MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS
FACULDADE DE AGRONOMIA “ELISEU MACIEL”
DEPARTAMENTO DE CIÊNCIA E TECNOLOGIA AGROINDUSTRIAL
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

TESE

Microencapsulação simbiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 usando soro de queijo e inulina por spray drying e aplicação em diferentes matrizes alimentares

Michele Dutra Rosolen
Nutricionista

Pelotas/RS, 2020

Michele Dutra Rosolen

Microencapsulação simbiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 usando soro de queijo e inulina por spray drying e aplicação em diferentes matrizes alimentares

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

Comitê de orientação: Profª. Drª. Simone Pieniz
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva
Profª. Drª. Ângela Maria Fiorentini

Pelotas/RS 2020

Michele Dutra Rosolen

Microencapsulação simbiótica de *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 usando soro de queijo e inulina por spray drying e aplicação em diferentes matrizes alimentares

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora 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: 13 de março de 2020

Banca examinadora:

.....
Profª. Drª. Simone Pieniz (Orientadora), Doutora em Microbiologia Agrícola e do Ambiente pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....
Prof. Dr. Wladimir Padilha da Silva, Doutor em Ciência dos Alimentos pela Universidade de São Paulo

.....
Profª. Drª. Ângela Maria Fiorentini, Doutora em Ciência dos Alimentos pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Prof. Dr. Fabrício Rochedo Conceição, Doutor em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas

.....

Profª. Drª. Francieli Moro Stefanello, Doutora em Ciências Biológicas-Bioquímica pela Universidade Federal do Rio grande do Sul

.....

Profª. Drª. Graciela Völz Lopes, Doutora em Ciências Veterinárias pela Universidade Federal do Rio Grande do Sul

.....

Profª. Drª. Elessandra da Rosa Zavarese, Doutora em Engenharia e Ciência de Alimentos pela Universidade Federal de Rio Grande

Dedicatória

Dedico aos que estiveram ao meu lado em todos os momentos, meu filho amado Eduardo, meu estimado marido Sedenir e meus pais Elbio e Gislaine.

Agradecimentos

À minha família, especialmente ao meu filho Eduardo, meu marido Sedenir, aos meus pais Elbio e Gislaine e meu irmão Alessandro pelo constante apoio e incentivo.

À professora Simone Pieniz, Ângela Maria Fiorentini e Wladimir Padilha da Silva pela orientação e ensinamentos ao longo da caminhada.

Aos professores Fabrício Rochedo Conceição e Patrícia Silva Diaz pela oportunidade e confiança para a execução deste trabalho.

Aos colegas do Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos pelo companheirismo e acolhimento.

À Fernanda Bordini pelo carinho, amizade e parceria indispensável para a execução do trabalho.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior-Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro.

Muito obrigada.

"Não te rendas, ainda estás a tempo de alcançar e começar de novo,
aceitar as tuas sombras enterrar os teus medos"
(Mario Benedetti)

Resumo

SIGILOSO

Palavras-chave: microcápsula; inulina; soro de queijo; probiótico, prebióticos e resistência térmica.

Abstract

SIGILOSO

Keywords: microcapsule; inulin; cheese whey; probiotic; prebiotics; thermal resistance.

Lista de Figuras

Figura 1 Ação de alguns pós-bióticos no hospedeiro. 22
Figura 2 Estrutura química da cadeia de inulina. 24
Figura 3 Representação esquemática da seção transversal de uma microcápsula. 27
Figura 4 Representação de fatores que afetam a eficácia da microencapsulação 29
Figura 5 Descrição geral dos passos para produção de microcápsulas. 30
Figura 6 Ilustração da secagem por atomização. 32

Lista de Tabelas

Tabela 1 Simbióticos comuns e fontes microbianas 26

Sumário

1 Introdução 12

2 Revisão Bibliográfica 14
2.1 Bactérias Ácido Láticas 14
2.1.1 Lactococcus lactis (L. lactis) 16
2.2 Probióticos 17
2.3 Para-Probióticos 20
2.4 Pós-bióticos 21
2.5 Prebióticos 22
2.6 Inulina 24
2.7 Simbióticos 25
2.8 Encapsulação de probióticos 27
2.9 Métodos de Encapsulação 29
2.9.1 Emulsificação 30
2.9.2 Coarcervação 31
2.9.3 Secagem por Atomização (*Spray Drying*) 31
2.10 Tipos de Materiais Encapsulantes 33
2.10.1 Soro de queijo 33
2.10.2 Oligossacarídeos 35
2.11 Principais Métodos de Avaliação de Microcápsulas 36

3 Objetivos 38
3.1. Objetivo geral 38
3.2. Objetivos específicos 38

4 Capítulo I. Artigo 39

5 Capítulo II. Manuscrito 41

6 Considerações Finais 42

7 Apêndice: 48

1 Introdução

Alimentos contendo microrganismos probióticos aumentaram nos últimos anos, em virtude da preocupação dos consumidores com dietas saudáveis e bem-estar. Em virtude disso, aumenta o interesse por isolamento de novas espécies bacterianas como bactérias ácido láticas (BAL), visando obter microrganismos melhores adaptados às condições intrínsecas e extrínsecas, alguns deles com potencial tecnológico e até mesmo probiótico (MANINI et al., 2016; HUANG et al., 2017).

Nesse contexto, BAL representam o principal grupo de microrganismos utilizados em processos fermentativos na indústria de alimentos, em todo o mundo. Estas também são exploradas por suas propriedades probióticas, conferindo efeitos benéficos ao hospedeiro ou melhorando seu equilíbrio intestinal (ARAYA et al., 2002; MANINI et al., 2016). Consiste em uma variedade de gêneros incluindo, mas não limitado, *Lactobacillus, Lactococcus, Streptococcus, Leuconostoc, Pediococcus e Enterococcus* (HILL et al., 2017). Cabe ressaltar que os efeitos benéficos dos probióticos são cepa dependente, assim como diretamente relacionados à concentração e a viabilidade das bactérias ingeridas (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016).

