

Universidade Federal de Pelotas

Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel

Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos



Dissertação de mestrado

**Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica
pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico
microencapsulado em *spray dryer***

Izadora Almeida Perez

Bacharela em Química de Alimentos

Pelotas, 2021

Izadora Almeida Perez

**Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica
pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico
microencapsulado em *spray dryer***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial da Universidade Federal de Pelotas, como requisito final à obtenção do título de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira

Co-orientador(es): Prof^a. Dr^a. Ângela Maria Fiorentini

Dr^a. Karine Laste Macagnan

Pelotas, 2021

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas
Catalogação na Publicação

P438x Perez, Izadora Almeida

Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico microencapsulado em *spray dryer* / Izadora Almeida Perez; Angelita da Silveira Moreira, orientadora; Ângela Maria Fiorentini, Karine Laste Macagnan, coorientadoras. — Pelotas, 2021.

115 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Faculdade de Agronomia Eliseu Maciel, Universidade Federal de Pelotas, 2021.

1. *Lactiseibacillus rhamnosus* GG . 2. Armazenamento. 3. Digestão simulada. 4. Viabilidade. I. Moreira, Angelita da Silveira, orient. II. Fiorentini, Ângela Maria, coorient. III. Macagnan, Karine Laste, coorient. IV. Título.

CDD: 664

Elaborada por Gabriela Machado Lopes CRB: 10/1842

Izadora Almeida Perez

**Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica
pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico
microencapsulado em *spray dryer***

Dissertação aprovada, como requisito parcial para a 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 de defesa: 12 de agosto de 2021

Banca examinadora:

Prof.^a Dr.^a. Adriane Antunes, Doutora em Alimentos e Nutrição pela Universidade Estadual de Campinas.

Prof.^a Dr.^a. Ângela Maria Fiorentini (Co-orientadora), Doutora em Ciências dos Alimentos pela Universidade Federal de Santa Catarina.

Prof.^a. Dr.^a. Angelita da Silveira Moreira (Orientadora), Doutora em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.^a Dr.^a. Caroline Dellinghausen Borges, Doutora em Biotecnologia Agrícola pela Universidade Federal de Pelotas.

Prof.^a Dr.^a. Rosane da Silva Rodrigues, Doutora em Tecnologia de Alimentos pela Universidade Estadual de Campinas.

Dedico este trabalho aos meus pais, Silvia e Marco, e ao meu noivo, Wagner.

Agradecimentos

A Deus, por me guiar e me dar forças nos momentos em que nada parecia fazer sentido, por estar constantemente presente em minha vida e não me permitir desistir.

À minha mãe, Silvia, por todo o amor e incentivo. Por ser minha melhor amiga e meu lugar de paz. És meu maior exemplo de caráter e honestidade, a responsável por tudo o que sou. Agradeço por ter me ensinado a lutar pelos meus sonhos.

Ao meu noivo, Wagner, por todo o companheirismo e amor, por acreditar em mim incansavelmente, me incentivar e sempre ter palavras de conforto. És meu refúgio nos momentos difíceis e tens o melhor abraço do mundo, que é capaz de me fazer esquecer qualquer problema.

Ao meu pai Marco Antônio e aos meus irmãos Pamella e João Marcos, pela amizade e por estarem sempre ao meu lado.

À minha sobrinha Laura, por ser uma das minhas maiores motivações.

Aos demais familiares, tias, prima e avós por todo o carinho, amor e incentivo. Obrigada por sempre torcerem por mim.

Aos meus sogros, Ana e Claudiomar, e à vó Maria, por sempre me receberem com muito amor, me proporcionarem momentos leves e por serem minha segunda família.

À Karine, por toda a disponibilidade e por ter me auxiliado em todas as etapas deste trabalho. Agradeço também pela amizade e compreensão.

À minha amiga e colega Camila, por estar ao meu lado em todos os momentos, sempre disposta a me ajudar, escutar e entender. Por dividir as angústias e multiplicar as alegrias. Obrigada por ter tornado esse período mais leve.

À Júlia e à Victoria, que mesmo não estando mais presentes no laboratório, me ensinaram muitas coisas.

À minha orientadora Prof^a. Dr^a. Angelita da Silveira Moreira, por todos os ensinamentos, disponibilidade e orientação. Obrigada por todo o acolhimento, desde a época da minha iniciação científica.

À banca examinadora, pela disponibilidade, atenção e contribuição para elevar a qualidade deste trabalho.

Ao programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos da Universidade Federal de Pelotas, pela oportunidade de realização deste projeto.

À CAPES, por conceder a bolsa de mestrado.

A todos que, mesmo indiretamente, colaboraram para a realização deste trabalho. Muito obrigada!

*“Conheça todas as teorias, domine todas as técnicas. Mas
ao tocar uma alma humana, seja apenas outra alma
humana.”*

Carl Jung

RESUMO

PEREZ, Izadora Almeida. Xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica pirogênica como antiagregante na estabilidade de probiótico microencapsulado em *spray dryer*. 2021. 115f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2021.

Probióticos são microrganismos vivos que, quando consumidos em concentrações adequadas, exercem diversos benefícios à saúde. Porém as condições de processamento, armazenamento, consumo e passagem pelo trato digestório podem prejudicar a viabilidade dos probióticos. Portanto, é de suma importância identificar e otimizar processos que visem manter essa viabilidade por um período prolongado. A microencapsulação por *spray dryer* é um dos métodos mais utilizados para esse fim, sendo que, nessa técnica, é necessário que o agente encapsulante ofereça resistência e estabilidade. A elevada viscosidade da xantana comercial a torna inadequada para a utilização como agente encapsulante em *spray dryer*, reduzindo a qualidade e rendimento do processo. Entretanto o uso de xantana Pruni de baixa viscosidade pode ser uma solução. Objetivou-se microencapsular *Lactobacillus rhamnosus* GG em *spray dryer*, utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica pirogênica (Aerosil®) como antiagregante, bem como avaliar o efeito da concentração dessas variáveis no processo. Para a elaboração das microcápsulas em *spray dryer* utilizou-se diferentes concentrações de xantana Pruni BV (0,75 a 1,75%) e de sílica pirogênica (0,45 a 1,15%), estabelecidas segundo delineamento fatorial completo 2² em dois níveis (-1, +1) e com três repetições no ponto central. As microcápsulas obtidas foram armazenadas sob temperatura ambiente, refrigeração e congelamento, e avaliadas por até 120 dias. Foram realizadas análises morfológicas, físicas, de viabilidade da bactéria e de resistência às condições de digestão simulada. O efeito da xantana na eficiência de encapsulação dos probióticos foi maior quando a concentração de Aerosil® foi fixada no máximo valor investigado, com resultados superiores a 85,83% em todos os tratamentos. Os probióticos microencapsulados permaneceram viáveis durante os 120 dias de armazenamento em todas as temperaturas avaliadas, verificando-se a maior redução sob temperatura ambiente. Sob a temperatura de congelamento e de refrigeração a concentração, aos 120 dias de armazenamento, permaneceu na faixa de 8 log UFC g⁻¹. As microcápsulas apresentaram formato esférico, com presença de concavidades. Os microrganismos microencapsulados resistiram à digestão simulada e tiveram elevada viabilidade na porção entérica, com concentração de 8,97 log UFC g⁻¹. A elevada eficiência de encapsulação, bem como a manutenção da viabilidade durante os 120 dias e a resistência das microcápsulas sob as condições de digestão simulada indicam que a utilização da xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante é adequada para o processo de microencapsulação em *spray dryer*, aumentando a proteção do microrganismo.

Palavras-chave: *Lactobacillus rhamnosus* GG. Armazenamento. Proteção. Viabilidade. Digestão simulada.

ABSTRACT

PEREZ, Izadora Almeida. **Low viscosity Xanthan Pruni as an encapsulating agent and fumed silica as an anti-aggregant in the stability of microencapsulated probiotics in a spray dryer**. 2021. 115p. Dissertation (Masters in Food Science and Technology) - Graduate Program in Food Science and Technology, Department of Agroindustrial Science and Technology, Federal University of Pelotas, Pelotas, 2021.

Probiotics are live microorganisms that, when consumed in adequate concentrations, exert several health benefits. However, the conditions of processing, storage, consumption and passage through the digestive tract can affect the viability of probiotics. Therefore, it is extremely important to identify and optimize processes that aim to maintain this viability for an extended period. The spray dryer microencapsulation is one of the most used methods for this purpose, and in this technique it is necessary that the encapsulating agent offers strength and stability. The high viscosity of commercial xanthan makes it unsuitable for use as an encapsulating agent in a spray dryer, reducing the quality and yield of the process. However the use of low viscosity Pruni xanthan can be a solution. The objective was to microencapsulate *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG in a spray dryer, using low viscosity Pruni xanthan as an encapsulating agent and fumed silica (Aerosil®) as an anti-caking agent, as well as to evaluate the effect of the concentration of these variables in the process. For the preparation of microcapsules in a spray dryer, different concentrations of xanthan Pruni BV (0.75 to 1.75%) and fumed silica (0.45 to 1.15%) were used, established according to a complete factorial design 2^2 in two levels (-1, +1) and with three repetitions in the midpoint. The microcapsules obtained were stored at room temperature, refrigerated and frozen, and evaluated for up to 120 days. Morphological, physical, bacterial viability and resistance to simulated digestion conditions were performed. The effect of xanthan on the encapsulation efficiency of probiotics was greater when the Aerosil® concentration was fixed at the maximum value investigated, with results above 85.83% in all treatments. Microencapsulated probiotics remained viable during 120 days of storage at all temperatures evaluated, with the greatest reduction being observed at room temperature. Under freezing and refrigeration temperature, the concentration, at 120 days of storage, remained in the range of $8 \log \text{CFU g}^{-1}$. The microcapsules had a spherical shape, with the presence of concavities. Microencapsulated microorganisms resisted simulated digestion and had high viability in the enteric portion, with a concentration of $8.97 \log \text{CFU g}^{-1}$. The high encapsulation efficiency, as well as the maintenance of viability during 120 days and the resistance of the microcapsules under simulated digestion conditions indicate that the use of low viscosity Pruni xanthan as an encapsulating agent is suitable for the microencapsulation process in a spray dryer, increasing the protection of the microorganism.

Keywords: *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG. Storage. Protection. Viability. Simulated digestion.

LISTA DE FIGURAS

Revisão Bibliográfica

Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos probióticos no organismo humano.	24
Figura 2 - Representação da estrutura das microcápsulas (a) e micropartículas (b).....	28
Figura 3 - Representação do funcionamento da secagem por <i>spray dryer</i>	31
Figura 4 - Representação da estrutura química da xantana.	41

Manuscrito 1

Figura 1 - Curva de crescimento do microrganismo <i>L. rhamnosus</i> GG e DO _{600nm} ao longo do período de 28 h.....	55
Figura 2 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a eficiência (%) de encapsulação do probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG.....	58
Figura 3 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre o rendimento (%) de encapsulação do probiótico <i>L. rhamnosus</i> GG.....	60
Figura 4 - Concentração de microrganismos viáveis nas microcápsulas ao longo do período de 120 dias de armazenamento, armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C), refrigeração (7 °C) e ambiente (±25 °C).....	63
Figura 5 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C), no período de até 120 dias.....	68
Figura 6 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura de refrigeração (7 °C), no período de até 120 dias.....	69
Figura 7 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura ambiente (±25 °C), no período de até 120 dias.....	71

Manuscrito 2

Figura 1 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a cor (L^* , a^* , b^*) das microcápsulas.....	87
Figura 2 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a umidade (%) das microcápsulas.....	89
Figura 3 - Micrografias obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura.....	92
Figura 4 - Concentração ($\log \text{UFC g}^{-1}$) do microrganismo <i>L. rhamnosus</i> GG viáveis livres e microencapsulados, submetidos à digestão simulada ao longo de 6 h.....	94

LISTA DE TABELAS

Revisão bibliográfica

Tabela 1 - Condições utilizadas e resultados obtidos nos processos de microencapsulação de probióticos por <i>spray dryer</i>	33
---	----

Manuscrito 1

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial completo 2 ² , com 3 pontos centrais (C) para definição dos tratamentos (formulações) para a elaboração das microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> GG em <i>spray dryer</i> , utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade (X) como agente encapsulante e Aerosil® (A) como antiagregante.....	52
Tabela 2 - Eficiência do processo para a obtenção das microcápsulas probióticas considerado a relação entre a concentração de microrganismos viáveis antes (inóculo) e após (microcápsula) o processo de microencapsulação por <i>spray dryer</i>	57
Tabela 3 - Rendimento de microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> GG após processo de microencapsulação em <i>spray dryer</i> utilizando xantana Pruni como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante.....	59

Manuscrito 2

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial completo 2 ² , com 3 pontos centrais (C), para definição dos tratamentos (formulações) para a elaboração das microcápsulas de <i>L. rhamnosus</i> GG em <i>spray dryer</i> , utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade (X) como agente encapsulante e Aerosil® (A) como antiagregante.....	82
Tabela 2 - Parâmetros colorimétricos no sistema CIEL*a*b* das microcápsulas probióticas nos tratamentos variando a concentração de xantana Pruni BV e Aerosil®	85
Tabela 3 - Resultados de umidade (%) das microcápsulas nos diferentes tratamentos, variando a concentração de xantana Pruni BV e Aerosil®	88

SUMÁRIO

1 Introdução	17
2 Hipótese	19
3 Objetivos	20
3.1 Objetivo geral	20
3.2 Objetivos específicos	20
4 Revisão bibliográfica	20
4.1 Microrganismos probióticos	20
4.2 <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>	24
4.3 Microencapsulação	27
4.4 <i>Spray Dryer</i>	30
4.5 Agente encapsulante	38
4.6 Xantana comercial e xantana Pruni	40
4.7 Aditivo de secagem: sílica pirogênica	43
5 Manuscrito 1	47
5.1 Introdução	48
5.2 Material e métodos	50
5.2.1 Produção da xantana Pruni de baixa viscosidade	50
5.2.2 Avaliação da curva de crescimento de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG	50
5.2.3 Inóculo	51
5.2.4 Soluções encapsulantes	51
5.2.5 Microencapsulação	52
5.2.6 Eficiência do processo de microencapsulação	53
5.2.7 Rendimento do processo de microencapsulação	53
5.2.8 Avaliação da viabilidade do microrganismo nas microcápsulas	54
5.2.9 Análise estatística	54
5.3 Resultados e discussão	55
5.3.1 Curva de crescimento	55
5.3.2 Eficiência do processo de microencapsulação	56
5.3.3 Rendimento	59

5.3.4 Avaliação da viabilidade nas microcápsulas em diferentes períodos e temperaturas de armazenamento	62
5.4 Conclusão	72
5.5 Referências bibliográficas	74
6 Manuscrito 2	78
6.1 Introdução	79
6.2 Material e métodos	80
6.2.1 Inóculo	80
6.2.2 Microcápsulas	81
6.2.3 Cor	82
6.2.4 Umidade	83
6.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	83
6.2.6 Sobrevivência do probiótico livre e encapsulado sob as condições de digestão simulada	83
6.2.7 Análise estatística	84
6.3 Resultados e discussão	85
6.3.1 Análise de cor	85
6.3.2 Análise de umidade	87
6.3.3 Análise de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)	91
6.3.4 Análise da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado sob as condições de digestão simulada	93
6.4 Conclusão	96
6.5 Referências bibliográficas	97
7 Considerações finais	101
8 Referências gerais	102
Apêndices	114

1 Introdução

A busca por qualidade de vida, bem como a manutenção da saúde e bem-estar através da alimentação é crescente, o que amplia a importância de estudos em relação à funcionalidade e mecanismo de ação dos alimentos. Diante disso, os alimentos funcionais estão em ênfase, pois podem trazer benefícios através da presença de substâncias fisiologicamente ativas. Dentre esses enquadram-se os alimentos probióticos, os quais destacam-se devido às suas vantagens e aplicações (LIMA et al. 2014).

Probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (BRASIL, 2018). Esses microrganismos propiciam diversos benefícios quando consumidos, dentre esses pode-se citar os efeitos antagônicos na microbiota intestinal e estímulo ao sistema imune, resultando em aumento da resistência contra microrganismos patogênicos (COOK et al., 2002).

Estudos ainda indicam que probióticos podem beneficiar alguns consumidores com intolerância à lactose, tendo em vista que possuem a enzima capaz de promover a hidrólise desse carboidrato em açúcares simples (glicose e galactose), favorecendo o metabolismo dos indivíduos. Os microrganismos probióticos mais estudados são pertencentes à família Lactobacillaceae e ao gênero *Bifidobacterium* (OUWEHAND; SALMINEN, 1998).

Entretanto, é importante destacar que para que os microrganismos probióticos exerçam essas funções, eles devem estar em concentração adequada, sendo esta em torno de $10^6 - 10^7$ UFC g⁻¹, durante toda a vida útil do produto em que estiverem presentes, além de resistir às barreiras do trato digestório (IBARRA et al., 2012; KENT; DOHERTY, 2014).

Quando aplicados em alimentos com alegação de propriedade funcional, os microrganismos devem, inicialmente, possuir resistência às operações de processamento. Porém, alguns tipos de alimentos passam por etapas que podem ser desfavoráveis à sobrevivência dos microrganismos, como a utilização de temperaturas extremas. Além disso, têm-se as características intrínsecas do alimento, como sua composição, seu armazenamento e condições de consumo, as quais irão afetar diretamente na viabilidade. A sobrevivência reduzida de

microrganismos probióticos quando adicionados como células livres a alguns alimentos, principalmente não lácteos, já foi relatada em diversos estudos (AKIN et al., 2007; CAVALHEIRO et al., 2015).

A secagem por *spray dryer* ou atomização é um dos métodos mais utilizados para a encapsulação e preservação de microrganismos probióticos. Esse método, quando associado a um encapsulante adequado, protege os microrganismos tanto em relação ao alimento em que será aplicado, temperaturas de processamento e tempo de armazenamento, como em relação às condições gastrointestinais, como o meio ácido, sais biliares e presença de oxigênio (FAREEZ et al. 2015; OLIVEIRA et al., 2007). Tal método consiste na atomização de uma emulsão ou de uma suspensão contendo as células vivas do microrganismo juntamente com agentes de encapsulação em uma câmara de secagem por ar quente, isso resulta em uma rápida evaporação de água. Possui como vantagens a rapidez e custo de operação relativamente baixo, além da elevada reprodutibilidade e de ser adequado para aplicação industrial (COOK et al., 2012; KAILASAPATHY, 2009; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007).

Entretanto, apresenta a desvantagem de redução na viabilidade do microrganismo, resultante da temperatura e da perda de água que ocorre durante a realização da técnica. Para reduzir esse problema pode-se utilizar agentes encapsulantes com capacidade termoprotetora, os quais são adicionados antes da secagem (BURGAIN et al., 2011; SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2009).

Como agente encapsulante utiliza-se uma matriz considerada como segura para garantir a integridade do microrganismo, a qual irá gerar proteção tanto em relação ao alimento como aos processos digestórios da parte superior do trato gastrointestinal. Os biopolímeros, como a xantana, são materiais ideais para este tipo de processo (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Para escolher o material encapsulante é importante que se tenha conhecimento da sua composição, bem como de aspectos como porosidade, solubilidade, viscosidade, transição vítrea, formação de filme e fatores econômicos. Além disso, o material não deve reagir com o núcleo, oferecendo propriedades desejáveis de revestimento, tais como resistência e estabilidade (BRAZEL, 1999; DONBROW, 1992). Aspectos como a concentração do agente

encapsulante também devem ser estudados, tendo em vista que tende a afetar a sobrevivência do microrganismo, sendo que uma maior quantidade de sólidos resulta em um tamanho maior de partículas, e assim um maior tempo de secagem (SANTIVARANGKNA et al., 2007). Diante desses aspectos, destaca-se a xantana, um biopolímero de origem microbiana, devido às suas propriedades que podem gerar efeito crioprotetor extracelular.

De maneira geral, a xantana possui como estrutura química primária uma cadeia principal de unidades de β -D-glicose unidas por ligação glicosídica 1-4, suas ramificações são formadas por β -D-manose - 1,4- β -D-ácido glicurônico - 1,2- α -D-manose. As ramificações estão presentes em unidades alternadas de β -D-glicose, sendo as ligações com as unidades de β -D-manose do tipo O-3. Em sua estrutura ainda estão presentes substituintes pirúvicos e acéticos, o que a torna um polímero aniônico (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

A xantana produzida por *Xanthomonas arboricola* pv *pruni* difere-se quanto à estrutura química e algumas propriedades reológicas, pelo fato de possuir uma ramnose em sua composição, o que não ocorre na xantana produzida por *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Em estudos realizados em relação à composição química de xantana produzida por diversas cepas de *Xanthomonas arboricola* pv *pruni*, foi verificado que todos os polímeros eram compostos por glicose, manose, ácido glicurônico e também apresentavam a ramnose (MOREIRA et al. 2001).

2 Hipótese

A combinação do encapsulante xantana Pruni de baixa viscosidade com o dessecante sílica pirogênica (Aerosil®) aumenta a eficiência de microencapsulação em *spray dryer* do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG.

A técnica de microencapsulação em *spray dryer* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante, mantém a viabilidade do probiótico ao longo do armazenamento em diferentes temperaturas.

O probiótico *L. rhamnosus* GG microencapsulado em *spray dryer* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante, resiste à digestão simulada.

3 Objetivos

3.1 Objetivo geral

Determinar a influência da concentração de xantana Pruni e sílica pirogênica na estabilidade do probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG ao processo de microencapsulação em *spray dryer*, no armazenamento e às condições do trato gastrointestinal simulado.

3.2 Objetivos específicos

- Determinar diferentes concentrações de xantana Pruni e sílica pirogênica, segundo delineamento fatorial completo 2², para microencapsular o probiótico.
- Avaliar a sobrevivência do probiótico ao processo de microencapsulação e armazenamento em diferentes temperaturas.
- Caracterizar as microcápsulas com relação às suas propriedades físicas e morfológicas.
- Selecionar a melhor condição de microencapsulação – proporção de xantana Pruni e sílica pirogênica.
- Avaliar a viabilidade do probiótico, obtido na condição selecionada, em simulação de condições gástricas e intestinais.

4 Revisão bibliográfica

4.1 Microrganismos probióticos

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos, os quais, quando ingeridos em quantidades suficientes, conferem benefício à saúde do

hospedeiro. Esses microrganismos ocasionam diversos efeitos benéficos e são pertencentes a diferentes gêneros e espécies (BRASIL, 2018; FAO/WHO, 2002).

Para que o microrganismo seja classificado desta forma, ele deve obedecer a alguns critérios, os quais, de acordo com Szajewska et al. (2006), consistem em: não ser patogênico, ser resistente ao processamento do produto, ser estável e permanecer viável após ser exposto às condições digestivas, aderir-se às células epiteliais do intestino, ser capaz de persistir no trato gastrointestinal e exercer influência na atividade metabólica local.

A Resolução RDC Anvisa nº 241, de 27 de julho de 2018 dispõe sobre os requisitos para a aprovação do uso de probióticos em alimentos, através da comprovação da segurança e dos benefícios à saúde (BRASIL, 2018). Para que seja realizada a avaliação os requisitos principais a serem cumpridos são:

- Comprovação da identidade dos probióticos: deve ser realizada a caracterização e identificação inequívoca da linhagem do microrganismo, através de documentos técnicos ou estudos científicos. Esses documentos deverão identificar a espécie, através da nomenclatura binomial atualizada; identificar e caracterizar a linhagem, com a utilização tanto de métodos genotípicos, como fenotípicos; especificar a origem da linhagem; e comprovar o depósito da linhagem em uma coleção de cultura internacionalmente reconhecida (BRASIL, 2018).

- Comprovação de segurança: os documentos técnicos devem conter histórico de uso seguro, bem como ausência de fatores de virulência e patogenicidade. Além disso, não devem produzir substâncias que gerem riscos e não podem possuir resistência transferível a antibióticos, devendo ser susceptível a, pelo menos, dois tipos. Estudos em relação à genotoxicidade, mutagenicidade e toxicidade devem ser realizados quando os microrganismos não forem isolados de alimentos ou da microbiota humana e não tiverem sua segurança estabelecida em nível de gênero ou espécie. Quando associadas, as linhagens utilizadas devem ter sua segurança comprovada individualmente (BRASIL, 2018).

- Comprovação do efeito benéfico: deve conter alegação de propriedade funcional ou de saúde aprovada para a linhagem. O benefício pode ter caráter geral ou específico, sendo que a comprovação exige demonstração da

sobrevivência às condições do trato digestório humano e de evidências de efeitos em humanos obtidas através de estudos que utilizem um número representativo da população de interesse (BRASIL, 2018).

A viabilidade dos probióticos pode ser afetada por inúmeros fatores, como a cepa utilizada e ingredientes adicionados ao longo da produção do alimento. Além disso, o teor de oxigênio e temperatura de armazenamento são fatores que influenciam. É importante ressaltar que as concentrações recomendadas de probióticos devem ser mantidas durante todo o processamento do produto, bem como serem capazes de resistir às barreiras do organismo humano como por exemplo o contato com enzimas, pH do estômago e sais biliares (CRUZ et al., 2009).

Apesar de alguns pesquisadores afirmarem que a concentração em torno de $10^6 - 10^7$ UFC g⁻¹ no alimento é suficiente para que o microrganismo probiótico apresente efeito benéfico, a legislação brasileira exige que seja avaliada individualmente a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício, sendo essa dependente de cada linhagem (BRASIL, 2018).

Saad et al. (2011) citaram as três principais formas de ações benéficas dos microrganismos probióticos ao serem consumidos. A primeira é a capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro, tanto o sistema inato, quanto o adquirido. A segunda forma seria o efeito direto sobre microrganismos comensais ou patogênicos, atuando, desta forma, na prevenção e tratamento de infecções e restauração do equilíbrio da mucosa intestinal. Ainda teria o efeito de eliminação de toxinas produzidas pelo metabolismo de outros microrganismos, ocasionando a desintoxicação do intestino.

Dentre os efeitos imunológicos causados pela ingestão de probióticos, pode-se citar o aumento da secreção de interferon gama, devido, provavelmente, à decorrência do desvio da resposta imunológica para um perfil Th1. Desta forma, pacientes com dermatite atópica, bem como alergia a leite são auxiliados, podendo desenvolver uma resposta tolerogênica. Além disso, evidências sugerem a redução de enzimas β -glicuronidase e nitroredutase, as quais são sintetizadas por bactérias patogênicas; esse fator ocasiona a hidrólise de compostos carcinogênicos, com consequente redução de substâncias nocivas,

diminuindo o risco de neoplasia (LEBLANC; PERDIGÓN, 2005; POHJAVUOR, et al., 2004).

Os probióticos podem promover fermentação de diversos substratos ingeridos na alimentação, gerando ácidos graxos de cadeia curta, diminuindo o nível de triglicerídeos sérico, bem como atuando na redução do pH, tornando o meio desfavorável para bactérias patogênicas. Em caso de fermentação de proteínas, ainda pode-se ter redução dos níveis séricos de amônia, além de participar na síntese de vitaminas do complexo B (BLAUT, 2002; PERIS et al., 2002).

Com a presença de microrganismos probióticos no intestino humano, o triptofano é hidrolisado, formando o precursor do hormônio serotonina (5HTP). Além disso, pode haver a produção das vitaminas K e B₁₂, digestão de fibras insolúveis, gerando nutrientes que podem ser utilizados pelo organismo do hospedeiro. Diante do exposto, pode-se afirmar que os microrganismos probióticos aumentam de maneira expressiva o valor nutritivo e potencialmente funcional dos alimentos, podendo também, em alguns casos, gerar modificações sensoriais desejáveis em diversos produtos fermentados (GOMES; MALCATA, 1999).

Um dos mecanismos de ação evidenciados é o de exclusão competitiva, na qual o probiótico, liga-se a sítios das células do intestino, impedindo a adesão de patógenos à mucosa, formando uma barreira física e promovendo competição por nutrientes. Além disso, pode haver produção de bacteriocinas, as quais são capazes de inibir microrganismos indesejados e, conseqüentemente, suas citocinas pró-inflamatórias, como por exemplo o fator de necrose tumoral-alfa e a interleucina 2 (KARKOW et al., 2007; MORAIS; JACOB, 2006).

A Figura 1 refere-se aos principais mecanismos de ação dos microrganismos probióticos no intestino do hospedeiro.

