveram resultados positivos de proteção em alguns testes.

A microencapsulação por atomização promove uma ampla abrangência de testes e parâmetros de secagem para mudança, buscando a melhor otimização do processo e proteção do micro-organismo probiótico. Há muitos estudos utilizando esta técnica e ainda tem muito para ser explorado (ECKERT et al., 2017; MACIEL et al., 2014; RANADHEERA et al., 2015).

3.3.1.2 Extrusão

A extrusão é um método antigo e de baixo custo para produzir cápsulas hidrocoloides e causa poucas lesões a bactéria probiótica. O micro-organismo é misturado a solução de hidrocoloide, e então, passado por uma extrusora (seringa) formando gotículas em uma solução de endurecimento (cloreto de cálcio). Logo após esse gotejamento as células ficam aprisionadas no polímero, como

demonstrado na Figura 2, formando reticulações tridimensionais que se cruzam com os íons de cálcio (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). O tamanho das partículas varia principalmente conforme a distância entre a seringa e a matriz polimérica, bem como o tamanho do orifício da extrusora, podendo essas partículas variar de 0.3 a 3 mm de tamanho (ANAL; SINGH, 2007; KAVITAKE et al., 2018).

Kim et al. (2017) encapsularam *Lactobacillus acidophilus* por gelificação iônica com extrusão eletrostática e encontraram maior sobrevivência em armazenamento refrigerado e condições gastrintestinais.

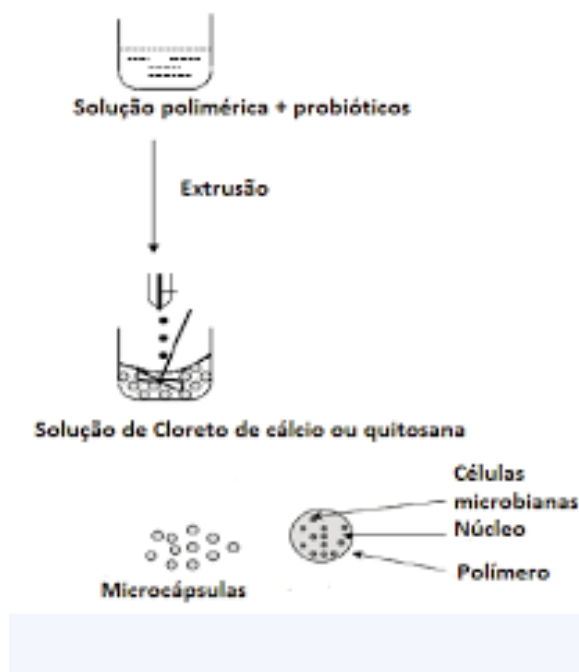


Figura 2: Processo de extrusão

Fonte: Etchepare et al., 2015 (adaptado de: Krasaekoopt, Bhandari & Deeth, 2000).

3.3.1.3 Liofilização (*freeze drying*)

Assim como a técnica de *spray drying*, a liofilização como descrito no item 3.2.3 é um método tanto para secagem de células quanto para encapsulação, embora a atribuição da liofilização para encapsulamento seja recente. O processo baseia-se nos mesmos processos; congelamento, seguidos de duas desidratações, diferindo no acréscimo de materiais protetores às células probióticas antes do processamento (WANG et al., 2004). Alguns materiais como leite desnatado, proteínas do soro de leite, glucose, maltodextrina, entre outros, e ainda podem ser usados crioprotetores anterior a fermentação para auxiliar na adaptação dos micro-

organismos ao meio externo (SANTIVARANGKNA et al., 2007; MARTÍN et al., 2015). Porém, assim como o uso da liofilização para secagem é um método dispendioso de custos elevados e de tempo, quando comparado a outros.

3.3.1.4 Secagem por congelamento (*spray freeze drying*)

Esta técnica é a combinação entre as técnicas de *spray drying* e *freeze drying*, onde as células microbianas em uma solução aquosa, são atomizadas em vapor frio de um líquido criogênico, como o nitrogênio líquido. Este processo faz com que haja uma dispersão de gotículas congeladas. Estas são secas em um liofilizador, tendo como vantagens da técnica tamanho controlado e maior proteção à célula, porém necessita do uso de muita energia, tempo longo de processamento e custo de 30 a 50 vezes maior que a secagem por pulverização (ZUIDAM; NEDOVIĆ, 2010; MARTÍN et al., 2015).

3.3.2 Materiais encapsulantes

Diferentes matrizes são utilizadas para encapsulação, desde proteínas (gelatina, caseína, soro de leite), lipídeos (mono e diglicerídeos) e polissacarídeos (gomas, maltodextrina) (VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012; KAVITAKE et al., 2018).

3.3.2.1 Soro de queijo

O soro de queijo é um subproduto da indústria de lácteos originado da transformação de leite em queijo. A cada 1 kg de queijo produzidos, sobram 9 litros de soro. A produção mundial de queijo cresce cerca de 2% ao ano, sendo que em 2016 o cálculo foi de aproximadamente 120 milhões de toneladas de soro produzido, constituindo um sério problema ambiental, pois embora cerca de 50% seja remanejado para outras aplicações de valor agregado, grandes volumes ainda são descartados sem tratamento adequado (KAMINARIDESSK, 2015; DIMITRELLOU et al., 2017).

Este soro corresponde a 50% de sólidos totais do leite, sendo o principal reuso industrial a secagem em soro de leite ou de queijo em pó e concentrado de proteínas do soro, além de ser um dos ingredientes de inúmeros produtos alimentícios, como outros tipos de queijos (RIERA; GONZÁLEZ; MURO, 2016). O soro de queijo é utilizado por exemplo, como aditivo em iogurtes, pois é capaz de

retardar o processo de pós-acidificação devido a capacidade tamponante das proteínas α -lactoglobulina e β -lactoglobulina quando comparadas a caseína abundante no leite (KALIN, 2007; SHORI, 2016).

É crescente o interesse para seu uso como protetor de probióticos, visto que é um produto de alto valor nutritivo contendo proteínas de alto valor biológico e de baixo custo quando comparado aos demais materiais disponíveis (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; ECKERT et al., 2017)

Muitos estudos utilizam o soro como material encapsulante, como é o caso do estudo de Eckert et al. (2017) que microencapsularam *L. plantarum* ATCC 8014 por *spray drying* com soro, permeado e retentado de soro. Os resultados demonstram que o soro e o retentado são os mais eficientes na proteção das células bacterianas ao longo dos testes, como é o caso do TGI simulado. De Castro-Cislaghi et al., (2012) microencapsularam *Bifidobacterium* Bb-12 pela técnica de *spray drying* com soro de leite, e observaram que durante a exposição ao trato intestinal (bile) a microcápsula não ofereceu proteção as células, porém durante ao armazenamento a 4°C ofereceu proteção com sobrevivência de células por 12 semanas.

3.3.2.2 Pectina

A pectina é um heteropolissacarídeo extraído de plantas e da parede primária de frutos e vegetais, um polímero natural que promove rigidez a planta. Sua estrutura é composta por uma cadeia linear de unidades de ácido galacturônico, onde grupos carboxílicos envolvidos nas ligações podem ser esterificados por grupos metil, e resíduos de açúcares estão presentes ao longo da cadeia. A pectina pode ser classificada conforme seu grau de metoxilação (BARRETO; RAMÍREZ-MÉRIDA; ETCHEPARE, 2015). Sua estrutura química está ilustrada na Figura 4.

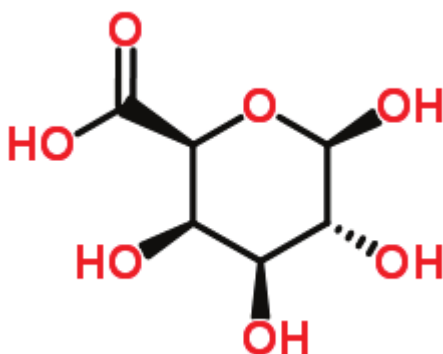


Figura 3. Estrutura química da molécula de pectina

Fonte: <http://www.chemspider.com/>

Possui uma capacidade espessante e geleificante sendo muito utilizado como aditivo na indústria alimentícia, como para uso em geleias, por exemplo, e na indústria farmacêutica para revestimento de compostos. É uma fibra solúvel muito apreciada do ponto dietético, pois exerce todas as funções de um prebiótico, sendo fermentada por micro-organismos pertencentes à microbiota no intestino, contribuindo na formação de acetato, propionato e butirato de ácidos graxos de cadeia curta, que promovem benefícios à saúde do consumidor (TIAN et al., 2017; KOH; XU; WICKER, 2018).

A pectina possui capacidade de formação de complexos com outros polímeros, dependendo do pH, e devido a esta capacidade estudos relacionados ao revestimento de microcápsulas com esses complexos vêm sendo estudados (BARRETO; RAMÍREZ-MÉRIDA; ETCHEPARE, 2015).

Gerez et al. (2012) encontraram aumento na taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* CRL 1505 exposto a condições gastrintestinais quando microencapsulado com pectina e proteínas do soro de leite por coaservação complexa. Já Gebara et al. (2013) microencapsularam *Lactobacillus acidophilus* La5 com pectina por gelificação ionotrópica e recobriram com proteínas do soro de leite por interação eletrostática, e observaram como resultado a proteção das células perante a passagem no TGI, porém concluíram que o recobrimento com proteínas não influenciou na proteção já conferida pela pectina.

Oliveira et al. (2007) microencapsularam *B. lactis* (BI 01) e *L. acidophilus* (LAC 4) por complexo de pectina e caseína por coaservação complexa, seguido de *spray drying* e avaliaram a viabilidade do micro-organismo microencapsulado em condições ácidas e de armazenamento a 7 °C, obtendo resultados positivos para ambos quando comparados às células livres controles.

A pectina tem sido usada também na microencapsulação de compostos bioativos como óleos essenciais, e na indústria farmacêutica como revestimento de medicamentos. Aberkane; Roudaut e Saurel (2014) microencapsularam ácidos graxos poliinsaturados (PUFA) com pectina e proteína isolada de ervilha por *spray drying* e conferiram um retardamento do processo de oxidação do óleo.

3.3.2.3 Goma Xantana

A goma xantana, conforme apresentado na Figura 3, é um heteropolissacarídeo natural extracelular, produzido por cepas de *Xanthomonas campestris*, que constitui unidades repetitivas de pentassacarídeo (glicose, manose e ácido glicurônico na relação molar de 2:2:1) (LAGOUEYTE; PAQUIN, 1998; SANTOS; CASAS; GO, 2000; KAVITAKE et al., 2018). É também o primeiro biopolímero a ser produzido em escala industrial (ROSALAM; ENGLAND, 2006; ARGIN; KO; LO, 2014).

A esta goma é atribuído alto poder espessante e de resistência a temperatura elevada, de viscosidade relativa, variando conforme a temperatura usada na dissolução, características estruturais da molécula e concentrações de sais e pH. Geralmente apresenta alta viscosidade em baixas concentrações (ARGIN; KO; LO, 2014).

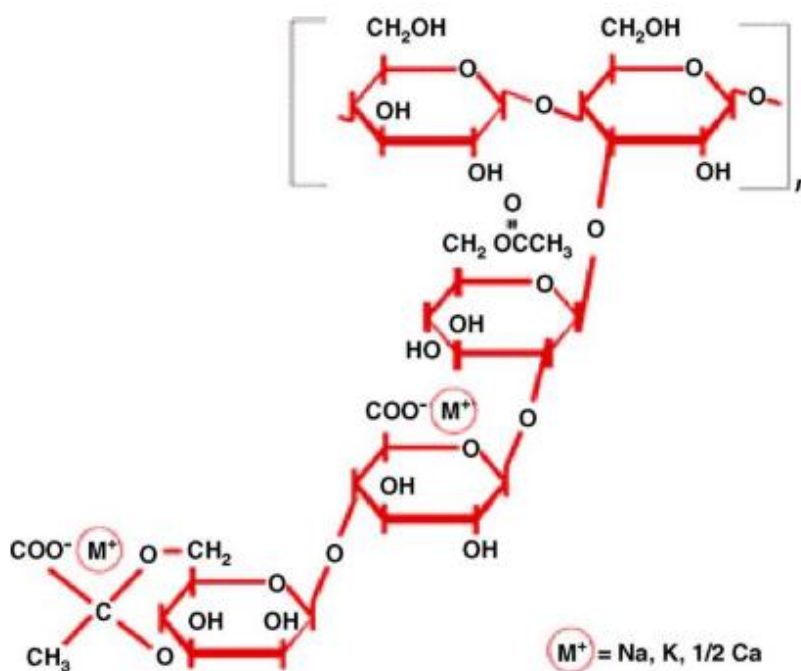


Figura 4. Unidade estrutural da goma xantana

Fonte: adaptado de Rosalam et al., (2006)

Em 1969 a FDA liberou seu uso como aditivo alimentar, pois sua toxicidade e fatores de segurança foram amplamente elucidados, não apresentando toxicidade, nem quaisquer tipos de dano a saúde do consumidor. Seu uso foi liberado em alimentos sem quantidade específica limitada (SANTOS; CASAS; GO, 2000).