Deve-se considerar ainda que os probióticos para serem aplicados em produtos comerciais devem apresentar propriedades tecnológicas como a capacidade de cultivo em escala industrial, viabilidade e estabilidade ao armazenamento (SARAO; ARORA, 2017). No entanto, ainda há problemas com respeito à baixa viabilidade de bactérias probióticas em produtos lácteos fermentados incluindo acidez titulável, pH, peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio dissolvido, temperatura de armazenamento e a concentração de ácido lático e acético (TC, 2017; ANAL; SINGH, 2007).

Em virtude da baixa estabilidade e fácil degradação dos probióticos por fatores ambientais e de processamento, além do crescente interesse na busca de novas matrizes alimentares, com características físico-químicas distintas, a técnica de microencapsulação surge como uma alternativa para a produção de microcápsulas com alta eficiência para aplicação em alimentos (GRANATO et al., 2019; PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016).

A microencapsulação de células dentro de uma matriz encapsulante surgiu como uma alternativa para proteção de probióticos, fornecendo um microambiente propício para o microrganismo, aumentando sua viabilidade e possibilitando a liberação controlada de células no trato intestinal. A tecnologia de encapsulação é uma das maneiras mais eficazes de proteger os probióticos durante o processamento e armazenamento subsequente (OZYURT; OTLES, 2014).

A técnica de secagem por atomização é um dos processos mais utilizados na indústria, tendo em vista a alta reprodutibilidade e baixo custo. Esse método consiste na atomização de um líquido ou de uma suspensão na câmara de secagem, levando a formação de partículas secas ao final do processo (MARTÍN et al., 2015). A fim de minimizar a morte celular, os efeitos dos parâmetros de secagem devem ser bem compreendidos (entrada e saída de ar, vazão de ar, umidade relativa, tempo de permanência, agentes protetores) com intuito de otimizar o processo e assegurar a sobrevivência das bactérias (DAS et al., 2014).

Outro fator de extrema importância na garantia da viabilidade da bactéria encapsulada é a escolha do material de parede. Sistemas baseados no uso de açúcares, polissacarídeos, proteínas ou a combinação deles, são utilizados durante o processo de secagem por atomização, a fim de otimizar a proteção de microrganismos contra ambientes adversos (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016). O soro de queijo apesar de ser o principal poluente da indústria de laticínios, possui um alto valor nutricional contendo proteínas de alto valor biológico, e por conta das suas características tem demonstrado bons resultados na microencapsulação de probióticos (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; ECKERT et al., 2017). Considerando que um dos recentes esforços na área de alimentos é o uso de matrizes encapsulantes funcionais, o uso de prebióticos como a inulina, surge como um grande apelo na formação de microcápsulas simbióticas (ZABOT et al., 2016).

Dessa forma, produtos alimentares inovadores com propriedades sensoriais melhoradas têm atraído o interesse da indústria de alimentos, especialmente em função da crescente demanda por alimentos seguros e funcionais (YERLIKAYA, 2014). Para isso, garantir a viabilidade dos probióticos nessas matrizes alimentares depende em grande parte da composição nutricional e físico-química, dos processos de fabricação e das condições de

estocagem (MIN et al., 2017). Portanto, torna-se indispensável o domínio sobre as tecnologias empregadas na sua produção sendo um grande desafio para os setores da indústria e da ciência (HOMAYOUNI, et al., 2012).

Alguns trabalhos relatam a aplicação de microcápsulas contendo bactérias probióticas em matrizes alimentares utilizando diversos materiais de parede como extratos vegetais, alginato e óleos (ENDO, TERÄSJÄRVI, & SALMINEN, 2014; PRASANNA & CHARALAMPOPOULOS, 2018; AMAKIRI &THANTSHA, 2016). No entanto, não há estudos que referem o uso de microcápsula simbiótica contendo soro de queijo e inulina como material encapsulante aplicada em matrizes alimentares apresentando como características a alta viabilidade celular quando submetida à passagem pelo trato gastrointestinal simulado e alta resistência térmica.

A presente pesquisa faz parte do projeto institucional da Universidade Federal de Pelotas (UFPel): *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7: microencapsulação e aplicação de microcápsulas da bactéria em matriz alimentar (COCEPE-10247). A bactéria utilizada pertence à coleção de bactérias do Laboratório de Nutrigenômica e Metabologia da Faculdade de Nutrição (UFPel). *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 foi isolado de queijo ricota e está depositado no GenBank (KF879126). A execução da pesquisa foi desenvolvida no Laboratório de Tecnologia de Bioprocessos pertencente ao Centro de Desenvolvimento Tecnológico (CDTec)-UFPel.

Os resultados obtidos estão apresentados na forma de capítulos os quais abordam: Capítulo I - Microencapsulação de *L. lactis* R7 utilizando soro de queijo e inulina por *spray drying*; Capítulo II e Apêndice – conteúdo sigiloso.

2 Revisão Bibliográfica

2.1 Bactérias Ácido Láticas

Bactérias ácido láticas (BAL) são um grupo de microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos, catalase negativos e tolerantes aos baixos pH. Possuem temperaturas de crescimento entre 30 e 42 °C para espécies mesófilas e termófilas, respectivamente, podendo apresentar-se na forma de cocos ou bacilos (SABO et al., 2014). Os gêneros que compõem esse grupo de microrganismos são *Carnobacterium, Oenococcus, Enterococcus, Pediococcus, Lactococcus, Streptococcus, Lactobacillus, Bifidobacterium, Tetragenococcus,*

Lactosphaera, Vagococcus, Leuconostoc e Weissella (LIESE, 2016).