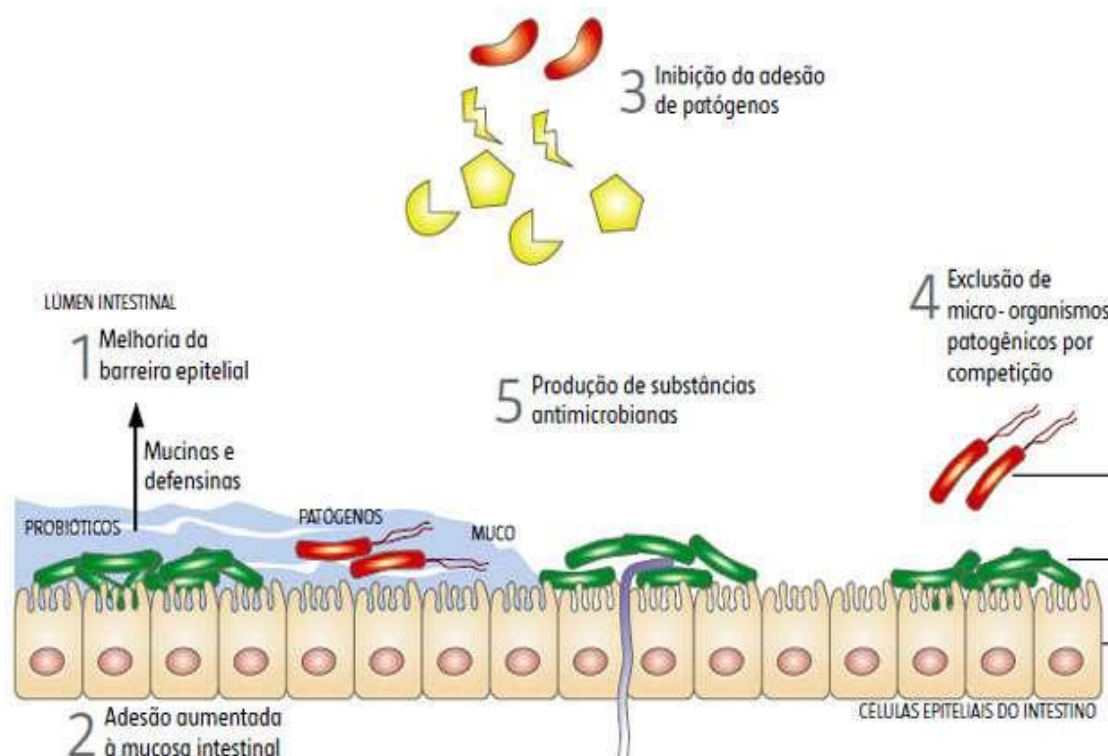


Figura 1 - Principais mecanismos de ação dos probióticos no organismo humano.

Fonte: ALMEIDA et al., 2009.

Os probióticos mais utilizados e estudados são os *Lactobacillus* spp. e as *Bifidobacterium* spp., sendo que ambos são capazes de hidrolisar proteínas com potencial alergênico no trato gastrointestinal, fazendo com que as mesmas sejam digeridas pelo organismo humano, desta forma reduzindo a alergenicidade (MORAIS; JACOB, 2006).

4.2 *Lactobacillus rhamnosus*

A família Lactobacillaceae é formada por células em forma de bastonetes regulares e cocobacilos medindo entre 0,5-1,2 µm de largura e 1,0-10 µm de comprimento (BERGEY; HOLT, 1994). A maioria são imóveis, catalase negativa, com atividade pseudocatalase em algumas cepas, oxidase negativa, não redutores de nitrato, indol ou H₂S negativos, e não esporulantes. São Gram-positivos, anaeróbios facultativos ou microaerofílicos e toleram a presença de ácidos (AXELSSON, 2004; HOLZAPFEL et al., 2001; KONEMAN et al., 2005). Recentemente, foram propostas alterações na taxonomia do gênero

Lactobacillus, com a reclassificação surgiram novos gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus* (ZHENG et al., 2020).

De acordo com Gomes e Malcata (1999), a faixa de temperatura ótima para a multiplicação desses microrganismos é de 35 a 40 °C, e os valores de pH mais favoráveis são de 5,5 a 6,0, entretanto, algumas espécies podem suportar pH bastante inferiores. Os nutrientes utilizados para o crescimento são carboidratos, proteínas e seus produtos de degradação, vitaminas do complexo B, derivados dos ácidos nucléicos e alguns minerais.

Estudos apontam que microrganismos da família Lactobacillaceae possuem a capacidade de aderir-se a receptores específicos da membrana intestinal, o que confere resistência aos movimentos de peristaltismo e capacidade de competir com microrganismos patogênicos, como por exemplo *Salmonella* Typhimurium, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, que por não possuírem capacidade de adesão acabam tendo seus potenciais malefícios ao hospedeiro reduzidos (MARCO; PAVAN; KLEEREBEZEM, 2004).

Os microrganismos dessa família podem ser obrigatoriamente homofermentativos, facultativamente heterofermentativos e obrigatoriamente heterofermentativos. Os *Lactobacillus* homofermentativos, os quais são geralmente encontrados no organismo humano, são representados por três grupos: 1) o grupo *Lactobacillus acidophilus*, envolvendo linhagens de *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus gasseri*, *Lactobacillus crispatus* e *Lactobacillus johnsonii*; 2) *Ligilactobacillus salivarius* (anteriormente denominado *Lactobacillus salivarius*); e 3) o grupo *Lacticaseibacillus casei* (anteriormente denominado *Lactobacillus casei*), incluindo linhagens de *Lacticaseibacillus rhamnosus* (anteriormente denominado *Lactobacillus rhamnosus*) e *Lacticaseibacillus paracasei* (anteriormente denominado *Lactobacillus paracasei*) (HOLZAPFEL et al., 2001; ZHENG et al., 2020).

Lacticaseibacillus rhamnosus GG é um microrganismo probiótico bastante estudado, pesquisas apontam inúmeros benefícios à saúde humana vinculado à essa bactéria; dentre esses pode-se citar a prevenção e tratamento de diarreia aguda em crianças, prevenção e redução de alergias alimentares, além de outros efeitos satisfatórios para outros problemas de saúde (DORON et al., 2005).

Yáñez et al. (2008) avaliaram a viabilidade do *L. rhamnosus* em relação às condições de meio ácido, ocasionado por fermentação, e afirmam a resistência do microrganismo a pH próximo a 4,0. Silva et al. (2013) evidenciaram que a espécie produz ácido láctico eficientemente através do consumo de carboidrato, utilizando preferencialmente hexoses.

De acordo com pesquisas, o *L. rhamnosus* é capaz de combater infecções causadas por microrganismos patogênicos, especificamente por *E. coli*, além de inibir o desenvolvimento de uropatógenos em casos de infecções urinárias. Os autores também evidenciaram que *L. rhamnosus* GG possui eficiência na redução e tratamento de diarreias causadas por rotavírus e pelo consumo de antimicrobianos (CHANG et al., 2013; FIGUEROA-GONZÁLES et al., 2011).

Vong et al. (2014) afirmaram que a cepa probiótica de *L. rhamnosus* GG apresenta atividade antioxidante bastante elevada, atenuando a produção de espécies reativas de oxigênio e a capacidade fagocítica dos neutrófilos, desse modo, atuando contra a citotoxicidade celular.

Beristain-Bauza et al. (2016) avaliaram o efeito do sobrenadante do caldo fermentado de *L. rhamnosus* e encontraram atividade antimicrobiana sobre diversas bactérias patogênicas, como *E. coli*, *S. Typhimurium*, *L. monocytogenes* e *S. aureus*, o que pode ser devido ao pH ácido pela presença de ácido láctico e também por bacteriocinas produzidas.

Segundo Tuomola e Salminen (1998), o fato do *L. rhamnosus* possuir elevada capacidade de aderência às células epiteliais, bem como facilidade de colonização, contribui para que haja modulação do sistema imune, eliminação de patógenos e melhor contato com a mucosa. Desse modo, ocorre uma fortificação da microbiota residente benéfica, a qual torna-se uma parte integrante da barreira na mucosa que serve para impedir a adesão de patógenos.

Tumola et al. (1999) ainda salientam que existem outros fatores bastante importantes nessa espécie, como a elevada resistência aos sais biliares e a capacidade de causar redução no pH do meio, gerando acidificação, através da fermentação de carboidratos, com formação de ácido láctico.

Alander et al. (1999) realizaram estudos em relação à capacidade de adesão *in vitro* com células epiteliais e muco e *in vivo* avaliando a capacidade de adesão à mucosa intestinal. Os autores obtiveram bons resultados em ambos os

casos, verificando que o microrganismo pode persistir aderido durante mais de uma semana após a ingestão oral por adultos saudáveis. Bajaj et al. (2014) ressaltaram que um dos fatores responsáveis pela elevada capacidade de adesão desse microrganismo à mucosa intestinal é a presença de pili.

4.3 Microencapsulação

A aplicação dos microrganismos probióticos é geralmente realizada em produtos lácteos, tendo em vista que esses são muito favoráveis para a sua viabilidade e sobrevivência devido à presença de lactose (utilizada como substrato), à atividade de água adequada e à faixa de pH favorável. Entretanto, os avanços nas pesquisas em desenvolvimento e tecnologia têm propiciado a incorporação dos probióticos em uma ampla diversidade de matrizes alimentares, através de técnicas de proteção dos microrganismos. Dentre as tecnologias estudadas pode-se citar técnicas que utilizam secagem, propiciando a preservação do microrganismo (ALTAMIRANO-FORTOUL et al., 2012; CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; IBARRA et al., 2012; SANTOS, 2013).

Para que os probióticos exerçam os inúmeros benefícios já citados, é essencial que os mesmos suportem as características intrínsecas e extrínsecas do produto em que forem aplicados, bem como as modificações físico-químicas que podem ocorrer durante o processamento e armazenamento. Além disso, a viabilidade em concentração adequada deve permanecer até o seu local de ação, assim deve sobreviver às condições de pH ácido do estômago, bem como as condições biliares no intestino delgado. Diante desse problema, surge a necessidade da aplicação de tecnologias, a fim de garantir a sobrevivência dos microrganismos tanto em produtos lácteos, como em novas matrizes alimentares, destacando-se, neste contexto, as técnicas de microencapsulação (DOHERTY, 2014; GOMES et al., 2011; IBARRA et al. 2012; KENT).

A microencapsulação pode ser definida como um processo que imobiliza e gera proteção aos microrganismos através de um material encapsulante, onde o processo pode ser mecânico ou físico-químico. As partículas que são geradas possuem diâmetros de tamanho bastante pequeno, podendo variar de nanômetros a poucos milímetros. Sua estrutura pode ser mantida em condições

adversas do meio, sendo que o conteúdo da cápsula deve ser liberado somente no sítio de ação adequado que, no caso dos probióticos, é o intestino (BORGOGNA et al., 2010).

Quanto ao tamanho, as partículas são classificadas como nanopartículas quando variam de 0,01 a 0,2 μm , micropartículas de 1 a 100 μm e como macropartículas quando possuem tamanho superior a 100 μm (RÉ, 1998).

As microcápsulas podem diferir-se quanto a sua estrutura. Podendo apresentar o material encapsulado, denominado núcleo, o qual permanece presente na região central e envolto por um material encapsulante, cobertura ou parede. Ou então, o núcleo pode ser uniformemente disperso na matriz polimérica, fazendo com que uma pequena fração do material ativo permaneça exposta na superfície. O primeiro é classificado como sistema do tipo reservatório, e é denominado microcápsula; já o segundo, é classificado como sistema matricial, e pode ser denominado como micropartícula ou microesfera. Apesar da classificação, os termos encapsulação e microcápsulas são amplamente utilizados, englobando as microesferas. Ainda existe a possibilidade de as microcápsulas possuírem mais de um núcleo, ou mais de um tipo de material de parede para um mesmo núcleo. Na Figura 2 estão representadas a estrutura das microcápsulas e das micropartículas (AZEREDO, 2005; GIBBS et al., 1999).

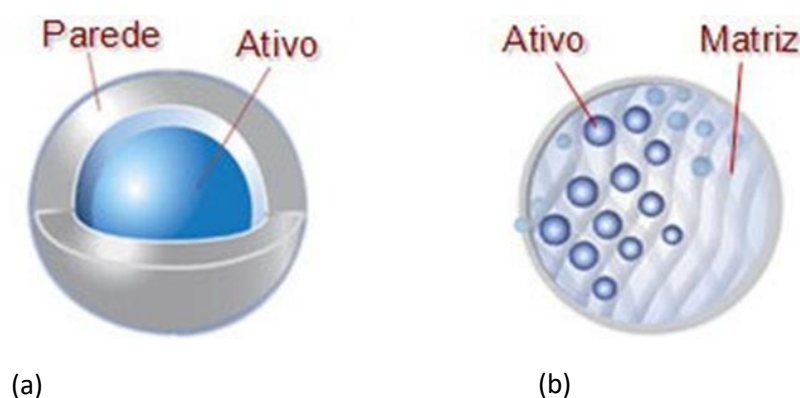


Figura 2 - Representação da estrutura das microcápsulas (a) e micropartículas (b).

Fonte: MAIA, 2013.

Segundo Cook et al. (2012), a liberação controlada do conteúdo das cápsulas pode ocorrer por diferentes mecanismos, como mudança no pH, estresse mecânico, temperatura, ação de enzimas, tempo, fermentação bacteriana, entre outros. Kailasapathy (2009) afirma que essa tecnologia fornece uma barreira física aos microrganismos, o que aumenta a resistência a condições adversas. Vários estudos comparativos apontam que a sobrevivência é bastante reduzida quando as bactérias são inoculadas livres nas matrizes.

Existem diversos métodos que podem ser utilizados para a produção das microcápsulas, estes podem ser divididos em três diferentes grupos. O primeiro grupo consiste em métodos físico-químicos, abrangendo coacervação simples e complexa e envolvimento lipossômico. O segundo grupo são métodos físicos, como o *spray dryer*, *spray coating*, *spray chilling*, gelificação iônica, leiteo fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização. Por último, têm-se os métodos químicos, como polimerização interfacial e inclusão molecular. Essas técnicas são capazes de driblar limitações quanto ao emprego em determinados produtos alimentícios, sendo que podem impedir a liberação de odores e ampliar a estabilidade em relação às condições ambientais adversas, como a presença de oxigênio e pHs extremos (RABELLO, 2009; SOHAIL et al., 2011).

De acordo com Jackson e Lee (1991), essas diferentes técnicas permitem encapsular diversos ingredientes alimentícios, substâncias, compostos bioativos, fármacos, entre outros. A escolha do método deve ser feita através de avaliação minuciosa, observando qual o objetivo final de aplicação da microcápsula, bem como as características físico-químicas, tanto do material encapsulante, como do conteúdo encapsulado; ainda deve ser avaliado o tamanho desejado de microcápsula e o mecanismo de liberação de seu conteúdo.

Chen e Chen (2007) afirmam que a viabilidade final das células bacterianas presentes no interior das cápsulas irá depender diretamente da sobrevivência do probiótico ao processo de microencapsulação, bem como do tipo e da concentração do material encapsulante, do tamanho das partículas, concentração inicial de células bacterianas a serem encapsuladas, cepa utilizada e temperatura de armazenamento.

4.4 *Spray Dryer*

De modo geral, a utilização de técnicas de secagem, onde soluções no estado líquido passam para o estado sólido, gera produtos com estabilidade superior, aumenta o tempo de armazenamento, prolongando a vida útil do produto, além de poder preservar compostos biologicamente ativos, com a presença de agentes encapsulantes (ANSELMO et al., 2006; BURGAIN et al., 2011). De acordo com Carmo et al. (2015), a técnica de microencapsulação por *spray dryer* é uma das mais utilizadas, tendo bastante destaque na área de probióticos, pois possui elevada facilidade de operação e boa relação entre custo e benefício. Nesse método têm-se uma solução de trabalho, contendo o agente encapsulante e o núcleo ou material ativo, que passa do estado líquido para o estado sólido através da rápida desidratação do líquido com a utilização de temperaturas elevadas, resultando em um produto pulvulento. O funcionamento do equipamento conta com um bico injetor, o qual é responsável por realizar a aspersão de pequenas gotículas da solução de trabalho no interior de uma câmara de secagem, a qual possui circulação de ar superaquecido que, ao entrar em contato com as gotículas de pequeno diâmetro da amostra, proporciona a rápida desidratação e formação das microcápsulas.

O equipamento é formado por diferentes sistemas, sendo esses: o sistema de atomização da solução a ser seca, de aquecimento e controle de temperatura do ar de secagem, de bombeamento e controle de vazão da alimentação da solução ainda líquida, de alimentação do ar para secagem, câmara de secagem e sistema de separação do ar e material seco (DAVIS et al., 2018).

Especificamente, ocorre o bombeamento da solução contendo o material ativo e o material de parede até a câmara de secagem, a qual possui o bico atomizador no seu interior. Esse apresenta um orifício de pequeno diâmetro em sua extremidade, o que faz com que as gotículas líquidas tenham uma área superficial elevada; assim, ao entrarem em contato com o ar quente na câmara de secagem elas passam para o estado sólido. As partículas de densidade mais elevada são coletadas na parte inferior da câmara de secagem, já as de densidade inferior consistem no produto de interesse, as quais são

encaminhadas para o ciclone, onde serão coletadas (DAVIS et al., 2018). O funcionamento do *spray dryer* é mostrado na Figura 3.

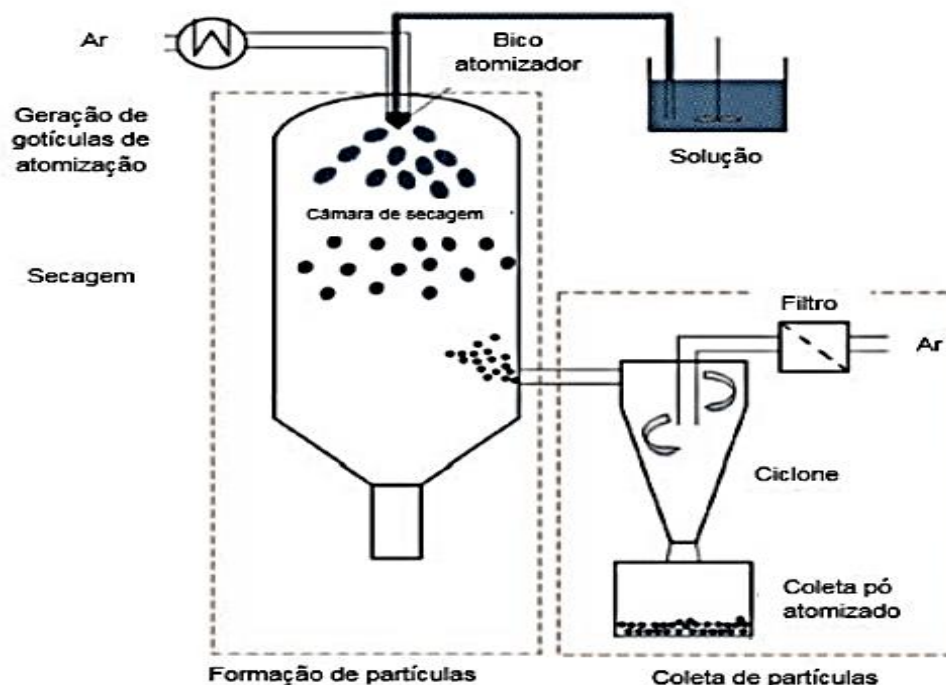


Figura 3 - Representação do funcionamento da secagem por *spray dryer*. Fonte: CHAGAS, 2018.

Além das propriedades do material a ser submetido à secagem, o produto obtido pode ser afetado pelas condições utilizadas no *spray dryer*, como a vazão da alimentação, velocidade de secagem e temperatura de entrada e saída do ar de secagem (TONON, 2009).

A atomização ou secagem por *spray dryer* possui diversas vantagens, dentre elas pode-se citar a velocidade do processo, a qual é relativamente rápida. Além disso, o método é altamente reprodutível e sua característica principal consiste na adequação para aplicações industriais (ANSELMO et al., 2006; BURGAIN et al., 2011).

A secagem de microrganismos probióticos por *spray dryer* é uma técnica promissora, sendo adequada para soluções protetoras, gerando pós com concentrações elevadas de microrganismos viáveis, facilitando o manuseio e armazenamento das culturas probióticas, bem como suas subsequentes aplicações em alimentos funcionais. Entretanto, para que os resultados da microencapsulação sejam satisfatórios, com culturas encapsuladas viáveis e

com tamanho de partícula desejado, é importante que os ajustes e controle de condições de processamento como temperaturas de entrada e saída do ar sejam feitos devidamente (KAILASAPATHY, 2002; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007). E, também que o agente encapsulante seja adequado ao processo. A Tabela 1 mostra condições e microrganismos utilizados, bem como resultados obtidos, com diferentes encapsulantes, na microencapsulação de probióticos por *spray dryer*, relatado por diversos autores.

Tabela 1 - Condições utilizadas e resultados obtidos nos processos de microencapsulação de probióticos por *spray dryer*.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Referências
<i>Bifidobacterium</i> Bb-12	Soro de leite	Temperatura de entrada e de saída de ar de 150 °C e de 50-60 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,36 L h ⁻¹ *, e pressão de ar do compressor de 7,1 kgf cm ² *	-	84 dias*	> 9	> 9	CASTRO-CISLAGHI et al., 2012.
<i>Lactobacillus rhamnosus</i> B442	Amido de arroz nativo e inulina	Temperaturas de entrada de 135, 145 ou 155 °C. Taxa de alimentação de 0,84 L h ⁻¹ *	-	32 dias	De 8,66 a 9,08	de 7,08 a 8,77 (4º C) e de 6,65 a 8,79 (25 °C)	AVILA-REYES et al., 2014.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Leite em pó desnatado ou soro de leite em pó doce	Temperaturas de entrada e saída de 180 e 85-95 °C, respectivamente. Pressão do ar de 5,0 kgf cm ² , taxa de fluxo de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ *	75,4% para soro de leite 77,7% para leite desnatado	90 dias	Em torno de 7	Redução média de 0,43 em todos os tratamentos	MACIEL et al., 2014.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Referências
<i>Lactocaseibacillus paracasei</i>	Soro de queijo	Temperatura do ar de entrada e de saída de 160 °C e de 55-60 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,36 L h ⁻¹ , e pressão de ar do compressor de 7,1 kgf cm ² *	93.12%	-	-	-	ILHA et al., 2015.
<i>Lactiplantibacillus plantarum</i> (MTCC 5422)	Frutooligossacarídeo, isolado de proteína de soro de leite e isolado de proteína de soro de leite desnaturado	Temperatura de entrada e de saída de 110 °C e de 55 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 0,24 L h ⁻¹ . Pressão do ar de 2 kgf cm ² *	70,8 a 98,63%	60 dias	De 7,3 a 9,8	Redução em torno de 1	RAJAM e ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015.
<i>Ligilactobacillus salivarius</i> NRRL B-30514	Leite desnatado reconstituído, sacarose, trealose e lactose	Temperatura de entrada de 170 °C e temperaturas de saída de 98-100, 94-96, 90-92, 84-86, 80-82, 74-76 e 70-72 °C	-	14 dias*	De 4,68 a 7,22	De 3,21 a 5,20	ZHANG; LIN e ZHONG, 2016.
<i>Bifidobacterium infantis</i> ATCC 15679 e <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> ATCC 8014	Mucilagem e proteína solúvel extraídas de sementes de chia e linhaça	Temperaturas de entrada e saída de ar de 110 °C e 75-80 °C, respectivamente e 0,36 L h ⁻¹ * de alimentação	94.8% para <i>B. infantis</i> e 88.3% para <i>L. plantarum</i>	45 dias	10,25 para <i>B.infantis</i> e 9,69 para <i>L. plantarum</i>	10,11 para <i>B.infantis</i> e 9.55 para <i>L. plantarum</i>	BUSTAMANTE et al., 2017

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Referências
<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA-5	Caseinato de sódio, isolado de proteína de soja, proteína de ervilha, glicose D + e maltodextrina	Temperatura de entrada e de saída de 150 °C e de 65 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 1,2 L h ⁻¹ * pressão de ar do compressor de 4,1 kgf cm ² *	-	56 dias*	De 6,69 a 9,20	De 2,58 a 7,90 (25 °C) De 2,65 a 7,57 (30 °C) e 0 a 6,63 (35 °C)	DIANAWATI et al., 2017.
<i>Lactocaseibacillus casei</i> Shiota	Maltodextrina, dextrose, goma arábica e leite desnatado reconstituído	Temperatura de entrada e de saída de 160 °C e entre 64 e 68 °C, respectivamente. Fluxo de alimentação de 0,54 L h ⁻¹ *	De 82,9% a 95,4%	60 dias	Entre 8 e 9	Redução entre 4,4-39,37 e 9,49-64,3% durante o armazenamento a 4 e 24 ° C, respectivamente	GUL, 2017.
<i>Lactocaseibacillus casei</i> LK-1	Leite desnatado, trealose e maltodextrina	Temperatura de saída do ar de 70 °C. Taxa de fluxo de alimentação de 0,32 L h ⁻¹ *	92,9% para leite desnatado, 56,3% para trealose e 34,6% para maltodextrina	70 dias*	Em torno de 9	-	LIAO et al., 2017.
<i>Lactobacillus pentosus</i>	Mistura de amido e pulque	Temperatura de entrada do ar de 92-148 °C. A taxa de fluxo de alimentação de 0,24 L h ⁻¹ *	De 79.2% a 98.4%	84 dias*	9	9 (4 °C) e menos de 6 (30 °C) a partir da 6 ^a semana	HERNÁNDEZ-LÓPEZ et al., 2018.
<i>Lactobacillus zeae</i> LB1	Caseinato de sódio, alginato de sódio e proteína de soja	Temperatura de entrada e de saída de 170 °C e 80 °C, respectivamente. Taxa de fluxo de alimentação de 0,3 L h ⁻¹ *.	Em torno de 85%	112 dias*	Em torno de 9	-	LIU et al., 2018.

Microrganismo utilizado	Material encapsulante	Parâmetros de secagem	Eficiência de encapsulação	Tempo da avaliação da viabilidade (dias)	Viabilidade inicial da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Viabilidade final da microcápsula (log UFC g⁻¹)	Referências
<i>Lactobacillus acidophilus</i> La-5	Goma arábica, maltodextrina, inulina, amido de milho e trealose	Temperatura de entrada e de saída de 130 °C e de 76 °C, respectivamente. Taxa de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ e pressão do ar de 6,1 kgf cm ² *	De 89.7% para goma arábica a 94.3% para amido	120 dias	De 10,01 a 10,98	5.46 a 6.81 (25 °C) 7.08 a 8.40 (-18 °C) 7.78 a 9.33 (7 °C)	NUNES et al., 2018.
<i>Lactobacillus acidophilus</i> (NCDC 016)	Maltodextrina e goma arábica	Temperatura de saída de ar de 55 °C. Taxa de fluxo de alimentação de 0,48 L h ⁻¹ *	De 65% a 89,15%	-	7,30 a 9,97	-	AREPALLY e GOSWAMI, 2019.

*Valores originais foram convertidos, pois a unidade foi padronizada.

Existem diversos critérios que devem ser utilizados para selecionar as condições de secagem e o microrganismo utilizado para realizar a microencapsulação por *spray dryer*. A maioria dos estudos utiliza bactérias dos gêneros *Lactobacillus* (que antes incluía o atual *Lacticaseibacillus*), *Lactococcus* e *Bifidobacterium*, devendo levar em consideração as características de resistência da cepa bacteriana, a fim de obter-se uma elevada eficiência e viabilidade probiótica nas microcápsulas (HUANG et al., 2017).

Huang et al. (2016) avaliaram a sobrevivência de *Propionibacteria freudenreichii* ITG P20 e de *Lacticaseibacillus casei* BL23 após o processo de secagem e obtiveram a sobrevivência de 70% para *P. freudenreichii* ITG P20 e 40% para *L. casei* BL23, mesmo sob condições de secagem mais severas com temperatura de entrada de 180 °C e temperatura de saída de 73 °C comparando com temperatura de entrada de 140 °C e temperatura de saída de 63 °C.