Além da indústria de alimentos, que utiliza a goma xantana como espessantes, outros usos são aplicados como a fabricação de cosméticos, recuperação de petróleo, tintas à base de água, formulações de fungicidas e de herbicidas, entre outros, devido a suas propriedades reológicas que permitem estabilizar emulsões e suspensões. Sua capacidade pseudo-plástica é apreciada, se tornando a mais selecionada para uso industriais quando comparadas a outras gomas, devido à alta reprodutibilidade química e execução relativamente simples (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Suas características tornam o seu uso satisfatório pelo comportamento não newtoniano, rendimento de viscosidade mesmo em baixas concentrações, baixa sensibilidade de viscosidade a mudanças de salinidade, resistência a temperatura e ser um material biodegradável e ecologicamente correto (ROSALAM; ENGLAND, 2006).

O uso na microencapsulação de probióticos tem sido relatada em alguns estudos. Um complexo muito utilizado é xantana-quitosana, capaz de formar géis complexos polieletrólíticos (PEC), os quais são sugeridos como eficientes na entrega controlada e direcionada de materiais encapsulados para administração oral, pois são produzidos apenas metabolitos não tóxicos durante sua degradação e este complexo apresenta resistência enzimática relativamente alta (ARGIN; KO; LO, 2014).

Chen et al. (2017) microencapsularam *B. bifidum* BB01 pelo método de extrusão com xantana e quitosana, e avaliaram a viabilidade celular em iogurte armazenados por até 21 dias a 4 °C e 24 dias a 25 °C. Os autores também avaliaram a sobrevivência as condições gastrintestinais, onde a microcápsula protegeu as células em todas condições testadas quando comparadas as células livres. Além disso, Chen et al. (2015) também microencapsularam pela técnica de extrusão, o *L. acidophilus* utilizando xantana e quitosana e avaliaram a influência do pH, concentração de quitosana, xanose e a relação suspensão celular e xantana, encontrando a melhor otimização do processo de encapsulação.

Argin et al. (2014) microencapsularam *Pediococcus acidilactici* com complexo xantana-quitosana pela técnica de extrusão e avaliaram sua passagem as condições gastrintestinais e detectaram proteção das células, tendo esta cápsula potencial para entrega de probióticos no intestino.

Apesar disso, ainda são escassos os estudos que utilizam xantana na microencapsulação de probióticos por *spray drying*, sendo utilizados geralmente outros métodos e combinações de materiais de parede.

4. Manuscrito 1 - Microencapsulação de *P. pentosaceus* P107 por *spray drying* utilizando como material de parede soro de queijo, pectina, xantana

Bordini FW, Rosolen, MD, Oliveira PD, Conceição F, Fiorentini A, Silva WP, Pieniz S.

Fernanda Weber Bordini^{a,*} fernandawbordini@gmail.com; Michele Dutra Rosolen^a michele.dutra@gmail.com; Patrícia Diaz de Oliveira^{a,b} bilica.diaz@gmail.com; Fabrício Rochedo Conceição^b fabricio.rochedo@ufpel.edu.br; Ângela Maria Fiorentini^a angefiore@gmail.com; Wladimir Padilha da Silva^a wladimir.padilha2011@gmail.com; Simone Pieniz^c nutrisimone@yahoo.com.br

^aDepartamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos - Universidade Federal de Pelotas, Av Eliseu Maciel - Campus Capão do Leão - Pelotas - RS / Brasil.

^bCentro de Desenvolvimento Tecnológico, Unidade de Biotecnologia - Universidade Federal de Pelotas, Av Eliseu Maciel - Campus Capão do Leão - Pelotas - RS / Brasil.

^cDepartamento de Nutrição, Faculdade de Nutrição - Universidade Federal de Pelotas, Campus Anglo, Gomes Carneiro n1, Porto, Pelotas - RS / Brasil.

*Autor Correspondente: Fernanda Weber Bordini. Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, UFPel, Av Eliseu Maciel, Campus Capão do Leão, Pelotas - RS - Brasil. fernandawbordini@gmail.com
Número de telefone: 55 (53) 981246835

Manuscrito escrito de acordo com as normas do periódico *Journal of functional foods*.

ABSTRACT

The objective of the present study was to investigate the use of pectin and xanthan gum associated whey as encapsulating agents of *Pediococcus pentosaceus* P107 by *spray drying*. For this the cells were cultured in bioreactor bench and after added to materials encapsulant, whey, pectin and xanthan. All solutions were dried by spray equipment with input temperature of 100° C, 68° C output with power flow in 250 mL/h. In the storage test at temperatures of -20 and 4 ° C the most viable microcapsule was WP (whey and pectin), but WX (whey and xanthan) presented better stability. At 25 ° C WX did not present probiotic viability (<6 Log UFC.g⁻¹) after 15 days and WP after 60 days while W (whey) and free cell remained for 110 days. In the passage through the simulated gastrointestinal tract the WX microcapsule stood out in all tested conditions, presenting high cellular viability. For the thermal resistance test WP was shown to be efficient in the protection of *Pediococcus pentosaceus* P107 cells. The three microcapsules produced were able to protect the cellular viability of the microorganisms, as well as the drying parameters were suitable for both microencapsulation and atomization of the free cells.

Keywords: heat treatment; microcapsules; probiotics; protection;

1. INTRODUÇÃO

As bactérias ácido lácticas (BAL) estão presentes na microbiota, principalmente, de mamíferos e em alimentos *in natura* ou processados (DELCENSERIE et al., 2008; ZHANG; LIN; ZHONG, 2015). É grande o interesse pela descoberta e caracterização de novas bactérias pertencentes a este grupo, visando inovação e aprimoramento de produtos alimentícios, bem como promoção de saudabilidade ao consumidor (DOMINGOS-LOPES et al., 2017; LEITE et al., 2015).

Pediococcus pentosaceus pertence ao grupo das BAL e é comumente encontrado na microbiota de mamíferos, porém já foi isolado de diversos produtos fermentados, como leite, Ildy (massa fermentada da Índia), bambu, queijos, sorgo e coalhadas (BELHADJ et al., 2014; ELENA; MICHELA, 2013; VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012). É utilizado como cultura iniciadora na fermentação de produtos vegetais e embutidos cárneos, aumentando sua conservação. Além disso, é utilizado também como suplemento probiótico para seres humanos e animais (PAPAGIANNI; ANASTASIADOU, 2009; PORTO et al., 2017; VIDHYASAGAR; JEEVARATNAM, 2012).

Diversos estudos têm demonstrado o potencial probiótico de *Pediococcus spp.* constatando sua capacidade de aderência às células epiteliais, bem como sua resistência a passagem gástrica e intestinal (Papagianni & Anastasiadou, 2009; Porto et al., 2017; Vidhyasagar & Jeevaratnam, 2012). Porém, sua viabilidade pode ser comprometida durante o armazenamento ou no processamento de alimentos, ou ainda pela própria passagem no trato gastrintestinal (NUNES; MARQUES; HOLKEM, 2015; RATHORE et al., 2013).

Afim de melhorar a viabilidade no armazenamento das células, a secagem de células bacterianas é um método muito utilizado. Isto se torna possível, pois ocorre a redução drástica da umidade e da atividade de água, levando ao processo de anidrobiose celular, mantendo o metabolismo inativo até que ocorra a reidratação (BELKIN et al., 2006). Visando prolongar e

potencializar a proteção dessas células para uso posterior, a microencapsulação é utilizado, pois possibilita um “empacotamento” do objeto de proteção, de condições adversas indesejáveis (FRITZEN-FREIRE et al., 2012; NUNES; MARQUES; HOLKEM, 2015; YE; GEORGES; SELOMULYA, 2018). Para isto, a técnica de *spray drying* é utilizada tanto para microencapsulação como para secagem de micro-organismos (MARTÍN et al., 2015a; RATHORE et al., 2013).

Diferentes matrizes são utilizadas na microencapsulação, tais como polissacarídeos (gomas e maltodextrinas), proteínas (caseína, gelatina e soro de leite) e lipídios (mono e diglicerídeos) (KAVITAKE et al., 2018; VIDHYALAKSHMI; BHAKYARAJ; SUBHASREE, 2009). O soro de queijo vem recebendo destaque nos últimos anos, em virtude da sua alta capacidade nutritiva, contendo proteínas de alto valor biológico e baixo custo quando comparado a outros materiais mais nobres (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; ECKERT et al., 2017).

A pectina, um homopolissacarídeo, abundante na parede de frutas, é também utilizada como material encapsulante. É utilizada pela indústria de alimentos como aditivo, geleificante e espessante natural, ou na indústria farmacêutica como revestimento de medicamentos. Tais características em conjunto com sua insolubilidade no trato digestório podem auxiliar na proteção de micro-organismos (GEREZ et al., 2012; MARTÍN et al., 2015a). Além disso, sua propriedade fibrosa é apreciada do ponto de vista dietético, contribuindo para saúde do consumidor (SANSONE et al., 2011).

Outro material utilizado é a goma xantana, um heteropolissacarídeo natural extracelular, produzido por cepas de *Xanthomonas*, sendo considerado um biopolímero de uso industrial (LAGOUEYTE; PAQUIN, 1998). É uma goma com alto poder espessante e sua viscosidade pode ser relativa conforme a temperatura usada na dissolução, características estruturais da molécula, concentrações de sais e pH. De forma geral, as soluções de xantana

possuem alta viscosidade em baixas concentrações, sua toxicidade e fatores de segurança já foram amplamente elucidados, sendo utilizada como aditivo em alimentos sem quantidade específica limitada (SANTOS; CASAS; GO, 2000). Sua capacidade pseudo-plástica em conjunto com sua resistência a temperatura e a algumas enzimas são fatores positivos a microencapsulação (ARGIN; KO; LO, 2014; ROSALAM; ENGLAND, 2006).

Nesse contexto, o objetivo deste estudo foi investigar o uso de soro de queijo associado a pectina e goma xantana como agentes encapsulantes de *Pediococcus pentosaceus* P107 por *spray drying*, assim como avaliar o efeito do processo de secagem na viabilidade de células livres.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Micro-organismo e Condições de cultivo

Pediococcus pentosaceus P107 foi isolado de presunto fatiado cozido e pertence a Coleção de bactérias probióticas e culturas iniciadoras do Laboratório de Microbiologia de Alimentos – Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos (DCTA)/ Universidade Federal de Pelotas (UFPel). Para o cultivo celular de alta densidade, sua multiplicação foi realizado em duas etapas, sendo ambas utilizando soro de queijo em pó, com composição média de 11% de proteínas, 1,5% de gorduras, 6% de sais minerais e 3% de umidade, conforme fabricante (Relat - Estação, RS, Brasil), o qual foi reconstituído em água destilada estéril a 6% (m.v⁻¹) e após submetido ao tratamento térmico (65 °C por 30 min).

Na primeira etapa de cultivo, *P. pentosaceus* P107 foi inoculada em soro de queijo reconstituído e incubado *overnight*, a 37 °C, 150 rpm em agitador orbital (CERTOMAT BS-1), sob condições anaeróbicas. Para a segunda etapa, o inóculo reativado foi adicionado a 3% em uma cuba com capacidade de 2 L e contendo volume final de 2 L de soro de queijo, em biorreator de bancada (BIOSTAT B -New Brunswik, EUA), a 37 °C, *overnight* a 100 rpm. Ao

final do processo, ao obter uma densidade de 13 Log Unidades Formadora de Colônia (UFC mL⁻¹), as células foram centrifugadas a 2370 *g* por 10 min a 4 °C e o *pellet* lavado em tampão fosfato-salino (PBS) (10 mM, pH 7,0), ressuspensão em 100 mL do mesmo e resultando em uma concentração de aproximadamente 14 Log UFC/ mL⁻¹, mantido sob refrigeração a 4 °C.

2.2 Produção de microcápsulas e secagem das células livres de *P. pentosaceus* P107 por *spray drying*

O soro de queijo combinado com pectina e goma xantana foram utilizados como materiais encapsulantes na produção das microcápsulas. Em todas as soluções preparadas foi adicionado o agente antiaglomerante aerosil (Farma-química; Málaga, Espanha) na concentração de 1,25%.

As soluções preparadas foram: soro de queijo (6%) (W) dissolvido em água destilada esterelizada; soro de queijo (6%) e xantana pruni (WX) sintetizada pela cepa 101 de *Xanthomonas arboricola* pv pruni (1,25%) e produzida no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos, (CDTec/UFPel), previamente (24 h) dissolvida em água esterilizada á 100 °C; soro de queijo (4%) e pectina comercial (WP) (Farma-química; Málaga, Espanha) (2%) dissolvidas em água destilada esterilizada à 100 °C. Todas soluções foram submetidas ao tratamento térmico por 30 min a 65 °C e mantidas sob agitação em agitador orbital.

Após a suspensão celular de *P. pentosaceus* P107 (14 Log UFC.mL⁻¹) foi adicionada nas respectivas soluções encapsulantes e mantidas sob agitação em agitador magnético. Para as células livres, o pellet foi ressuspensionado em água destilada esterelizada em temperatura ambiente. Todas as soluções foram submetidas ao processo de secagem utilizando *spray dryer* (LabMaq – MSDi 1.0, São Paulo, SP, Brasil). Os parâmetros foram 100 °C temperatura de entrada, 68 °C de saída, fluxo de alimentação de 0,25 L h⁻¹ e fluxo de ar de 3,00 m³ min⁻¹. O

produto final seco foi coletado em frascos estéreis e acondicionado em diferentes temperaturas de armazenamento, -20, 4 e 25 °C.