A maioria das BAL é de origem alimentar e, são geralmente reconhecidas como seguras para o consumo humano (*Generally Recognized as Safe* - GRA) (KORCZ; KERÉNYI; VARGA, 2018). Além disso, estão entre os microrganismos mais importantes na fermentação de alimentos, assim como na melhora dos aspectos tecnológicos e sensoriais dos produtos (MOKOENA, 2017). Destacam-se não apenas por serem culturas iniciadoras em processos fermentativos, como pela capacidade de formação de cor, aroma e produção de ácidos orgânicos, principalmente o ácido lático que contribui para melhorar as propriedades sensoriais, além de prolongar a vida útil e aumentar a segurança microbiana do produto final. Sua aplicação inclui melhorar a preservação, as características organolépticas e o valor nutricional de uma grande variedade de alimentos e bebidas (LEE et al., 2017).

Considerando o processo de fermentação, algumas BAL realizam fermentação homolática, ou seja, sob condições de excesso de glicose e oxigênio limitado, catabolizam glicose a alto rendimento de ácido lático como o único produto final. O equilíbrio redox intracelular é mantido por meio da oxidação de nicotinamida adenina dinucleotídeo hidreto (NADH), concomitante com piruvato para redução ao ácido láctico. Este processo produz dois moles de adenosina trifosfato (ATP) por mole de glicose consumido. Realizam fermentação homolática, principalmente os representantes de *Lactococcus, Enterococcus, Streptococcus, Pediococcus e Lactobacillus* do grupo I e II (LIESE, 2016).

A fermentação heterolática ocorre pela via das pentoses fosfato e é caracterizada pela inicial desidrogenação seguida pela formação de 6-fosfogluconato e depois descarboxilação para produzir gás carbônico (CO_2). A pentose-5-fosfato resultante é clivada em gliceraldeído fosfato (GAP) e acetilfosfato (AcP). GAP é posteriormente metabolizado em lactato como na fermentação homolática, com o AcP reduzido a etanol via intermediários acetil-CoA e acetaldeído. Consequentemente, a fermentação heterolática resulta em quantidades significativas de outros produtos finais, como etanol, acetato e CO_2 em adição ao ácido láctico. BAL heterofermentativas incluem *Leuconostoc, Oenococcus, Weissella e Lactobacillus* do grupo III (LIESE, 2016).

Cabe salientar que algumas BAL podem causar efeitos benéficos ao hospedeiro, incluindo a regulação da atividade intestinal e melhora do bem-estar, exercendo efeito antagonista a patógenos gastrintestinais, alteração da resposta imune e redução do colesterol sérico e, por isso, podem ser caracterizadas com potencial probiótico. Ainda ressalta-se que as BAL são um grupo majoritário de microrganismos que possuem potencial probiótico, no entanto, alguns fungos como *Sacharomyces spp. e Aspergillus spp.* também podem ser utilizados com características probióticas (ZANNINI et al., 2016; SARAO; ARORA, 2017).

2.1.1 Lactococcus lactis (L. lactis)

Lactococcus lactis é comumente associado a produtos lácteos, no entanto esse microrganismo foi originalmente isolado de plantas em que se acredita que estava dormente, o qual somente foi ativado quando ingerido por ruminantes, multiplicando-se após atingir o trato gastrintestinal (TGI). Originário do gênero *Streptococcus* e reclassificado em *Lactococcus* em 1985, *L. lactis* é dividido em três subespécies: *L. lactis* subsp. *lactis, L. lactis* subsp. *cremoris, L. lactis* subsp. *hordniae*. Fenotipicamente é classificado como gram-positivo, esférico, homolático, não esporulado e anaeróbio facultativo (SONG et al., 2017).

Lactococcus tem um papel importante como cultura iniciadora (ou cultura mista) em queijos e outros produtos lácteos fermentados, devido sua alta capacidade de proteólise e acidificação. São categorizados como bactérias homofermentativas com formação de ácido lático como produto principal, além de apresentar capacidade de produção de nisina. Duas estirpes de *Lactococcus* são geralmente as mais utilizadas na indústria de alimentos, que são *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* e *Lactococcus lactis* subsp*. cremoris.* Cabe salientar que suas propriedades funcionais, como a sobrevivência no TGI, bem como a capacidade de aderência à superfície da mucosa, são altamente dependentes da cepa (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016).

Lactococcus lactis tem sido usado na fermentação de alimentos, especialmente em queijos, iogurtes, chucrutes e produtos similares, tornando-o reconhecido por ser um microrganismo do tipo GRAS, ou seja, seguro para o consumo (PAPAGIANNI; AVRAMIDIS, 2011). Além disso, tem sido considerado uma fábrica de células de expressão, por ser um organismo de fácil manuseio e entendimento genético o que resultou no desenvolvimento de vários sistemas de

expressão gênica (RAJ PANDEYA; HONG, 2012). Com ênfase na engenharia metabólica, *L. lactis* demonstrou capacidade de produção de compostos como vitaminas B, especialmente folato (B9), riboflavona (B2) (SONG et al., 2017) e ácido linoleico conjugado (CLA) (ANDRADE et al., 2012), dentre outros compostos de grande valor bioeconômico especialmente para a indústria de alimentícia e farmacêutica.

Cunha (2017) isolou *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis* R7) de queijo ricota, caracterizando e identificando molecularmente o microrganismo, o qual foi depositado no GenBank sob número de acesso KF879126. Esse isolado apresentou potencial probiótico *in vitro* quanto a tolerância ao pH ácido, sais biliares e passagem ao TGI simulado. Além disso, foi sensível aos antimicrobianos clindamicina, cloranfenicol, meropen, eritromicina, vancomicina e penicilina, não apresentando atividade hemolítica, bem como DNAse e gelatinase negativa.