Um dos principais parâmetros que influenciam na viabilidade é o tempo de permanência das partículas probióticas na câmara de secagem, sendo que quanto maior esse período, maior será o tempo de exposição ao estresse e elevada temperatura, ocasionando uma redução na sobrevivência e eficiência do processo. Na maioria dos casos, quando em escala industrial, o *spray dryer* é equipado com dispositivos pneumáticos que, além de permitirem a coleta contínua, geram resfriamento dos pós, ocasionando aumento na eficiência de encapsulação (HUANG et al., 2017).

Desse modo, a combinação da temperatura e tempo de secagem é um fator de extrema importância em estudos relacionados às microcápsulas probióticas, devido à sensibilidade das células bacterianas a altas temperaturas. Assim, a cinética da secagem irá determinar o grau de inativação bacteriana, exigindo cuidado em relação à temperatura em função do tempo (WANG et al., 2016).

Outros fatores que influenciam na redução da concentração dos microrganismos após a secagem são o tipo e concentração de material encapsulante utilizado, bem como a atividade de água do produto final. Diante disso, torna-se necessário avaliar parâmetros para a otimização da secagem, utilizando combinações de múltiplas estratégias, sendo essas variáveis de acordo com cada microrganismo (ZHANG et al., 2016).

Zhang et al. (2016) avaliaram efeitos da temperatura do *spray dryer* na sobrevivência de *Ligilactobacillus salivarius* NRRL B-30514 após a secagem e durante o armazenamento. As temperaturas de saída foram estudadas de 70 °C a 100 °C. Temperaturas de saída mais elevadas resultaram em atividade de água mais baixas e em melhor capacidade de sobrevivência após 2 semanas de armazenamento. Entretanto, a mortalidade de *L. salivarius* aumentou com o aumento da temperatura de saída. Mas a atividade de água também pode ser controlada pelo uso adequado de dessecantes.

A redução da viabilidade causada por uma temperatura de saída elevada também pode variar de acordo com o material encapsulante utilizado. Perdana et al. (2013) constataram em seu estudo que a utilização de secagem rápida em baixas temperaturas ocasiona uma perda mínima de viabilidade. Isso pode ocorrer devido a vitrificação instantânea da matriz sólida em torno das células bacterianas. Uma secagem rápida com temperaturas mais elevadas pode ocasionar a inativação térmica.

4.5 Agente encapsulante

De acordo com Rabello (2009), a microencapsulação ou preservação utilizando agente encapsulante consiste no processo de confinamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em partículas de pequeno diâmetro, sendo que essas são capazes de liberar seu conteúdo de forma controlada e sob condições específicas.

O agente encapsulante possui a função de proteger o material ativo da cápsula quanto às condições adversas do ambiente ao qual é exposto, evitando que haja uma exposição inadequada. A cápsula formada pelo agente encapsulante é desfeita quando há estímulo específico, ocasionando a liberação das substâncias ativas no local ideal (SOHAIL et al., 2011).

A seleção do agente encapsulante deve levar em consideração as propriedades físicas e químicas do material ativo, bem como as características desejadas no produto final. Deve possuir a capacidade de formar uma película coesa, exigindo compatibilidade química e física com o núcleo, a fim de proporcionar estabilidade, resistência e impermeabilidade (VENKATESAN et al., 2009).

De acordo com Weinbreck et al. (2010), a escolha do agente encapsulante é dependente da não reatividade com o material ativo durante todo o período de

estocagem do produto, do método a ser utilizado para a elaboração das microcápsulas, do mecanismo de liberação do conteúdo encapsulado. Também depende das propriedades reológicas, habilidade de dispersar ou emulsificar e capacidade de proteger o núcleo em relação às características físico-químicas do alimento em que a cápsula será aplicada, como por exemplo uma elevada atividade de água.

O agente encapsulante ou material de parede ideal deve cumprir alguns requisitos. De acordo com Shahidi e Han (1993), deve apresentar baixa viscosidade, mesmo em concentrações elevadas, bem como possuir facilidade de manipulação durante todo o processo; não ser altamente higroscópico, afim de evitar aglomeração; não apresentar reatividade com o núcleo; deve ter a capacidade de selar e ser impermeável ao material ativo, segurando-o dentro da estrutura da cápsula; possibilitar a liberação completa do solvente utilizado durante o processo de formação da cápsula; proteger o núcleo quanto a condições desfavoráveis, como pH, oxigênio e ingredientes que possam ser desfavoráveis à sua reatividade; não deve ocasionar alterações sensoriais negativas quando aplicado em um produto alimentício; deve ser viável economicamente.

Um dos principais pontos estudados na área de microencapsulação consiste na identificação de materiais de parede adequados, bem como o estudo dos métodos para a elaboração das cápsulas. Pode-se utilizar diversos tipos de proteínas e polissacarídeos reconhecidos como seguros e, dessa forma, diferentes atributos funcionais podem ser alcançados (JOYE; MCCLEMENTS, 2014).

Barreto et al. (2015) evidenciaram que diversos polissacarídeos e proteínas podem ser utilizados como agentes encapsulantes na produção de microcápsulas, sendo os mais utilizados o alginato de cálcio, carragena, amido, amido resistente, quitosana, gelatina e proteínas, principalmente do leite. Além disso, os autores citam a possibilidade da utilização de outros materiais, como goma xantana, goma arábica, pectina e maltodextrina. Segundo Jafari et al. (2008), os carboidratos, as proteínas e os biopolímeros emergentes são as três principais classes de materiais de parede utilizados e adequados para a elaboração de microcápsulas através da utilização de *spray dryer*.

É crescente o estudo em relação à utilização de polímeros de origem natural, tendo em vista as elevadas possibilidades de aplicações, substituindo efetivamente

os polímeros sintéticos. Ainda podem apresentar vantagens como a baixa toxicidade, elevada disponibilidade e biodegradabilidade (PEPPAS, 2004). De acordo com Ribeiro et al. (2003), as gomas naturais são alternativas interessantes por apresentarem inúmeras possibilidades e por serem rentáveis, com um elevado mercado internacional. Jiménez-Pranteda et al. (2012) utilizaram alguns polímeros microbianos como xantana comercial, gelana e pululana como materiais de revestimento para a encapsulação de *Lactiplantibacillus plantarum* e *Lactocaseibacillus rhamnosus* e concluíram que polímeros microbianos são uma interessante fonte de material de revestimento para a encapsulação de microrganismos probióticos.

4.6 Xantana comercial e xantana Pruni

Xantana é como se denomina o polímero formado por polissacarídeos extracelulares produzido por bactérias do gênero *Xanthomonas*, as quais são fitopatogênicas e pertencentes à família Pseudomonaceae. De modo geral, possui elevado interesse comercial, sendo utilizada nas indústrias do ramo alimentício, podendo ser aplicada em diversos produtos e também na indústria farmacêutica, presente principalmente em cosméticos; além disso ainda possui interesse no setor petroquímico, onde é empregada como lubrificante e agente suspensivo na lama de perfuração de poços, e na recuperação terciária, com o intuito de aumentar o rendimento de extração. O elevado interesse é decorrente de suas características físico-químicas, as quais destacam-se em relação a outros polissacarídeos (GARCÍA-OCHOA et al., 2000).

Dentre as características em destaque pode-se citar as propriedades reológicas, que permitem a formação de soluções com elevada viscosidade, mesmo quando em baixas concentrações (0,05-1,0%); além disso possui estabilidade em ampla faixa de pH e temperatura, mesmo quando há presença de sais (FONTANIELLA et al., 2002; GARCÍA-OCHOA et al., 2000). Entretanto, para a aplicação como agente encapsulante em *spray dryer*, a elevada viscosidade dificulta o processo e reduz o rendimento.

A xantana comercial é sintetizada por *Xanthomonas campestris* pv *campestris*. Jansson, Kenne e Lindberg (1975) definiram a estrutura química desse polímero como

sendo um heteropolissacarídeo com a estrutura primária formada por unidades pentassacarídicas. A cadeia principal é formada por unidades de D-glicose unidas por ligações β (1-4). Nas cadeias laterais ocorrem um ácido glicurônico entre duas unidades de D-manopiranosil, e a unidade de manose terminal pode ser substituída em O-4 e O-6 por um grupamento piruvato. O grupo O-acetila pode estar presente em O-6 da unidade de manose interna.

Quimicamente a xantana pode ser considerada como um polieletrólito aniônico, que possui cátions como Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Mg^{2+} , os quais estão ligados em resíduos ácidos em diferentes proporções. Os cátions podem ser originados dos sais utilizados em meios de produção e através da manutenção de pH durante a fermentação (KLAIC et al., 2016).

Na Figura 4 está sendo mostrada a estrutura química da xantana.

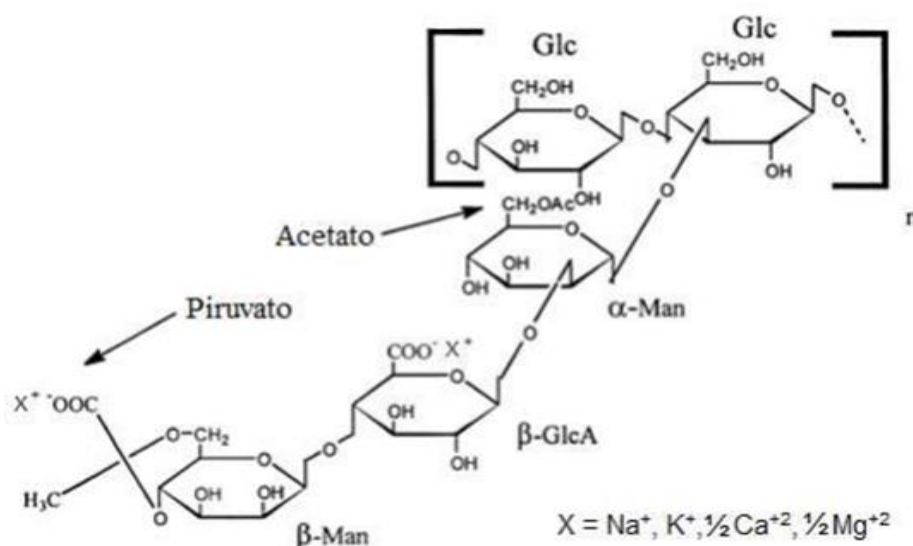


Figura 4 - Representação da estrutura química da xantana.

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

O patovar *Xanthomonas campestris* pv Pruni foi reclassificado como *Xanthomonas arboricola* pv Pruni (MAYER et al., 2011). Moreira et al. (2001) relataram a presença do monossacarídeo ramnose na xantana produzida pela *Xanthomonas arboricola* pv Pruni. Além disso Klaic et al. (2016) afirmaram que a xantana produzida pelo patovar Pruni pode possuir uma menor concentração de piruvato em relação à xantana comercial, sendo que a ramnose parece substituir algumas moléculas externas de D-manose.

Tessmann (2002) afirmou que algumas cepas do patovar Pruni de *Xanthomonas arboricola* apresentam potencial para a produção de xantana com qualidade elevada. A xantana produzida por esse patovar tem sido denominada xantana Pruni. A xantana Pruni diferencia-se quanto às características reológicas e estrutura química. Além disso, segundo Silva (2018), possui atividade antioxidante significativamente superior em relação à xantana comercial.

Além das características já citadas, é importante ressaltar que a xantana, de modo geral, possui comportamento não newtoniano e de pseudoplasticidade, uma vez que, quando em solução, sua viscosidade é reduzida conforme o aumento da taxa de cisalhamento; porém a viscosidade é recuperada em maior ou menor grau quando a tensão de cisalhamento é cessada. As cadeias de xantana ligam-se por pontes de hidrogênio e, quando em repouso, tornam-se estáveis (XUEWU et al., 1996).

Atribui-se a esse polímero um elevado poder espessante, resistência à temperatura e uma viscosidade que pode variar, sendo influenciada pela temperatura de dissolução, características da estrutura química da molécula, bem como concentrações de sais e pH da solução (ARGIN; KO; LO, 2014).

Moreira et al. (2001) relacionaram a viscosidade à composição química e relataram que os polímeros com concentrações mais elevadas de manose apresentaram viscosidade mais elevada utilizando a temperatura de 65 °C; já os que possuíam altas concentrações de glicose apresentaram efeito oposto. Os autores ainda apresentaram resultados que indicam que, entre as cepas, não há relação no rendimento do processo de produção e viscosidade.

Pesquisadores do Laboratório de Biopolímeros do Centro de Desenvolvimento Tecnológico da Universidade Federal de Pelotas vem realizando, de modo pioneiro, estudos sobre a produção de xantana Pruni por *Xanthomonas arboricola* pv Pruni desde 1995. A produção de xantana Pruni é realizada através de cepas isoladas pela Embrapa Clima Temperado, no Rio Grande do Sul e em Santa Catarina. Assim, o grupo de pesquisa possui diversos trabalhos em destaque, incluindo patentes depositadas e concedidas, no Brasil e nos Estados Unidos.

Quanto à utilização de xantana como material encapsulante, pode-se citar o pedido de patente de nº BR1020180687239, a qual trata de microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana. A patente destaca a utilização de xantana de baixa

viscosidade, a mesma utilizada no presente estudo, como agente encapsulante, sendo que em combinação com Aerosil®, geram soluções encapsulantes com as características desejadas para a secagem (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2018).

Fioravante (2019) desenvolveu microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante, através de secagem em *spray dryer*, e posteriormente, aplicou em um gelado comestível. A autora observou que as concentrações de xantana Pruni e de Aerosil® tiveram uma menor influência sobre a viabilidade das microcápsulas em comparação ao método e tempo de armazenamento. Entretanto, o aumento na concentração de xantana Pruni e de Aerosil® ocasionou uma maior sobrevivência dos microrganismos após o processo de secagem. O gelado comestível foi sensorialmente aceito e os probióticos permaneceram viáveis durante o período de armazenamento de 30 dias.

Outros autores já utilizaram xantana comercial, porém nunca como agente encapsulante único ou principal. Ding e Shah (2009) utilizaram diferentes materiais encapsulantes para encapsular microrganismos probióticos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* através do método de emulsão. A xantana destacou-se diante de outros materiais utilizados (xantana, goma guar e locusta, alginato de sódio e carragena), principalmente na simulação gastrointestinal *in vitro*, onde preservou uma maior concentração de microrganismos.

4.7 Aditivo de secagem: sílica pirogênica

Quando se emprega o método de secagem por *spray dryer* surge a necessidade da utilização de aditivos de secagem. O aditivo viabiliza o processo de secagem, tendo em vista que auxilia na redução de perdas por deposição do material na parede do equipamento, o que afeta diretamente a qualidade do produto final, bem como seu rendimento. Além disso, ainda pode gerar alterações nas características do material seco, podendo reduzir sua capacidade de absorção de umidade do ambiente (KESHANI et al., 2015; OLIVEIRA; PETROVICK, 2010).

Na etapa de formação de gotículas para a atomização, pode ocorrer a presença de algumas partículas com diâmetro superior ao desejado, o que pode fazer com que esses aglomerados entrem em contato com a parede da câmara antes do processo de secagem estar completo, ocasionando aderência e formação de depósitos no

equipamento. Essa deposição é responsável por formar torrões, também denominados de *caking*, e pode reduzir a fluidez, a capacidade de reidratação e de dispersão do pó, gerar perdas nas características sensoriais de determinados produtos (principalmente sabor e aroma) e reduzir a vida útil e o rendimento do processo. Quanto mais perdas e aglomerados no produto, menor será a qualidade final (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005).

Para que o rendimento do processo de secagem seja superior, reduzindo o problema de adesão do material às paredes da câmara do equipamento, pode-se optar pela utilização de diversos aditivos, que podem, ainda, auxiliar na alteração de propriedades do produto final, ampliando sua estabilidade e ocasionando liberação controlada de compostos ativos (LABMAQ, 2004).

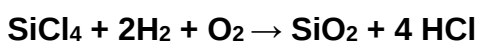
Dentre as opções de aditivos de secagem, encontra-se a sílica. Sílica, dióxido de silício (SiO_2) é o principal componente da areia e a principal matéria-prima para o vidro. Em seu estado natural pode ser encontrada em diversas formas, a grande maioria cristalina, mas também podem ser encontradas na natureza formas vítreas e amorfas. A mesma é composta por grupos siloxanos em seu interior, enquanto a superfície é composta por grupamentos silanóis, os quais são dispostos aleatoriamente, podendo ser denominados como isolados ou livres, quando apresenta apenas uma hidroxila ligada a um átomo de silício; vicinais ou em ponte, quando apresenta dois grupos hidroxilas ligados a dois diferentes átomos de silício; geminais quando têm-se dois grupos hidroxilas ligados a um mesmo átomo de silício (ZURAVLEV, 2000).

De acordo com Napierska et al. (2010), os três tipos de grupos silanóis se diferem em relação às características de adsorção e de reatividade química. No caso do tipo de hidroxilas vicinais, por exemplo, ocorre uma forte interação com moléculas de água, as quais são responsáveis por excelentes propriedades de adsorção de água da sílica, sendo bastante utilizadas em operações de secagem a gás industrial.

As formas cristalinas de sílica podem induzir à produção de quimiocinas, citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, esses mediadores ocasionam iniciação e progressão de doenças pulmonares. Além disso, a sílica cristalina pode induzir toxicidade através da formação de espécies reativas de oxigênio, gerando estresse oxidativo (CASTRANOVA, 2004).

Favoravelmente, a sílica pirogênica consiste em dióxido de silício amorfo, que é uma sílica sintética, de elevada pureza, a qual é constituída por partículas de dimensão de 7 a 16 nm. O Aerosil® é um tipo de sílica comercial pirogênica, a qual possui elevada pureza, é amorfa e com fina granulometria. Para a sua produção utiliza-se um processo contínuo de hidrólise de clorosilanos. Com esse processo ocorre uma conversão do SiCl_4 em gás, o qual, posteriormente, reage com o vapor d'água formado em uma atmosfera contendo oxigênio e hidrogênio, a reação ocasiona perda considerável de calor. Como subproduto da reação têm-se o gás ácido clorídrico, o qual é separado da sílica (Reação 1) (CARVALHO et al., 2015).

Reação 1:



Segundo Starch et al. (2003), a molécula de Aerosil® é composta por grupos silanóis, e no interior das partículas de SiO_2 são encontrados fragmentos de siloxano. Assim, na ausência de moléculas de água, os grupos hidroxila compensam a ação dos átomos de silício. Na superfície da molécula têm-se centros ativos capazes de adsorver água, o que ocasiona a formação de uma camada com a presença de grupos hidroxila e água.

O Aerosil® é capaz de facilitar o manuseio e processamento de diversos produtos em pó ou misturas, sendo aprovado para alimentos e aplicações farmacêuticas. Quando adicionado ocasiona aprimoramento no desempenho de manuseio, reduzindo problemas de fluxo e fornecendo benefícios como dosagem precisa, função antiagregante, distribuição homogênea de ativos e estabilidade durante o armazenamento. Além disso, diminui a possibilidade de ocorrer agregação do pó na parede interna do secador por atomização e pode contribuir para um maior rendimento (EVONIK, 2015).

Neto (2014) elaborou micropartículas de quitosana estruturadas com Aerosil® através do processo de secagem por *spray dryer*, visando gerar sistemas carreadores de fármacos por via oral ou nasal com liberação controlada. Como resultado obteve redução considerável da carga superficial das micropartículas; redução da capacidade em absorver umidade; aumento da estabilidade térmica; maior estabilidade em meio ácido e efeito de barreira à absorção de umidade.

Yan et al. (2011) desenvolveram um sistema de entrega de medicamento auto-emulsionante contendo curcumina, o qual posteriormente foi seco através de *spray dryer*, utilizando Aerosil® 200 como transportador. Como resultados foi observado que o Aerosil® gerou uma taxa de dissolução *in vitro* mais rápida, além de permitir uma melhora significativa em relação à biodisponibilidade da curcumina em testes *in vivo* em ratos, após administração oral. Ainda proporcionou estabilidade por, no mínimo, 3 meses sob temperatura de 40 °C e 75% de umidade relativa.

Fioravante (2019) elaborou microcápsulas do probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356, variando as concentrações de xantana Pruni de baixa viscosidade e Aerosil® em 11 tratamentos e obteve resultados promissores. Os tratamentos contendo 1,25 a 2,31% de xantana Pruni de baixa viscosidade combinados com Aerosil® em concentrações de 0,5 a 1,25% resultaram as maiores eficiências de encapsulação, sendo a média de eficiência de 75%. Ainda foi realizada a aplicação das microcápsulas em gelado comestível de mirtilo, e o mesmo manteve a viabilidade dos probióticos durante o período de armazenamento. Comprovando que as microcápsulas probióticas de *L. acidophilus* ATCC 4356 foram aptas a serem utilizadas em produtos alimentícios.

5 Manuscrito 1

Microencapsulação em *spray dryer* de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG com xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante

Izadora Almeida Perez¹, Karine Laste Macagnan², Camila Waschburger Ames¹, Alain Sourabié³, Ângela Maria Fiorentini¹, Angelita da Silveira Moreira^{1,2,4}

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

² Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico

³ Empresa Procelys by Lesaffre - Maisons-Alfort, França

⁴ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

RESUMO – Estudos sobre métodos que visam manter a viabilidade dos probióticos durante o processamento, armazenamento e consumo dos produtos em que forem aplicados são de grande importância. A microencapsulação por *spray dryer* é uma técnica promissora, que quando associada a um agente encapsulante protege as células frente a fatores adversos. O uso de xantana como agente encapsulante em *spray dryer* é prejudicado pela sua elevada viscosidade, entretanto, o uso de xantana Pruni de baixa viscosidade (BV) pode ser uma solução. Objetivou-se microencapsular o microrganismo *Lactocaseibacillus rhamnosus* em *spray dryer*, utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e sílica pirogênica (Aerosil®) como antiagregante, bem como avaliar o efeito da concentração dessas variáveis na eficiência e no rendimento do processo, e na viabilidade do microrganismo até 120 dias de armazenamento, sob diferentes temperaturas. Para a elaboração das microcápsulas em *spray dryer*, utilizou-se diferentes concentrações de xantana Pruni BV (0,75 a 1,75%) e do antiagregante Aerosil® (0,45 a 1,15%), estabelecidas segundo delineamento fatorial completo 2² em dois níveis (-1, +1) e com três repetições no ponto central, para avaliar os efeitos das concentrações sobre as variáveis respostas: eficiência e rendimento do processo, e viabilidade do microrganismo armazenado sob temperatura ambiente (± 25 °C), refrigeração (7 °C) e congelamento (-20 °C), durante 120 dias. Houve significância estatística ($p \leq 0,05$) para a interação xantana e Aerosil® na eficiência de encapsulação dos probióticos, sendo o efeito positivo; os resultados foram superiores a 85,83% em todos os tratamentos, com eficiência máxima de 99,31%. Para a variável resposta rendimento, a interação de xantana e de Aerosil® apresentou efeito negativo, ou seja, a utilização de menores concentrações, principalmente de xantana, aumenta o rendimento de encapsulação. Os probióticos microencapsulados permaneceram viáveis durante os 120 dias de armazenamento em todas as temperaturas avaliadas, verificando-se a maior redução sob temperatura ambiente. Apesar do baixo rendimento, a elevada eficiência de encapsulação, bem como a manutenção da viabilidade da bactéria durante os 120 dias indicam que a utilização da xantana Pruni BV como agente encapsulante é adequada para o processo de microencapsulação em *spray dryer*.

Palavras-chave: Probióticos. Microcápsulas. Eficiência. Viabilidade. Armazenamento.

5.1 Introdução

Os probióticos são microrganismos vivos que, ao serem ingeridos em concentrações adequadas, geram diversos benefícios para a saúde do consumidor (BRASIL, 2018). O gênero *Lactobacillus* é um dos mais estudados, abrange bactérias Gram-positivas, com formato bacilar ou cocobacilar, não formadoras de esporos, sem flagelos e aerotolerantes ou anaeróbias (GOMES e MALCATA, 1999). Recentemente ocorreu alteração na taxonomia de *Lactobacillus*, com a reclassificação surgiram novos gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus* (ZHENG et al., 2020).

Lacticaseibacillus (anteriormente denominado *Lactobacillus*) compreende as espécies *L. casei*, *L. paracasei* e *L. rhamnosus*. *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG foi a primeira cepa pertencente ao gênero a ser patenteada em 1989. O microrganismo é resistente à baixo pH e à presença de bile, além de possuir a capacidade de adesão aos enterócitos. Dentre os benefícios gerados, destaca-se a prevenção e tratamento de diarreia aguda em crianças, prevenção e redução de alergias alimentares, além da capacidade de reduzir a expressão de diversos marcadores de ativação e inflamação nos monócitos e a apoptose do epitélio intestinal (CAPURSO, 2019; DORON et al., 2005; ZHENG et al., 2020).

Uma das principais formas de ação benéfica dos microrganismos probióticos é a capacidade de modular o sistema imune do hospedeiro, exercendo efeito direto sobre os microrganismos patogênicos. Desse modo, ocorre prevenção de infecções e restauração do equilíbrio da mucosa intestinal, podendo ainda auxiliar na desintoxicação do intestino (SAAD et al., 2011).

Manter uma viabilidade satisfatória dos microrganismos probióticos, em torno de 10^6 a 10^7 UFC g⁻¹, durante toda a vida útil dos alimentos é um grande desafio para as indústrias, tendo em vista que diversos fatores podem dificultar sua sobrevivência. As características intrínsecas do produto em que forem aplicados, como ingredientes utilizados, pH extremo, nível de oxigênio, umidade, atividade de água e temperaturas de processamento e armazenamento podem ser desfavoráveis à sua viabilidade (BAKR, 2015; KAVITAKE et al., 2018).

Para minimizar esse problema, a técnica de microencapsulação por *spray dryer* é uma alternativa a ser utilizada. Essa técnica é altamente adequada para aplicações industriais, possui elevada reprodutibilidade, rapidez e custo relativamente baixo,

quando comparada a outros métodos. Além disso, gera uma maior estabilidade aos microrganismos e prolonga o período de armazenamento, estendendo a vida útil. A utilização de temperaturas elevadas é a principal desvantagem; entretanto, a aplicação de um agente encapsulante adequado pode proteger o microrganismo frente a essa condição (ANSELMO et al., 2006; CARMO et al., 2015; RAY et al., 2016).

Os agentes encapsulantes melhoram o desempenho da secagem e das propriedades do produto, além de gerar proteção ao microrganismo. Envolvem os microrganismos formando as microcápsulas e preservam suas características essenciais, protegendo-o frente a fatores ambientais como oxigênio, luz, umidade, temperaturas extremas e condições do trato gastrointestinal, gerando um produto de elevada qualidade. Além de possuir a capacidade de proporcionar a liberação das substâncias ativas no local ideal, através de estímulo específico (KAUSHIK et al., 2015; SOHAIL et al. 2011).

Como agente encapsulante, a xantana é um polissacarídeo que se destaca por suas propriedades. Moreira et al. (2018), microencapsularam *Lactobacillus acidophilus* em *spray dryer*, utilizando, pela primeira vez, xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e obtiveram excelentes resultados. Essa xantana é mais adequada para esse tipo de aplicação, tendo em vista que xantanas comerciais, que são produzidas pelo patovar campestris, ocasionam elevada viscosidade na solução de trabalho, o que dificulta o processo. De acordo com Moreira et al. (2001), a xantana Pruni é produzida por *Xanthomonas arboricola* pv Pruni e diferencia-se da xantana comercial tanto na estrutura química, como nas propriedades reológicas, possuindo uma ramnose em sua composição, provavelmente nas cadeias laterais. Além disso, segundo Silva (2018), a xantana Pruni possui atividade antioxidante significativamente superior em relação à xantana comercial.

No presente estudo, objetivou-se avaliar o efeito da concentração de xantana Pruni de baixa viscosidade e sílica pirogênica (Aerosil®) na eficiência e no rendimento do processo de microencapsulação por *spray dryer*, bem como a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulado e armazenado sob diferentes temperaturas por 120 dias.

5.2 Material e métodos

5.2.1 Produção da xantana Pruni de baixa viscosidade

A cepa utilizada no presente estudo foi a cepa 101 de xantana Pruni, a qual foi isolada por pesquisadores da Embrapa Clima Temperado – e cedida ao Laboratório de Biopolímeros, CDTec da Universidade Federal de Pelotas. A produção do inóculo foi realizado através da suspensão das células em meio líquido, permanecendo durante o período de 24h em agitador orbital (*shaker*). A fase de produção do polímero foi realizada através do método de fermentação submersa, utilizando biorreator de 14 litros com um volume útil de 10 L (Biostat B, B. Braun Biotech International®). Foram utilizadas condições operacionais como descrito no pedido de patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006), com componentes do meio de cultura e suas concentrações selecionados para obtenção de xantana de baixa viscosidade, com modificação nos componentes e suas concentrações no meio de produção de inóculo, utilizando 2,5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 2,5 g L⁻¹ de peptona.