2.3 Caracterização da microcápsula

A morfologia das microcápsulas foi determinada em 7 dias de armazenamento a -20 °C. Para isso, as amostras foram fixadas com uma fita de carbono dupla face, revestida com ouro por aspersão (Leica, modelo EM SCD 500 , Wetzlar, Alemanha), visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (MEV) Jeol®, modelo JSM - 6610LV (Jeol®, Tóquio, Japão) em modo de alto vácuo para examinar a morfologia da superfície. O tamanho médio de partícula foi realizado com auxílio do software Image J a partir de 50 medidas.

A atividade de água (a_w) foi medida por método direto, a 25 °C, por meio do analisador Labtouch- a_w (Novasina, Neuheimstrasse, Suíça).

O conteúdo de umidade presente na microcápsula foi determinado gravimetricamente por secagem em estufa de acordo com as diretrizes da Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 2012) usando o método No. 990.20.

As análises de cor foram determinadas através de colorímetro (Minolta Chroma Meter CR-300, Osaka, Japão), com sistema de leitura CIE 'L*a*b*', proposto pela Comissão Internationale de l'Eclairage (CIE).

2.4 Teste de rompimento das microcápsulas

Para determinar o rompimento das microcápsulas foram utilizadas duas soluções: Solução A: contendo tampão PBS (100 mM, pH 7,4) e solução B: solução salina 0,5% (m.v⁻¹) pH 2.5 contendo 3 mg.mL⁻¹ de pepsina nos tempos 30, 60 e 120 min. Para todas microcápsulas 0,01g do pó foi ressuspenso em 1 mL de ambas soluções (A e B), agitados em vórtex e mantidos em agitador orbital a 37 °C, 150 rpm.

A contagem das células viáveis foi determinada por meio de diluição seriada em água peptonada 0,15% (m v⁻¹) e alíquotas foram plaqueadas utilizando a técnica de *drop plate* em ágar MRS, incubadas a 37 °C por 48 h em jaras de anaerobiose e a concentração das células viáveis foi expressa em Log UFC.g⁻¹.

2.5 Eficiência de encapsulação (EE) e rendimento do processo

Para determinar a eficiência de encapsulação (EE) foi utilizada a equação 1 descrita por (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008) e apresentada em percentual.

$$EE (\%) = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100 \quad (1)$$

Onde N é número de células viáveis após o processo e N₀ anterior ao processo.

O rendimento foi expresso em percentual conforme proposto por (GONSALVES et al., 2009), calculada de acordo com a equação 2.

$$Rendimento(\%) = \frac{\text{massa final do processo}}{\text{massa teórica inicial}} \times 100 \quad (2)$$

2.6 Viabilidade das células microencapsuladas de *Pediococcus pentosaceus* P107 ao armazenamento em diferentes temperaturas

A viabilidade das células livres e das microcápsulas contendo *P. pentosaceus* P107 foram realizadas durante 110 dias de armazenamento, em três diferentes temperaturas, -20 ± 1 °C (congelamento), 4 ± 1 °C (refrigeração) e 25 ± 1 °C (ambiente). Para o rompimento das microcápsulas de WP e WX, 0,01 g de pó foi disperso em 1 mL de solução salina 0,5% (m.v⁻¹) pH 2,5 contendo 3 mg.mL⁻¹ de pepsina e mantido em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C durante 30 min, conforme Meira, Helfer, Velho, Lopes, & Brandelli (2012) com

modificações. Já para a microcápsula W, 0,01 g do pó foi suspenso em 1 mL de tampão PBS (100 mM, pH 7,4) e mantido em agitador orbital a 150 rpm a 37 °C durante 30 min, conforme Eckert et al. (2017) com modificações. Para a determinação das células livres de *P. pentosaceus* P107, 0,01 g do pó foi suspenso em 1 mL de água peptonada 0,15% (m.v⁻¹) estéril e homogeneizada em vórtex. A contagem das células viáveis foi determinada conforme no item 2.4.

2.7 Sobrevivência das células livres e microencapsuladas expostas às condições gastrintestinais simuladas *in vitro*

Anterior aos 7 dias de armazenamento a -20 °C a célula livre e as microcápsulas foram submetidas a 60 min de exposição aos fluidos gástricos e 240 min aos fluidos intestinais simulados. O teste foi realizado de acordo com o método proposto por Meira, Helfer, Velho, Lopes, & Brandelli (2012) com modificações. Para isso, 0,1 g das célula livres e microencapsuladas foram expostas a 1 mL de suco gástrico simulado, contendo 3,0 mg.mL⁻¹ de pepsina e solução salina 0,5% (m.v⁻¹), acidificado com HCl para pH 2,0, 2,5 e 3,0. Já para o suco intestinal simulado a solução foi preparada com 1,0 mg mL⁻¹ de pancreatina e solução salina 0,5% de (m.v⁻¹), e o pH foi ajustado para 8,0, com ou sem 0,5% de bile bovina. Ambas as soluções foram esterilizadas por filtração por meio de membranas de 0,22 µm (Sartorius Stedim Biotech, GmbH, Goettingen, Germany). Alíquotas foram coletadas e a contagem de células viáveis foi realizada conforme item 2.3.

2.8 Resistência Térmica

A resistência térmica foi realizada conforme Ilha et al. (2015) com modificações., utilizando 1 g do micro-organismo livre e microencapsulado adicionados de 9 mL de água peptonada 0,1% (m.v⁻¹) em tubos de ensaio e submetidos às condições térmicas de 65 °C por 30 min e 72 °C por 15 seg em banho termostático (QUIMIS, Brasil), seguidos de banho de

gelo em imersão por 10 min. Após alíquotas foram coletadas e contagens realizadas como descrito no item 2.4.

2.9 Análise estatística

Os dados obtidos foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o programa Graphpad Prism 7 seguidos pelo teste de Tukey para comparação das médias em um nível de 95% ($p < 0,05$) de significância. As análises foram realizadas em triplicata e os resultados da microencapsulação e secagem foram calculados com médias de três experimentos independentes.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Caracterização das microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107

A Tabela 1 apresenta os valores de umidade, atividade de água e de cor para as três microcápsulas produzidas. Pode-se observar que os valores de atividade de água apresentaram baixa variação entre as três microcápsulas produzidas, sendo observados valores entre 0,233 e 0,265. Estes valores estão de acordo com o referenciado na literatura ($< 0,6$) para produtos atomizados e do mínimo necessário para manter a viabilidade celular (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; ECKERT et al., 2017; FAVARO-TRINDADE et al., 2010; FRITZEN-FREIRE et al., 2012). De Castro-Cislaghi et al., (2012) encontraram resultado semelhante para a atividade de água (0,23) ao analisar microcápsulas de soro de queijo.

Já os valores de umidade diferiram entre as microcápsulas, onde a microcápsula W apresentou o menor valor (0,86%), a microcápsula WX um valor intermediário (1,93%) e a microcápsula WP o valor mais elevado de umidade (3,40%). Entretanto, todas as microcápsulas se mantiveram abaixo do valor máximo recomendado (4%) para produtos lácteos secos de boa qualidade, diminuindo assim os riscos associados ao armazenamento,

como a cristalização da lactose, ainda presente no soro de queijo utilizado como material encapsulante (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005; GARDINER et al., 2000; RANADHEERA et al., 2015).

Eckert et al. (2017) encontraram valores de umidade de 4,12% para microcápsula de soro de queijo, obtida por *spray drying*. (Rajam & Anandharamakrishnan, (2015) encontraram valores que variavam de 5,52 até 9,47% de umidade nas microcápsulas contendo frutooligossacarídeos ou proteínas do soro. Muitos dos valores encontrados na literatura são superiores ao do presente estudo e, alguns fatores como parâmetros do equipamento, temperatura de entrada e saída, e escolha do material encapsulante podem influenciar diretamente neste parâmetro, visto que, por exemplo, cada polímero tem uma capacidade diferente de se ligar a água (GARDINER et al., 2000; OLIVEIRA et al., 2007).

Com relação a cor, as três microcápsulas apresentaram valores altos para L^* , indicando cores claras, valores negativos para a^* que indicam tons verdes e valores de b^* positivos indicando tendência ao amarelo. Estes parâmetros podem ser atribuídos a predominância do emprego de soro de queijo nas três microcápsulas produzidas, visto que o soro apresenta coloração amarelo-esverdeado e ao secar pode pronunciar sua cor devido a reação de Maillard (Carvalho, Prazeres, & Rivas, 2013; Eckert et al., 2017).

Tabela 1. Características das microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107.

Microcápsulas	Umidade (%)	Atividade de água	Parâmetros de cor
			L*= 95,65
W	0,86 ± 0,01 ^c	0,233 ± 0,01 ^a	a*= -1,67 b*= 5,68
			L*= 94,24
WX	1,93 ± 0,02 ^b	0,244 ± 0,01 ^a	a*= -0,56 b*= 7,19
			L*= 96,12
WP	3,40 ± 0,01 ^a	0,265 ± 0,02 ^a	a*= -0,24 b*= 4,82

W: microcápsula de soro de queijo;

WX: microcápsula de soro de queijo e xantana;

WP: microcápsula de soro de queijo e pectina;

^{a-c} Médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística ($p < 0,05$).

A Figura 1 mostra as imagens de microscopia eletrônica de varredura (MEV) das células livres e das microcápsulas. A célula livre apresentou um tamanho médio de $2,98 \pm 0,45 \mu\text{m}$, tamanho este considerado inferior em comparação ao tamanho das microcápsulas, as quais apresentaram tamanhos médios de $12,32 \pm 0,80 \mu\text{m}$, $6,99 \pm 0,67 \mu\text{m}$, $9,87 \pm 0,76 \mu\text{m}$ para W, WP e WX, respectivamente. As microcápsulas contendo soro de queijo (W) e soro de queijo com goma xantana (WX) são mais simétricas e arredondadas, provavelmente o soro de queijo possa influenciar nesta conformação e a goma xantana não altera, também mantendo o padrão esférico. Já a microcápsula WP possui um formato levemente arredondado, porém com algumas deformações em sua superfície, fato este que pode estar associado a interação do calor do processo com a pectina.

Os resultados do presente estudo quanto a morfologia e tamanho das microcápsulas, são relatadas na literatura como sendo adequadas para uso na indústria alimentícia, visto que não irão interferir nas características sensoriais dos alimentos produzidos (Martín et al., 2015; Ranadheera, Evans, Adams, & Baines, 2015).

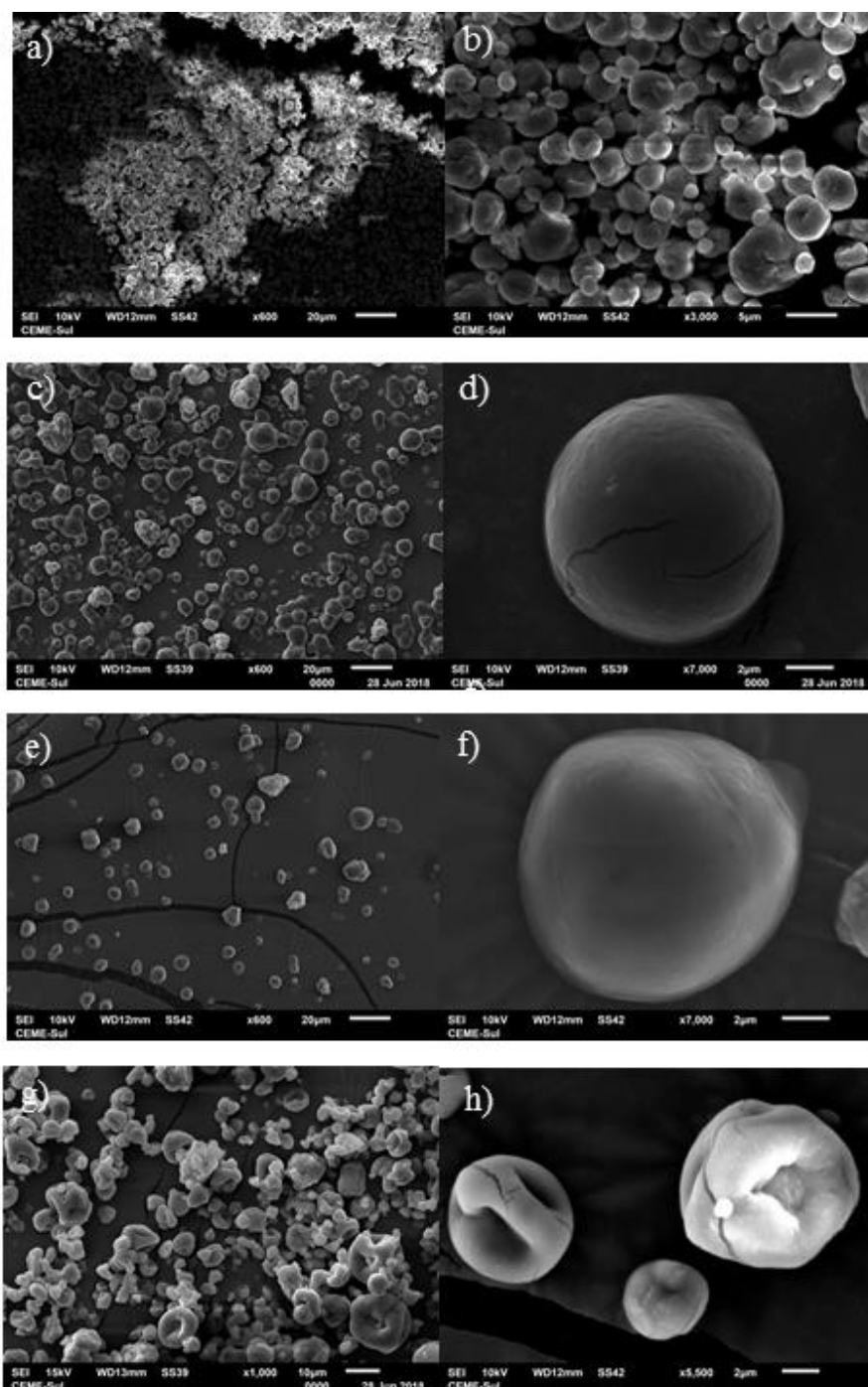


Fig 1. Imagem de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) de *Pediococcus pentosaceus* P107 livre (a,b), microencapsulado com soro de queijo W (c,d), com soro de queijo e goma xantana WX (e,f), e com soro de queijo e pectina WP (g,h) aos 7 dias de armazenamento a -20 °C.