Jaskuski et al. (2019) investigaram a ação do mesmo isolado (*L. lactis* R7) na proteção contra o câncer de cólon retal em ratos da linhagem *Wistar*. Para isso, os animais receberam doses subcutâneas de 1,2 dimetilhidrazina (DMH) a fim de induzir o câncer associado a dieta hipercalórica na promoção do ganho de peso. *L. lactis* R7 foi administrado por via oral com intuito de prevenir ou tratar a doença induzida nos roedores. Após 20 semanas, foram analisados histologicamente os tecidos dos animais, sendo avaliados o peso ponderal, consumo de alimentos, parâmetros hematológicos e bioquímicos, alteração do estado redox. *L. lactis* R7 demonstrou potencial probiótico, tendo em vista que, quando administrado associado ao DMH e dieta hipercalórica, a maioria dos animais apresentou atipias benignas das criptas intestinais e grande infiltrado de linfócitos demonstrando melhora da resposta imune do hospedeiro. Além disso, o isolado apresentou capacidade de estabilizar o ganho de peso e reduzir a adiposidade abdominal, quando comparado ao grupo controle.

2.2 Probióticos

A história moderna dos probióticos começa no início de 1900 com os estudos pioneiros de Elie Metchnikoff, um cientista russo que investigou os possíveis efeitos dos microrganismos envolvidos em processos de fermentação na saúde humana. Ele associou maior longevidade aos indivíduos que consumiam

regularmente produtos fermentados como o iogurte. Mais tarde, sugeriu que que *Lactobacillus* poderiam neutralizar os efeitos putrefativos do metabolismo gastrointestinal que contribui para a doença e o envelhecimento (GASBARRINI; BONVICINI, 2016).

Nos últimos anos, um número crescente de bactérias tem sido investigado por seu potencial probiótico, uma vez que conferem benefícios para o hospedeiro quando administradas em quantidades adequadas. Os efeitos benéficos dos probióticos dependem da especificidade da cepa, da concentração e da viabilidade das bactérias ingeridas (HUANG et al., 2017). De fato, os probióticos segundo a *World Health Organization* (WHO) são definidos como culturas únicas ou mistas de microrganismos vivos que quando aplicados ao homem ou animal afetam beneficamente o hospedeiro ao melhorar as propriedades da microbiota nativa (ARAYA et al., 2002).

A maioria dos probióticos é relacionado aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium.* No entanto, para considerar o uso de diferentes cepas como probióticos, deve-se considerar que esses microrganismos, sobrevivam ao trato digestivo superior e sejam capazes de sobreviver e se multiplicarem no intestino na presença de sais biliares (SARAO; ARORA, 2017).

2.2.1 Mecanismos de Ação

2.2.1.1 Modulação da imunidade humoral mediada por células

Embora o mecanismo completo de ação dos probióticos no organismo humano não seja totalmente elucidado, a manipulação da microbiota intestinal para aumentar a concentração de microrganismos benéficos, ainda desperta interesse pelos pesquisadores. A capacidade de modulação da imunidade humoral mediada por células é demonstrada por alguns probióticos pela capacidade de aumentar a fagocitose ou pela atividade natural das células *killer* em interagir diretamente com células dendríticas. Alguns também demonstram a capacidade de regular positivamente a secreção de anticorpos traduzindo em melhores defesas contra patógenos e aumentando as respostas às vacinas. Estirpes probióticas podem aumentar os níveis de citocinas anti-inflamatórias como o fator de necrose tumoral (TNF -α) reduzindo o câncer de cólon e colite. A arquitetura da superfície celular como fímbrias, cápsulas e estruturas de superfície

expressas por alguns probióticos é um fator determinante para várias dessas atividades (SANDERS et al., 2019).

2.2.1.2 Produção de Ácidos Orgânicos

Espécies probióticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* produzem ácidos lático e acético como produtos finais do metabolismo de carboidratos. Esses ácidos orgânicos quando produzidos *in situ* podem diminuir o pH do lúmen intestinal e desencorajar o crescimento de patógenos. *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* não produzem butirato, porém por meio da alimentação cruzada de outros microrganismos (*Faecalibacterium*) os níveis de butirato e outros ácidos orgânicos de cadeia curta podem aumentar influenciando potencialmente muitos aspectos fisiológicos, incluindo o fenótipo cardiometabólico. Este fenótipo pode ser derivado do aumento da produção de butirato, correlacionando-se com a resposta insulínica melhorada (STEFAN et al., 2016).

2.2.1.3 Interação com a microbiota intestinal

Estirpes probióticas podem interagir com a microbiota intestinal por meio da competição por nutrientes, antagonismo e alimentação cruzada. Muitos probióticos são antagônicos a outros microrganismos, em parte devido ao metabolismo sacarolítico, que produz ácidos orgânicos, mas também pela produção de bacteriocinas. Esses compostos podem ser ativos contra patógenos em muitos locais, incluindo o trato urinário humano e o intestino de humanos e animais (HEGARTY et al., 2019).

2.2.1.4 Melhora na função de barreira

Uma maneira pela qual cepas probióticas podem melhorar a função de barreira é por meio da regulação positiva da expressão dos genes de secreção de muco, reduzindo assim a ligação das células epiteliais. Além desse mecanismo, algumas linhagens celulares demonstram aumentar a expressão de proteínas da “*tight junction*” (SANDERS et al., 2019).

2.2.1.5 Produção de pequenas moléculas

Pequenas moléculas produzidas por certos probióticos com diferentes efeitos sobre o hospedeiro e sua microbiota já foram descritas. A produção de neuroquímicos como ocitocina, ácido gama-aminobutírico, serotonina, triptamina, noradrenalina, dopamina e acetilcolina, os quais apresentam efeitos na função cerebral (REID, 2019).

2.2.1.6 Produção de Enzimas

Enzimas microbianas como β-galactosidase e hidrolase de sais biliares são produzidas e entregues por algumas cepas probióticas melhorando a digestão da lactose e o perfil lipídico no sangue em humanos, respectivamente (SANDERS et al., 2019).