Realizou-se a recuperação da xantana Pruni BV a partir do caldo fermentado, por precipitação com adição de etanol a 96% (v/v) numa proporção de 4:1 (v/v). Após essa etapa, secou-se o polímero a 56 °C e triturou-se. A xantana utilizada no experimento resultou de uma mistura do produto de duas fermentações, entre as quais a diferença entre o rendimento e a viscosidade do polímero foi menor que 5%.

5.2.2 Avaliação da curva de crescimento de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG

O microrganismo probiótico utilizado foi o *Lacticaseibacillus rhamnosus* (anteriormente denominado *Lactobacillus rhamnosus*) GG ATCC 53103, produzido pela Vivera® e doado pela Procelys by Lasaffre – Maisons-Alfort, França. A cultura liofilizada foi armazenada sob congelamento. Para reativá-la foi adicionado caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharp) (Kasvi®) e, após 20 minutos de reidratação, realizou-se o plaqueamento em placas de Petri, contendo ágar MRS (Kasvi®); incubou-se as placas a temperatura de 37 °C durante 72 h, sob condição de anaerobiose.

A fim de determinar o período de concentração máxima do probiótico *L. rhamnosus*, determinou-se a curva de crescimento, através da contagem em placas do microrganismo e da determinação da densidade ótica por espectrofotômetro. A curva de crescimento possibilita a determinação do período ideal para o microrganismo ser adicionado à solução encapsulante.

Para a obtenção do inóculo, foram preparadas placas de repiques multiplicativos contendo *L. rhamnosus*, incubadas à temperatura de 37 °C durante 72 h, sob condição de anaerobiose. Ressuspendeu-se as células contidas nas placas de Petri em 3 Erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 200 mL de meio líquido MRS (Kasvi®), e incubou-se em agitador orbital (*Shaker*) sob as condições de 150 rpm e 37 °C. Amostras foram coletadas no período inicial (0 h), após 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14, 16, 18, 20, 22, 24, 26 e 28 h de incubação.

Para determinar a concentração de microrganismos em log UFC mL⁻¹, em cada um dos períodos de coleta, realizou-se diluições decimais seriadas seguidas de semeadura em placas de Petri contendo meio MRS ágar, em triplicata. Posteriormente, incubou-se as placas a 37 °C em jarras de anaerobiose, durante 72 h, e, após, foi realizada a contagem do número de unidades formadoras de colônia e correção da diluição para expressão dos resultados. Determinou-se a DO_{600nm} em todos os períodos de coleta, em triplicata, através de leitura em espectrofotômetro (Ultrospec10, Reino Unido) no comprimento de onda de 600nm.

5.2.3 Inóculo

Para obter o inóculo, realizou-se o preparo de 20 placas de repiques multiplicativos contendo *L. rhamnosus* e incubou-se à temperatura de 37 °C durante 72 h, sob condição de anaerobiose. Ressuspendeu-se as células contidas nas placas de Petri em 5 Erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 200 mL de MRS caldo e incubou-se os Erlenmeyers em agitador orbital (*Shaker*) sob as condições de 150 rpm e 37 °C durante 22 h.

5.2.4 Soluções encapsulantes

As concentrações dos componentes das soluções encapsulantes (xantana Pruni BV e Aerosil®) foram definidas através da utilização de delineamento fatorial

completo 2^2 em dois níveis (-1, +1) com adição de três repetições no ponto central para avaliar os efeitos das concentrações de xantana (0,75 a 1,75%) e de Aerosil® (0,45 a 1,15%) totalizando 7 tratamentos. Esterelizou-se as soluções em autoclave, sob a temperatura de 121 °C durante 15 minutos. Na Tabela 1 está sendo especificado as formulações referentes a cada tratamento utilizado para a preparação das microcápsulas.

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial completo 2^2 , com 3 pontos centrais (C) para definição dos tratamentos (formulações) para a elaboração das microcápsulas de *L. rhamnosus* GG em *spray dryer*, utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade (X) como agente encapsulante e Aerosil® (A) como antiagregante.

Tratamento	Níveis codificados		Níveis reais (%)	
	X	A	X	A
1	-1	-1	0,75	0,45
2	+1	-1	1,75	0,45
3	-1	+1	0,75	1,15
4	+1	+1	1,75	1,15
5 (C)	0	0	1,25	0,80
6 (C)	0	0	1,25	0,80
7 (C)	0	0	1,25	0,80

X: xantana Pruni BV; A: Aerosil®

5.2.5 Microencapsulação

Para a elaboração das microcápsulas, transferiu-se o inóculo para tubos Falcons de 50 mL e submeteu-se à centrifugação a 4 °C, 10000 g, durante 5 min. Após centrifugar, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células do probiótico no mesmo volume de solução encapsulante, formando a solução de trabalho. Realizou-se a secagem por *spray dryer* (Lab Maq®, modelo MSD 1.0, Brasil), o qual está disponível no Centro de Desenvolvimento Tecnológico de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas. As condições utilizadas foram: temperatura de entrada de ar de 110 ± 2 °C e temperatura de saída de ar 65 ± 5 °C. A solução de trabalho foi introduzida na câmara de secagem utilizando uma bomba peristáltica com

vazão de alimentação equivalente a $0,4 \text{ L h}^{-1}$. As condições de pressão do compressor do ar de secagem foram $2 - 4 \text{ kgf cm}^{-2}$ e a vazão de ar comprimido 40 kgf cm^{-2} .

Armazenou-se as microcápsulas probióticas em frascos hermeticamente fechados, sob diferentes temperaturas – ambiente ($\pm 25 \text{ }^{\circ}\text{C}$), de refrigeração ($7 \text{ }^{\circ}\text{C}$) e de congelamento ($-20 \text{ }^{\circ}\text{C}$) - até a realização das análises.

5.2.6 Eficiência do processo de microencapsulação

A eficiência de encapsulação foi determinada de acordo com Ilha et al. (2015), relacionando-se a concentração de microrganismos viáveis antes e após o processo de microencapsulação por *spray dryer*. Realizou-se o cálculo de acordo com a equação 1, e o resultado foi expresso em percentual (%).

Equação 1: $EE = \log(cf) / \log(ci) * 100$

Em que:

EE= Eficiência de encapsulação

Cf= Concentração celular final após atomização

Ci= Concentração celular inicial

5.2.7 Rendimento do processo de microencapsulação

Determinou-se o rendimento de acordo com Fioravante (2019), por gravimetria, levando em consideração a quantidade de microcápsula obtida. O cálculo foi realizado através da relação da massa polimérica total sobre o volume de solução (m/v), e expresso em percentual (%).

5.2.8 Avaliação da viabilidade do microrganismo nas microcápsulas

Para realizar a contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* GG ATCC 53103 presentes nas microcápsulas, utilizou-se a metodologia de Silva et al. (2014), adaptada por Fioravante (2019). Adicionou-se 0,01 g das microcápsulas a 1 mL de solução tampão fosfato 0,2 M e submeteu-se à agitação de 150 rpm e temperatura de 37 °C, durante 3 h em agitador orbital (*Shaker*) para proporcionar a abertura ou dissolução das microcápsulas.

Após esse período, realizou-se o plaqueamento, no qual diluições decimais seriadas foram semeadas em placas de Petri contendo ágar MRS. Posteriormente, incubou-se as placas a 37 °C em jarras de anaerobiose, durante 72 h, e assim realizou-se a contagem do número de unidades formadoras de colônia e correção da diluição para expressão dos resultados em log UFC g⁻¹. Determinou-se a contagem de células viáveis nas microcápsulas no tempo inicial, após as mesmas serem produzidas, e em 7, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento, sob temperatura ambiente (± 25 °C), de refrigeração (7 °C) e de congelamento (-20 °C). Realizou-se a análise em triplicata.

5.2.9 Análise estatística

Analisou-se os efeitos das variáveis independentes (concentração da xantana Pruni BV e Aerosil®) em relação ao rendimento, à eficiência e à viabilidade nos diferentes dias de armazenamento pelo teste ANOVA usando o programa *Statistica 7.0®* para *Windows*. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo.

A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a influência de cada parâmetro investigado na função resposta. O teste-t e o P-valor foram empregados para avaliar a significância dos parâmetros. P-valor $\leq 0,05$ expressa efeito significativo no intervalo de confiança de 95%. Os efeitos estimados padronizados que cada variável exerce na resposta avaliada foram descritos através de gráfico de Pareto.

Os resultados das contagens de microrganismos probióticos viáveis durante o armazenamento por 120 dias em diferentes temperaturas foram submetidos à análise de variância (ANOVA), teste F, e, no caso de diferença significativa, as médias foram

comparadas pelo teste de Tukey com significância de 5% de probabilidade, usando o programa *Statistix 8.0®* para *Windows*.

5.3 Resultados e discussão

5.3.1 Curva de crescimento

A Figura 1 é referente à curva de crescimento do microrganismo *L. rhamnosus*, mostrando a concentração de células viáveis (log UFC mL⁻¹) e da densidade óptica ao longo do período de incubação.

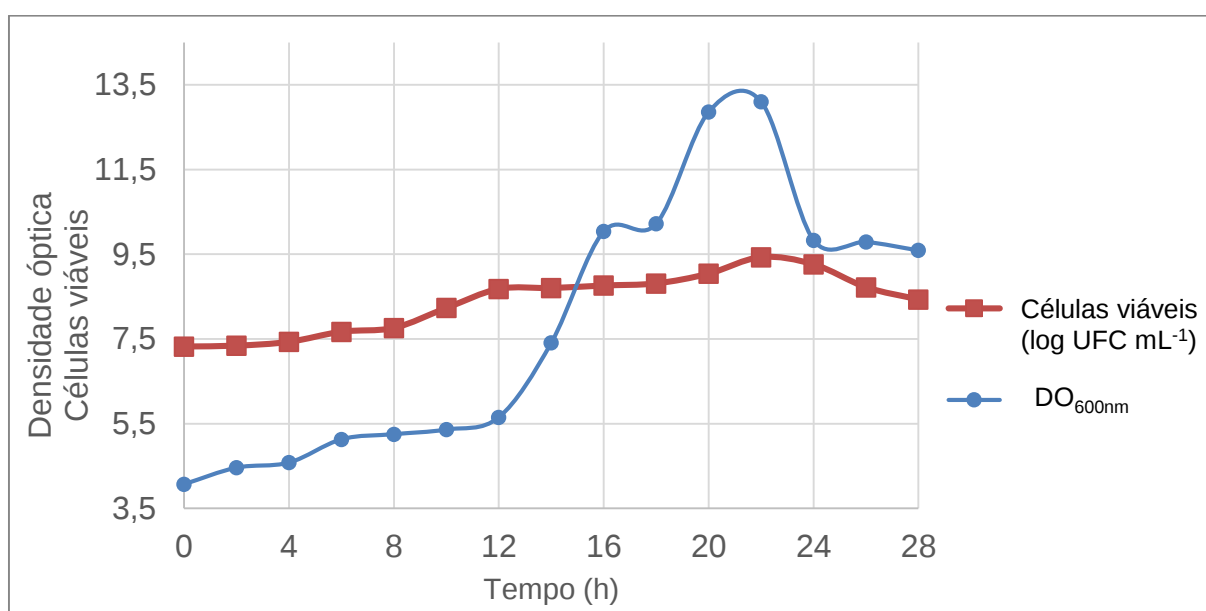


Figura 1 - Curva de crescimento do microrganismo *L. rhamnosus* GG (log UFC mL⁻¹) e DO_{600nm} ao longo de 28 h de incubação.

A concentração inicial de *L. rhamnosus* GG foi de 7,32 log UFC mL⁻¹, alcançando a concentração máxima de 9,43 log UFC mL⁻¹ em 22 h de incubação. A partir desse período, iniciou-se uma redução da concentração de microrganismos, chegando a 8,43 Log UFC mL⁻¹ em 28 h.

Avila-Reyes et al. (2014) avaliaram a cinética de crescimento de *L. rhamnosus* B442 a fim de determinar o período com a concentração máxima de microrganismos. Os autores inocularam uma concentração de cerca de 3 log UFC mL⁻¹ em caldo MRS, incubaram a 35 °C durante 48 h e retiraram amostras para quantificar o

microrganismo. Nessas condições, a concentração máxima de células foi atingida em 36 h, com cerca de 9 log UFC mL⁻¹.

Lopes (2016) determinou a curva de crescimento celular de *L. rhamnosus* ATCC 7469. Inoculou 5% (v/v) do microrganismo em caldo MRS e incubou o inóculo sob a temperatura de 37 °C, com coletas de amostra por até 24 h. Assim como no presente estudo, a concentração inicial foi na faixa de 7 log UFC mL⁻¹. Entretanto, a concentração máxima foi inferior, sendo na faixa de 8 log UFC mL⁻¹, após 14 h de fermentação.

Além da determinação da concentração de microrganismos, a realização da análise de DO_{600nm} é de total importância. Os resultados da DO_{600nm} foram concordantes, com leitura inicial de 4,07 e alcançando 13,10, após 22 h. A partir das 24 h de fermentação, houve uma queda na DO_{600nm}, alcançando-se o valor de 9,59 em 28 h.

Eckert (2016) avaliou a curva de crescimento de *L. acidophilus* e determinou a densidade óptica (DO). Os inóculos foram adicionados em frascos contendo caldo MRS, em uma proporção de 5%, e avaliados quanto ao crescimento em 3, 6, 9, 15, 24, 29, 33 e 48 h. A determinação da DO foi realizada a 600 nm em espectrofotômetro. A autora encontrou uma DO inicial de 1,09, alcançando o máximo de 12,78 no período de 29 h de incubação.

5.3.2 Eficiência do processo de microencapsulação

Os resultados obtidos referentes à eficiência (%) do processo de microencapsulação, relacionados à sobrevivência dos microrganismos após a secagem por *spray dryer*, estão mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Eficiência do processo para a obtenção das microcápsulas probióticas considerado a relação entre a concentração de microrganismos viáveis antes (inóculo) e após (microcápsula) o processo de microencapsulação por *spray dryer*.

Tratamento	Inóculo (log UFC mL ⁻¹)	Microcápsula (log UFC g ⁻¹)	Eficiência (%)
1	9,18±0,02	8,77±0,01	95,53
2	9,75±0,03	9,43±0,09	96,72
3	9,26±0,01	8,11±0,06	87,58
4	8,68±0,10	8,62±0,02	99,31
5	9,53±0,06	8,18±0,20	85,83
6	9,49±0,02	8,26±0,23	87,04
7	9,49±0,02	8,08±0,14	85,14

*médias de $\bar{x} \pm$ desvio padrão.

De acordo com Tripathi e Giri (2014), o processo de secagem por *spray dryer* ocasiona uma redução na viabilidade dos microrganismos, uma vez que as células são submetidas a elevadas temperaturas de entrada e de saída do equipamento, cisalhamento mecânico, desidratação e pressão osmótica. Apesar disso, os resultados obtidos no presente estudo foram excelentes, sendo todos superiores a 85%. O maior resultado foi de 99,31% no tratamento 4, o qual possui a concentração máxima, tanto de xantana como de Aerosil®, já os valores de eficiência inferiores foram observados nos pontos centrais (T5, T6 e T7).

Fioravante (2019) desenvolveu microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade e Aerosil® como agente encapsulante, também através de secagem em *spray dryer*. Utilizando concentrações de xantana e Aerosil® que variaram entre 0,19 a 2,31%, a autora obteve resultados entre 74,10% no tratamento com 2% de xantana e 2% de Aerosil® e 77,25% no tratamento com 0,19% de xantana e 1,25% de Aerosil®, obtendo resultados inferiores ao presente estudo em todos os tratamentos.

Ananta et al. (2005) microencapsularam *L. rhamnosus* GG em *spray dryer*, com temperatura de saída de 70 a 100 °C, utilizando leite desnatado em pó (20%) como agente encapsulante, e obtiveram uma eficiência de 60% com a temperatura de saída de 80 °C.

Maciel et al. (2014) microencapsularam *L. acidophilus* La-5 em *spray dryer*, utilizando soro de leite reconstituído ou leite desnatado (30% de sólidos totais) como

agente encapsulante e avaliaram a eficiência de encapsulação. Os resultados obtidos foram de 75,43% para soro de leite reconstituído e 77,73% para leite desnatado, correspondendo a contagens de probióticos de $7,08 \pm 0,36$ e $7,27 \pm 0,57$ log UFC g⁻¹, respectivamente.

Ilha et al. (2015) microencapsularam *Lacticaseibacillus paracasei* isolado de massa fermentada de uva em *spray dryer*, utilizando leite desnatado e soro de queijo como agentes encapsulantes e obtiveram eficiência de encapsulação de 93,12%, com uma concentração inicial de células viáveis de 10,20 log UFC g⁻¹ e alcançando 9,49 log UFC g⁻¹ após o processo de microencapsulação por *spray dryer*.

Além das condições utilizadas no *spray dryer*, sendo as principais as temperaturas de entrada e de saída, outros fatores geram influência na redução da concentração dos microrganismos após a secagem, consequentemente, alterando a eficiência de encapsulação. Dentre esses fatores, destaca-se o tipo e a concentração de materiais encapsulantes utilizados (ZHANG et al., 2016). A Figura 2 mostra os efeitos das variáveis xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a eficiência.

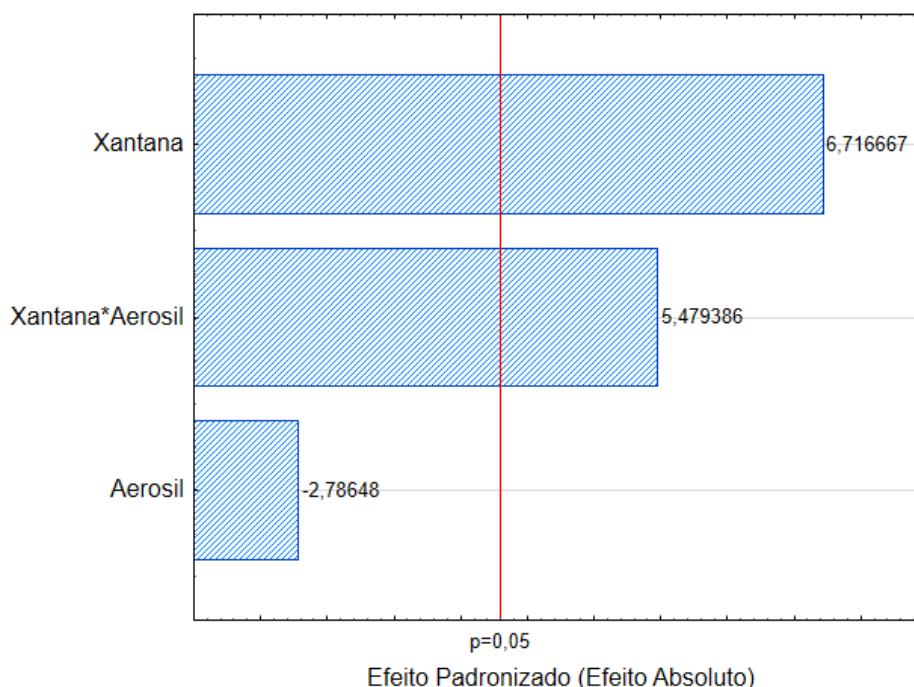


Figura 2 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a eficiência (%) de encapsulação do probiótico *L. rhamnosus* GG.

Na Figura 2 pode-se observar que houve significância estatística ($p \leq 0,05$) para a interação xantana e Aerosil®, sendo o efeito positivo, ou seja, o efeito da xantana na

eficiência de encapsulação dos probióticos é maior quando a concentração de Aerosil® é fixada no máximo valor investigado (1,15%).

Fioravante (2019) avaliou o efeito das variáveis independentes xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável resposta eficiência de microencapsulação do microrganismo *L. acidophilus*. Assim como no presente estudo, a utilização de xantana resultou em efeito positivo. Entretanto, para a autora, a combinação das variáveis não resultou em efeito significativo e o Aerosil® apresentou efeito negativo, o que indica que o aumento da concentração de xantana e redução da concentração de Aerosil® na solução encapsulante, geraram aumento na viabilidade de *L. acidophilus*.

O efeito positivo da xantana Pruni BV e da combinação das variáveis xantana Pruni BV e Aerosil® pode estar relacionado ao fato de o polissacarídeo conferir proteção térmica ao microrganismo, o qual é sensível a temperaturas elevadas. O agente encapsulante possui a função de proteção quanto às condições extremas, evitando que haja uma exposição inadequada e favorecendo a viabilidade do probiótico (SOHAIL et al., 2011).

5.3.3 Rendimento

Os resultados referentes ao rendimento do processo de microencapsulação de *L. rhamnosus* por *spray dryer*, utilizando as diferentes concentrações de xantana Pruni BV e Aerosil® estão mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 - Rendimento de microcápsulas de *L. rhamnosus* GG após processo de microencapsulação em *spray dryer* utilizando xantana Pruni como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante.

Tratamentos	Rendimento (%)
1	26,98
2	25,40
3	29,99
4	18,13
5	21,15
6	21,31
7	20,99

O rendimento do processo de microencapsulação por *spray dryer* pode estar relacionado às condições utilizadas no equipamento, entretanto, até o momento, não foram encontradas informações detalhadas sobre a relação entre o rendimento e as condições do processo na literatura. Segundo Maury et al. (2004), a maior limitação do processo de microencapsulação por *spray dryer* é o baixo rendimento de pó obtido. Este tende a aumentar, quando se aplica temperaturas de entrada mais elevadas, devido ao fato de a secagem das gotículas geradas no processo ser aprimorada, ocasionando em uma redução da deposição e agregação de partículas nas paredes da câmara de secagem. Porém, no caso de microencapsulação de microrganismos probióticos, deve-se ter cuidado com temperaturas muito elevadas. Além disso, uma das principais razões para um baixo rendimento de pó é o projeto do separador de ciclone, o qual não deve reter partículas com diâmetros inferiores a 2 mm, devendo encaminhá-las para a saída de ar.

O tipo e a concentração de agentes encapsulantes utilizados geram grande influência no rendimento do processo de secagem por *spray dryer*. Na Figura 3 pode-se observar os efeitos determinados para as variáveis independentes xantana (%) e Aerosil® (%) sobre o rendimento do processo.

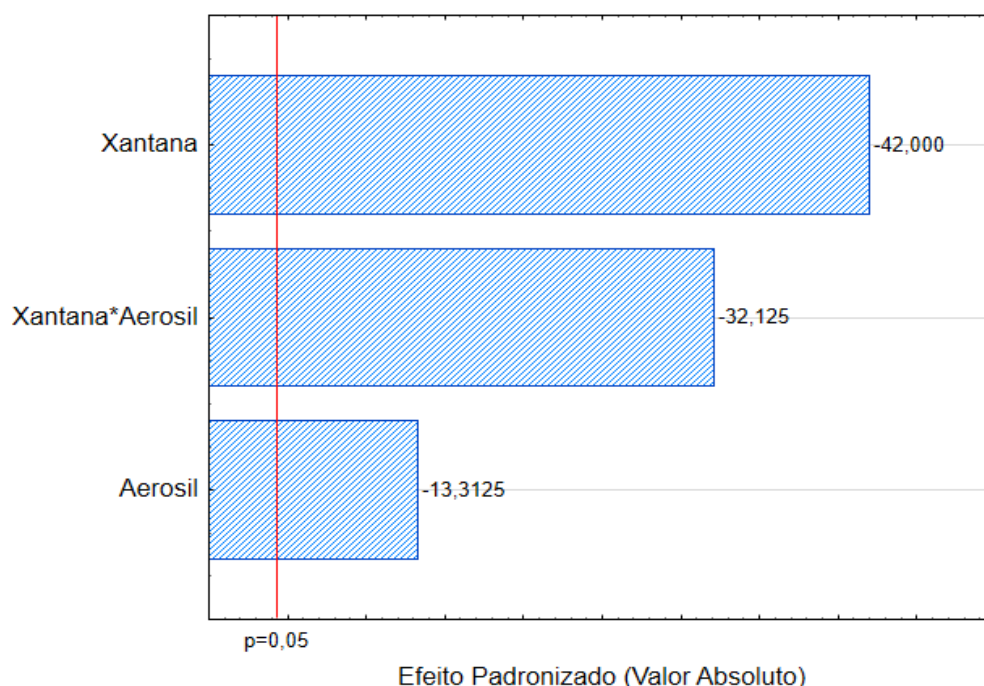


Figura 3 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre o rendimento (%) de encapsulação do probiótico *L. rhamnosus* GG.

A Figura 3 evidencia que todos os parâmetros foram estatisticamente significativos no intervalo de confiança de 95%. A interação de primeira ordem mostra ser de significância estatística para a interação % de xantana e % de Aerosil®, sendo o efeito negativo, ou seja, a utilização de menores concentrações, principalmente de xantana, aumentam o rendimento de encapsulação.

Os resultados variaram de 18,13% a 29,99% (Tabela 3). O maior rendimento corresponde ao Tratamento 3, o qual possui maior concentração de Aerosil® (1,15%) e menor concentração de xantana (0,75%). Isso pode ser explicado pelo fato do antiagregante auxiliar para que não haja aderência do produto ao equipamento, o que é facilitado quando combinado com uma concentração mais baixa de xantana. O segundo melhor rendimento é referente ao tratamento com menor concentração de sólidos (Tratamento 1), o que enfatiza o que foi citado anteriormente, demonstrando que concentrações inferiores auxiliam para que não haja deposição elevada de produto ao equipamento, favorecendo o processo através da formação de gotículas de menor diâmetro.

O menor rendimento foi de 18,13% no Tratamento 4, o qual possui concentração máxima de xantana (1,75%) e de Aerosil® (1,15%), 11,86 pontos percentuais menor que no Tratamento 3. O resultado obtido indica que uma maior concentração de sólidos presentes na solução encapsulante pode gerar a formação de gotículas com diâmetro superior ao ideal, o que ocasiona em uma elevada quantidade de produto aderido ao equipamento e, conseqüentemente, reduz o rendimento do processo. De acordo com Barbosa-Cánovas et al. (2005), na etapa de secagem pode ocorrer a formação de gotículas com diâmetro de tamanho elevado, isso tende a resultar na formação de aglomerados que ocasionam aderência e formação de depósitos no equipamento. Essa deposição forma torrões, também denominados de *caking*, e reduz consideravelmente o rendimento do processo.

Fioravante (2019) obteve resultados de rendimento entre 14,84% e 50,64%. O menor rendimento ocorreu no tratamento contendo 0,5% de xantana e 2,0% de Aerosil®, já o maior rendimento ocorreu no tratamento contendo o máximo de xantana (2,31%) e o intermediário de Aerosil® (1,25%). A autora afirma que o aumento da concentração de xantana e de Aerosil® aumentaram o volume de pó gerado, diferindo do presente estudo, onde os resultados foram contrários.

De acordo com Langrish et al. (2007), a adesividade do material encapsulante gera perdas consideráveis, devido a agregação do produto ao equipamento, reduzindo o desempenho de secagem. Apesar de ter sido utilizada uma xantana de baixa viscosidade, quando aplicada em elevadas concentrações, a solução encapsulante torna-se viscosa, o que dificulta o processo. Segundo Keshani *et al.* (2015), quando utilizados corretamente, os aditivos de secagem auxiliam diretamente na redução de perdas por deposição do material na parede do *spray dryer*, aumentando o rendimento. Destacando-se, desse modo, a importância da avaliação do efeito de diferentes concentrações de antiagregante e de agente encapsulante na solução de trabalho.

5.3.4 Avaliação da viabilidade nas microcápsulas em diferentes períodos e temperaturas de armazenamento

A Figura 4 é mostrada a concentração dos microrganismos viáveis armazenados sob temperatura de congelamento, refrigeração e ambiente, pelo período de 1, 7, 30, 60, 90 e 120 dias.