3.1 Característica do rompimento e viabilidade celular

Por meio dos resultados obtidos pode-se inferir que as microcápsulas W apresentou diferença significativa entre os tempos de exposição em tampão PBS 100 mM (pH 7,4) (Tabela 2) sendo eficiente no rompimento da mesma e apresentando a maior concentração celular (12,85 Log UFC g⁻¹) em 30 min. Já em solução salina (0,5% pH 2,5 com pepsina 3 mg.mL⁻¹), não houve diferença entre os tempos de exposição e exibiu concentração celular menor (Tabela 1).

O tampão PBS na concentração de 100 mM tem sido descrito na literatura como tampão de rompimento para microcápsulas (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; ECKERT et al., 2017; FRITZEN-FREIRE et al., 2012; ILHA et al., 2015; NUNES et al., 2018). Porém cabe salientar que o material de parede, assim como o tempo de exposição influenciam na ruptura e exposição do núcleo (PINTO et al., 2015b; WANG et al., 2016).

No estudo de Eckert et al. (2017) as microcápsulas de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 produzidas com soro de queijo por *spray drying* foram rompidas utilizando tampão PBS 100 mM (pH 7,4) por 15 min. Assim como no estudo de De Castro-Cislaghi, Silva, Fritzen-Freire, Lorenz, & Sant'Anna, (2012) os quais utilizaram o mesmo tampão de rompimento, porém pelo tempo de 10 min, ao microencapsular *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* Bb-12 com soro de leite por *spray drying*.

De acordo com Shori (2016) o uso do soro de queijo no cultivo celular e como material protetor pode potencializar a viabilidade de probióticos, visto que durante o processamento térmico, ocorre a liberação de aminoácidos sulfurados que pode reduzir o efeito redox. Além do mais, Eckert et al. (2017) e Pinto et al. (2015) ressaltam que as proteínas encontradas no soro como a α -lactoalbumina e a β -lactoglobulina podem interagir

com a membrana lipídica da célula bacteriana durante a secagem, criando uma estrutura que promove proteção da célula.

Para as microcápsulas WP o tampão PBS não foi capaz de expor as células de *P. pentosaceus* P107 no tempo total de 120 min, ao contrário da solução ácida que expôs de forma significativa, a maior concentração de células (13,63 Log UFC.g⁻¹) em 30 min de análise.

A pectina é um polissacarídeo espessante, capaz de formar gel, com uma força que se eleva na presença de cálcio, porém reduz na presença de pH ácido (<3,0) e de temperatura elevada, podendo promover poros nessa rede (MENEZES et al., 2015). Este fato pode justificar sua ruptura no presente estudo, mediante a combinação de solução ácida e temperatura. Resultado semelhante é descrito por Gerez et al. (2012) que microencapsularam *L. rhamnosus* CRL 1505 com complexo de proteínas de soro de leite e pectina, utilizando para o rompimento uma solução de citrato de sódio a 2% por 15 min.

Quando analisada as microcápsulas WX, observou-se que o rompimento em tampão PBS mostrou diferença significativa entre os tempos analisados, ocorrendo aumento da viabilidade celular com o aumento do tempo de exposição, mas não superior a determinada na solução ácida que apresentou maior viabilidade celular aos 30 min, decrescendo com o tempo de exposição.

A maior resistência à ruptura em tampão PBS pode ser em virtude da propriedade pseudo-plástica da xantana. Na literatura há poucos relatos de estudos que utilizam goma xantana na microencapsulação de probióticos. Argin, Ko, & Lo, (2014) microencapsularam *Pediococcus acidilactici* pela técnica de coacervação seguido de liofilização com xantana e quitosana, utilizando solução ácida (pH 1,0) (pepsina, NaCl, HCl) por período inferior a 2,5 horas, possivelmente porque o pH ácido promove a quebra das ligações formadas entre a

xantana e a quitosana, promovendo relaxamento e possibilitando a dissolução e exposição das células.

Tabela 2. Rompimento das microcápsulas utilizando diferentes soluções e tempos de análise.

Os dados foram expressos em Log UFC g⁻¹.

Tempo (min)	Tampão PBS 100 mM pH 7,4			Solução salina 0,5% pH 2,5 e pepsina 3 mg.mL ⁻¹		
	Log UFC g ⁻¹					
	W	WP	WX	W	WP	WX
30	12,85 ± 0,34 ^{a,A}	0,00 ± 0,00 ^{a,B}	7,09 ± 0,13 ^{c,B}	8,92 ± 0,07 ^{a,B}	13,63 ± 0,15 ^{a,A}	12,99 ± 0,20 ^{a,A}
60	12,69 ± 0,10 ^{b,A}	0,00 ± 0,00 ^{a,B}	8,15 ± 0,15 ^{b,B}	8,76 ± 0,26 ^{a,B}	9,15 ± 0,15 ^{b,A}	11,58 ± 0,51 ^{b,A}
120	11,87 ± 0,67 ^{c,A}	0,00 ± 0,00 ^{a,B}	9,15 ± 0,15 ^{a,B}	8,44 ± 0,39 ^{a,B}	9,00 ± 0,10 ^{b,A}	11,15 ± 0,15 ^{b,A}

W: microcápsula de soro de queijo;

WP: microcápsula de soro de queijo e pectina;

WX: microcápsula de soro de queijo e xantana;

Os resultados representam a média (desvios padrão), n=3.

^{a-c} Médias com letras minúsculas sobrescritas diferentes na mesma coluna representam diferença estatística (p <0,05). ^{A-B} Médias com letras maiúsculas sobrescritas diferentes na mesma linha referente a mesma amostra representam diferença estatística (p <0,05).

A viabilidade das células livres e microencapsuladas de *P. pentosaceus* P107, a eficiência de encapsulação e o rendimento do processo podem ser observados na Tabela 3.

Tabela 3. Viabilidade *Pediococcus pentosaceus* P107 livre e microencapsulado antes e após *spray drying*.

	Número de células viáveis (Log UFC.g ⁻¹)		Redução (Log UFC.g ⁻¹)	Eficiência de Encapsulação (EE%)	Rendimento (%)
	Antes <i>spray drying</i>	Após <i>spray drying</i>			
Célula livre	14,10 ± 0,06	10,45 ± 0,28	3,65 ± 0,22 ^a	NA	1,38 ± 0,85 ^d
W	13,50 ± 0,20	12,45 ± 0,71	1,05 ± 0,51 ^b	92,22 ± 0,50 ^b	17,37 ± 1,05 ^{a,b}
WX	13,67 ± 0,50	12,39 ± 0,80	1,28 ± 0,30 ^b	90,63 ± 0,25 ^c	9,58 ± 0,98 ^c
WP	13,76 ± 0,22	13,63 ± 0,50	0,13 ± 0,28 ^c	99,05 ± 0,20 ^a	15,23 ± 0,67 ^b

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;

W: microcápsula de soro de queijo;

WP: microcápsula de soro de queijo e pectina;

WX: microcápsula de soro de queijo e xantana;

Os resultados representam a média ± desvios padrão (n=3).

^{a,d} Médias com letras sobrescritas diferentes, na mesma coluna representam diferença estatística (p<0,05).

NA = Não se aplica

A célula livre apresentou uma redução de 3,65 Log UFC.g⁻¹, porém, ainda assim, com alta viabilidade celular ao final do processo (10,45 Log UFC.g⁻¹), enquanto que as microcápsulas apresentaram reduções de 1,05, 1,28 e 0,13 Log UFC.g⁻¹ para W, WX e WP, respectivamente. Cabe salientar que vários estudos utilizam um meio veículo ao fazer a secagem por *spray drying* (FERREIRA et al., 2017; MORGAN et al., 2006), favorecendo a sobrevivência ao processo de secagem, ao contrário do presente estudo, em que nenhum material protetor foi adicionado, apenas as células livres de *P. pentosaceus* P107 lavadas e ressuspensas em água destilada esterilizada.

A técnica de *spray drying* possui como principal desvantagem o uso de altas temperaturas, sendo prejudicial à célula bacteriana (Eckert et al., 2017; Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015). Outros fatores que podem contribuir de forma positiva para minimizar a redução de viabilidade, são a escolha do meio de cultivo celular, material

encapsulante e os ajustes de temperatura, velocidade de passagem da amostra e pressão do ar do equipamento (ABD EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015; ECKERT et al., 2017; LIAO et al., 2017; SHOKRI et al., 2015).

Tanto a liofilização quanto a atomização são utilizadas para a secagem de células visando a conservação e viabilidade destas (KANDIL; SODA, 2015; PORTO et al., 2017; SHOKRI et al., 2015). Porém, a liofilização é um processo oneroso quando comparado a atomização, visto que o equipamento (*spray dryer*) já está disponível dentro da maioria das indústrias de laticínios (HUANG et al., 2017; SANTOS; NOGUEIRA; ROSENTHAL, 2018). Além disso, é um método dispendioso de tempo de preparo e processo da amostra (MORGAN et al., 2006) e exige o uso de algum material protetor, como leite desnatado ou glicerol.

Estudo de Ferreira et al. (2017), onde compararam estes dois métodos de secagem com as células de *L. plantarum*, confirmaram que a secagem por atomização proporcionou uma maior viabilidade as células após o processo e durante a estocagem a 4 °C. Um fator possivelmente determinante é o pré-processamento, que consiste no congelamento lento das células, originando cristais de gelo, os quais são prejudiciais as células bacterianas, levando a lesões na membrana plasmática e desnaturação proteica (GIULIO et al., 2005).

Os resultados provenientes da eficiência de encapsulação demonstraram que a microcápsulas WP apresentaram a maior eficiência (99,05%) em relação às demais. Ainda assim, ressalta-se que as três microcápsulas apresentaram valores acima de 90%, e este percentual pode ser atribuído a alguns fatores como o teor de sólidos totais, apresentando uma variação entre 19,25% (W, WP) e 20,5% (WX), corroborando com a literatura a qual indica percentuais de 20-30% de sólidos totais com influenciador positivo na eficiência de encapsulação (Huang et al., 2017; Huang et al., 2016). Ainda cabe destacar o cultivo celular, tendo em vista que o meio escolhido pode influenciar diretamente na resistência das células

ao processo. De acordo com Huang et al. (2017), a utilização de soro de queijo como meio de cultivo, promove o acúmulo de solutos compatíveis por micro-organismo, como aminoácidos e carboidratos, na tentativa de compensar a redução de atividade água e aumento da pressão osmótica. Estes solutos podem apresentar maior disponibilidade nestes produtos se comparados a meios comerciais como o MRS.

3.2 Viabilidade das células livre e microencapsuladas de *P. pentosaceus* P107 ao armazenamento em diferentes temperaturas

Na Figura 2 estão apresentados os resultados referentes as células livres e microencapsuladas de *P. pentosaceus* P107 nas temperaturas de -20 °C, 4 °C e 25 °C, durante 110 dias de armazenamento.