Segundo as diretrizes e informações da Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) (ARAYA et al., 2002), há a necessidade de que as cepas probióticas permaneçam intactas no trato intestinal superior para garantir os efeitos de promoção da saúde. Para isso, quando veiculadas em matrizes alimentares devem manter sua viabilidade para exercerem suas funções fisiológicas positivas no organismo (TERPOU et al., 2019). Além disso, cabe salientar que os benefícios essenciais para a saúde podem ser atribuídos a uma espécie, em vez de cepas específicas. Alguns países europeus (Itália e Canadá) incorporaram uma lista de espécies consideradas probióticas em suas diretrizes regulatórias. Em contraste, na maior parte da Europa os alimentos não podem mencionar o termo “probiótico” no rótulo (MARCO et al., 2017). Ainda, nesse documento contendo as diretrizes, as autoridades regulatórias tinham como interesse proteger os consumidores contra interesses competitivos das empresas (HILL et al., 2014).

Atualmente, a regulamentação no Brasil para probióticos está em uma fase de transição, em que um novo marco normativo está sendo reformulado, centrado na comprovação científica da eficácia do benefício no produto (ANVISA, 2017).

2.3 Para-Probióticos

Os para-probióticos, também conhecidos como “probióticos não viáveis ou probióticos inativados”, refere-se às células microbianas inativadas, as quais

quando administradas em quantidades suficientes, conferem benefícios ao consumidor (AGUILAR-TOALÁ et al., 2018).

Apesar dos benefícios dos probióticos comprovados para a saúde, células microbianas não viáveis, ou frações inativadas podem ter vantagens, reduzindo o risco de translocação microbiana ou infecção demonstrada por alguns probióticos. A inativação celular bacteriana pode ser obtida por condições físicas (perturbação mecânica, tratamento térmico ou métodos de irradiação ultravioleta (UV), alta pressão hidrostática e liofilização) ou químicas (desativação ácida) que podem alterar as estruturas celulares microbianas ou suas funções fisiológicas e, dessa forma, as bactérias tornam-se incapazes de multiplicarem-se e, assim, retêm os efeitos benéficos à saúde que a sua forma viável fornece (ALMADA et al., 2016).

As células inativadas podem liberar componentes bacterianos com importantes efeitos imunomodulatórios e com propriedades antagônicas contra patógenos. Diferentes componentes bacterianos como ácidos lipoteicóicos, peptidioglicanos ou exopolissacarídeos estão, supostamente, envolvidos em mecanismos responsáveis por exercer efeitos benéficos à saúde do hospedeiro (PIQUÉ; BERLANGA; MIÑANA-GALBIS, 2019)

Kanauchi; Andoh (2018) descrevem o uso de para-probióticos com ação coadjuvante no tratamento e profilaxia de infecções virais, em função de manterem sua atividade imunomodulatória além da sua viabilidade.

A aplicação de para-probióticos em alimentos pode oferecer certas vantagens em relação aos probióticos como menor ou nenhuma interação com outros componentes dos produtos alimentares, que poderiam diretamente refletir na vida útil do produto; maior facilidade de processamento como a possibilidade de ser adicionado antes do tratamento térmico com manutenção das suas propriedades exigidas para os benefícios à saúde pretendidos; simplicidade de armazenamento e transporte, o que pode resultar em maior facilidade para administração como suplementos para indivíduos imunocomprometidos (DE ALMADA et al., 2016).

2.4 Pós-bióticos

Recentes pesquisas sugerem que produtos bacterianos, na ausência de organismos viáveis, podem ter efeitos semelhantes nas vias de sinalização. Esses produtos bacterianos são amplamente caracterizados como pós-bióticos

e podem ser definidos como produtos bacterianos não viáveis ou subprodutos metabólicos de microrganismos probióticos que possuem atividade biológica no hospedeiro. Em geral, os pós-bióticos incluem bacteriocinas, ácidos orgânicos, etanol, diacetil, acetaldeídos e peróxido de hidrogênio. Além desses, certos probióticos inativados pelo calor, também podem reter estruturas bacterianas importantes que podem exercer atividade biológica no hospedeiro. Os pós-bióticos não são tóxicos, nem patogênicos e resistem à hidrólise por enzimas de mamíferos (GEORGE KERRY et al., 2018). A Figura 1 apresenta alguns pós-bióticos e sua ação sistêmica no hospedeiro.