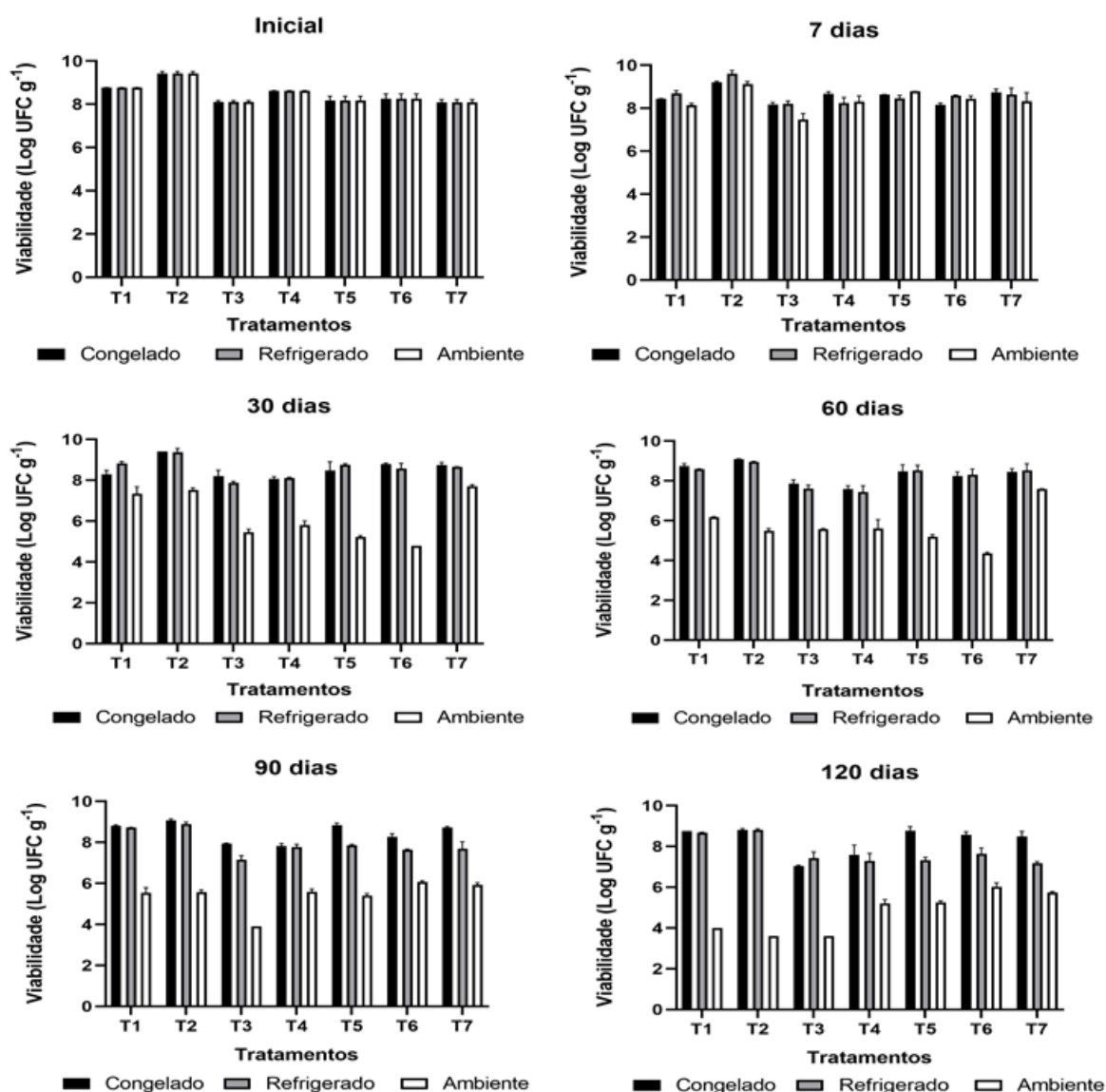


Figura 4 - Concentração de microrganismos viáveis nas microcápsulas ao longo do período de 120 dias de armazenamento, armazenados sob temperatura de congelamento (-20 °C), refrigeração (7 °C) e ambiente (± 25 °C). Médias $\pm$ desvio padrão.

Os tratamentos não diferiram entre si relativamente à concentração de microrganismos contidos nas microcápsulas no período inicial. Aos 7 dias de armazenamento, houve redução significativa na concentração de microrganismos submetidos aos tratamentos T1 (0,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®), T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®), quando armazenados sob temperatura ambiente, em relação aos demais. O restante dos tratamentos e das condições de armazenamento não apresentaram diferença significativa. Já aos 30 e aos 60 dias de armazenamento, apenas a concentração de

microrganismos quando armazenados à temperatura ambiente diferiu significativamente em todos os tratamentos em relação ao armazenamento sob congelamento e refrigeração.

Aos 90 dias, os melhores resultados foram observados para as microcápsulas armazenadas sob temperatura de congelamento e para o T1 (0,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®), T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e T4 (1,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) armazenados sob refrigeração. O T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) e os pontos centrais (T5, T6 e T7), na temperatura de refrigeração, foram inferiores estatisticamente em relação à temperatura de congelamento. O armazenamento das microcápsulas sob temperatura ambiente ocasionou a obtenção das menores concentrações do microrganismo, no T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) e nos pontos centrais (T5, T6 e T7). Aos 120 dias de armazenamento, os melhores resultados foram observados em todos os tratamentos da temperatura de congelamento, e no T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®), T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) e T4 (1,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) da temperatura de refrigeração. As maiores reduções foram observadas na temperatura ambiente, principalmente no T1 (0,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e nos pontos centrais (T5, T6 e T7).

As microcápsulas armazenadas sob a temperatura de congelamento apresentaram excelentes resultados de viabilidade. O T1 (0,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e os pontos centrais (T5, T6 e T7) mantiveram-se no mesmo ciclo logarítmico durante todo o período de armazenamento. O T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) manteve-se em 9 log UFC g⁻¹ até os 90 dias de armazenamento, finalizando com a concentração de 8,81 log UFC g⁻¹ após os 120 dias, sendo a mais elevada em relação a todos os tratamentos. As maiores reduções após os 120 dias de armazenamento foram observadas no T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®) e T4 (1,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®), sendo essas de 1,07 e de 1,09 ciclos logarítmicos, respectivamente. Finalizando com a concentração de 7,04 log UFC g⁻¹ para o T3 e 7,53 UFC g⁻¹ para o T4.

Sob temperatura de refrigeração, a menor redução após os 120 dias de armazenamento ocorreu no T1 (0,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®), diminuindo apenas 0,29 ciclo logarítmico, em relação a concentração inicial, finalizando com a concentração de 8,48 log UFC g⁻¹. Apesar da redução ter sido superior no T2 (1,75%

de xantana e 0,45% de Aerosil®) (0,62 ciclo logarítmico), esse foi o tratamento com a maior viabilidade no período final, sendo esta da ordem de 8,81 log UFC g⁻¹. A maior redução foi de 1,20 ciclos logarítmicos no T4 (1,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®), com concentração final de 7,42 log UFC g⁻¹. A menor viabilidade foi de 7,11 log UFC g⁻¹ no T3, sendo ainda uma viabilidade adequada.

Como esperado, as maiores reduções da viabilidade de microrganismos ocorreram nas microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente. Entretanto, aos 30 dias de armazenamento, o T1 e o T2 apresentaram viabilidades elevadas, na faixa de 7,34 e 7,53 log UFC g⁻¹, respectivamente. O T1 manteve a viabilidade na faixa de 6,18 log UFC g⁻¹ por até 60 dias de armazenamento, sendo essa concentração adequada para utilização. A redução mais elevada, após o período de 120 dias, foi de 5,83 log UFC g⁻¹ no T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®), finalizando com a concentração de 3,60 log UFC g⁻¹. A maior concentração obtida foi de 5,21 log UFC g⁻¹ no T4 (1,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®), o qual obteve redução de 3,41 ciclos logarítmicos. Entretanto, as menores reduções foram observadas nos pontos centrais (T5, T6 e T7), sendo estas de 3,52 a 2,34 ciclos logarítmicos.

Fioravante (2019) avaliou a viabilidade das microcápsulas de *L. acidophilus* ao longo do período de 120 dias, armazenadas sob temperatura ambiente, refrigeração e congelamento. Obteve resultados inferiores aos do presente estudo em todas as temperaturas avaliadas. A temperatura ambiente não assegurou a viabilidade dos microrganismos até os 120 dias de armazenamento. Já para as microcápsulas armazenadas sob congelamento e refrigeração, as concentrações máximas foram 6 log UFC g⁻¹ e 5,57 log UFC g⁻¹, respectivamente, no final do período de avaliação.

Avila-Reyes et al. (2014) utilizaram amido de arroz nativo e inulina, ambos em concentração de 10 a 20% para microencapsular *L. rhamnosus* em *spray dryer* e avaliaram a viabilidade após 32 dias de armazenamento sob refrigeração (4 °C) e sob temperatura ambiente (25 °C). Partindo de concentrações iniciais da ordem de 8,66 a 9,08 log UFC g⁻¹, houve uma redução de 0,17 a 2,26 log UFC g⁻¹ para temperatura ambiente, e de 0,15 a 1,83 log UFC g⁻¹ para a temperatura de refrigeração, sendo a maior viabilidade obtida de 8,77 log UFC g⁻¹. Sendo estes resultados semelhantes aos do presente estudo.

Carvalho (2018) microencapsulou *L. acidophilus* La-5 em *spray dryer* utilizando dextrina de mandioca como agente encapsulante. A autora realizou 17 formulações

variando a concentração de dextrina tartarato de mandioca, a temperatura e a vazão de entrada do equipamento. A viabilidade das microcápsulas foi avaliada em até 45 dias de armazenamento, sob temperatura de refrigeração. Os resultados referentes à redução variaram entre 0 e 2,66 log UFC g⁻¹, iniciando com viabilidade de 5,09 a 8,52 log UFC g⁻¹ e finalizando de 4,34 a 7,47 log UFC g⁻¹.

Nunes et al. (2018) microencapsularam *L. acidophilus* La-5 em *spray dryer*, utilizando goma arábica (8%), maltodextrina (2%), glicerol (1,9%), Tween 80 (0,1%). Elaboraram 4 soluções encapsulantes, variando o agente encapsulante, utilizado-o na concentração de 8%: goma arábica, inulina, amido de milho e trealose. Avaliaram a concentração dos microrganismos sob temperatura ambiente, de congelamento e de refrigeração em até 120 dias de armazenamento; as concentrações iniciais eram da ordem de 10,01 a 10,98 log UFC g⁻¹. Assim como no presente estudo, as maiores reduções ocorreram nas microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente reduzindo de 3,49 ciclos logarítmicos a 4,55. A viabilidade final para esta temperatura variou de 5,46 a 6,81 log UFC g⁻¹. Para a temperatura de refrigeração, ocorreu redução de 1,09 a 2,23 ciclos logarítmicos, finalizando com uma concentração de 7,78 a 9,33 log UFC g⁻¹. Sob a temperatura de congelamento, houve variação da redução na faixa de 2,93 a 1,99 ciclos logarítmicos, com concentração final de 7,08 a 8,40 log UFC g⁻¹.

Hernández-Lopez et al. (2018) microencapsularam *Lactobacillus pentosus* em *spray dryer*, utilizando uma mistura de amido e pulque (bebida alcoólica mexicana) como agente encapsulante, variando a concentração de 24 a 31% de sólidos e a temperatura de entrada de 92 a 148 °C. A viabilidade inicial do microrganismo encapsulado foi em torno de 9 log UFC g⁻¹, posteriormente os autores avaliaram a viabilidade sob a temperatura de 30 °C e sob refrigeração com temperatura de 4 °C, no período de até 12 semanas de armazenamento. Sob a temperatura de refrigeração, a concentração de *L. pentosus* permaneceu em 9 log UFC g⁻¹ até o final do armazenamento (12 semanas). Entretanto, quando armazenado a 30 °C, a partir da semana 6 a concentração de *L. pentosus* foi reduzida para menos de 6 log UFC g⁻¹, sendo que no final do período de armazenamento não houve sobrevivência.

Dianawati et al. (2017) avaliaram a viabilidade do microrganismo probiótico *L. acidophilus* La-5 microencapsulado em *spray dryer*, utilizando caseinato de sódio (6%), isolado de proteína de soja (6%) ou proteína de ervilha (6%), glicose D+ (6%) e

maltodextrina (10%) como agentes encapsulantes, por até 8 semanas, sob as temperaturas de 25, 30 e 35 °C. A viabilidade inicial variou de 7,12 a 9,18 log UFC g⁻¹, sendo que no final do período de armazenamento, a viabilidade foi de 3,64 a 7,90 log UFC g⁻¹ para a temperatura de 25 °C e de 2,65 a 7,57 log UFC g⁻¹ para temperatura de 30 °C. Sob a temperatura de 35 °C houve uma variação de não detectado (<2 log UFC g⁻¹) a 6,63 log UFC g⁻¹. A temperatura de armazenamento influenciou significativamente na viabilidade dos microrganismos em todos os tratamentos, sendo a temperatura de 35 °C a com maiores reduções.

Os resultados obtidos no presente estudo são concordantes com a literatura, sugerindo que a estabilidade dos probióticos microencapsulados aumenta com a redução da temperatura. Corcoran et al. (2004) afirmam que temperaturas inferiores melhoram as taxas de viabilidade celular, tendo em vista que geram a redução de possíveis reações químicas, como oxidação, que são prejudiciais aos microrganismos. De acordo com Silva et al. (2014), temperaturas mais baixas auxiliam na estabilidade dos microrganismos encapsulados, evitando rearranjos no material de parede e impedindo a exposição inadequada às condições indesejadas, ocasionando um aumento da vida útil das microcápsulas.

Além do período e das condições de armazenamento, a concentração de agentes encapsulantes utilizados no processo de microencapsulação influenciam diretamente na viabilidade dos microrganismos. Na Figura 5 pode-se observar o efeito das variáveis independentes xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos no período de até 120 dias de armazenamento, sob temperatura de congelamento.

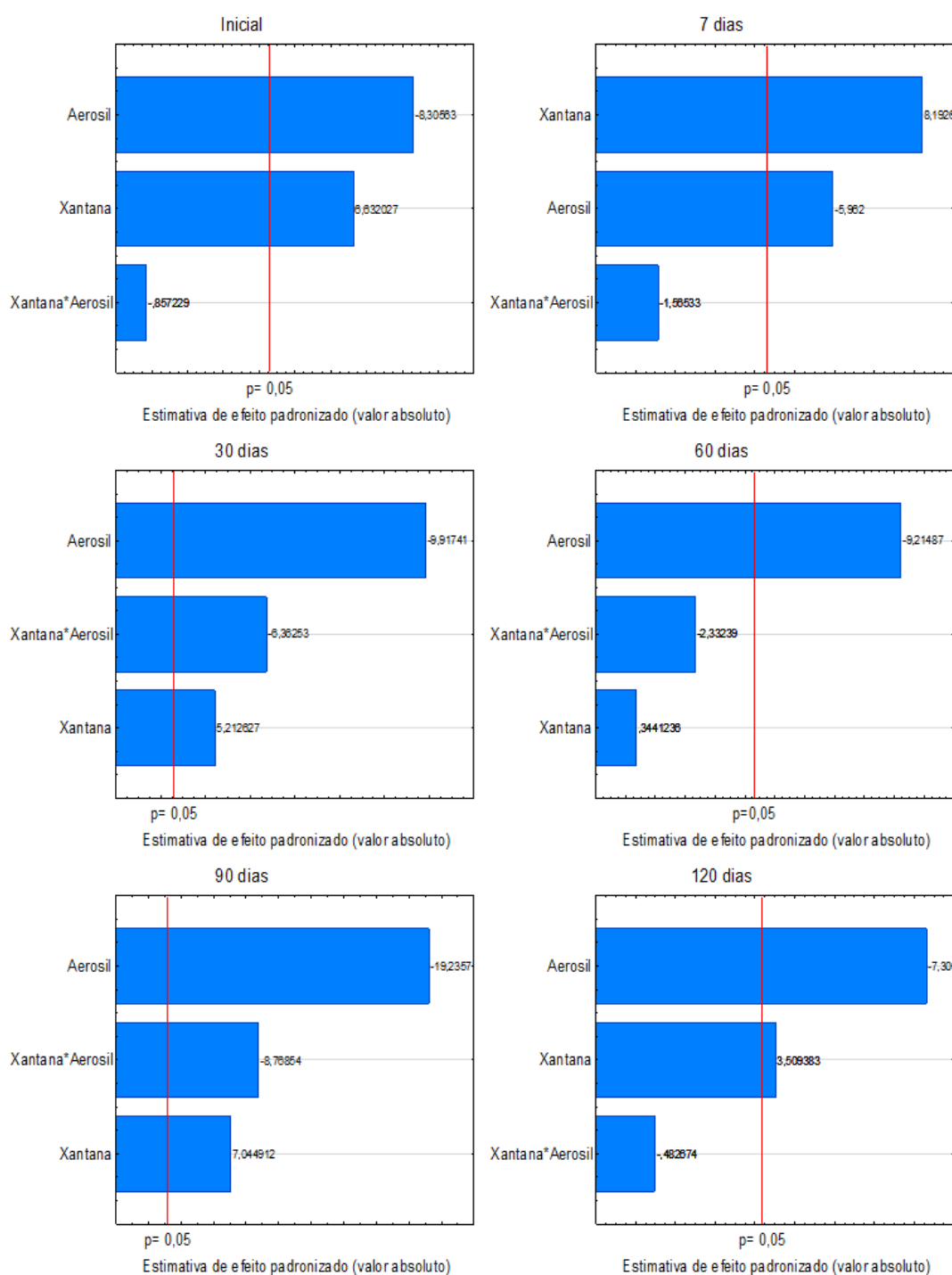


Figura 5 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura de congelamento (-20°C), no período de até 120 dias.

Para as microcápsulas armazenadas sob temperatura de congelamento, tanto no período inicial como aos 7 dias de armazenamento, as concentrações de xantana e Aerosil® resultaram em efeitos isolados positivo e negativo, respectivamente. A exceção do início do acompanhamento e dos 60 dias de armazenamento congelado,

nos demais períodos avaliados houve efeito negativo da interação entre xantana e Aerosil® sobre a viabilidade dos microrganismos, com maior influência do Aerosil® a partir dos 30 dias.

Na Figura 6 está o efeito das variáveis independentes xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos no período de até 120 dias de armazenamento, sob temperatura de refrigeração.

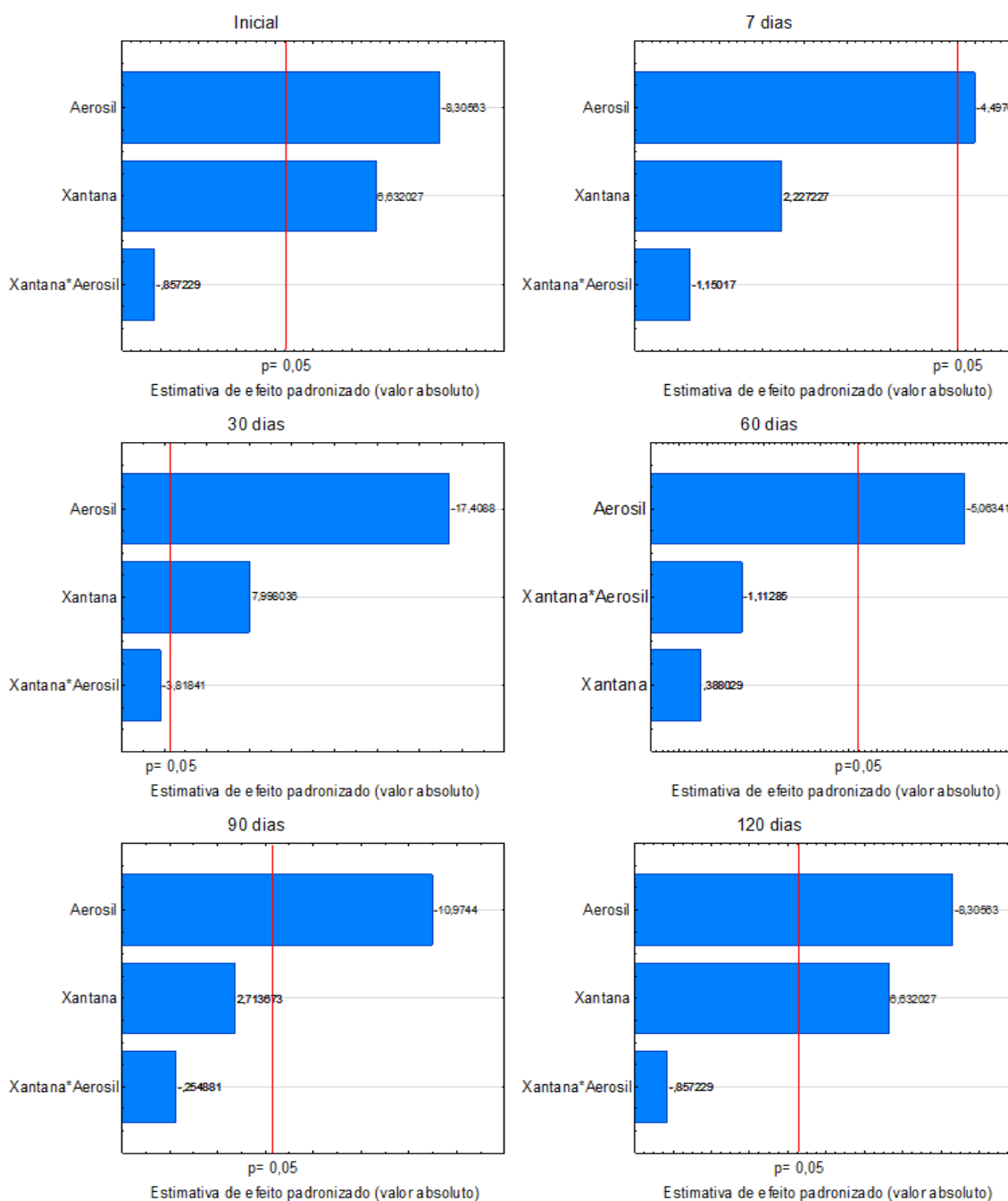


Figura 6 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura de refrigeração (7 °C), no período de até 120 dias.

Para as microcápsulas armazenadas sob temperatura de refrigeração, no período inicial, as concentrações de xantana e Aerosil® resultaram em efeitos isolados positivo e negativo, respectivamente. Aos 7 dias de armazenamento, apenas o Aerosil® individualmente apresentou efeito significativo, sendo este negativo. Aos 30 dias, houve um efeito significativo e negativo para Aerosil® individualmente e positivo para xantana individualmente. Aos 60 e 90 dias de armazenamento, apenas o Aerosil® apresentou efeito significativo e negativo. No período de 120 dias, a variável independente Aerosil® obteve efeito negativo individualmente, enquanto que a xantana teve individualmente efeito positivo.

O Aerosil® é o fator com maior influência sobre a viabilidade dos microrganismos microencapsulados armazenados sob refrigeração por 120 dias, sendo que o aumento da concentração de Aerosil® na solução encapsulante ocasiona redução na viabilidade. A xantana teve efeito menor sobre essa resposta e somente no início, aos 30 dias e ao final do período avaliado.

Na Figura 7 é mostrado o efeito das variáveis independentes xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos no período de até 120 dias de armazenamento, sob temperatura ambiente.

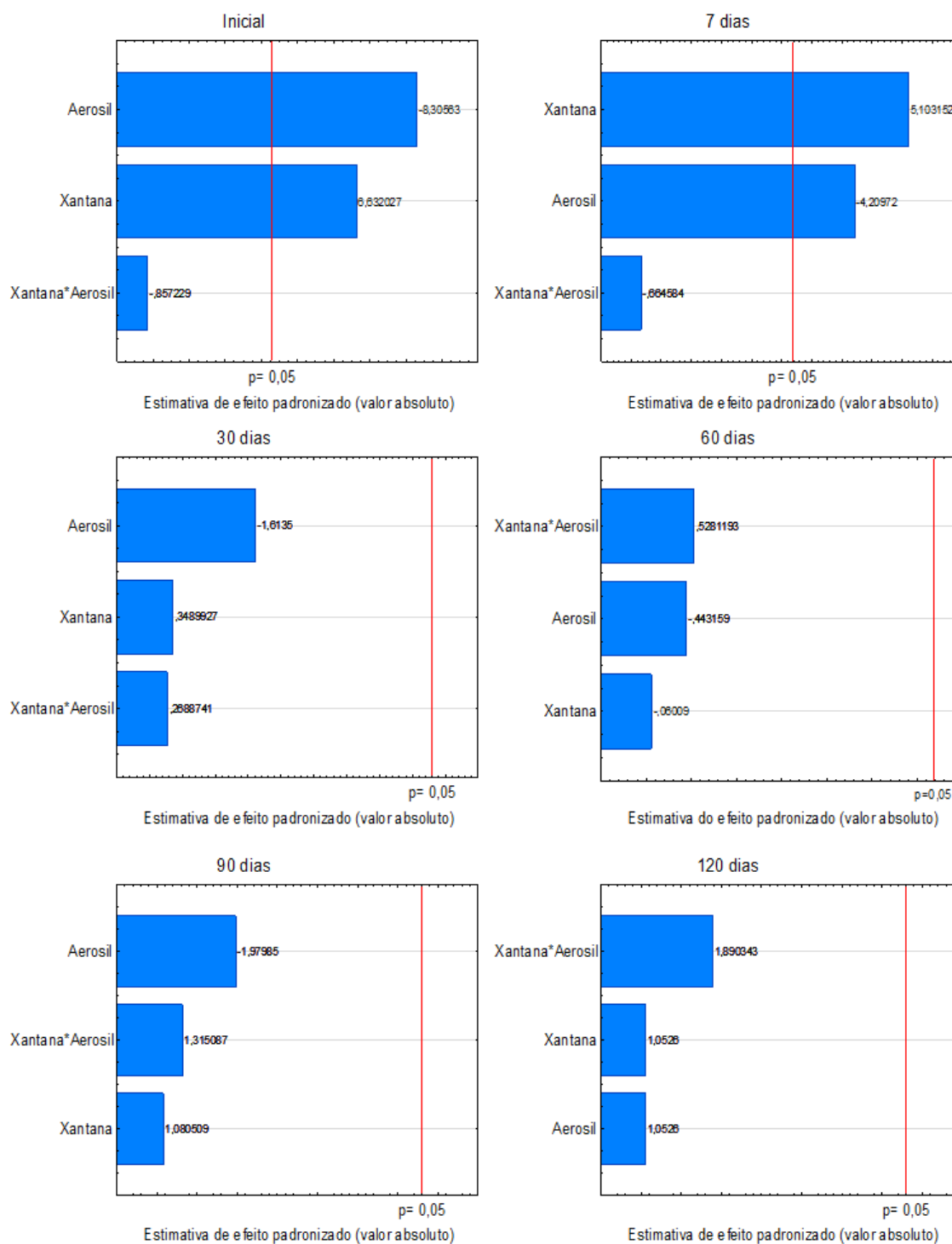


Figura 7 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana (%) e Aerosil® (%) sobre a variável viabilidade dos microrganismos armazenados sob temperatura ambiente ($\pm 25^{\circ}\text{C}$), no período de até 120 dias.

Para as microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente, no período inicial e aos 7 dias de armazenamento, as concentrações de xantana e Aerosil® resultaram em efeitos isolados positivo e negativo, respectivamente. A partir de 30 até

os 120 dias de armazenamento a temperatura ambiente, as variáveis independentes xantana e Aerosil® não influenciaram na viabilidade dos microrganismos.

O resultado indica que a variação da concentração do agente encapsulante, na faixa estudada, não gera efeito na proteção dos microrganismos armazenados sob temperatura ambiente. A maior redução de microrganismos é relacionada à temperatura de armazenamento, como visualizado na Figura 4, onde a contagem de células reduz muito no armazenamento a essa temperatura. Assim, apesar da boa contagem, ocorre uma queda na viabilidade, independente do tratamento utilizado para a microencapsulação.

Fioravante (2019) avaliou o efeito das variáveis independentes xantana Pruni de baixa viscosidade (%) e Aerosil® (%), ambas na faixa de concentração de 0,19 a 2,31% sobre a viabilidade de *L. acidophilus* encapsulado em até 120 dias de armazenamento, sob temperatura ambiente, refrigeração e congelamento. Para os microrganismos encapsulados armazenados sob congelamento, aos 15, aos 45 e aos 60 dias, as variáveis concentração de xantana Pruni e Aerosil® exerceram efeito positivo, isoladamente, aos 120 dias exerceram efeito negativo em interação, e, nos demais períodos avaliados (7, 30 e 90 dias), não se verificou efeito para ambas. Nas microcápsulas armazenadas sob refrigeração foi verificado efeito negativo da interação entre concentrações de xantana e de Aerosil® aos 7 e aos 60 dias de armazenamento, sem efeito nos demais períodos (15, 30, 45, 90 e 120 dias). A temperatura ambiente, em nenhum dos tempos de armazenamento avaliados, houve efeito das variáveis independentes sobre as microcápsulas armazenadas.