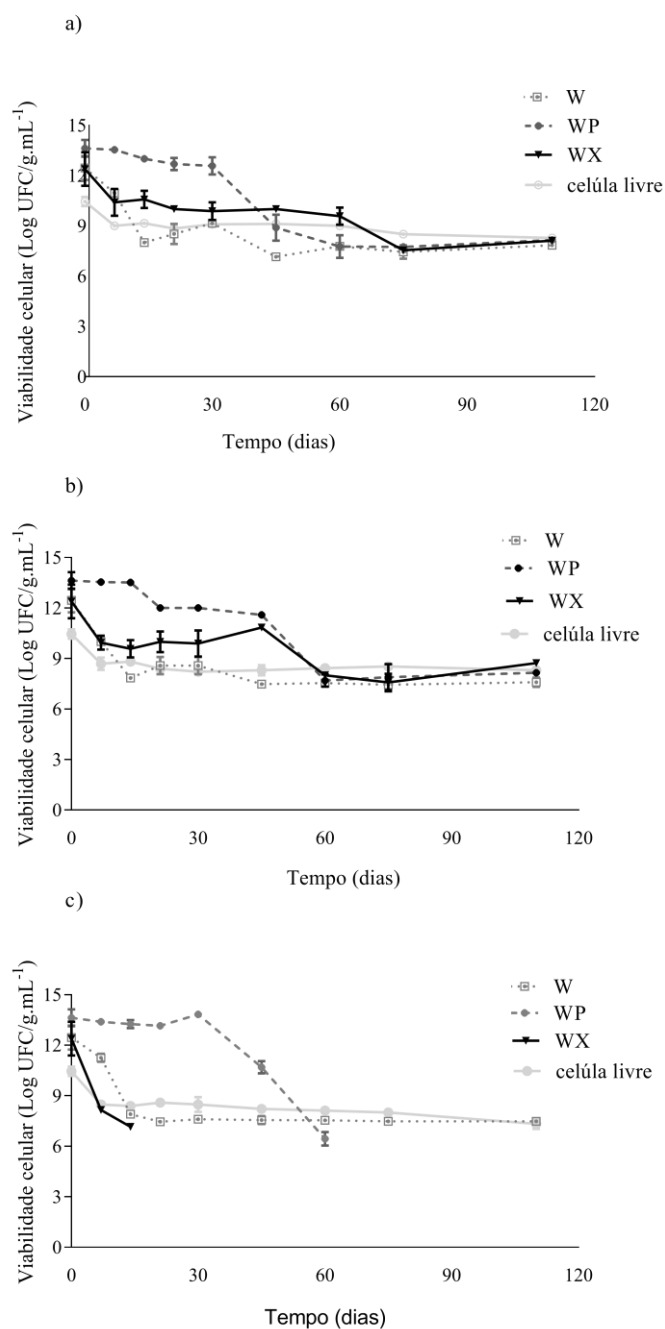


Fig. 2 Viabilidade de *Pediococcus pentosaceus* P107 livre e microencapsulado durante 110 dias de armazenamento nas temperaturas de congelamento, -20 °C, (a), refrigeração, 4 °C, (b) e ambiente, 25 °C, (c). Os resultados estão apresentados como médias $\pm$ desvios padrão (n=3).

W: microcápsula de soro de queijo;

WP: microcápsula de soro de queijo com pectina;

WX: microcápsula de soro de queijo com xantana;

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;

Quando analisada a temperatura de -20 e 4 °C observou-se um comportamento semelhante entre as microcápsulas, onde a microcápsula WX foi a que se manteve mais estável ao longo do tempo. Diferentemente da microcápsula WP, que embora apresentasse a maior viabilidade celular ($>12 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) em 30 dias de armazenamento, não se manteve estável, visto a queda abrupta de viabilidade no período destacado.

Aos 15 dias de armazenamento a microcápsula W foi a que apresentou maior perda inicial, reduzindo 4,45 e 4,61 Log UFC.g⁻¹ respectivamente, para -20 e 4 °C, enquanto que a microcápsula WP apresentou redução de apenas 0,63 e 0,12 Log UFC.g⁻¹. A partir do período de 60 dias a viabilidade das microcápsulas e as células livre não apresentavam diferença significativa entre si, com contagens de 8,5 a 7 Log UFC.g⁻¹, sendo este valor considerado acima do mínimo preconizado para ser probiótico no alimento (6 Log UFC.g⁻¹) (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP, 2002).

Lavari, Páez, Cuatrin, Reinheimer, & Vinderola, (2014) compararam três micro-organismos (*Lactobacillus paracasei* JP1, *Lb. rhamnosus* 64 e *Lb. gasseri* 37 microencapsulados por *spray drying*, utilizando como materiais encapsulantes o amido de soro de queijo e amido de leite desnatado, armazenados a 5 °C por 180 dias e não encontraram diferenças significativas entre os dois materiais utilizados, porém encontraram diferenças significativas entre os diferentes micro-organismos estudados, ressaltando a importância das características do micro-organismo escolhido que se sobrepõe a escolha do material de parede neste caso. Já De Castro-Cislaghi et al. (2012) obtiveram alta viabilidade das microcápsulas de *Bifidobacterium* Bb-12 ($>9 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) com soro de queijo a 4 °C por até 12 semanas de armazenamento, assim como no presente estudo que permaneceram por 110 dias (15 semanas). Tais resultados descritos demonstram que o soro de queijo é um promissor material de parede na proteção de células probióticas.

A temperatura de 25 °C (Fig. 2) afetou diferentemente as microcápsulas. A microcápsula de soro (WC) e as células livres de *P. pentosaceus* P107 mantiveram um padrão semelhante de perda de viabilidade, apresentando uma diminuição nos primeiros 15 dias e mantendo contagens em torno de 7 log UFC.g⁻¹ até os 110 dias. As microcápsulas com soro de queijo e pectina (WP) apresentaram viabilidade constante para utilização como probiótico até o período de 30 dias, após este período apresentou redução de viabilidade até o período de 60 dias a partir do qual não apresentou mais viabilidade mínima probiótica. Resultados semelhantes foram observados no estudo de Ananta, Volkert, & Knorr, (2005) que utilizaram leite desnatado como material de revestimento para *Lactobacillus rhamnosus* GG e obtiveram alta viabilidade por 30 dias de armazenamento a 25 °C. A microcápsula de soro de queijo com goma xantana (WX) apresentou uma queda brusca de viabilidade, chegando ao valor inferior a 6 log UFC.g⁻¹ em 15 dias de análise, não sendo mais considerada probiótica.

Tendo em vista que a maioria dos alimentos que contém bactérias probióticas são de base láctea, existe a necessidade de armazenamento dos produtos sob refrigeração (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016; ECKERT et al., 2017; MANINI et al., 2016). Os resultados obtidos neste estudo mostram que essas células podem ser armazenadas à temperatura ambiente (25 °C) e que talvez seja possível a aplicação em alimentos com bases não-lácteas de armazenamento menos oneroso.

3.3 Sobrevivência de *Pediococcus pentosaceus* P107 microencapsulado a passagem pelo trato gastrointestinal simulado

A Figura 3 apresenta a viabilidade das microcápsulas de *P. pentosaceus* P107 encapsulado após a passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Observou-se que nas microcápsula WX apresentou maior viabilidade nos três diferentes pH avaliados, exibindo valores que variaram de $11,58 \pm 0,15$ Log UFC.g⁻¹ no pH 2,5 até $13,39 \pm 0,08$ Log UFC.g⁻¹

no pH 2,0, demonstrando sua maior proteção dos agentes encapsulantes às células de *P. pentosaceus* P107 quando comparadas as outras duas microcápsulas.

Quando exposto ao pH 2,0 durante 60 min (Fig. 3) todas microcápsulas e a célula livre apresentaram diferença significativa, WX apresentou a maior viabilidade celular, seguido de W e WP, enquanto que a célula livre expôs a menor viabilidade ($7,15 \pm 0,06 \log \text{UFC.g}^{-1}$). Para o pH 3,0 W e a célula livre se mantiveram iguais e novamente WX apresentou as maiores contagens ($12,69 \log \text{UFC.g}^{-1}$).

Chen et al., (2015) microencapsularam *B. bifidum* BB01 pela técnica de extrusão com xantana-quitosana, e encontraram viabilidade abaixo de 8 Log UFC.g⁻¹ quando expostas a pH 1,2 por 60 min, enquanto que De Castro-Cislaghi et al. (2012) encontraram diferença na viabilidade entre célula livre de *Bifidobacterium* Bb-12 e microencapsulada com soro de queijo por *spray drying* apenas quando submetidos ao pH 2,0, onde a célula livre apresentou uma maior redução da viabilidade.

Brinques, Antônio, & Ayub, (2011) encontraram redução significativa na viabilidade celular de *L. plantarum* livre e microencapsulado com pectina e pectina mais alginato exposto a 120 min em pH 2,0. Ambos materiais encapsulantes não foram eficazes na proteção das células, sendo observada viabilidade inferior a 6 Log UFC.g⁻¹ (NP). No presente trabalho, os resultados mostram que pectina associada a soro de queijo protegeu as células a exposição ácida (pH 2,0) por 60 minutos.

Quando submetidos ao suco intestinal simulado na ausência de sais biliares, apenas a célula livre apresentou diferença significativa quando comparada as microcápsulas, porém as microcápsulas ainda não estariam completamente rompidas e com exposição máxima de células, como a própria célula livre, visto que o pH desta solução é neutro e não há a presença de sais. Podendo ser confirmado quando analisado, por exemplo, a microcápsula WX na presença de sais biliares que apresentou viabilidade superior às demais microcápsulas e a

célula livre. Este fato possivelmente se deve pela presença de sais biliares os quais podem promover o rompimento das ligações de soro e goma xantana presentes na parede da microcápsula, expondo as células.

Chen et al. (2015) ressaltam ainda que quando as microcápsulas foram expostas a 1% de sais biliares por 60 min, encontraram viabilidade abaixo de 7 Log UFC.g⁻¹. Já no estudo de De Castro-Cislaghi et al. (2012) as microcápsulas apresentaram maior viabilidade (>10 Log UFC.g⁻¹) que a célula livre (> 9 Log UFC.g⁻¹) quando expostas a 0,5% de sais biliares por 60 min.

Brinques, Antônio, & Ayub, (2011) observaram baixa redução na viabilidade das células livres quando submetidas aos sais biliares a 4,5% no tempo máximo de 120 min. Ao avaliar as microcápsulas contendo pectina com alginato não foi observada redução da viabilidade. Já no presente estudo a microcápsula com pectina demonstra viabilidade menor quando exposta aos sais biliares se comparada a exposição sem sais.

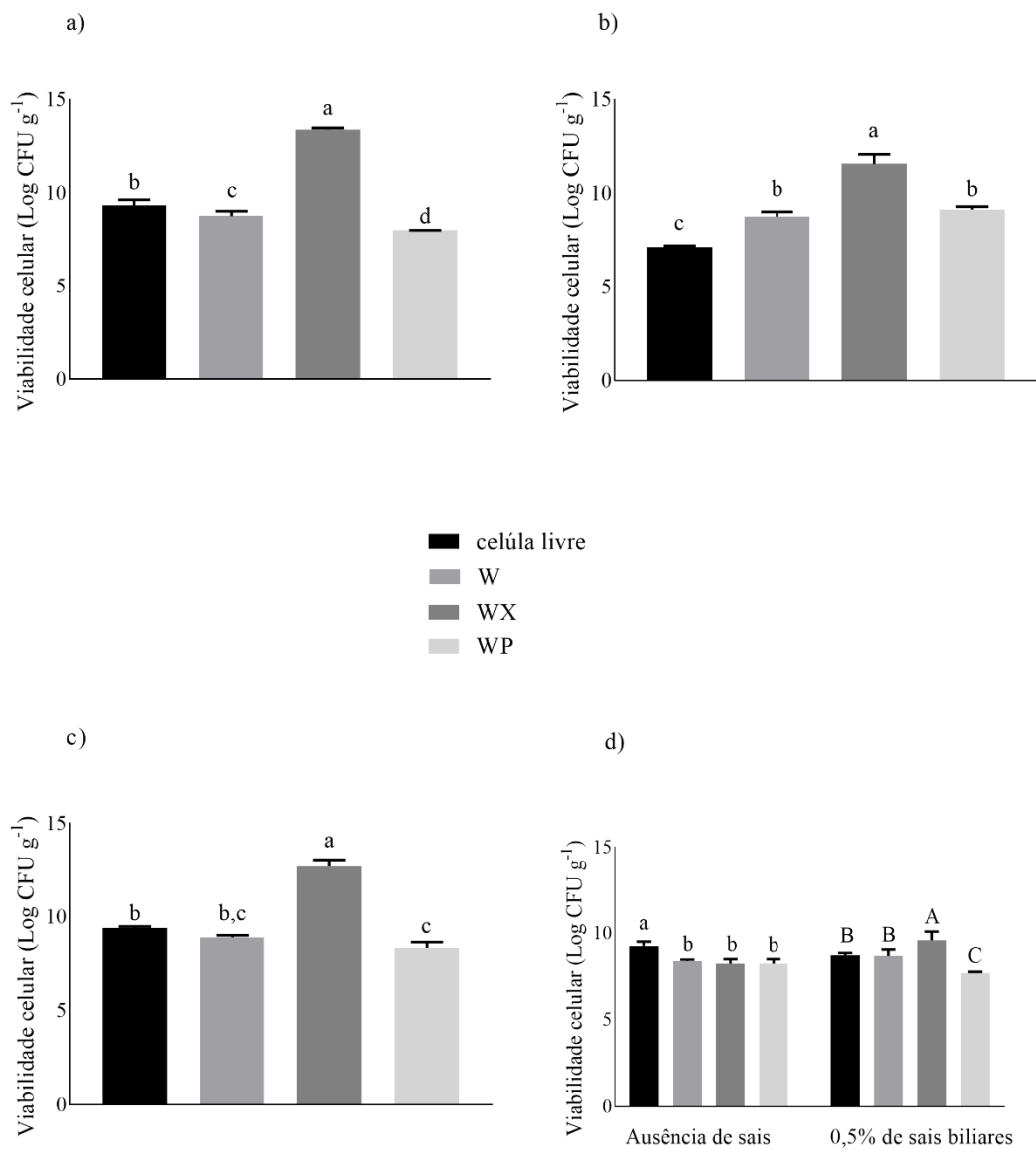


Fig. 3. Viabilidade de *Pediococcus pentosaceus* P107 livre e microencapsulado em até 7 dias de armazenamento a -20°C durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado. (a) fluido gástrico pH 2,0 por 60 min, (b) fluido gástrico pH 2,5 por 60 min, (c) fluido gástrico pH 3,0 por 60 min, (d) fluido intestinal com 0,5% de sais biliares e sem sais biliares, ambos por 4 h. ^{A-C} Médias $\pm$ desvio padrão com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$). ^{a-d} Médias $\pm$ desvio padrão com letras minúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$).