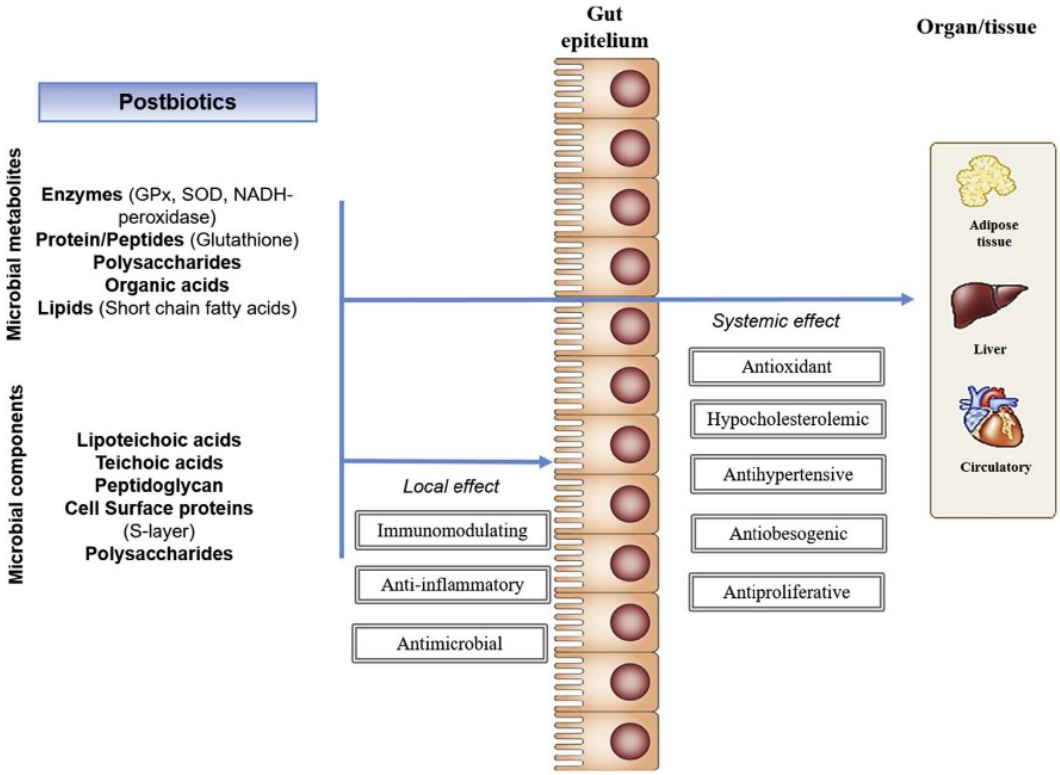

Figura 1 Ação de alguns pós-bióticos no hospedeiro.
Fonte: AGUILAR-TOALÁ et al. (2018).

2.5 Prebióticos

O termo prebiótico foi introduzido em 1995 por Glen Gibson e Marcel Roberfroid e, foi definido como um ingrediente alimentar não digerível que afeta beneficamente o hospedeiro estimulando seletivamente o crescimento e/ou atividade de um número limitado de bactérias no cólon e, portanto, melhorando a saúde do hospedeiro (HUTKINS et al., 2016).

Os carboidratos não-digeríveis podem ser encontrados naturalmente em plantas. Por exemplo, alimentos como aspargos, beterraba, alho, chicória, cebola, alcachofra, trigo, mel dentre outras fontes. Frequentemente os prebióticos são chamados de carboidratos de baixo peso molecular não digeridos por enzimas digestivas humanas e regulam positivamente a composição e atividade da microbiota intestinal. No entanto, outros compostos como ácido linoleico, ácido graxo poli-insaturado, compostos fenólicos e fitoquímicos também podem ser propostos como candidatos a prebióticos (FARIAS; ARAÚJO; NERI-NUMA, 2019).

Os prebióticos podem ser separados em três grupos principais: (I) oligossacarídeos de polióis (lactulose, xilitol, manitol, lactiol); (II) Frutooligossacarídeos (FOS), galactooligossacarídeos (GOS), inulina, entre outros; (III) Fibras (celulose, dextrina, pectina e β-glucana (MOHANTY et al., 2018).

Prebióticos como os frutooligossacarídeos (FOS) e a inulina são resistentes ao suco gástrico e pancreático e quando presentes no intestino grosso, além do papel seletivo sobre *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* influenciam diversos aspectos da função intestinal, por meio da fermentação. Os ácidos graxos de cadeia curta são um dos principais produtos da decomposição prebiótica, mas ainda não foi identificado um padrão característico de fermentação. Assim, por meio da estimulação do crescimento bacteriano e da fermentação, os prebióticos afetam o hábito intestinal e são levemente laxativos (SARAO; ARORA, 2017).

Alguns critérios são utilizados para reconhecer um composto como prebiótico: (I) resistência à acidez gástrica, à hidrólise por enzimas de mamíferos e à adsorção ao TGI, (II) fermentação pela microbiota intestinal e (III) estimulação seletiva do crescimento e/ou atividade dessas bactérias intestinais que contribuem para a saúde e o bem-estar.

Devido às características tecnológicas, alguns prebióticos podem melhorar a qualidade final de produtos alimentícios com relação às propriedades sensoriais, textura e características físico-químicas, na adição de fibras e na substituição parcial de açúcares e gorduras. Por esses motivos, esses compostos estão cada vez mais aplicados na indústria de alimentos,

particularmente com o objetivo de substituir e/ou combinar ingredientes clássicos com oligossacarídeos (FARIAS; ARAÚJO; NERI-NUMA, 2019).

Além disso, os prebióticos têm propriedades anticâncer ao apoiar a inibição do crescimento de adenomas e de carcinomas no intestino e de reduzir fatores de risco envolvidos nas doenças colorretais. Soma-se isso a capacidade de influenciar positivamente na absorção de minerais, aumentando a absorção de cálcio e magnésio. No entanto a quantidade e o tipo de prebióticos têm um impacto profundo na composição e atividade da comunidade microbiana benéfica (HILL et al., 2017).

2.6 Inulina

Entre os prebióticos, os frutanos do tipo inulina (Figura 2) têm sido extensivamente estudados e, portanto, adquiriram o *status* de prebiótico modelo.

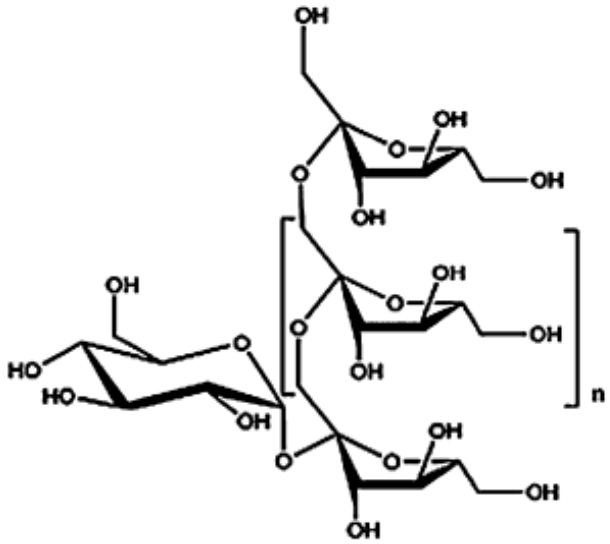

Figura 2 Estrutura química da cadeia de inulina.
Fonte: Adaptado de (SHOAIB et al., 2016).