5.4 Conclusão

A eficiência do processo de microencapsulação em *spray dryer* do probiótico *L. rhamnosus* GG com xantana Pruni de baixa viscosidade pode ser considerada extremamente satisfatória em todos os tratamentos avaliados. A interação entre xantana e Aerosil® apresenta efeito positivo na eficiência, sendo o maior efeito da xantana Pruni BV. Contudo, diminui o rendimento do produto obtido, uma vez que, para essa variável há efeito da interação das variáveis independentes, com maior efeito negativo da xantana. Todos os tratamentos são capazes de manter a viabilidade do probiótico durante o período analisado (120 dias), com menor proteção na

temperatura ambiente, sendo recomendado o armazenamento até o período de 60 dias para o T1. Sob temperatura de congelamento e de refrigeração a concentração aos 120 dias de armazenamento é elevada, encontrando-se na faixa de 8 log UFC g⁻¹. Para as microcápsulas armazenadas sob congelamento, ocorre efeito da interação a partir de 30 dias, com maior efeito negativo do Aerosil® sobre a viabilidade dos microrganismos microencapsulados. Sob a temperatura de refrigeração, o Aerosil® apresentou efeito negativo. Já sob a temperatura ambiente, não há efeito das variáveis sobre a viabilidade a partir de 30 dias. Os resultados obtidos demonstram que a utilização da xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante, no processo de secagem por *spray dryer* é eficiente, protegendo o probiótico *L. rhamnosus* GG frente às condições de secagem e de armazenamento.

5.5 Referências bibliográficas

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

ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M. C.; ARRUDA, P. C.; SOUSA, M. C. Determinação da higroscopicidade do cájá em pó por meio da secagem por atomização. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v.6, n.2, 2006.

AVILA-REYES, S. V.; GARCIA-SUAREZ, F. J.; JIMÉNEZ, M. T.; MARTÍN-GONZALEZ, M. F. S.; BELLO-PEREZ, L. A. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**. Vol. 102, p.423-430, 2014.

BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423-431, 2015.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. Food Powders: physical properties, processing and functionality. **Food engineering series**. New York: Kluwer, cap. 12, 2005.

BRASIL. **Resolução - RDC N° 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 05 mai. 2021.

CAPURSO, L. Thirty Years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: A Review. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 53, 2019.

CARMO, E. L.; FERNADES, R. V. B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por *spray drying*, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Revista de Engenharia Química e Química**, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

CARVALHO, K. Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 com dextrina de mandioca agente encapsulante e aplicação na formulação de preparado sólido para refresco. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos, Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

CORCORAN, B. M.; ROOS, F. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024–1039, 2004.

DIANAWATI, D.; LIM, S. F.; OOI, Y. B. H.; SHAH, N. P. Effect of Type of Protein-Based Microcapsules and Storage at Various Ambient Temperatures on the Survival and

Heat Tolerance of Spray Dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, v. 82, n. 9, p. 2134-2141, 2017.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. *Lactobacillus* GG: bacteriology and clinical applications. Gastroenterol. **Medical Clinics of North America**, Maryland Heights, v.34, p. 483-498, 2005.

ECKERT, C. Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrintestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia). Programa de pós-graduação stricto sensu. Centro Universitário UNIVATES, Lajeado, 2016.

FIORAVANTE, J. B. Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preservado em microcápsula de xantana e sílica pirogênica. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos -Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

GOMES, A. M. P.; MALCATA F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**. V. 64, p. 12-22, 1999.

HERNÁNDEZ-LOPEZ, Z.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; CADENA-RAMÍREZ, A.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; GORDILLO-MARTÍNEZ, A. J.; FALFÁN-CORTÉS, N. Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. **LWT - Food Science and Technology**. Vol. 95, p. 216-222, 2018.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. de O.; SANT'ANNA, E. S. *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**, v. 240, p. 977–984, 2015.

KAVITAKE, D.; KANDASAMY, S.; PALANISAMY, B. D.; HALADY, P. K. S. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods - A review. **Food Bioscience**, v. 21, p. 34-44, 2018.

KAUSHIK, P.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Microencapsulation of omega-3 fatty acids: A review of microencapsulation and characterization methods. **Journal of functional foods**, v. 19, p. 868-881, 2015.

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

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

LOPES, S. P. Desenvolvimento e caracterização de cápsulas probióticas contendo *Lactobacillus rhamnosus*. Dissertação (Mestrado em Química). Programa de Pós-

graduação em Química, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, 101 f., 2016.

MACIEL G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MAURY, K.; MURPHY, K.; KUMAR, S.; SHI, L.; LEE, G. Effects of process variables on the powder yield of spray-dried trehalose on a laboratory spray-dryer. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 59, p. 565–573, 2004.

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

MOREIRA, A. da S.; FIORAVANTE, J. B.; VENDRUSCOLO, C. T.; MACAGNAN, K. L. **Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana**. Ano: 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180687239, título: "Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depositante: Universidade Federal de Pelotas. Depósito: 14/09/2018. Data da publicação nacional: 24/03/2020.

NUNES, G. L.; ETCHEPARE, M. de A.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. P.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. de M.; SILVA, C. de B.; MENEZES, C. R. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 128-133, 2018.

RAY, M.; GHOSH, K.; SINGH, S.; MONDAL, K. C. Folk to functional: An explorative overview of rice-based fermented foods and beverages in India. **Journal of Ethnic Foods**, v. 3, p. 5-18, 2016.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas. 1ed. São Paulo: Varela, 669p., 2011.

SILVA, M. T. Obtenção e caracterização de antioxidantes derivados de xantana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 68 f., 2018.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. de; SILVA, C. de B.; SORIANI, H. H.; BASTOS, J. de O.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. Santa Maria/RS. **Revista Ciência Rural**, 2014.

SOHAIL, A.; TURNER, M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of Probiotics Encapsulated in Alginate Gel Microbeads Using a Novel Impinging Aerosols Method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 162-68, 2011.

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

VENDRUSCOLO, C. T.; VENRUSCOLO, J. L. S.; MOREIRA, A. da S. **Process for preparing a xanthan biopolymer**. Ano: 2006. International Application published under the patent cooperation treaty. International publication number: WO2006047845, title: "Process for preparing a xanthan biopolymer". World intellectual property organization. Applicants: Universidade Federal de Pelotas, International publication date: 11/05/2006.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. Effects of media, heat adaptation, and outlet temperature on the survival of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 after spray drying and subsequent storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 441-447, 2016.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GANZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.

6 Manuscrito 2

Avaliação de microcápsulas de xantana Pruni e viabilidade de *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG encapsulado nas condições do trato digestório *in vitro*

Izadora Almeida Perez¹, Karine Laste Macagnan², Camila Waschburger Ames¹, Alain Sourabié³, Ângela Maria Fiorentini¹, Angelita da Silveira Moreira^{1,2,4}

¹ Universidade Federal de Pelotas, Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

² Universidade Federal de Pelotas, Centro de Desenvolvimento Tecnológico

³ Empresa Procelys by Lesaffre - Maisons-Alfort, França

⁴ Universidade Federal de Pelotas, Centro de Ciências Químicas, Farmacêuticas e de Alimentos

RESUMO - Probióticos são capazes de exercer diversos benefícios à saúde, quando consumidos em concentrações adequadas. Entretanto, a sobrevivência desses microrganismos é marcadamente reduzida sob condições de digestão humana, a qual possui pH gástrico e elevadas concentrações de sais biliares presentes no intestino, além da ação de enzimas digestivas. Assim, é importante o estudo de processos que mantenham a viabilidade dos probióticos frente a essas condições, bem como ao processamento e armazenamento dos produtos em que forem aplicados. A microencapsulação por *spray dryer* tem se revelado bastante eficiente, mas só é adequada ao uso de agentes encapsulantes de baixa viscosidade. O uso de xantana Pruni de baixa viscosidade (BV) como agente encapsulante pode ser uma solução, tendo em vista que a elevada viscosidade da xantana comercial prejudica o processo de secagem por *spray dryer*. Objetivou-se microencapsular o probiótico *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG em *spray dryer*, utilizando xantana Pruni BV como agente encapsulante, e Aerosil® como antiagregante e realizar a caracterização funcional e tecnológica das microcápsulas. Para o preparo da solução encapsulante utilizou-se diferentes concentrações de xantana Pruni BV (0,75 a 1,75%) e do antiagregante Aerosil® (0,45 a 1,15%), estabelecidas segundo delineamento fatorial completo tipo 2², em dois níveis (-1, +1) e com três pontos centrais. Elaborou-se as microcápsulas em *spray dryer* utilizando as seguintes condições de secagem: temperatura de entrada de ar de 110 ± 2 °C e temperatura de saída de ar 65 ± 5 °C, vazão de alimentação de 0,4 L h⁻¹, pressão do ar de secagem de 2 - 4 kgf cm⁻² e a vazão de ar comprimido de 40 kgf cm⁻². Realizou-se análises de cor, umidade, microscopia eletrônica de varredura (MEV) e da sobrevivência comparada dos microrganismos livres e encapsulados sob condições de digestão simulada. Não houve escurecimento não enzimático das microcápsulas durante o processo de secagem, obtendo-se cápsulas claras, com luminosidades acima de 93,15 em todos os tratamentos. A umidade variou de 4,84 a 6,09%, sendo que xantana e Aerosil® individualmente tiveram efeito significativo, positivo e negativo, respectivamente. As microcápsulas apresentaram formato esférico, com presença de concavidades; o tamanho de partícula variou de 2,95 a 25,31 µm. Os probióticos microencapsulados resistiram às condições simuladas de digestão e com isso tiveram uma maior viabilidade na simulação da fase entérica, com concentração de 8,97 log UFC g⁻¹, enquanto as células livres apresentaram viabilidade de 6,85 log UFC mL⁻¹. Os resultados obtidos indicam que a xantana Pruni BV possui elevado potencial para utilização como agente encapsulante, protegendo eficazmente o microrganismo.

Palavras-chave: Probióticos. Microencapsulação. Cor. Umidade. Trato gastrointestinal.

6.1 Introdução

Os probióticos são microrganismos vivos que, quando ingeridos em quantidades adequadas, geram diversos benefícios à saúde do hospedeiro. Para que os benefícios ocorram, é necessário que a concentração de células viáveis seja adequada desde o processo de fabricação do produto, armazenamento e consumo, devendo ainda, sobreviver ao trato digestório (BRASIL, 2018).

O gênero *Lactobacillus* é um dos mais estudados dentre os probióticos, incluindo cepas com elevada importância na indústria de alimentos. Os microrganismos possuem formato de bastonetes que medem de 0,5-1,2 x 1,0-10 µm, a maioria é imóvel, catalase e oxidase negativas, não redutores de nitrato, não são formadores de esporos, de indol ou de H₂S (BERGEY; HOLT, 1994; KONEMAN et al., 2005). Recentemente ocorreu alteração na taxonomia de *Lactobacillus*, com a reclassificação foram propostos novos gêneros, incluindo *Lacticaseibacillus* (ZHENG et al., 2020).

A sobrevivência dos probióticos pode ser reduzida sob as condições de digestão humana, devido ao pH gástrico e as elevadas concentrações de sais biliares presentes no intestino, além da ação de enzimas digestivas. Tendo em vista que essa barreira é um dos principais obstáculos para a sobrevivência desses microrganismos, é de suma importância, do ponto de vista nutricional e tecnológico, o estudo de técnicas que propiciem sua resistência e proteção frente às condições adversas (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008; KAILASAPATHY, 2009; SABIKHI et al., 2010).

Diante disso, para proporcionar um aumento da viabilidade do probiótico, destaca-se a utilização de tecnologias de microencapsulação. A microencapsulação por *spray dryer* é um método promissor para a proteção dos probióticos. Consiste na dispersão das células em uma solução polimérica, a qual é atomizada na câmara de secagem (RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015; SILVA et al., 2014). Nessa técnica é necessário que o agente encapsulante seja escolhido de maneira adequada, devendo formar uma película coesa e possuir compatibilidade química e física com o material ativo (VENKATESAN et al., 2009).

A xantana é um polissacarídeo sintetizado por bactérias fitopatogênicas do gênero *Xanthomonas*. Sua estrutura química é formada por uma cadeia principal de unidades de β-D-glicose ligadas através de ligação glicosídica 1-4, as ramificações são formadas por β-D-manose - 1,4-β-D-ácido glicurônico - 1,2-α-D-manose. As

ligações do tipo β da cadeia principal tornam a xantana bastante resistente à hidrólise enzimática e química. Além disso, é um polímero aniônico, por possuir substituintes pirúvicos e acéticos em sua estrutura (GARCÍA-OCHOA et al., 2000). De acordo com Vendruscolo et al. (2013), a xantana possui capacidade de formar soluções viscosas, mesmo quando em baixas concentrações, além de possuir estabilidade a uma ampla faixa de pH e temperatura. Apesar de serem excelentes agentes encapsulantes, devido à elevada viscosidade das xantanas comerciais, elas não são adequadas para a utilização como agente encapsulante único ou adicionado em elevadas concentrações em métodos que utilizam secagem por *spray dryer*; pois dificultam o processo por causarem entupimento, e reduzem o rendimento devido às adesões no equipamento.

A xantana Pruni é produzida por *Xanthomonas arboricola* pv pruni, e possui diferenças na estrutura química e nas propriedades reológicas (MOREIRA et al. 2001). Foi descoberta em 1995, pelo Grupo de Pesquisa em Biopolímeros Intra e Extracelulares da Universidade Federal de Pelotas. Pode ter sua viscosidade modulada em função da cepa microbiana ou dos demais parâmetros do processo fermentativo. Assim, Moreira et al. (2018) utilizaram xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante de probiótico, em processo de secagem por *spray dryer* e obtiveram excelentes resultados.

O objetivo do presente estudo foi encapsular o probiótico *Lactobacillus rhamnosus* GG por *spray dryer*, utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante, e avaliar os parâmetros tecnológicos cor e umidade e a morfologia das microcápsulas, bem como o parâmetro funcional sobrevivência das microcápsulas, comparada a dos microrganismos livres, sob condições de digestão simulada.

6.2 Material e métodos

6.2.1 Inóculo

Utilizou-se o microrganismo probiótico *L. rhamnosus* GG ATCC 53103, produzido pela Vivera® e doado pela Procelys by Lasaffre – Maisons-Alfort, França. Armazenou-se a cultura liofilizada sob congelamento. Para reativá-la, reidratou-se em caldo MRS (De Man, Rogosa e Sharp) (Kasvi®) por 20 min e, posteriormente, realizou-

se a semeadura em placas de Petri, contendo ágar MRS, incubou-se as placas sob a temperatura de 37 °C durante 72 h, sob condição de anaerobiose.

Realizou-se o preparo de 20 placas de repiques multiplicativos contendo *L. rhamnosus* e incubou-se na temperatura de 37 °C durante 72 h, sob condição de anaerobiose. Ressuspendeu-se as células contidas nas placas de Petri em 5 Erlenmeyers de 500 mL, cada um contendo 200 mL de caldo MRS, incubou-se em agitador orbital (*Shaker*) sob as condições de 150 rpm e 37 °C durante 22 h. A concentração dos inóculos preparados variou de $8,68 \pm 0,10$ a $9,75 \pm 0,03$ log UFC mL⁻¹.

6.2.2 Microcápsulas

A xantana utilizada na solução encapsulante foi a produzida pela cepa 101 de *Xanthomonas arboricola* pv Pruni, utilizando-se condições operacionais descritas no pedido de patente WO/2006047845 (UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS, 2006) para obtenção de xantana de baixa viscosidade, com modificação nos componentes e suas concentrações no meio de produção de inóculo utilizando 2,5 g L⁻¹ de extrato de levedura e 2,5 g L⁻¹ de peptona.

Definiu-se as concentrações dos componentes das soluções encapsulantes (xantana Pruni BV e Aerosil®) através da utilização de delineamento fatorial completo tipo 2² em dois níveis (-1, +1), adicionado de três repetições no ponto central, para avaliar os efeitos das concentrações de xantana Pruni BV (0,75 a 1,75%) e de Aerosil® (0,45 a 1,15%), totalizando 7 tratamentos (Tabela 1). Esterelizou-se as soluções em autoclave, sob a temperatura de 121 °C, durante 15 minutos.

Tabela 1 - Matriz do delineamento fatorial completo 2^2 , com 3 pontos centrais (C) para definição dos tratamentos (formulações) para a elaboração das microcápsulas de *L. rhamnosus* GG em *spray dryer*, utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade (X) como agente encapsulante e Aerosil® (A) como antiagregante.

Tratamento	Níveis codificados		Níveis reais (%)	
	X	A	X	A
1	-1	-1	0,75	0,45
2	+1	-1	1,75	0,45
3	-1	+1	0,75	1,15
4	+1	+1	1,75	1,15
5 (C)	0	0	1,25	0,80
6 (C)	0	0	1,25	0,80
7 (C)	0	0	1,25	0,80

X: xantana Pruni BV A: Aerosil®

Para a elaboração das microcápsulas, centrifugou-se o inóculo em 10.000 *g* durante 5 min a 4 °C para separação das células. Após, descartou-se o sobrenadante e ressuspendeu-se as células do probiótico no mesmo volume de solução encapsulante, formando a solução de trabalho.

Realizou-se a secagem em *spray dryer* (Lab Maq®, modelo MSDi 1.0, Brasil), nas seguintes condições: temperatura de entrada de ar de 110 ± 2 °C e temperatura de saída de ar 65 ± 5 °C. Introduziu-se a solução de trabalho na câmara de secagem com vazão de alimentação de 0,4 L h⁻¹, pressão do ar de secagem de 2 - 4 kgf cm⁻² e a vazão de ar comprimido de 40 kgf cm⁻².

Armazenou-se as microcápsulas probióticas em frascos hermeticamente fechados até a realização das análises.

6.2.3 Cor

Realizou-se a análise de cor em espectrofotômetro portátil (X-Rite® 962, EUA), com sistema de leitura CIEL*a*b* proposto pela Comissão Internationale de l'Eclairage, em que L* representa a luminosidade (L*=0-preto e L*=100-branco) e a* e

b* expressam a cromaticidade (+a*=vermelho e -a*=verde; +b*=amarelo e -b*=azul). A análise foi realizada em triplicata. Com esses parâmetros, avaliou-se as coordenadas cilíndricas cromaticidade (croma), pureza ou intensidade da cor (equação 1), e o ângulo Hue (H°) - cor propriamente dita (equação 2).

Equação 1: $Croma = \sqrt{(a^*^2 + b^*^2)}$

Equação 2: $Hue = \arctan (b^*/a^*)$

6.2.4 Umidade

Determinou-se o teor de umidade das microcápsulas por gravimetria, de acordo com a metodologia da AOAC nº 968.11 (2000). Primeiramente, pesou-se as amostras em cápsulas de alumínio pré-pesadas. Colocou-se em estufa a 105 °C por 4 h, posteriormente as cápsulas com as amostras foram dispostas em dessecador, até atingirem a temperatura ambiente, e após pesou-se novamente. As operações de aquecimento e resfriamento foram repetidas (por cerca de 1 h) até a diferença de peso ser inferior a 0,5 mg g⁻¹ de amostra. A análise foi realizada em triplicata.

6.2.5 Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

Selecionou-se as microcápsulas obtidas por dois tratamentos representativos e as matérias primas-primas para serem analisadas por essa técnica de microscopia. Assim, observou-se a morfologia das microcápsulas dos tratamentos T2 (maior teor de xantana) e T3 (maior teor de Aerosil®), bem como da xantana e do Aerosil® puros, em um microscópio eletrônico de varredura (Jeol®, modelo JSM - 6610LV, Japão) a uma tensão de 15 kV. Avaliou-se as microcápsulas do T2 quanto ao tamanho médio de partícula medindo-se o diâmetro de 50 partículas utilizando o software ImageJ® (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2004).

6.2.6 Sobrevivência do probiótico livre e encapsulado sob as condições de digestão simulada

A análise de sobrevivência do probiótico encapsulado, sob as condições de digestão simulada foi realizada com o T2, tratamento que ofereceu a segunda maior

eficiência no encapsulamento e um dos melhores rendimentos. A metodologia utilizada foi de acordo com Castelli (2011), modificada por Fioravante (2019) quanto aos períodos de coleta. Para avaliar a resistência do probiótico encapsulado e livre às condições de digestão simulada, incubou-se 1 g de amostra para simular a peristalse; as condições foram 37 °C a 150 rpm. Simulou-se a fase gástrica em Erlenmeyer de 125 mL contendo 9 mL de solução (6,2 g L⁻¹ de NaCl, 2,2 g L⁻¹ de KCl, 0,22 g L⁻¹ de CaCl₂ e 1,2 g L⁻¹ de NaHCO₃) acidificada a pH 2 com HCl 0,1 M e suplementada com 1 mg mL⁻¹ de pepsina. Retirou-se alíquotas dessa solução após 0,5, 1 e 2 h para determinar os microrganismos viáveis através de diluições decimais seriadas seguidas de semeadura em ágar MRS. Para avaliar a resistência às condições simuladas na fase entérica, na mesma solução, de forma subsequente, suplementou-se com 1 mg mL⁻¹ de pancreatina e 0,2% de sais biliares e ajustou-se o pH em 8 com NaOH 0,1 M; retirou-se alíquotas dessa solução após 3, 4, 5 e 6 h para determinar os microrganismos presentes através de diluições seriadas seguidas de plaqueamento. A análise foi realizada em triplicata.

6.2.7 Análise estatística

Analizou-se os efeitos das variáveis independentes concentração de xantana Pruni BV e Aerosil® em relação à cor e umidade pelo teste ANOVA usando o programa *Statistica 7.0*® para *Windows*. O valor de $p \leq 0,05$ foi considerado significativo. A análise de variância (ANOVA) foi utilizada para verificar a influência de cada parâmetro investigado na função resposta. O teste-t e o P-valor foram empregados para avaliar a significância dos parâmetros. P-valor $\leq 0,05$ expressa efeito significativo no intervalo de confiança de 95%. Os efeitos estimados padronizados que cada variável exerce na resposta avaliada foram descritos através de gráfico de Pareto.

Avaliou-se as médias dos resultados da análise do trato gastrointestinal simulado e analisou-se estatisticamente pelo teste de *Tukey* $p \leq 0,05$ no programa *Statistix 9*® para *Windows*. Gerou-se o gráfico pelo programa *GraphPad Prism 9*. Além disso, analisou-se os efeitos das variáveis independentes (xantana e Aerosil®) em relação à cor e umidade pelo teste ANOVA usando o programa *Statistica 7.0*, $p < 0,05$ foi considerado significativo.

6.3 Resultados e discussão

6.3.1 Análise de cor

Os resultados referentes à análise das coordenadas de cor (parâmetros L* a* b*) das microcápsulas são mostrados na Tabela 2.

Tabela 2 - Parâmetros colorimétricos no sistema CIEL*a*b* das microcápsulas probióticas nos tratamentos variando a concentração de xantana Pruni BV e Aerosil®.

Tratamento	L*	a*	b*	°Hue	Croma
1	93,67±0,06	0,37±0,01	8,59±0,01	87,53±0,06	8,60±0,01
2	95,69±0,01	0,063±0,02	8,87±0,01	89,59±0,14	8,87±0,01
3	93,15±0,02	0,39±0,01	8,15±0,02	87,26±0,11	8,16±0,02
4	94,38±0,03	0,33±0,01	7,96±0,01	87,60±0,09	7,97±0,01
5	94,68±0,03	0,44±0,02	8,81±0,09	87,14±0,08	8,39±0,004
6	94,71±0,01	0,42±0,01	8,11±0,01	87,04±0,09	8,33±0,03
7	94,75±0,02	0,43±0,02	8,32±0,03	87,04±0,14	8,11±0,01
Aerosil®	91,87±0,02	1,07±0,00	-4,84±0,01	347,53±0,01	24,57±0,01
Xantana	90,21±0,02	-0,08±0,01	13,96±0,00	90,33±0,01	13,96±0,01
Pruni BV					

L*: luminosidade; a* e b*: cromaticidade
Média de 3 repetições ± desvio padrão.

Os valores de a* e b* verificados para todos os tratamentos são positivos e estão abaixo de 10, indicando tons de bege, com nuances avermelhadas, segundo o gráfico de cores do sistema CIEL*a*b* para comunicação e expressão de cor.

Pode-se observar cores claras (L*), com cromaticidade predominante do amarelo (b*) em relação ao vermelho (a*) para todos os tratamentos. Embora o Aerosil® tenha cromaticidade tendendo ao azul (-b*) e ligeiramente ao vermelho (a*), o mesmo não interferiu na cromaticidade das cápsulas, cuja predominância de amarelo deve-se, provavelmente, à xantana, para a qual os valores de b* são maiores, ou seja, predomina a cromaticidade amarela. Os valores obtidos para °Hue correspondem à amarelo claro, de baixa intensidade tendo em vista os baixos valores de croma.

Os resultados de L* (luminosidade) foram bastante elevados, variando de 93,15 a 95,69. O Aerosil® e a xantana tiveram resultados de 91,87 e 90,21, respectivamente. Os valores L* próximos a 100 indicam cores claras, o que é algo desejável para as microcápsulas, para que as mesmas não interfiram nas características colorimétricas de um produto alimentício onde venham a ser adicionadas.

Fioravante (2019) avaliou a cor de cápsulas de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com xantana Pruni e Aerosil® em *spray dryer* e obteve valores de L* que variaram de 95,01 a 96,75. Segundo a autora, valores elevados de luminosidade indicam a ausência de escurecimento não enzimático durante a produção das microcápsulas.

Castro-Cislagh (2012) microencapsulou *Bifidobacterium* Bb-12 em *spray dryer*, utilizando uma temperatura de entrada de 150 °C e uma temperatura de saída de 50-60 °C, utilizando soro de leite como agente encapsulante. O valor obtido para luminosidade foi de 85,96, inferior aos obtidos neste estudo, já os parâmetros a* e b* foram de 0,95 e 11,42, respectivamente, ambos superiores aos do presente estudo. As microcápsulas apresentaram altos valores de a* e b*, indicando predominância das cores vermelha e amarela, respectivamente. Segundo os autores, isso pode ser devido à reação de Maillard entre açúcares redutores e proteínas, que pode ter ocorrido durante a microencapsulação por *spray dryer*, sendo típica no material encapsulante utilizado e indesejável para a aparência do produto.

De acordo com Aryana e McGrew (2007), a cor do produto é influenciada pelos componentes utilizados. No caso das microcápsulas, existe a tendência de que o tipo e a concentração dos agentes encapsulantes utilizados influenciem nos parâmetros de cor. Na Figura 1 pode-se observar o efeito das variáveis independentes xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a variável resposta cor.

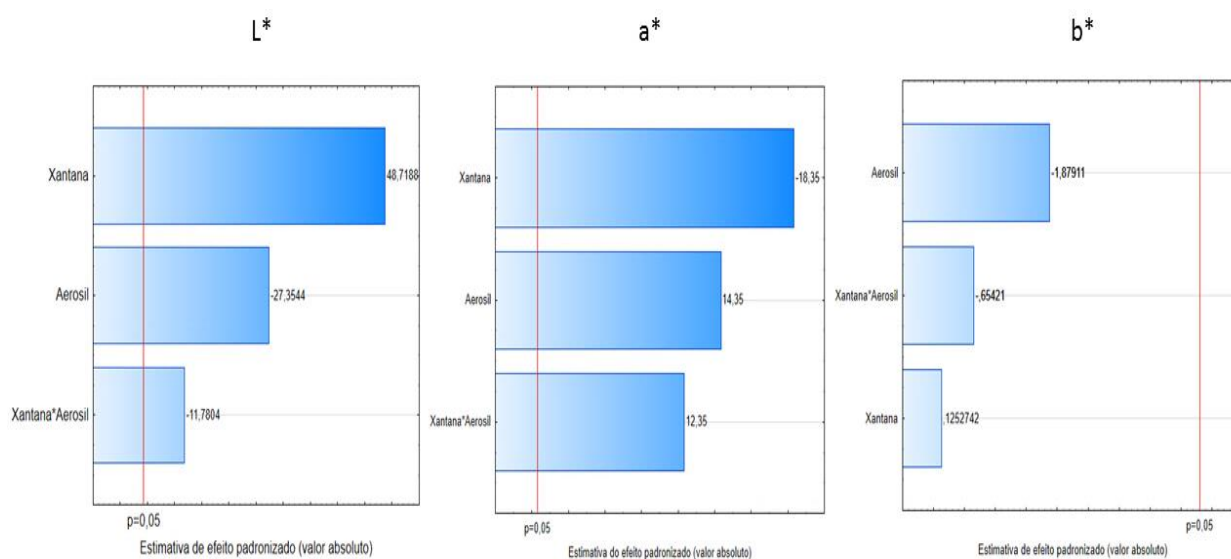


Figura 1 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a cor (L*, a*, b*) das microcápsulas.