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;
W: microcápsula de soro de queijo;
WP: microcápsula de soro de queijo com pectina;
WX: microcápsula de soro de queijo com xantana;

3.4 Avaliação da resistência térmica

Na Tabela 4 estão apresentados os valores resultantes do teste de submissão da célula livre e das microcápsulas ao tratamento térmico, tendo como parâmetro a contagem de células no tempo zero.

No primeiro tratamento térmico (65 °C por 30 min) a célula livre de *P. pentosaceus* P107 não apresentou resistência ao processo, porém observou-se viabilidade quando as células foram submetidas a microencapsulação, sendo que a microcápsula WP foi a que apresentou maior proteção às células pela exposição ao calor, seguido da microcápsula WX e W, com contagens de células viáveis de 12,01, 9,28 e 6,90 Log UFC.g⁻¹, respectivamente.

Ilha et al. (2015) submeteram as células de *L. paracasei* FNU livres e microencapsuladas por *spray drying* com soro de queijo, ao teste térmico a 65 °C por 30 min, e observaram que as células livres apresentaram viabilidade inferior a 6 Log UFC.g⁻¹, já a microcápsula apresentou um valor de 6,06 Log UFC.g⁻¹, corroborando com os resultados do presente estudo, embora algumas microcápsulas apresentassem valores maiores. No estudo de Ding & Shah, (2009) aos 30 min de exposição ao calor (65 °C) observaram que ainda havia viabilidade de células livres, mas que as respectivas microcápsulas foram mais eficientes na proteção destas, diferindo do encontrado neste estudo em que as células livres não apresentaram viabilidade mínima desejada.

Na temperatura de 72 °C por 15 seg, a célula livre apresentou sobrevivência ao final do processo com alta viabilidade (9,16 Log UFC.g⁻¹). Com relação as microcápsulas, estas apresentaram resultado similar ao tratamento térmico a 65 °C por 30 min, onde a microcápsula WP apresentou maior viabilidade (12,98 Log UFC.g⁻¹), seguido da microcápsula WX e W, com contagens de 10,46 e 8,05 Log UFC.g⁻¹, respectivamente. Os valores de viabilidade no teste térmico de 72 °C por 15 seg foram superiores aos observados no tratamento a 65 °C por 30 min. Embora a temperatura do segundo teste seja maior, o

tempo de exposição é significativamente inferior, causando menor injúria pelo calor nas células e na parede da microcápsula.

Tabela 4. Viabilidade de *Pediococcus pentosaceus* P107 livre e microencapsulado submetido ao tratamento térmico.

	Tempo zero	65 °C por 30 min	72 °C por 15 seg
	Log UFC.g ⁻¹		
Célula livre	9,15 ± 0,15 ^a	CV ^b	9,16 ± 0,11 ^a
W	8,00 ± 0,01 ^a	6,90 ± 0,30 ^b	8,05 ± 0,10 ^a
WX	10,58 ± 0,51 ^a	9,28 ± 0,10 ^b	10,46 ± 0,11 ^a
WP	13,00 ± 0,39 ^a	12,01 ± 0,51 ^a	12,98 ± 0,24 ^a

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;

W: microcápsula de soro de queijo;

WX: microcápsula de soro de queijo e xantana;

WP: microcápsula de soro de queijo e pectina;

CV = Células viáveis < 6 Log CFU.g⁻¹;

^{a-b} Médias ± desvio padrão com letras maiúsculas sobrescritas diferentes nas mesma linha indicam diferença significativa (p < 0,05).

4. CONCLUSÕES

Conclui-se que o método de *spray drying* é eficiente tanto para a secagem de células livres quanto para a microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107. Embora a secagem tenha sido eficiente, e a célula livre apresentasse resultados positivos em alguns testes a microencapsulação foi muito eficaz na proteção das células, apresentando maiores valores de viabilidade celular, como a eficiência de encapsulação, onde destaca-se a microcápsula WP a qual apresentou um percentual de 99% de EE. Esta microcápsula apresentou maior viabilidade celular nos primeiros 15 dias de armazenamento em todas temperaturas analisadas, e se manteve com valores satisfatório até 110 dias a -20 e 4 °C e ainda, maior resistência aos tratamentos térmicos.

Já a microcápsula WX, apresentou maior proteção ao micro-organismo na passagem pelo TGI, e também apresentou viabilidade satisfatória ($>9 \text{ Log UFC.g}^{-1}$) no teste térmico e estabilidade ao armazenamento a -20 e 4°C .

A microcápsula W apresentou a segunda melhor EE (90%) e se manteve estável após os 15 primeiros dias até o final de 110 dias em todas temperaturas de armazenamento avaliadas, embora com contagens de células inferiores às demais. Destaca-se a temperatura de 25°C , na qual as células permaneceram viáveis ao longo de toda análise. As microcápsulas WX e WP a partir de 15 e 60 dias, respectivamente, não apresentaram mais viabilidade celular mínima que *Pediococcus pentosaceus* P107 pudesse exercer potencial probiótico.

Por fim, conclui-se que a escolha do uso de microcápsulas, bem como do material encapsulante ou apenas da célula livre seca dependerá do objetivo de aplicação deste micro-organismo. Para este estudo o equipamento e seus parâmetros, bem como o material encapsulante utilizados foram capazes de prolongar a viabilidade celular de *Pediococcus pentosaceus* P107.

Agradecimentos:

Este estudo foi financiado em parte pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código Financeiro 001. Os autores agradecem também o apoio financeiro das agências brasileiras: CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq. Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio Grande do Sul – Brasil.

5. REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, Mohamed H.; EL-SHIBINY, Safinaz. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science and Technology**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 393–412, 2015.
- ABERKANE, Leïla; ROUDAUT, Gaëlle; SAUREL, Rémi. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1505–1517, 2014.
- ANAL, Anil Kumar; SINGH, Harjinder. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 399–409, 2005.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. Truelstrup. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 184–193, 2008.
- ARGIN, Sanem; KO, Peter; LO, Y. Martin. Food Hydrocolloids The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan e chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. [s. l.], v. 40, p. 138–144, 2014.
- BARRETO, Andressa Ribas; RAMÍREZ-MÉRIDA, Luis Guillermo; ETCHEPARE, Mariana De Araújo. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos Coating materials used in the microencapsulation of probiotics. **Ciência e Natureza**, [s. l.], v. 37, p. 164–174, 2015.
- BELHADJ, Hani et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 11–23, 2014. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/bmfh/33.11?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>
- BELKIN, Shimshon et al. Advances in preservation methods : keeping biosensor microorganisms alive and active. [s. l.], p. 43–49, 2006.
- BRINQUES, Graziela Brusch; ANTÔNIO, Marco; AYUB, Záchia. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions , refrigeration , and yogurt. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 123–128, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.006>>
- BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>>
- CARVALHO, Fátima; PRAZERES, Ana R.; RIVAS, Javier. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 445–446, p. 385–396, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>>
- CASTRO, Simone Vieira et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 1–18, 2011.
- CHEN, He et al. On microcapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels *. [s. l.], n. 2014, 2015.
- CHEN, Li et al. Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.005>>
- DAMODHARAN, Karthiyaini et al. Preliminary probiotic and technological characterization

- of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. AUG, p. 1–14, 2015.
- DE CASTRO-CISLAGHI, Fabiane Picinin et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>>
- DE PAOLI, Paolo. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 897–910, 2005. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168644505000124>>. Acesso em: 2 fev. 2019.
- DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal tract. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 37–54, 2008.
- DIANAWATI, Dianawati; MISHRA, Vijay; SHAH, Nagendra P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1685–1716, 2016.
- DIMITRELLOU, Dimitra et al. Novel probiotic whey cheese with immobilized lactobacilli on casein. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 86, p. 627–634, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.028>>
- DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 74, n. 2, 2009.
- DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity , safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 63, p. e9–e10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>>
- DORES, M. T.; SILVA, C. R. Evaluation of Pre-Inocular Aeration Conditions Used in the Cultivation of Lactical Acid Bacteria in Liquid Medium. [s. l.], v. 03, p. 835–840, 2017.
- ECKERT, Camila et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, p. 176–183, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.045>>
- ELENA, Maria; MICHELA, Martino. Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penocin operon. [s. l.], p. 1149–1163, 2013.
- FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 336–340, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>>
- FERREIRA, A. A. et al. Tracking Amazonian cheese microbial diversity : Development of an original , sustainable , and robust starter by freeze drying / spray drying. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12418>>
- FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [s. l.], p. 1–11, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>>
- FRITZEN-FREIRE, Carlise B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>>
- FRITZEN-FREIRE, Carlise B. et al. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 39–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>>
- GARDINER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying.

- Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 2605–2612, 2000.
Disponível em: <wos:000087358700045>
- GEBARA, Clarice et al. Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 872–878, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>>
- GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic *Lactobacillus rhamnosus* CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.
- GIULIO, B. De et al. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. [s. l.], p. 739–740, 2005.
- GONSALVES, J. K. M. C. et al. Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, [s. l.], v. 5; n 11, n. L, p. 1–8, 2009.
- HUANG, Song et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 1–17, 2017.
- HUBÁLEK, Zdenek. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 205–229, 2003.
- ILHA, Eunice Cassanego et al. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.
- KAILASAPATHY, Kaila. Current issues in intestinal microbiology_2002_Kailasapathy_Microencapsulation of probiotic bacteria technology and potential appli.pdf. [s. l.], p. 39–48, 2002.
- KALIN, A. S. A. Effects of Fructooligosaccharide and Whey Protein Concentrate on the Viability of Starter Culture in Reduced-Fat Probiotic Yogurt. [s. l.], v. 72, n. 7, p. 222–227, 2007.
- KAMINARIDESSK, Stelios. A modified form of Myzithra cheese produced by substituting the fresh cheese whey by dried whey protein concentrate and ovine milk and cream. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 131, p. 118–122, 2015.
- KANDIL, S.; SODA, M. El. Influence of Freezing and Freeze Drying on Intracellular Enzymatic Activity and Autolytic Properties of Some Lactic Acid Bacterial Strains. [s. l.], n. June, p. 371–382, 2015.
- KAVITAKE, Digambar et al. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 21, n. June 2017, p. 34–44, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>>
- KIM, Jeong Un et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 519–530, 2017.
- KOH, Jeewon; XU, Zhimin; WICKER, Louise. Blueberry Pectin Extraction Methods Influence Physico-Chemical Properties. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 0, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30462831>%0Ahttp://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.14380>
- KRASAEEKOOPT, Wunwisa; BHANDARI, Bhesh; DEETH, Hilton. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3–13, 2003.
- LAGOUEYTE, N.; PAQUIN, P. E. Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. [s. l.], v. 12, p. 4–6, 1998.
- LARENA, I.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a

- biological control agent against Fusarium wilt of tomato. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 151, n. 11–12, p. 600–606, 2003.
- LAVARI, Luisina et al. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. [s. l.], 2014.
- LEITE, A. M. O. et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], p. 1–11, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9265>>
- LIAO, Liang Kun et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, p. 82–89, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>>
- LV, Long Xian et al. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 98, n. 12, p. 5619–5632, 2014.
- MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1991–1998, 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214000964>>
- MANINI, F. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 275–283, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>>
- MARTÍN, María José et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 27, p. 15–25, 2015. a. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>>
- MASUDA, Takeyuki et al. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 329–335, 2010.
- MENEZES, Cáceres De et al. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina Microencapsulation of probiotics by using external ionic gelling pectin. [s. l.], 2015.
- MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying ; A review. [s. l.], v. 66, p. 183–193, 2006.
- NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 89, n. October 2017, p. 128–133, 2018.
- NUNES, Graciele Lorenzoni; MARQUES, Thaiane; HOLKEM, Augusto Tasch. Microencapsulação de culturas probióticas : princípios do método de spray drying Microencapsulation of probiotic cultures : principles of spray drying method. [s. l.], p. 132–141, 2015.
- OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 685–693, 2007. Disponível em: <<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040701532908>>
- PAPAGIANNI, Maria; ANASTASIADOU, Sofia. properties and applications. [s. l.], v. 16, n. class I, p. 1–16, 2009.
- PASSADOR, M. M. et al. Manutenção Da Viabilidade E Patogenicidade De Culturas Mantidas Na Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, [s. l.], v. 72, n. 1, p. 51–55, 2010. Disponível em: <http://www.biológico.sp.gov.br/docs/bio/v72_1/passador.pdf>
- PINTO, Stephanie S. et al. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and

- heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 64, n. 2, p. 1004–1009, 2015. a.
- PINTO, Stephanie S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, [s. l.], v. 67, p. 400–408, 2015. b. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.038>>
- PORTO, Maria Carolina W. et al. *Pediococcus* spp.: An important genus of lactic acid bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 35, n. 3, p. 361–374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>>
- RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>>
- RANADHEERA, C. Senaka et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 123, n. 1, p. 155–159, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.10.012>>
- RATHORE, Sweta et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>>
- RAYES, Nada et al. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation - A randomized, double-blind trial. **American Journal of Transplantation**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 125–130, 2005.
- RAYES, Nada et al. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: A randomized, double-blind trial. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 246, n. 1, p. 36–41, 2007.
- RIERA, Francisco; GONZÁLEZ, Pablo; MURO, Claudia. Whey cheese: Membrane technology to increase yields. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 96–103, 2016.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestris* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006.
- SANSONE, Francesca et al. Maltodextrin / pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 468–476, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.004>>
- SANTOS, Geânderson; NOGUEIRA, Regina Isabel; ROSENTHAL, Amauri. Powdered yoghurt produced by spray drying and freeze drying : a review Iogurte em pó por atomização e liofilização : uma revisão. [s. l.], 2018.
- SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GO, E. Xanthan gum : production , recovery , and properties. [s. l.], v. 18, 2000.
- SHOKRI, Zahra et al. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. [s. l.], 2015.
- SHORI, Amal Bakr. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 13, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.11.001>>
- TIAN, Lingmin et al. Effects of pectin on fermentation characteristics, carbohydrate utilization, and microbial community composition in the gastrointestinal tract of weaning pigs. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 1–10, 2017.
- VIDHYALAKSHMI, R.; BHAKYARAJ, R.; SUBHASREE, R. S. Encapsulation “ The Future of Probiotics ” -A Review. [s. l.], v. 3, p. 96–103, 2009.
- VIDHYASAGAR, Venkatasubramanian; JEEVARATNAM, Kadirvelu. Evaluation of

Pediococcus pentosaceus strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro.

JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS, [s. l.], p. 1–9, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.012>>

VIEIRA, Vanessa Rodrigues; BORSOI, Anderlise. Efeito Do Congelamento Na Contagem De Salmonella Enteritidis Pelo Método Do Número Mais Provável (Nmp) Em Cecos De Frangos De Corte Freezing Effect on Salmonella Enteritidis Counting By the Most Probable Number (Mpn) Method in Ceca From Broilers. [s. l.], p. 140–147, 2007.

VILLENA, MJ Martín et al. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **Ars Pharmaceutica**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 43–50–50, 2009.

WANG, Lijun et al. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 68, p. 8–13, 2016. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.001>>

YE, Qianyu; GEORGES, Nicolas; SELOMULYA, Cordelia. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 78, p. 167–179, 2018. Disponível em:

<<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>>

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 77–84, 2006.

ZHANG, Yun; LIN, Jun; ZHONG, Qixin. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. **Food Research International**, [s. l.], v. 71, p. 9–15, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>>

ZUIDAM, Nicolaas Jan; NEDOVIĆ, Viktor A. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, [s. l.], p. 1–400, 2010.

5. Considerações finais

A técnica de *spray drying* foi eficaz na secagem das células de *Pediococcus pentosaceus* P107, apresentando viabilidade celular satisfatória ao final do processo e resistência aos testes de armazenamento nas três temperaturas avaliadas (-20, 4 e 25 °C), bem como a passagem no TGI. A mesma técnica foi eficiente na microencapsulação do micro-organismo, e as três diferentes microcápsulas produzidas propiciaram proteção as células de *Pediococcus pentosaceus* P107, propiciando maior viabilidade quando comparada as células livres secas.

A microcápsula de soro de queijo com goma xantana (WX) apresentou maior estabilidade ao armazenamento nas temperaturas de -20 e 4 °C, porém a temperatura ambiente (25 °C) apresentou perda de viabilidade inferior ao mínimo esperado aos 15 dias. Também foi a microcápsula que melhor protegeu as células a exposição ao TGI, retratando as melhores contagens celulares.

Já a microcápsula de soro de queijo com pectina (WP) protegeu as células no teste térmico, e apresentou maior viabilidade durante os primeiros 30 dias de armazenamento, porém não se manteve estável.

A microcápsula de soro de queijo foi a única a se manter viável na célula livre por todo período de armazenamento avaliado (110 dias) a 25 °C. Porém, apresentou a menor viabilidade, e por consequência menor proteção quando comparada aos demais testes.

Por fim, todas as microcápsulas apresentaram alta porcentagem de eficiência de encapsulação (>90%). A escolha da microcápsula que promove maior proteção ao *Pediococcus pentosaceus* P107, dependerá do objetivo de aplicação, visando armazenamento, processamento térmico e a matriz alimentar de aplicação.

REFERÊNCIAS

- ABD EL-SALAM, Mohamed H.; EL-SHIBINY, Safinaz. Preparation and properties of milk proteins-based encapsulated probiotics: a review. **Dairy Science and Technology**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 393–412, 2015.
- ABERKANE, Leïla; ROUDAUT, Gaëlle; SAUREL, Rémi. Encapsulation and Oxidative Stability of PUFA-Rich Oil Microencapsulated by Spray Drying Using Pea Protein and Pectin. **Food and Bioprocess Technology**, [s. l.], v. 7, n. 5, p. 1505–1517, 2014.
- ANAL, Anil Kumar; SINGH, Harjinder. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.
- ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 15, n. 4, p. 399–409, 2005.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. Truelstrup. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, [s. l.], v. 41, n. 2, p. 184–193, 2008.
- ARGIN, Sanem; KO, Peter; LO, Y. Martin. Food Hydrocolloids The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan e chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. [s. l.], v. 40, p. 138–144, 2014.
- BARRETO, Andressa Ribas; RAMÍREZ-MÉRIDA, Luis Guillermo; ETCHEPARE, Mariana De Araújo. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos Coating materials used in the microencapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, [s. l.], v. 37, p. 164–174, 2015.
- BELHADJ, Hani et al. Phenotypic and Genotypic Characterization of Some Lactic Acid Bacteria Isolated from Bee Pollen: A Preliminary Study. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, [s. l.], v. 33, n. 1, p. 11–23, 2014. Disponível em: <<http://jlc.jst.go.jp/DN/JST.JSTAGE/bmfh/33.11?lang=en&from=CrossRef&type=abstract>>
- BELKIN, Shimshon et al. Advances in preservation methods : keeping biosensor microorganisms alive and active. [s. l.], p. 43–49, 2006.
- BRINQUES, Graziela Brusch; ANTÔNIO, Marco; AYUB, Záchia. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated

gastrointestinal conditions , refrigeration , and yogurt. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 103, n. 2, p. 123–128, 2011. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.10.006>>

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>>

CARVALHO, Fátima; PRAZERES, Ana R.; RIVAS, Javier. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 445–446, p. 385–396, 2013. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>>

CASTRO, Simone Vieira et al. Agentes crioprotetores intracelulares: características e utilização na criopreservação de tecido ovariano e oócitos. **Acta Scientiae Veterinariae**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 1–18, 2011.

CHEN, He et al. On microcapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in xanthan-chitosan polyelectrolyte complex gels *. [s. l.], n. 2014, 2015.

CHEN, Li et al. Effect of xanthan-chitosan-xanthan double layer encapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB01 in simulated gastrointestinal conditions, bile salt solution and yogurt. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.005>>

DAMODHARAN, Karthiyaini et al. Preliminary probiotic and technological characterization of *Pediococcus pentosaceus* strain KID7 and in vivo assessment of its cholesterol-lowering activity. **Frontiers in Microbiology**, [s. l.], v. 6, n. AUG, p. 1–14, 2015.

DE CASTRO-CISLAGHI, Fabiane Picinin et al. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>>

DE PAOLI, Paolo. Biobanking in microbiology: From sample collection to epidemiology, diagnosis and research. **FEMS Microbiology Reviews**, [s. l.], v. 29, n. 5, p. 897–910, 2005. Disponível em:

<<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0168644505000124>>. Acesso em: 2 fev. 2019.

DELCENSERIE, V. et al. Immunomodulatory effects of probiotics in the intestinal

tract. **Current Issues in Molecular Biology**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. 37–54, 2008.

DIANAWATI, Dianawati; MISHRA, Vijay; SHAH, Nagendra P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1685–1716, 2016.

DIMITRELLOU, Dimitra et al. Novel probiotic whey cheese with immobilized lactobacilli on casein. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 86, p. 627–634, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.028>>

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 74, n. 2, 2009.

DOMINGOS-LOPES, M. F. P. et al. Genetic diversity , safety and technological characterization of lactic acid bacteria isolated from artisanal Pico cheese. **Food Microbiology**, [s. l.], v. 63, p. e9–e10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.014>>

DORES, M. T.; SILVA, C. R. Evaluation of Pre-Inoculum Aeration Conditions Used in the Cultivation of Lactical Acid Bacteria in Liquid Medium. [s. l.], v. 03, p. 835–840, 2017.

ECKERT, Camila et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, p. 176–183, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.045>>

ELENA, Maria; MICHELA, Martino. Genotypic and phenotypic diversity of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from food matrices and characterisation of the penocin operon. [s. l.], p. 1149–1163, 2013.

FAVARO-TRINDADE, C. S. et al. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], v. 24, n. 4, p. 336–340, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2009.10.012>>

FERREIRA, A. A. et al. Tracking Amazonian cheese microbial diversity : Development of an original , sustainable , and robust starter by freeze drying / spray drying. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], p. 1–10, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2016-12418>>

FOOD AND AGRICULTURE ORGANISATION OF THE UNITED NATIONS AND WHO WORKING GROUP. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. [s. l.], p. 1–11, 2002. Disponível em: <<http://www.fao.org/es/ESN/Probio/probio.htm>>

- FRITZEN-FREIRE, Carlise B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, [s. l.], v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>>
- FRITZEN-FREIRE, Carlise B. et al. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 39–44, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>>
- GARDINER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic Lactobacillus paracasei and L. salivarius Strains during Heat Treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, [s. l.], v. 66, n. 6, p. 2605–2612, 2000. Disponível em: <wos:000087358700045>
- GEBARA, Clarice et al. Viability of Lactobacillus acidophilus La5 in pectin-whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 872–878, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.02.008>>
- GEREZ, C. L. et al. Whey protein coating bead improves the survival of the probiotic Lactobacillus rhamnosus CRL 1505 to low pH. **Letters in Applied Microbiology**, [s. l.], v. 54, n. 6, p. 552–556, 2012.
- GIULIO, B. De et al. Use of alginate and cryo-protective sugars to improve the viability of lactic acid bacteria after freezing and freeze-drying. [s. l.], p. 739–740, 2005.
- GONSALVES, J. K. M. C. et al. Osbeck pelo método da coacervação simples. **Scientia Plena**, [s. l.], v. 5; n 11, n. L, p. 1–8, 2009.
- HUANG, Song et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 1–17, 2017.
- HUBÁLEK, Zdenek. Protectants used in the cryopreservation of microorganisms. **Cryobiology**, [s. l.], v. 46, n. 3, p. 205–229, 2003.
- ILHA, Eunice Cassanego et al. Lactobacillus paracasei isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology**, [s. l.], v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.
- KAILASAPATHY, Kaila. Current issues in intestinal microbiology_2002_Kailasapathy_Microencapsulation of probiotic bacteria technology and potential appli.pdf. [s. l.], p. 39–48, 2002.

- KALIN, A. S. A. Effects of Fructooligosaccharide and Whey Protein Concentrate on the Viability of Starter Culture in Reduced-Fat Probiotic Yogurt. [s. l.], v. 72, n. 7, p. 222–227, 2007.
- KAMINARIDESSK, Stelios. A modified form of Myzithra cheese produced by substituting the fresh cheese whey by dried whey protein concentrate and ovine milk and cream. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 131, p. 118–122, 2015.
- KANDIL, S.; SODA, M. El. Influence of Freezing and Freeze Drying on Intracellular Enzymatic Activity and Autolytic Properties of Some Lactic Acid Bacterial Strains. [s. l.], n. June, p. 371–382, 2015.
- KAVITAKE, Digambar et al. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 21, n. June 2017, p. 34–44, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>>
- KIM, Jeong Un et al. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus acidophilus* by ionic gelation with electrostatic extrusion for enhancement of survival under simulated gastric conditions and during refrigerated storage. **International Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 2, p. 519–530, 2017.
- KOH, Jeewon; XU, Zhimin; WICKER, Louise. Blueberry Pectin Extraction Methods Influence Physico-Chemical Properties. **Journal of Food Science**, [s. l.], v. 0, p. 1–9, 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30462831>%0Ahttp://doi.wiley.com/10.1111/1750-3841.14380>
- KRASAEKOOPT, Wunwisa; BHANDARI, Bhesh; DEETH, Hilton. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 3–13, 2003.
- LAGOUEYTE, N.; PAQUIN, P. Effects of microfluidization on the functional properties of xanthan gum. [s. l.], v. 12, p. 4–6, 1998.
- LARENA, I.; MELGAREJO, P.; DE CAL, A. Drying of conidia of *Penicillium oxalicum*, a biological control agent against *Fusarium wilt* of tomato. **Journal of Phytopathology**, [s. l.], v. 151, n. 11–12, p. 600–606, 2003.
- LAVARI, Luisina et al. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. [s. l.], 2014.
- LEITE, A. M. O. et al. Probiotic potential of selected lactic acid bacteria strains isolated from Brazilian kefir grains. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], p. 1–11, 2015.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.3168/jds.2014-9265>>

LIAO, Liang Kun et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, p. 82–89, 2017. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>>

LV, Long Xian et al. Administration of *Lactobacillus salivarius* LI01 or *Pediococcus pentosaceus* LI05 improves acute liver injury induced by D-galactosamine in rats.