A inulina pertence a um grupo de frutanos que ocorre naturalmente em plantas como um carboidrato de armazenamento. É um polímero de ß(1-2) D-frutose constituindo cadeias de diferentes comprimentos, cada uma delas com uma unidade terminal de glicose. Entre as fontes naturais de inulina, a chicória industrial é uma das mais importantes devido ao seu teor de inulina com alto grau de polimerização (BEIRÃO-DA-COSTA et al., 2013).

A inulina é um pó branco com partículas finas e de sabor neutro, não oferecendo sabor residual. Apresenta viscosidade relativamente baixa e

propriedades gelificantes. Quando dissolvida em meio aquoso resulta na formação de uma estrutura cremosa branca que pode ser facilmente adicionada em alimentos como substituto da gordura (SHOAIB et al., 2016). Algumas das propriedades da inulina no TGI incluem estimular a fermentação microbiana, diminuindo a absorção de gordura e colesterol e reduzindo o pH do lúmen a partir da produção de ácidos orgânicos. Portanto, possui um efeito direto na redução de distúrbios intestinais, constipação, hiperglicemia e câncer (FAYED et al., 2019).

Soma-se a isso, a melhora do equilíbrio e trânsito intestinal, aumento da integridade e função da barreira mucosa intestinal, melhora da imunidade do hospedeiro, aumento da produção de ácidos graxos de cadeia curta e redução associada na interação com patógenos oportunistas na mucosa entérica e melhora no metabolismo lipídico (KORCZ; KERÉNYI; VARGA, 2018).

Com relação às propriedades nutricionais e benefícios à saúde, a inulina apresenta como característica o papel de fibra dietética, considerada como ingrediente chave em alimentos enriquecidos com fibras na melhoria da saúde humana. Apresenta características básicas como não sofrer hidrólise pelas secreções gástricas e não ser absorvida no intestino delgado, sendo fermentável pela microbiota do intestino grosso. Possui baixo valor calórico em virtude de sua não-digestibilidade. Além disso, o uso nutricional da inulina fornece uma maneira favorável de estimular o equilíbrio microbiano, fornecendo um mecanismo de defesa contra o ataque e a translocação de patógenos, assim como na inibição de doenças do TGI (SHOAIB et al., 2016).

Além dos benefícios relatados, a baixa capacidade de hidrólise permite sugerir que a inulina é adequada para a proteção de compostos bioativos suscetíveis à degradação ao longo do trato digestório humano (CASTEL; RUBIOLO; CARRARA, 2018).

2.7 Simbióticos

Simbióticos são considerados como a fusão de produtos probióticos e prebióticos (Tabela 1) que auxiliam no aumento da sobrevivência e na permanência de microrganismos vivos no intestino. Há evidências científicas crescentes de que a relação simbiótica, entre prebióticos e probióticos, contribui significativamente para a saúde. Pesquisas nessa área estão atualmente

focadas no desenvolvimento de novos alimentos promotores de saúde, bem como na seleção de culturas que demonstrem maior capacidade de colonizar o intestino humano juntamente com a sua capacidade de digerir novas formas de prebióticos. Sendo assim, há grande interesse de estudos que visem novas combinações de probióticos e de prebióticos para explorar novas possibilidades de melhorar os benefícios nutricionais e clínicos para a saúde (GEORGE KERRY et al., 2018).

Tabela 1 Simbióticos comuns e fontes microbianas

Simbióticos	
Prebióticos	Probióticos
Fruto-oligossacarídeos	*Bifidobacterium sp., Bacteroides fragilis, Peptostreptococcaceae, Klebsiellae Bifidobacterium sp.*
Inulina	*Bifidobacterium animalis, Lactobacillus acidophilus, Lactobacillus paracasei*
Isomaltose	*Bifidobacterium sp., Bacteroides fragilis*
Lactosucralose	*Zymomonas mobilis*
Galacto-oligossacarídeos	*Bifidobacterium longum, B. catenulatum*
Arabinoxilana	*Bifidobacterium sp.*

Fonte: Adaptado de GEORGE KERRY et al. (2018)

A administração de simbióticos pode contribuir para a normalização da disbiose, além de atuar em mecanismos na melhora da resposta glicêmica. No estudo de Morshedi; Asl; Hosseinifard (2020) foi investigado o uso simbiótico de *Lactobacillus plantarum* associado à inulina em roedores diabéticos. Os autores referem que os suplementos usados em associação foram capazes de aumentar a capacidade antioxidante significativamente, quando comparados ao uso isolado. Além disso, houve melhora na composição da microbiota intestinal, no estresse oxidativo e nos distúrbios neuropsicológicos de ratos diabéticos.

Evidências científicas demonstram que microcápsulas simbióticas são mais eficazes quando expostas ao TGI, no entanto, há poucos estudos demonstrando sua eficiência quando aplicadas em produtos alimentícios, assim como avaliando a sua interação com a matriz alimentar e a viabilidade do probiótico ao armazenamento (CRISTINA et al., 2018).

2.8 Encapsulação de probióticos

A encapsulação é um processo utilizado para o aprisionamento de pequenas partículas líquidas, sólidas ou gasosas em uma ou mais matrizes poliméricas. Como é possível observar na Figura 3, no centro da partícula está presente o material do núcleo e os polímeros compõem o revestimento externo, chamados de material de parede ou solução encapsulante (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016).

Figura 3 Representação esquemática da seção transversal de uma microcápsula.

A encapsulação tem como principal objetivo a proteção do material presente no núcleo dos fatores ambientais como luz, umidade, temperatura e oxigênio, extendendo o prazo de validade, além de liberação controlada e estabilidade do processo (SARAO; ARORA, 2017).

As microcápsulas apresentam várias vantagens interessantes como a proteção de materiais sensíveis, melhorando a processabilidade desses componentes, a capacidade de dispersão, fluidez, aumento do tempo de armazenamento, evitando reações de oxidação e de desidratação. Dessa forma, o processo é seguro para o manuseio conveniente de materiais tóxicos, imobilização de microrganismos e enzimas. A liberação do conteúdo da micropartícula de forma controlada, pode ser desencadeada por forças de cisalhamento, solubilização, aquecimento, alteração do pH e ação enzimática.