Na Figura 1 verifica-se efeito negativo significativo ($p \leq 0,05$) da interação entre xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) na luminosidade, e positivo na coordenada a* das microcápsulas, com maior influência da xantana em ambos os casos. Os resultados indicam que na combinação das variáveis, o efeito da xantana na luminosidade das cápsulas é maior quando a concentração de Aerosil® é fixada no mínimo valor da faixa estudada, resultando em maior luminosidade, relacionado a cores mais claras.

O parâmetro a* teve efeito da interação das variáveis e o fator preponderante foi concentração xantana. O efeito da xantana é menor sobre a* quando Aerosil® é usado em maior quantidade. O efeito da xantana explica que quanto mais xantana, menor o a*, ou seja, menos vermelho. Entretanto, a cromaticidade vermelha não é predominante nas cápsulas (Tabela 2).

O agente encapsulante e o antiagregante não tiveram efeito sobre a coordenada de cromaticidade b* das microcápsulas de probiótico *L. rhamnosus* GG.

6.3.2 Análise de umidade

Os resultados referentes à umidade (%) das microcápsulas, em cada tratamento, estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 - Resultados de umidade (%) das microcápsulas nos diferentes tratamentos, variando a concentração de xantana Pruni BV e Aerosil®.

Tratamentos	Umidade (%)
T1	4,91±0,02
T2	6,09±0,03
T3	4,84±0,04
T4	5,74±0,04
T5	5,34±0,09
T6	5,32±0,12
T7	5,25±0,07

Média de 3 repetições ± desvio padrão.

A umidade das microcápsulas variou de 4,84 a 6,09%. Essa é uma análise de extrema importância, tendo em vista que é um parâmetro que tem influência em relação à estabilidade das microcápsulas durante o período de armazenamento. De acordo com Riveros (2009), o ideal é que as microcápsulas apresentem umidade inferior a 10%, assim, os resultados encontrados no presente estudo são adequados.

Além da composição da solução encapsulante, os parâmetros operacionais utilizados no *spray dryer* durante a secagem, principalmente a temperatura de entrada e de saída do equipamento, influenciam diretamente no teor de umidade do pó (AVILA-REYES et al., 2014). Hernández-Lopez et al. (2018) microencapsularam o microrganismo probiótico *Lactobacillus pentosus* em *spray dryer*, variando a temperatura de entrada de 92 a 148 °C e utilizando uma mistura de amido e *pulque* (bebida alcoólica mexicana) como agente encapsulante, e a concentração de sólidos totais na solução entre 24 e 31%. De acordo com os autores, o teor de umidade foi reduzido com o aumento da temperatura de secagem, variando de 2,0% com a utilização de 140 °C a 3,7% com a temperatura de 92 °C. Além disso, a concentração de 25% de sólidos totais na solução encapsulante resultou no menor teor de umidade.

Entretanto, é importante salientar que a sobrevivência do microrganismo encapsulado após a secagem por *spray dryer* está diretamente relacionada às temperaturas de entrada e saída do equipamento, sendo que temperaturas mais baixas, apesar de resultarem em um maior teor de umidade, aumentam a viabilidade do microrganismo (GARDINER et al., 2000).

Ilha et al. (2015) microencapsularam *Lactocaseibacillus paracasei* com leite desnatado reconstituído e soro de queijo, em *spray dryer*, utilizando temperatura de entrada de 160 °C e temperatura de saída de 55-60 °C. O teor de umidade obtido variou de 4,30 a 4,77 % o que, segundo os autores, pode ser explicado pelo fato da temperatura de saída ter sido utilizada na faixa de 55 a 60 °C, sendo esta uma temperatura relativamente baixa, em comparação a outros estudos. De acordo com Riveros (2009), é desejável que as condições de operação do *spray dryer* sejam definidas, de modo a atingir temperaturas de saída próximas a 60 °C, afim de garantir viabilidade dos microrganismos e a obtenção de um produto com menos de 10% de umidade.

Além das condições do equipamento, as características hidrofílicas e a concentração do material encapsulante influenciam o teor de umidade final dos encapsulados (AVILA-REYES et al., 2014). Na Figura 2 pode-se observar os efeitos das variáveis xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a umidade das microcápsulas.

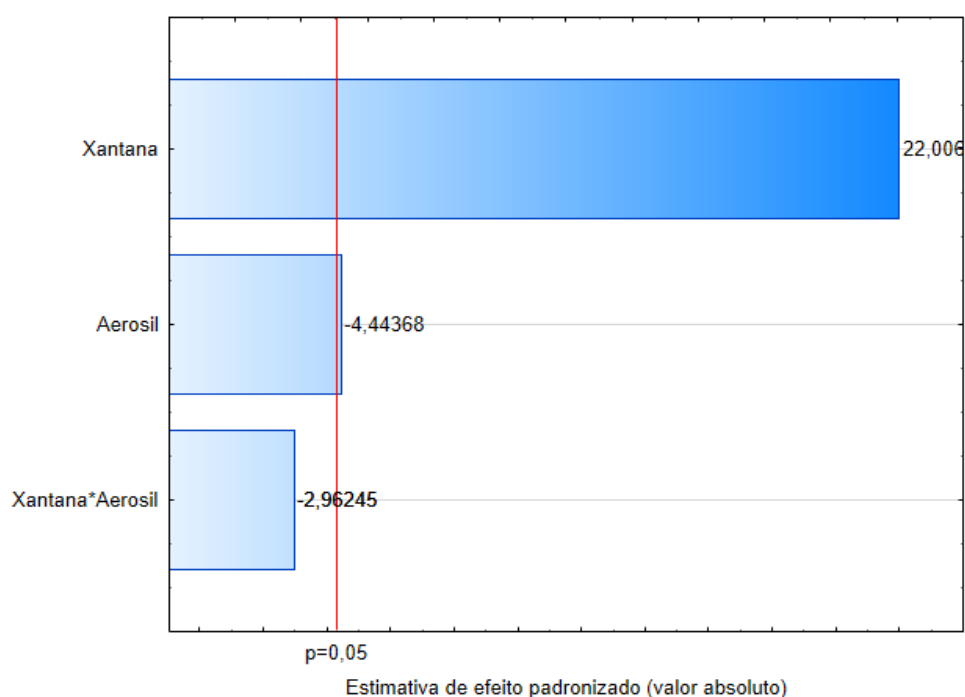


Figura 2 - Efeito dos parâmetros de encapsulação xantana Pruni BV (%) e Aerosil® (%) sobre a umidade (%) das microcápsulas.

As variáveis independentes xantana e Aerosil®, individualmente, apresentaram efeito significativo ($p \leq 0,05$) positivo e negativo, respectivamente. Esse resultado indica que o aumento da concentração de xantana e redução na concentração de Aerosil® na solução encapsulante, dentro da faixa estudada, induzem à maior umidade na cápsula. Assim, a utilização de concentrações mais elevadas do antiagregante Aerosil® reduz a umidade devido a sua ação dessecante que reduz a absorção de água pelo encapsulado. O maior efeito foi da xantana, sendo o efeito do Aerosil® secundário.

As xantanas são polissacarídeos muito hidrossolúveis e higroscópicos (BERNINGER et al., 2021). Entretanto, a adição do agente dessecante Aerosil® à solução encapsulante no presente trabalho permitiu a obtenção de encapsulados com faixa de umidade menor que muitos dos encapsulados aqui mencionados. Ademais, comparativamente, xantana Pruni de baixa viscosidade proporciona encapsulados com menor umidade que xantana Pruni de alta viscosidade.

Fioravante (2019) avaliou a umidade de microcápsulas elaboradas em *spray dryer* com *L. acidophilus* utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade e Aerosil® como agente encapsulante, com concentrações de 0,19 a 2,31% para ambos os componentes. Obteve resultados que variaram de 2,0 a 6,51%; entretanto, as variáveis independentes xantana e Aerosil® não apresentaram efeito significativo sobre a umidade.

Rajam e Anandharamakrishnan (2015) microencapsularam *Lactiplantibacillus plantarum* (MTCC 5422) utilizando fruto-oligossacarídeo combinado com isolado de proteína de soro de leite ou isolado de proteína de soro de leite desnaturado. A microencapsulação foi realizada com proporções de 1:1 e 1:1,5 entre o núcleo e o material encapsulante. A relação núcleo-material encapsulante de 1:1,5 resultou em maior teor de umidade do que a proporção 1:1. Segundo os autores, o aumento da concentração de material encapsulante facilita a formação de aglomerados, o que causa redução na difusão do vapor de água do interior da partícula para a superfície. Os resultados obtidos variaram de 5,52 a 9,47%, sendo significativamente influenciado pela composição e concentração da solução encapsulante. A ausência de dessecante justifica os valores mais elevados.

Liu et al. (2018) utilizaram as condições de temperatura de entrada de 170 °C e temperatura de saída de 80 °C em *spray dryer* para microencapsular *Lactobacillus*

zeae LB1 utilizando solução encapsulante contendo alginato de sódio (AG), caseinato de sódio (NaCas) ou isolado de proteína de soja. O teor de umidade variou de 4,30 para microcápsula com caseinato de sódio a 11,84 para microcápsula com alginato de sódio. O fato das microcápsulas elaboradas com proteínas terem apresentado conteúdo de umidade significativamente mais baixo, em comparação com microcápsulas de alginato, pode ser atribuído à natureza menos hidrofílica dessas duas proteínas em comparação com o polissacarídeo. Materiais mais hidrofílicos dificultam a evaporação das moléculas de água durante secagem.

6.3.3 Análise de Microscopia eletrônica de varredura (MEV)

A análise de microscopia eletrônica de varredura foi realizada nos Tratamentos T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e T3 (0,75% de xantana e 1,15% de Aerosil®). As microcápsulas referentes ao T2, com xantana no maior nível, apresentaram formato esférico, com presença de concavidades. Já as do T3, com Aerosil® no maior nível, apresentaram-se no mesmo formato, sendo que nem todas apresentaram concavidade, como pode-se observar na Figura 3. Não foram observados nenhum tipo de fissuras ou rupturas, o que, de acordo com Ilha et al. (2015), indica que as microcápsulas se encontram com boa integridade estrutural, sugerindo uma baixa permeabilidade a gases, o que é importante para a proteção dos microrganismos. Segundo Saénz et al. (2009), a formação de concavidades na superfície das microcápsulas pode ser atribuída ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à rápida evaporação da água contida nas gotículas.

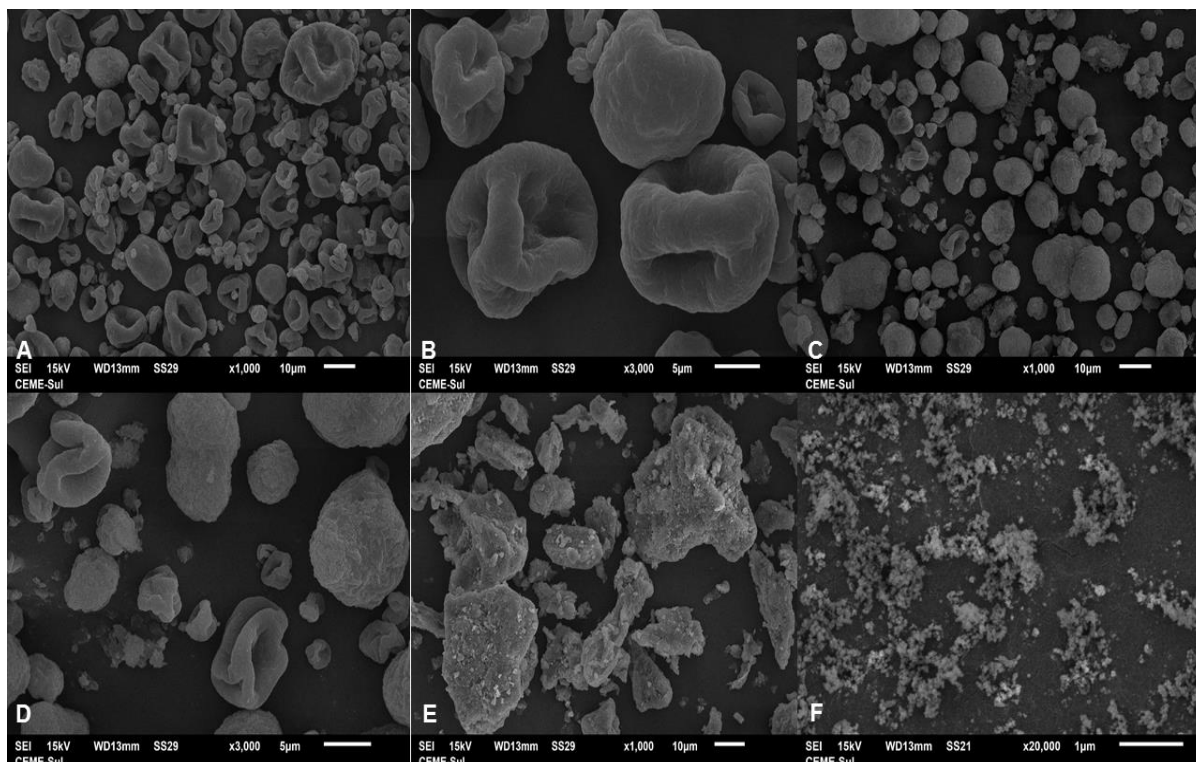


Figura 3 - Micrografias obtidas através de Microscopia Eletrônica de Varredura. A e B correspondem ao T2 com ampliação de 1000 e 3000 vezes, respectivamente; C e D correspondem ao T3 com ampliação de 1000 e 3000 vezes, respectivamente; E corresponde à xantana com ampliação de 1000 vezes; F corresponde à sílica pirogênica com ampliação de 20000 vezes.

As concavidades são típicas de produtos atomizados. Porém, dependem das temperaturas de secagem utilizadas; de maneira geral, temperaturas moderadas causam concavidades na superfície, as quais conferem às microcápsulas obtidas resistência mecânica e difusão do soluto. A extensão da presença dessas concavidades ainda depende do agente encapsulante utilizado e de sua concentração (LIAN et al., 2002; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; TRINDADE et al., 2010).

O tamanho de partícula foi avaliado apenas no T2 (1,75% de xantana e 0,45% de Aerosil®) e variou de 2,95 a 25,31 μm . De acordo com Champagne e Fustier (2007), microcápsulas de tamanho elevado podem afetar a textura dos alimentos em que foram aplicadas, o ideal é que o diâmetro seja inferior a 100 μm para a maioria das aplicações. Assim, o tamanho das microcápsulas obtidas encontra-se na faixa ideal.

Maciel et al. (2014) microencapsularam *L. acidophilus* La-5 em *spray dryer* com temperaturas de entrada e saída de 180 e 85-95 °C, respectivamente. Utilizando soluções encapsulantes contendo 30% de leite em pó desnatado ou soro de leite em

pó doce, e obtiveram medida de partícula em torno de 13,02 µm para soro de leite em pó doce e 12,86 µm para leite em pó desnatado.

Ilha et al. (2015) microencapsularam *Lactocaseibacillus paracasei* com leite desnatado reconstituído e soro de queijo, em *spray dryer*, utilizando temperatura de entrada de 160 °C e temperatura de saída de 55-60 °C. Nesse estudo, o formato das microcápsulas foi bastante semelhante ao do presente estudo, com superfície externa arredondada e de vários tamanhos, contendo concavidades ou achatamentos típicos de produtos atomizados. O tamanho das cápsulas foi de $10,96 \pm 2,81$ µm. Os autores também não observaram rupturas ou bactérias livres ao redor da cápsula.

Rajam e Anandharamakrishnan (2015) microencapsularam *Lactiplantibacillus plantarum* (MTCC 5422) utilizando fruto-oligossacarídeo combinado com isolado de proteína de soro de leite ou isolado de proteína de soro de leite desnaturado. Assim como no presente estudo, obtiveram uma elevada variação de tamanhos das microcápsulas, variando de 6,68 µm a 23,89 µm de diâmetro. As microcápsulas com uma concentração superior de agentes encapsulantes possuíram tamanho de partícula superior. De acordo com os autores, o tamanho das microcápsulas e sua distribuição são propriedades físicas importantes que afetam diretamente sua aplicação em alimentos.

Comparativamente, a xantana Pruni BV foi usada em concentração menor que os agentes encapsulantes utilizados nos estudos aqui citados. A eficiência de um encapsulante é inversamente proporcional à concentração necessária. Entretanto, devido à baixa viscosidade em relação às xantanas comerciais, de alta viscosidade, pode ser utilizada em maiores concentrações, que pode refletir em maior preservação do probiótico.

6.3.4 Análise da sobrevivência do probiótico livre e encapsulado sob as condições de digestão simulada

Na Figura 4 está sendo mostrada a concentração de microrganismos probióticos livres e microencapsulados, sob condições de digestão simulada.

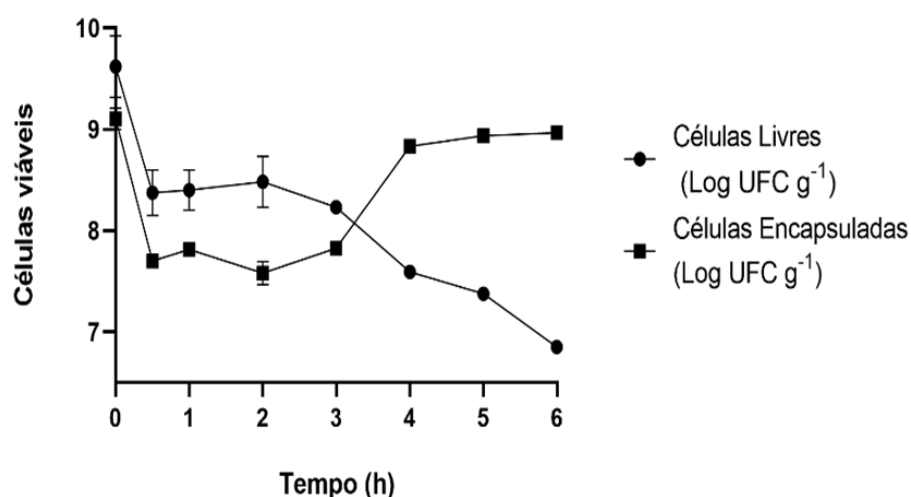


Figura 4 - Concentração (log UFC g⁻¹) do microrganismo *L. rhamnosus* GG viáveis livres e microencapsulados, submetidos à digestão simulada ao longo de 6 h.

A concentração inicial dos probióticos viáveis livres e encapsulados adicionados foi de 9,62 log UFC g⁻¹ e 9,10 log UFC g⁻¹, respectivamente. Na fase gástrica, submetidos a pH 2,0 e a presença da enzima pepsina, ocorreu uma redução média de 1,12 ciclos logarítmicos para as células livres. Já para as células encapsuladas, a redução foi de 1,52 ciclos logarítmicos em relação à concentração inicial, o que não implica necessariamente em perda de viabilidade, mas em cápsulas não dissolvidas, uma vez que essas devem liberar o seu conteúdo preferencialmente em pH alcalino, no intestino. Nas células livres a viabilidade foi decrescendo ao longo do período de coleta, iniciando com 8,37 log UFC g⁻¹ na fase gástrica e finalizando com 6,85 log UFC g⁻¹ na fase entérica, com redução total de 2,77 ciclos logarítmicos, em relação à concentração inicial. Já com o probiótico encapsulado, ocorreu o contrário, o número de células viáveis aumentou devido à liberação crescente da microcápsula, aumentando significativamente a partir de 4h, sendo esse período referente às condições entéricas simuladas. A viabilidade na primeira coleta foi de 7,70 log UFC g⁻¹ e na última foi de 8,97 log UFC g⁻¹. O pico de liberação do conteúdo das microcápsulas ocorreu na coleta de 6 h e a redução em relação à concentração inicial, foi de apenas 0,13 log UFC g⁻¹. Comparativamente, os probióticos encapsulados tiveram viabilidade final, após 6 h, de 98,57%, e as células livres de 71,21% (Tabela 1 – Apêndice A).

Fioravante (2019) avaliou a resistência às condições de digestão simulada de *L. acidophilus* microencapsulado utilizando xantana Pruni de baixa viscosidade ou xantana comercial (Farmaquímica®) e Aerosil® como agente encapsulante, nas proporções de 1,25% e 0,19%, respectivamente. A xantana Pruni demonstrou um melhor resultado, com viabilidades superiores na maioria dos períodos de coleta, inclusive na fase entérica, que é o mais desejável; no final do período de avaliação a viabilidade foi em torno de 7 log UFC g⁻¹ nos dois tratamentos, resultados inferiores aos obtidos no presente estudo. O que pode ser devido à concentração do agente encapsulante utilizado, que é superior neste trabalho, e também devido ao microrganismo utilizado.

Maciel et al. (2014) avaliaram a resistência de *L. acidophilus* La-5 microencapsulado em *spray dryer* utilizando leite em pó desnatado ou soro de leite em pó doce como agentes encapsulantes, sob as condições de digestão simulada, e compararam com as células livres do mesmo probiótico. Assim como no presente estudo, a sobrevivência do microrganismo microencapsulado foi significativamente maior em comparação com microrganismos livres, no final das condições gastrointestinais simuladas. No final do processo a viabilidade do microrganismo encapsulado com soro de leite doce e com leite em pó desnatado foi de 5,97 e 6,92 log UFC g⁻¹, respectivamente, enquanto para as células livres foi de 3,08 log UFC g⁻¹. Segundo os autores, a resistência do probiótico às condições gastrointestinais, além de ser dependente da cepa bacteriana, depende da técnica de microencapsulação e do tipo de agentes encapsulantes utilizados.

Nunes et al. (2018) avaliaram a sobrevivência de *L. acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulados em *spray dryer*, utilizando goma arábica (8 g), maltodextrina (2 g), glicerol (1,9 mL) e tween 80 (0,1 mL) como agentes encapsulantes submetidos às condições de digestão simuladas. Inicialmente, com a simulação da fase gástrica houve uma redução de 3,58 log UFC g⁻¹ para as microcápsulas de *L. acidophilus* e de 2,85 log UFC g⁻¹ para *Bifidobacterium*, em comparação à contagem inicial. Quando em contato com sais biliares e pH mais elevado, foi observado um aumento do número de células viáveis. No final do período da análise, as microcápsulas de *L. acidophilus* apresentaram uma concentração de 8,62 log UFC g⁻¹, enquanto as de *Bifidobacterium* 6,34 log UFC g⁻¹, com redução de

1,72 e 2,04 log UFC g⁻¹, respectivamente, em relação à concentração inicial, sendo essas reduções superiores à do presente estudo.

Gul (2017) avaliou a resistência às condições de digestão simulada de *Lactobacillus casei* Shirota livre e microencapsulado em *spray dryer* utilizando combinações de maltodextrina, leite desnatado reconstituído e goma arábica como agentes encapsulantes. A viabilidade das células livres foi completamente perdida após o período de 1 h em condições gástricas simuladas, sob pH 2,0. No final do período de exposição, a redução dos microrganismos encapsulados variou de 17,83% a 61,59%, indicando que o tipo de agente encapsulante utilizado influencia diretamente na proteção do microrganismo e na sua sobrevivência às condições de digestão simulada. No presente estudo, a redução foi bastante inferior, a utilização de xantana Pruni BV como agente encapsulante proporcionou uma redução de apenas 1,43%.

6.4 Conclusão

A xantana Pruni de baixa viscosidade possui adequabilidade satisfatória quanto aos parâmetros tecnológicos e funcionais para utilização como agente encapsulante de probiótico. Os encapsulados tiveram tons claros (L*), com cromaticidade predominante do amarelo (b*), em relação ao vermelho (a*) para todos os tratamentos. Todos os tratamentos geraram pós com baixa umidade, próxima a 5%. As variáveis independentes xantana Pruni de baixa viscosidade e Aerosil® apresentaram, individualmente, efeito significativo positivo e negativo, respectivamente, sobre a variável resposta umidade, sendo o maior efeito da xantana. Observou-se nas microcápsulas formato esférico, com presença de concavidades e com tamanho de partícula que variou de 2,95 a 25,31 µm. Funcionalmente, as microcápsulas apresentam comportamento adequado, ocorrendo baixa liberação nas condições gástricas ácidas e aumento da liberação nas condições entéricas alcalinas, garantindo proteção ao probiótico. Probióticos encapsulados tiveram viabilidade final superior, em relação às células livres.

6.5 Referências bibliográficas

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

AOAC. Association of Official Analytical Chemists. Official Methods of Analysis. Washington D.C.: AOAC, 1018 p., 2000.

ARYANA, K. J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **LWT – Food Science and Technology**, v. 40, p. 1808–1814, 2007.

AVILA-REYES, S. V.; GARCIA-SUAREZ, F. J.; JIMÉNEZ, M. T.; MARTÍN-GONZALEZ, M. F. S.; BELLO-PEREZ, L. A. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p.423-430, 2014.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. g. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9 ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1994.

BERNINGER, T.; DIETZ, N.; LOPEZ, O. G. Water-soluble polymers in agriculture: xanthan gum as eco-friendly alternative to synthetics. **Microbial Biotechnology**. p. 1-16, 2021.

BRASIL. **Resolução - RDC N° 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 05 mai. 2021.

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

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. dos R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *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**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 18, p. 184–190, 2007.

FIORAVANTE, J. B. Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preservado em microcápsula de xantana e sílica pirogênica. Tese (Doutorado em Ciências e

Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos -Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

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

GARDINER, G. E.; O'ULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M. A.; FITZGERALD, G. F.; COLLINS, J. K.; ROSS, R. P.; STANTON, C. Comparative survival rates of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2605–2612, 2000.

GUL, O. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-9, 2017.

HERNÁNDEZ-LOPEZ, Z.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; CADENA-RAMÍREZ, A.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; GORDILLO-MARTÍNEZ, A. J.; FALFÁN-CORTÉS, N. Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 216-222, 2018.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. de O.; SANT'ANNA, E. S. *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**, v. 240, p. 977–984, 2015.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KONEMAN, E. W.; WINN, J. R. W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRENBERGER, P.; WOODS, G. Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology. 6 ed. Lippincott: Williams and Wilkins, 1996, 2005.

KRASAEEKOOP, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, p. 737-743, 2003.

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

LIU, H.; GONG, J.; CHABOT, D.; MILLER, S. S.; CUI, S. W.; ZHONG, F.; WANG, Q. Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 100-108, 2018.

MACIEL, G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet

whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

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

MOREIRA, A. da S.; FIORAVANTE, J. B.; VENDRUSCOLO, C. T.; MACAGNAN, K. L. **Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana**. Ano: 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180687239, título: "Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depositante: Universidade Federal de Pelotas. Depósito: 14/09/2018. Data da publicação nacional: 24/03/2020.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, Part. 1, p. 773-780, 2015.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, p. 123–132, 2009.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L. A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E. J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

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

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

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. de; SILVA, C. de B.; SORIANI, H. H.; BASTOS, J. de O.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. Santa Maria/RS. **Revista Ciência Rural**, 2014.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. da S. Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; Deise Maria Passos da Silva; José de Paula Oliveira; José Nildo Tabosa; Fernando Gomes da Silva; José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 4ª ed. Recife: CCS- Gráfica e Editora, v. 1, p. 31-58, 2013.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GANZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.

7 Considerações finais

O processo de microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG, nas condições utilizadas, mostra-se satisfatório. A utilização de xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante e Aerosil® como antiagregante proporcionam uma elevada eficiência em todas as formulações avaliadas, alcançando até 99,31%. A temperatura de armazenamento é um fator relevante na viabilidade dos microrganismos, com reduções superiores nas microcápsulas armazenadas sob temperatura ambiente. Sob as temperaturas de refrigeração e congelamento, a viabilidade é elevada até os 120 dias de armazenamento, mantendo-se em torno de 8 log UFC g⁻¹.