Applied Microbiology and Biotechnology, [s. l.], v. 98, n. 12, p. 5619–5632, 2014.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, [s. l.], v. 97, n. 4, p. 1991–1998, 2014. Disponível em:

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0022030214000964>>

MANINI, F. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 275–283, 2016.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>>

MARTÍN, María José et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 27, p. 15–25, 2015. a. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>>

MARTÍN, María José et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 27, p. 15–25, 2015. b.

MASUDA, Takeyuki et al. *Pediococcus pentosaceus* Sn26 inhibits IgE production and the occurrence of ovalbumin-induced allergic diarrhea in mice. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, [s. l.], v. 74, n. 2, p. 329–335, 2010.

MENEZES, Cáceres De et al. Microencapsulação de probióticos por gelificação iônica externa utilizando pectina Microencapsulation of probiotics by using external ionic gelling pectin. [s. l.], 2015.

MORGAN, C. A. et al. Preservation of micro-organisms by drying ; A review. [s. l.], v. 66, p. 183–193, 2006.

NUNES, Graciele Lorenzoni et al. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 89, n. October 2017, p. 128–133, 2018.

NUNES, Graciele Lorenzoni; MARQUES, Thaiane; HOLKEM, Augusto Tasch.

Microencapsulação de culturas probióticas : princípios do método de spray drying

Microencapsulation of probiotic cultures : principles of spray drying method. [s. l.], p. 132–141, 2015.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L.*

acidophilus (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of**

Microencapsulation, [s. l.], v. 24, n. 7, p. 685–693, 2007. Disponível em:

<<http://www.tandfonline.com/doi/full/10.1080/02652040701532908>>

PAPAGIANNI, Maria; ANASTASIADOU, Sofia. properties and applications. [s. l.], v.

16, n. class I, p. 1–16, 2009.

PASSADOR, M. M. et al. Manutenção Da Viabilidade E Patogenicidade De Culturas

Mantidas Na Micoteca “Mário Barreto Figueiredo”. **Biológico**, [s. l.], v. 72, n. 1, p.

51–55, 2010. Disponível em:

<http://www.biologico.sp.gov.br/docs/bio/v72_1/passador.pdf>

PINTO, Stephanie S. et al. Influence of microencapsulation with sweet whey and

prebiotics on the survival of Bifidobacterium-BB-12 under simulated gastrointestinal

conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 64,

n. 2, p. 1004–1009, 2015. a.

PINTO, Stephanie S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as

carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying.

Food Research International, [s. l.], v. 67, p. 400–408, 2015. b. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.11.038>>

PORTO, Maria Carolina W. et al. Pediococcus spp.: An important genus of lactic acid

bacteria and pediocin producers. **Biotechnology Advances**, [s. l.], v. 35, n. 3, p.

361–374, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biotechadv.2017.03.004>>

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of Lactobacillus

plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying.

LWT - Food Science and Technology, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015.

Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>>

RANADHEERA, C. Senaka et al. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus

LA-5, Bifidobacterium animalis subsp. lactis BB-12 and Propionibacterium jensenii

702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, [s. l.], v. 123, n. 1, p.

155–159, 2015. Disponível em:

<<http://dx.doi.org/10.1016/j.smallrumres.2014.10.012>>

- RATHORE, Sweta et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 116, n. 2, p. 369–381, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.12.022>>
- RAYES, Nada et al. Supply of pre- and probiotics reduces bacterial infection rates after liver transplantation - A randomized, double-blind trial. **American Journal of Transplantation**, [s. l.], v. 5, n. 1, p. 125–130, 2005.
- RAYES, Nada et al. Effect of enteral nutrition and synbiotics on bacterial infection rates after pylorus-preserving pancreatoduodenectomy: A randomized, double-blind trial. **Annals of Surgery**, [s. l.], v. 246, n. 1, p. 36–41, 2007.
- RIERA, Francisco; GONZÁLEZ, Pablo; MURO, Claudia. Whey cheese: Membrane technology to increase yields. **Journal of Dairy Research**, [s. l.], v. 83, n. 1, p. 96–103, 2016.
- ROSALAM, S.; ENGLAND, R. Review of xanthan gum production from unmodified starches by *Xanthomonas comprestis* sp. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 39, n. 2, p. 197–207, 2006.
- SANSONE, Francesca et al. Maltodextrin / pectin microparticles by spray drying as carrier for nutraceutical extracts. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 105, n. 3, p. 468–476, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.03.004>>
- SANTOS, Geânderson; NOGUEIRA, Regina Isabel; ROSENTHAL, Amauri. Powdered yoghurt produced by spray drying and freeze drying : a review logurte em pó por atomização e liofilização : uma revisão. [s. l.], 2018.
- SANTOS, V. E.; CASAS, J. A.; GO, E. Xanthan gum : production , recovery , and properties. [s. l.], v. 18, 2000.
- SHOKRI, Zahra et al. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. [s. l.], 2015.
- SHORI, Amal Bakr. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 13, p. 1–8, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.fbio.2015.11.001>>
- TIAN, Lingmin et al. Effects of pectin on fermentation characteristics, carbohydrate utilization, and microbial community composition in the gastrointestinal tract of weaning pigs. **Molecular Nutrition and Food Research**, [s. l.], v. 61, n. 1, p. 1–10, 2017.
- VIDHYALAKSHMI, R.; BHAKYARAJ, R.; SUBHASREE, R. S. Encapsulation “ The Future of Probiotics ” -A Review. [s. l.], v. 3, p. 96–103, 2009.

VIDHYASAGAR, Venkatasubramanian; JEEVARATNAM, Kadirvelu. Evaluation of *Pediococcus pentosaceus* strains isolated from Idly batter for probiotic properties in vitro. **JOURNAL OF FUNCTIONAL FOODS**, [s. l.], p. 1–9, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2012.10.012>>

VIEIRA, Vanessa Rodrigues; BORSOI, Anderlise. Efeito Do Congelamento Na Contagem De Salmonella Enteritidis Pelo Método Do Número Mais Provável (Nmp) Em Cecos De Frangos De Corte Freezing Effect on Salmonella Enteritidis Counting By the Most Probable Number (Mpn) Method in Ceca From Broilers. [s. l.], p. 140–147, 2007.

VILLENA, MJ Martín et al. Técnicas de microencapsulación: una propuesta para microencapsular probióticos. **Ars Pharmaceutica**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 43-50–50, 2009.

WANG, Lijun et al. Effect of skim milk coated inulin-alginate encapsulation beads on viability and gene expression of *Lactobacillus plantarum* during freeze-drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 68, p. 8–13, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.001>>

YE, Qianyu; GEORGES, Nicolas; SELOMULYA, Cordelia. Microencapsulation of active ingredients in functional foods: From research stage to commercial food products. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 78, p. 167–179, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.05.025>>

ZAMORA, L. M.; CARRETERO, C.; PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. **Food Science and Technology International**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 77–84, 2006.

ZHANG, Yun; LIN, Jun; ZHONG, Qixin. The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. **Food Research International**, [s. l.], v. 71, p. 9–15, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>>

ZUIDAM, Nicolaas Jan; NEDOVIĆ, Viktor A. Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing. **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**, [s. l.], p. 1–400, 2010.

Apêndices

Apêndice A – Figuras com os resultados da exposição a condições gástricas simulada nos tempos de 30 e 120 minutos

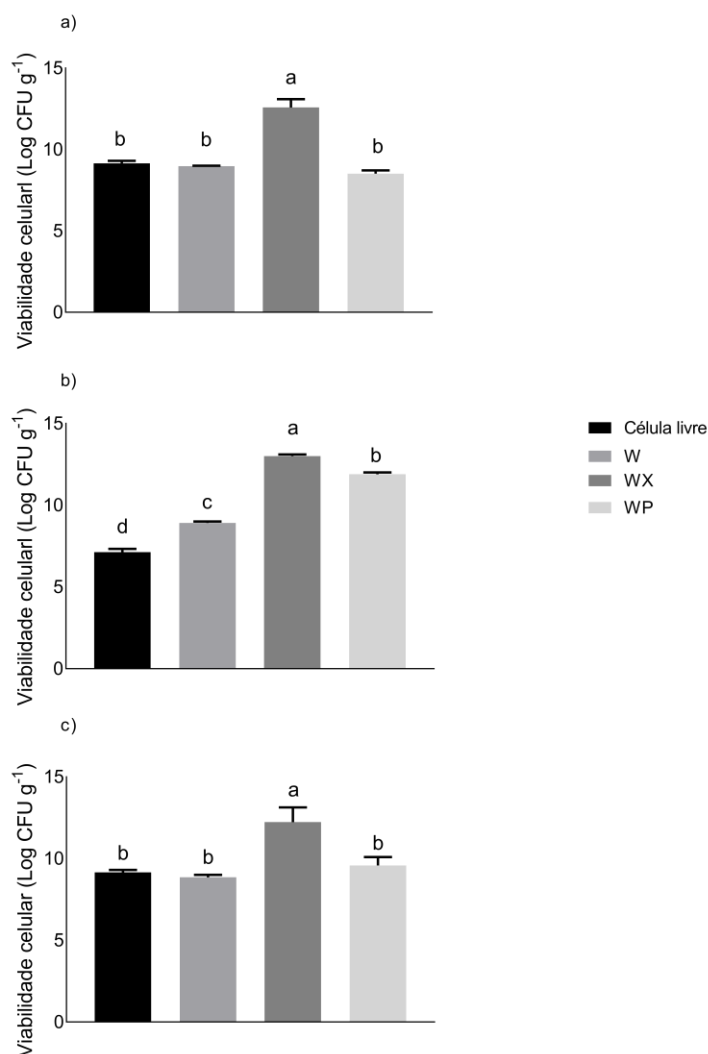


Fig. 4. Viabilidade de microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107 com 7 dias de armazenamento a -20 °C durante exposição ao TGI simulado. (a) fluído gástrico pH 2.0 por 30 min, (b) fluído gástrico pH 2.5 por 30 min, (c) fluído gástrico pH 3.0 por 30 min. ^{a-d} Médias $\pm$ desvio padrão com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;

W: microcápsula com soro de queijo;

WP: microcápsula com soro de queijo e pectina;

WX: microcápsula com soro de queijo e goma xantana;

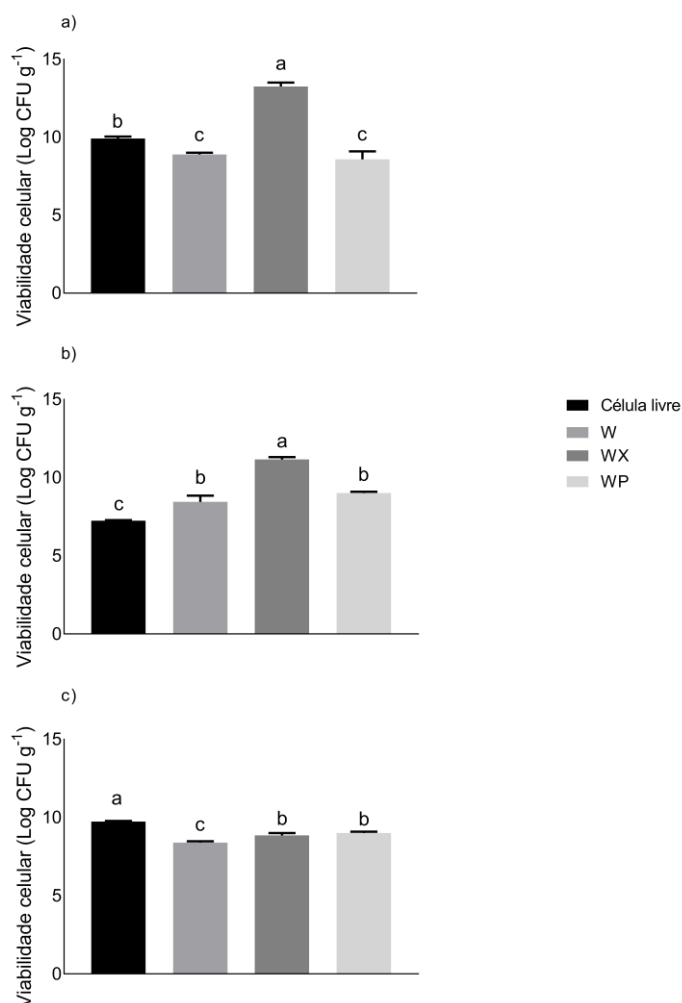


Fig. 5. Viabilidade de microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107 com 7 dias de armazenamento a -20 °C durante exposição ao TGI simulado. (a) fluído gástrico pH 2.0 por 120 min, (b) fluído gástrico pH 2.5 por 120 min, (c) fluído gástrico pH 3.0 por 120 min. ^{a-c} Médias $\pm$ desvio padrão com letras maiúsculas sobrescritas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0.05$).

Célula livre: *Pediococcus pentosaceus* P107;

W: microcápsula com soro de queijo;

WP: microcápsula com soro de queijo e pectina;

WX: microcápsula com soro de queijo e goma xantana;