As microcápsulas analisadas - T2 e T3 - possuem formato esférico, com presença de concavidades e com tamanho de partícula variando de 2,95 a 25,31 µm, sendo este tamanho adequado para posterior aplicação em matriz alimentar. O microrganismo *L. rhamnosus* GG microencapsulado com xantana Pruni de baixa viscosidade na concentração de 1,75% e com 0,45% do antiagregante Aerosil®, resiste ao trato digestório e tem uma maior viabilidade na porção entérica com concentração de 8,97 log UFC g⁻¹, enquanto as células livres apresentaram viabilidade de 6,85 log UFC g⁻¹.

Os resultados obtidos demonstram que a utilização da xantana Pruni de baixa viscosidade como agente encapsulante, no processo de secagem por *spray dryer*, é eficiente para a proteção dos probióticos e proporciona parâmetros tecnológicos desejáveis em microcápsulas.

Como perspectivas futuras, objetiva-se aplicar as microcápsulas probióticas em uma matriz alimentar de origem não láctea, avaliando a viabilidade dos microrganismos ao longo do período de armazenamento, bem como verificar a aceitação do produto.

8 Referências gerais

- AKIN, M. B.; AKIN, M. S.; KIRMACI, Z. Effects of inulin and sugar levels on the viability of yogurt and probiotic bacteria and the physical and sensory characteristics in probiotic ice-cream. **Food Chemistry**, v. 104, p. 93-99, 2007.
- ALANDER, M.; SATOKARI, R.; KORPELA, R.; SAXELIN, M.; VILPPONEN-SALMELA, T.; MATTILA-SANDHOLM, T.; WRIGHT, A. V. Persistence of colonisation of human colonic mucosa by a probiotic strain, *Lactobacillus rhamnosus* GG after oral consumption. **Applied Environmental Microbiology**, v. 65, p.351-354, 1999.
- ALMEIDA, L. B.; MARINHO, C. B.; SOUZA, C. S.; CHEIB V. B. P. Disbiose intestinal. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. São Paulo, v. 24, n.1, p. 58-65, 2009.
- ALTAMIRANO-FORTOUL, R.; MORENO-TERRAZAS, R.; QUEZADA-GALLO, A.; ROSSEL, C. M. Viability of some probiotic coatings in bread and its effect on the crust mechanical properties. **Food Hydrocolloids**, v. 29, p. 166–74, 2012.
- ANSELMO, G. C. S.; MATA, M. E. R. M. C.; ARRUDA, P. C.; SOUSA, M. C. Determinação da higroscopicidade do cájá em pó por meio da secagem por atomização. **Revista de biologia e ciências da terra**, v. 6, n. 2, 2006.
- AREPALLY, D.; GOSWAMI, T. K. Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, p.583-593, 2019.
- ARGIN, S.; KOFINAS, P.; LO, Y. M. The cell release kinetics and the swelling behavior of physically crosslinked xanthan e chitosan hydrogels in simulated gastrointestinal conditions. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 138–144, 2014.
- AVILA-REYES, S. V.; GARCIA-SUAREZ, F. J.; JIMÉNEZ, M. T.; MARTÍN-GONZALEZ, M. F. S.; BELLO-PEREZ, L. A. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p.423-430, 2014.
- AXELSSON, L. **Lactic Acid Bacteria: Classification and Physiology**. 3rd revised and expanded ed. Marcel Dekker, Inc., New York, p.1- 66, 2004.
- AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação a tecnologia de alimentos. **Brazil of Food and Nutrition**, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.
- BAJAJ, J. S.; HEUMAN, D. M.; HYLEMON, P. B.; SANYAL, A. J.; PURI, P.; STERLING, R. K.; LUKETIC, V.; STRAVITZ, T.; SIDDIQUI, M. S.; FUCHS, M.; THACKER, L. R.; WADE, J. B.; DAITA, W.; SISTRUN, S.; WHITE, M. B.; NOBLE, N. A.; THORPE, C.; KAKIYAMA, G.; PANDAK, W. M.; SIKAROODI, M.; GILLEVET, P. M. Randomized clinical trial: *Lactobacillus* GG modulates gut microbiome, metabolome and endotoxemia in patients with cirrhosis. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 39, p. 1113- 1125, 2014.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food Powders: physical properties, processing and functionality**. Food engineering series. New York: Kluwer, cap. 12, 2005.

BARRETO, A. R.; MÉRIDA, L. G. R.; ETCHEPARE, M. de A.; LOPES, E. J.; MENEZES, C. R. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 164 – 174, 2015.

BERGEY, D. H.; HOLT, J. G. *Bergey's manual of determinative bacteriology*. 9 ed. Lippincott Williams and Wilkins, 1994.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BLAUT, M. Relationship of probiotics and food to intestinal microflora. **European Journal of Nutrition**, v. 41, 2002.

BORGOGNA, M.; BELLICH, B.; ZORZIN, L.; LAPASIN, R.; CESÀRO, A. Food microencapsulation of bioactive compounds: rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. **Food Chemistry**, v. 122, n. 2, p. 416–423, 2010.

BRAZEL, C. S. Microencapsulation: offering solutions for the food industry. **Cereal Foods World**, v.44, n.6, p.388-393, 1999.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Disponível em: <http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm>. Acesso em: 21 jun. 2019.

BRASIL. **Resolução - RDC N° 241, de 26 de julho de 2018**. Dispõe sobre os requisitos para comprovação da segurança e dos benefícios à saúde dos probióticos para uso em alimentos. Brasília: Ministério da Saúde, 2018. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_241_2018_.pdf/941cda52-0657-46dd-af4b-47b4ee4335b7>. Acesso em: 05 mai. 2021.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467-483, 2011.

BUSTAMANTE, M.; OOMAH, B. D.; RUBILAR, M.; SHENE, C. Effective *Lactobacillus plantarum* and *Bifidobacterium infantis* encapsulation with chia seed (*Salvia hispanica* L.) and flaxseed (*Linum usitatissimum* L.) mucilage and soluble protein by spray drying. **Food Chemistry**, v. 216, p. 97-105, 2017.

CARMO, E. L.; FERNADES, R. V. B.; BORGES, S. V. Microencapsulação por spray drying, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **Revista de Engenharia Química e Química**, v. 1, n. 2, p. 30-44, 2015.

CARVALHO, N. B.; LIMA, A. S.; CARVALHO, N. B. Uso de sílicas modificadas para imobilização de lipases. **Química Nova**, v. 38, nº 3, São Paulo, 2015.

CASTRANOVA, V. Signaling pathways controlling the production of inflammatory mediators in response to crystalline silica exposure: Role of reactive oxygen/nitrogen species. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 37, p. 916-925, 2004.

CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. dos R.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *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**, v. 113, p. 186-193, 2012.

CAVALHEIRO, C.P.; ETCHEPARE, M.A.; SILVEIRA, M.F.; MENEZES, C.; MENEZES, C.R.; FRIES, L.L.M. Encapsulação: alternativa para a aplicação de microrganismos probióticos em alimentos termicamente processados. **Ciência e Natura** v.37, Ed. Especial-Nano e Microencapsulação de compostos bioativos e probióticos em alimentos, p. 65-74, 2015.

CHAGAS, V. S. Microencapsulação por Spray drying de bactéria láctica com potencial probiótico. Dissertação (Mestrado em Bioquímica e Biologia Molecular) Programa Multicêntrico de Pós-graduação em Bioquímica e Biologia Molecular da Universidade Federal de São João Del Rei. Divinópolis, 2018.

CHANG, C. P., LIEW, S. L. Growth Medium Optimization for Biomass Production of a Probiotic Bacterium, *Lactobacillus rhamnosus* ATCC7469. **Journal of Food Biochemistry**, v.37, 536–543, 2013.

CHEN, M. J.; CHEN, K. N. Applications of probiotic encapsulation in dairy products. In: Lakkis, Jamileh M. (Ed.), *Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems*. Wiley-Blackwell, USA. p. 83–107, 2007.

CHEOW, W. S.; KIEW, T. Y.; HADINOTO, K. Controlled release of *Lactobacillus rhamnosus* biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 103, p. 587-595, 2014.

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

CRUZ, A. G.; BURITI, F. C. A.; SOUZA, C. H. B.; FARIA, J. A. F.; SAAD, S. M. I. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology** , v. 20, n. 8, p. 344-354, 2009.

DAVIS, M.; WALKER, G. Recent strategies in spray drying for the enhanced bioavailability of poorly water-soluble drugs. **Journal of Controlled Release**, v. 269, p. 110-127, 2018.

DIANAWATI, D.; LIM, S. F.; OOI, Y. B. H.; SHAH, N. P. Effect of Type of Protein-Based Microcapsules and Storage at Various Ambient Temperatures on the Survival and

Heat Tolerance of Spray Dried *Lactobacillus acidophilus*. **Journal of Food Science**, v. 82, Nº. 9, p. 2134-2141, 2017.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal Of Food Science**, v. 74, n. 2, p. 100-107, 2009.

DONBROW, M. Microcapsules and nanoparticles in medicine and pharmacy. Boca Raton: CRC Press, p.1-13, 1992.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R.; GORBACH, S. L. Lactobacillus GG: bacteriology and clinical applications. Gastroenterol. **Medical Clinics of North America**, Maryland Heights, v.34, p.483-498, 2005.

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

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

FIGUEROA-GONZÁLES, I., QUIJANO, G., RAMÍREZ, G., CRUZ-GUERRERO, A. Probiotics and Prebiotics-Perspectives and Challenges. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, p. 1341-1348, 2011.

FIORAVANTE, J. B. Probiótico *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 preservado em microcápsula de xantana e sílica pirogênica. Tese (Doutorado em Ciências e Tecnologia de Alimentos). Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos -Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

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>> Acesso em: 20 jun. 2020.

FONTANIELLA, B.; RODRÍGUEZ, C. W.; PIÑÓN, D.; VICENTE, C.; LEGAZ, M. E. Identification of xanthans isolated from sugarcane juices obtained from scalded plants infected by *Xanthomonas albilineans*. **Journal Of Chromatography B**, v. 770, n. 1-2, p. 275-281, 2002.

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

GOMES, A. M. P.; MALCATA F. X. Agentes probióticos em alimentos: aspectos fisiológicos e terapêuticos, e aplicações tecnológicas. **Boletim da Sociedade Portuguesa de Biotecnologia**, v. 64, p. 12-22, 1999.

GOMES, A. A.; BRAGA, S. P.; CRUZ, A. G.; CADENA, R.; LOLLO, P. C. B.; CARVALHO, C.; AMAYA-FARFAN, J.; FARIA, J. A. F.; BOLLINI, H. M. A. Effect of the inoculation level of *Lactobacillus acidophilus* in probiotic cheese on the

physicochemical features and sensory performance compared with commercial cheeses. **Journal Dairy Science**, v. 94, p. 4777–4786, 2011.

GIBBS, S.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C. N. Encapsulation in the food industry: a review. International. **Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999.

GUL, O. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 41, p. 1-9, 2017.

HERNÁNDEZ-LOPEZ, Z.; RANGEL-VARGAS, E.; CASTRO-ROSAS, J.; GÓMEZ-ALDAPA, C. A.; CADENA-RAMÍREZ, A.; ACEVEDO-SANDOVAL, O. A.; GORDILLO-MARTÍNEZ, A. J.; FALFÁN-CORTÉS, N. Optimization of a spray-drying process for the production of maximally viable microencapsulated *Lactobacillus pentosus* using a mixture of starch-pulque as wall material. **LWT - Food Science and Technology**, v. 95, p. 216-222, 2018.

HOLZAPFEL, W. H.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJÖRKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 2, p. 365S- 373S, 2001.

HUANG, S.; CAUTY, C.; DOLIVET, A.; LE LOIR, Y.; CHEN, X. D.; SCHUCK, P.; JAN, G.; JEANTET, R. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 453-463, 2016.

HUANG, S.; VIGNOLLES, M.; CHEN, X. D.; LE LOIR, Y.; JAN, G.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1-17, 2017.

IBARRA, A.; ACHA, R.; CALLEJA, M. T.; CHIRALT-BOIX, A.; WITTIG, E. Optimization and shelf life of a low-lactose yogurt with *Lactobacillus rhamnosus* HN001. **Journal Dairy Science**, v. 95, p. 3536–3548, 2012.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. de O.; SANT'ANNA, E. S. *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**, v. 240, p. 977–984, 2015.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT - Food Science and Technology**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

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

JANSSON, P. E.; KENNE, L.; LINDBERG, B. Structure of the extracellular polysaccharide from *Xanthomonas campestris*. **Carbohydrate Research**, Amsterdam, v. 45, p. 275-285, 1975.

JIMÉNEZ-PRANTEDA, M. J.; PONCELET, D.; NÁDER-MACÍAS, M. E.; ARCOS, A.; AGUILERA, M.; MONTEOLIVA-SÁNCHEZ, M.; RAMOS-CORMENZANA, R. Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 113, n. 2, p. 179–184, 2012.

JOYE, I. J.; McCLEMENTS, D. J. Biopolymer-based nanoparticles and microparticles: Fabrication, characterization, and application. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 19, n. 5, p. 417- 427, 2014.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, **Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KARKOW, F. J. A.; FAINTUCH, J.; KARKOW, A. G. M. Probióticos: perspectivas médicas. **Revista AMRIGS**, v. 51, p.38-48, 2007.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: Technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39–48, 2002.

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 64, p. 567-576, 2014.

KESHANI, S.; WAN, W. R. D.; NOUROUZI, M. M.; NAMVAR, F.; HASEMI, M. Spray drying: an overview on wall deposition, process and modeling. **Journal of Food Engineering**, v. 146, p. 152-162, 2015.

KLAIC, P. M. A. Desenvolvimento de método de digestão ácida para determinação de sais em xantana e potencialização reológica de xantana de *Xanthomonas arboricola* PV pruni por troca iônica. 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, p.111, 2012.

KLAIC, P. M. A.; VENDRUSCOLO, C. T.; FURLAN, L.; MOREIRA, A. da S. Ion exchange as post-fermentative process enhancer of viscosity of xanthan produced by *Xanthomonas arboricola* pv pruni. **Food Hydrocolloids**, v. 56, p. 118-12, 2016.

KONEMAN, E. W.; WINN JR, W.; ALLEN, S.; JANDA, W.; PROCOP, G.; SCHRENBERGER, P.; WOODS, G. **Koneman's color atlas and textbook of diagnostic microbiology**. 6 ed. Lippincott: Williams and wilkins, 2005.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, p. 737-743, 2003.

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

LEBLANC, A. M.; PERDIGÓN, G. Reduction of betaglucuronidase and nitroreductase activity by yogurt in a murine colon cancer model. **Biocell**, v. 29, p. 15-24, 2005.

LIAO, L.; WEI, X.; GONG, X.; LI, J.; HUANG, T.; XIONG, T. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**, v. 82, p. 82-89, September 2017.

LIMA, J. R.; LOCATELLI, G. O.; FINKLER, L.; FINKLER, C. L. L. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho. **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 27-34, 2014.

LIU, H.; GONG, J.; CHABOT, D.; MILLER, S. S.; CUI, S. W.; ZHONG, F.; WANG, Q. Improved survival of *Lactobacillus zeae* LB1 in a spray dried alginate-protein matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 78, p. 100-108, 2018.

MACIEL G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, p.1991-1998, 2014.

MAIA, J. L. Desenvolvimento de microcápsulas contendo as antocianinas presentes no corante do extrato do jambo por polimerização interfacial. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, UFRN, 2013.

MAYER, L.; VENDRUSCOLO, C. V.; SILVA, W. P.; VÖRHOLTER, F.; BECKER, A.; PÜHLER, A. Insights into the genome of the xanthan-producing phytopathogen *Xanthomonas arboricola* pv. *pruni* 109 by comparative genomic hybridization. **Journal of Biotechnology**, v. 155, p. 40-49, 2011.

MARCO, M. L.; PAVAN, S.; KLEEREBEZEM, M. Towards understanding molecular modes of probiotic action. **Current Opinion Biotechnology**, v. 17, p. 204-210, 2004.

MORAIS, M. B.; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **The Journal of Pediatrics**, v. 82, p. 189-197, 2006.

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

MOREIRA, A. da S.; FIORAVANTE, J. B.; VENDRUSCOLO, C. T.; MACAGNAN, K. L. **Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana**. Ano: 2018, Brasil. Patente: Privilégio de Inovação. Número do registro: BR1020180687239, título: "Microcápsulas à base de xantana para preservação ou liberação controlada de probióticos e composição para microcápsulas a base de xantana", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depositante: Universidade Federal de Pelotas. Depósito: 14/09/2018. Data da publicação nacional: 24/03/2020.

NAPIERSKA, D.; THOMASSEN, L. C.; LISON, D.; MARTENS, J. A.; HOET, P. H. The nanosilica hazard: another variable entity. **Particle and Fibre Toxicology**, v. 7, 39, 2010.

NETO, B. P. C. Micropartículas de quitosana estruturadas com aerosil®; estabilidade, adsorção, encapsulação e liberação de substâncias ativas. Tese (Doutorado em Engenharia Química), Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 164 f., 2014.

NUNES, G. L.; ETCHEPARE, M. de A.; CICHOSKI, A. J.; ZEPKA, L. P.; LOPES, E. J.; BARIN, J. S.; FLORES, E. M. de M.; SILVA, C. de B.; MENEZES, C. R. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 128-133, 2018.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, p. 685-693, 2007.

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

OUWEHAND, A.; SALMINEN J. The health effects of culture milk products with viable and non viable bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, p. 749-758, 1998.

PEPPAS, N. A. Devices based on intelligent biopolymers for oral protein delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 277, n. 1-2, p. 11-17, 2004.

PERDANA, J.; BERESCHENKO, L.; FOX, M. B.; KUPERUS, J. H.; KLEEREBEZEM, M.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A. I. Dehydration and thermal inactivation of *Lactobacillus plantarum* WCFS1: Comparing single droplet drying to spray and freeze drying. **Food Research International**, v. 54, n. 2, p. 1351-1359, 2013.

PERIS, G. P.; LESMES, B.; CUERDA, C. M.; ALVAREZ, C. Metabolismo colônico de la fibra. **Nutrición Hospitalaria**. p. 11-16, 2002.

POHJAVUORI, E.; VILJANEN, M.; KORPELA, R.; KUITUNEN, M.; TIITTANEN, M.; VAARALA, O.; SAVILAHTI, E. *Lactobacillus* GG effect in increasing IFN gamma production in infants with cow's milk allergy. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**. p. 114-131, 2004.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, Part. 1, p. 773-780, 2015.

RAMIREZ, M. R.; IZQUIERDO, I.; RASEIRA, M. do C. B.; ZUANAZZI, J. A.; BARROS, D.; HENRIQUES, A. T. Effect of lyophilised vaccinium Berries on memory, anxiety and locomotion in adult rats. **Pharmacological Research**, v. 52, p. 457-462, 2005.

REBELLO, F. F. P. Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Revista Agrogeoambiental**, p.134-144, 2009.

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

RIBEIRO, R. C. C.; CORREIA, J. C. G.; MONTE, M. B. M.; SEIDL, P. R.; MOTHÉ, C. G.; LIMA, C. A. Cashew gum: a new depressor for limestone in the phosphate minerals flotation. **Minerals Engineering**, Oxford, v. 16, n. 9, p. 873–875, sep. 2003.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATOCALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

ROSSI, M.; CORRADINI, C.; AMARETTI, A.; NICOLINI, M.; POMPEI, A.; ZANONI, S.; MATTEUZZI, D. Fermentation of fructooligosaccharides and inulin by *Bifidobacteria*: a comparative study of pure and fecal cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, p. 6150-6158, 2005.

SAAD, S. M. I.; CRUZ, A. G.; FARIA, J. A. F. Probióticos e prebióticos em alimentos: Fundamentos e aplicações tecnológicas. 1ed. São Paulo: Varela, 669p., 2011.

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

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying process for the industrial preservation of Lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v. 23, p. 302-15, 2007.

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

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

SILVA, M. T. Obtenção e caracterização de antioxidantes derivados de xantana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos), Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Pelotas, 68 f., 2018.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R. de; SILVA, C. de B.; SORIANI, H. H.; BASTOS, J. de O.; MOTTA, M. H.; RIBEIRO, R. F. Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. Santa Maria/RS. **Revista Ciência Rural**, 2014.

SILVA, T. L.; MARQUES, S.; ALVES, L.; ROSEIRO, J. C. The simultaneous utilization of kinetic analysis and flow cytometry in the assessment of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 physiological states produced by increasing oxygen limitation levels and lactic acid accumulation. **Biochemical Engineering Journal**, v. 74, p. 54– 59, 2013.

SOHAIL, A.; TURNER, M. S.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of Probiotics Encapsulated in Alginate Gel Microbeads Using a Novel Impinging Aerosols Method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, n. 1, p. 162-68, 2011.

SOUTINHO, A. M. S. Avaliação dos compostos fenólicos e da actividade de frutos vermelhos produzidos em modo biológico. Tese de Doutorado. (Doutorado em Qualidade e Tecnologia Alimentar - ESAV). Viseu: Instituto Politécnico de Viseu. Escola Superior Agrária. p. 95, 2012.

STARCH, M. S.; FIORI, J. E.; LIN, Z. Beyond rheology modification: hydrophilically modified silicone elastomers provide new benefits. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 54, n. 2, p. 193-205, 2003.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209-214, 2009.

SZAJEWSKA, H.; SETTY, M.; MRUKOWICZ, J.; GUANDALINI, S. Probiotics in gastrointestinal diseases in children: hard and not-so-hard evidence of efficacy. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, v. 42, n. 5, p. 454-75, 2006.

TESSMANN, C. Caracterização molecular de *Xanthomonas campestris* pv pruni pela técnica de RAPD e relação com a planta hospedeira e com a produção, viscosidade e composição química da xantana. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia Agroindustrial) - Departamento de Ciência e Tecnologia Agroindustrial, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2002.

TONON, R. V. Secagem por atomização do suco de açaí: Influência das variáveis de processo, qualidade e estabilidade do produto. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos). Departamento de Engenharia de Alimentos, Universidade estadual de Campinas, Campinas, 242p., 2009.

TUOMOLA, E. M.; SALMINEN, S. J. Adhesion of some probiotic and dairy *Lactobacillus* strains to Caco-2 cell cultures. **International Journal Food Microbiology**, v. 41, p. 45-51, 1998.

TUOMOLA, E. M.; OUWEHAND, A. C.; SALMINEN, S. J. The effect of probiotic bacteria on the adhesion of pathogens to human intestinal mucus. **FEMS Immunol. Journal of Medical Microbiology**, v. 26, p.137–142, 1999.

VENDRUSCOLO, C. T.; ANDREAZZ, I. F.; GANTER, J. L. S.; FERRERO, C.; BRESOLIN, T. M. B. Xanthan and Galactomannan (from *M. scabrella*) matrix tablets

for oral controlled delivery of theophylline. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 296, p.1-11, 2005.

VENDRUSCOLO, C. T.; MOREIRA, A. da S. Xantana pruni: biopolímero de isolado de clima sub-tropical. In: Márcia do Vale Barreto Figueiredo; Deise Maria Passos da Silva; José de Paula Oliveira; José Nildo Tabosa; Fernando Gomes da Silva; José Teodorico de Araújo Filho. (Org.). **Estratégia para uma Agricultura Sustentável**. 4ª ed. Recife: CCS- Gráfica e Editora, v. 1, p. 31-58, 2013.

VENDRUSCOLO, C. T.; VENRUSCOLO, J. L. S.; MOREIRA, A. da S. **Process for preparing a xanthan biopolymer**. Ano: 2006. International Application published under the patent cooperation treaty. International publication number: WO2006047845, title: "Process for preparing a xanthan biopolymer". World intelectual property organization. Applicants: Universidade Federal de Pelotas, International publication date: 11/05/2006.

VENKATESAN, P.; MANAVALAN, R.; VALLIAPPAN, K. Microencapsulation: a vital technique in novel drug delivery system. **Journal of Pharmaceutical Sciences and Research**, v. 1, n. 4, p. 26-35, 2009.

VIEBKE, C. Order–Disorder Conformational Transition of Xanthan Gum. Polysaccharides: structural diversity and functional versatility. Second Edition, CRC Press, New York, p. 459 – 474, 2004.

VONG, L.; LORENTZ, R. J.; ASSA, A.; GLOGAUER, M.; SHERMAN, P. M. Probiotic *Lactobacillus rhamnosus* Inhibits the Formation of Neutrophil Extracellular Traps. **The Journal of Immunology**, v. 192, n. 4, p. 1870-1877, 2014.

WANG, H., CAO, G., PRIOR, R. Oxygen radical absorbing capacity of anthocyanins. **Food Chemistry**, v. 45, p. 304-309, 1997.

WANG, J.; HUANG, S.; FU, N.; JEANTET, R.; CHEN, X. D. Thermal aggregation of calcium-fortified skim milk enhances probiotic protection during convective droplet drying. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 30, p. 6003-6010, 2016.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M. L. Can Encapsulation Lengthen the ShelfLife of Probiotic Bacteria in Dry Products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 364-67, 2010.

XAVIER, M. F. Estudo da extração de antocianinas em colunas recheadas. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 120p, 2004.

XUEWU, Z.; XIN, L.; DEXIANG, G.; WEI, Z.; TONG, X.; YONGHONG, M. Rheological models for xanthan gum. **Journal of Food Engineering**, v. 27, p. 203-209, 1996.

YÁÑEZ, R.; MARQUES, S.; GÍRIO, F. M.; ROSEIRO, J. C. The effect of acid stress on lactate production and growth kinetics in *Lactobacillus rhamnosus* cultures. **Process Biochemistry**, v. 43, 2008, p. 356-361.

YAN, Y.; KIM, J. A.; KWAK, M. K.; YOO, B. K.; YONG, C. S.; CHOI, H. Enhanced Oral Bioavailability of Curcumin via a Solid Lipid-Based Self-Emulsifying Drug Delivery System Using a Spray-Drying Technique. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v. 34, p. 1179-1186, 2011.

ZHANG, Y.; LIN, J.; ZHONG, Q. Effects of media, heat adaptation, and outlet temperature on the survival of *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 after spray drying and subsequent storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 441-447, 2016.

ZHENG, J.; WITTOUCK, S.; SALVETTI, E.; FRANZ, C.; HARRIS, H. M. B.; MATTARELLI, P.; O'TOOLE, P. W.; POT, B.; VANDAMME, P.; WALTER, J.; WATANABE, K.; WUYTS, S.; FELIS, G. E.; GANZLE, M. G.; LEBEER, S. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of Lactobacillaceae and Leuconostocaceae. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 70, p. 2782–2858, 2020.

ZURAVLEV, L. T.; The Surface Chemistry of Amorphous Silica. Zuravlev Model. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 173, 2000.

Apêndices

Apêndice A – Resultados de concentração dos probióticos viáveis nas microcápsulas e nas células livres (log UFC g⁻¹) submetidos às condições de digestão simulada.

Tabela 1 – Concentração dos probióticos viáveis nas microcápsulas e nas células livres (log UFC g⁻¹) submetidos às condições de digestão simulada.

Tempo (h)	Células livres (log UFC g⁻¹)	Células encapsuladas (log UFC g⁻¹)
0	9,62 ^{Aa} ± 0,53	9,10 ^{Aa} ± 0,18
0,5	8,37 ^{Abc} ± 0,39	7,70 ^{Bb} ± 0,11
1	8,40 ^{Abc} ± 0,35	7,81 ^{Bb} ± 0,12
2	8,48 ^{Ab} ± 0,44	7,58 ^{Bb} ± 0,20
3	8,23 ^{Abcd} ± 0,03	7,83 ^{Bb} ± 0,11
4	7,59 ^{Bcde} ± 0,01	8,83 ^{Aa} ± 0,05
5	7,38 ^{Bde} ± 0,06	8,94 ^{Aa} ± 0,04
6	6,85 ^{Be} ± 0,09	8,97 ^{Aa} ± 0,03

Médias de três repetições ± desvio padrão; letras maiúsculas e minúsculas diferentes indicam diferença estatística em relação ao tratamento (linha) e ao tempo (coluna), respectivamente, pelo teste de *Tukey* p<0,05.