Essa tecnologia tem diferentes aplicações nas indústrias alimentícia, biomédica, farmacêutica e cosmética, assim como na agricultura (DAS et al., 2014).

Segundo González-Ferrero et al. (2020) a microencapsulação é um dos processos mais eficientes, não apenas para manter a viabilidade durante o processamento e o armazenamento de bactérias probióticas, mas também de garantir sua viabilidade no intestino. Diferentes BAL foram encapsuladas em diferentes polímeros e com diferentes objetivos, como por exemplo, *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 que aumentou significativamente a viabilidade ao armazenamento após 18 meses mantidos congelados em nitrogênio líquido (KAVITAKE et al., 2018). *Lactobacillus acidophilus* foi encapsulado por *spray drying* utlizando diferentes polissacarídeos e garantiu o aumento da proteção térmica e sobrevivência ao TGI (NUNES et al., 2018). *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* LM0230 foi microencapsulado em partículas de hidrogel e demonstrou maior viabilidade ao armazenamento quando comparado à célula livre (YEUNG et al., 2016).

Deve-se considerar que vários fatores afetam a microencapsulação e que podem ser superados selecionando o método de encapsulação adequado, o material de revestimento e as condições do processo (Figura 4).

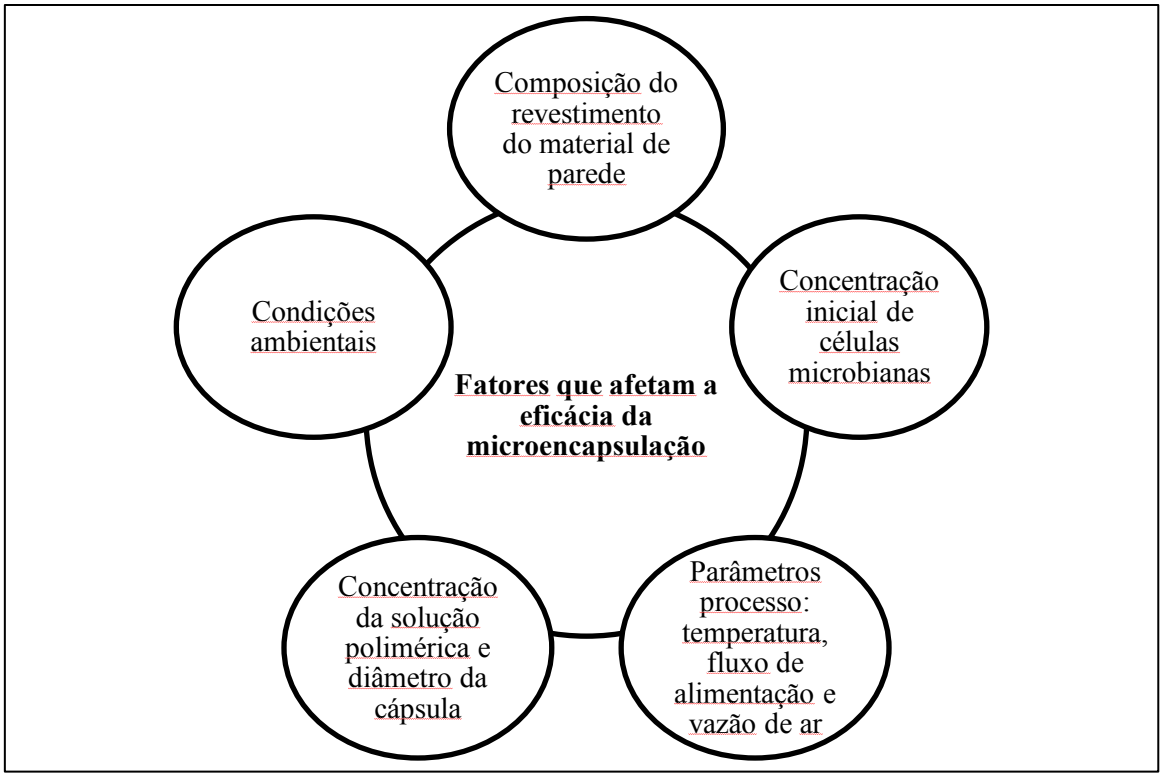

Figura 4 Representação de fatores que afetam a eficácia da microencapsulação
Fonte: Adaptado de KAVITAKE et al. (2018).

2.9 Métodos de Encapsulação

A encapsulação é dividida em três classes: métodos químicos, físicos e físico-químicos. Os métodos químicos incluem suspensão, dispersão, emulsão e polimerização; os métodos físicos mecânicos incluem a secagem por atomização (*spray drying*), o revestimento em leito fluidizado e a encapsulação eletrostática; os físico-químicos como CO_2 supercrítico e encapsulamento sol-gel (DAS et al., 2014). Tendo em vista as diferentes metodologias aplicadas na técnica de encapsulação, deve-se considerar fatores como tamanho da partícula, propriedades físico-químicas do núcleo e do material de parede, aplicação da microcápsula, liberação do conteúdo, dentre outros (MARTÍN et al., 2015).

Como demonstrado na Figura 5, a tecnologia de encapsulação é usualmente empregada em três etapas. A primeira etapa consiste em incorporar um componente bioativo em uma matriz polimérica que pode ser líquida ou sólida. No caso do núcleo ser líquido, a incorporação será uma dissolução ou uma dispersão na matriz, enquanto se o núcleo for sólido será uma aglomeração ou adsorção. Para a segunda etapa, a matriz líquida está dispersa enquanto a

solução é pulverizada em uma matriz sólida. A última etapa consiste na estabilização por um produto químico (polimerização), físico-química (gelificação) ou física (processo de evaporação, solidificação e coalescência) (BURGAIN et al., 2011).

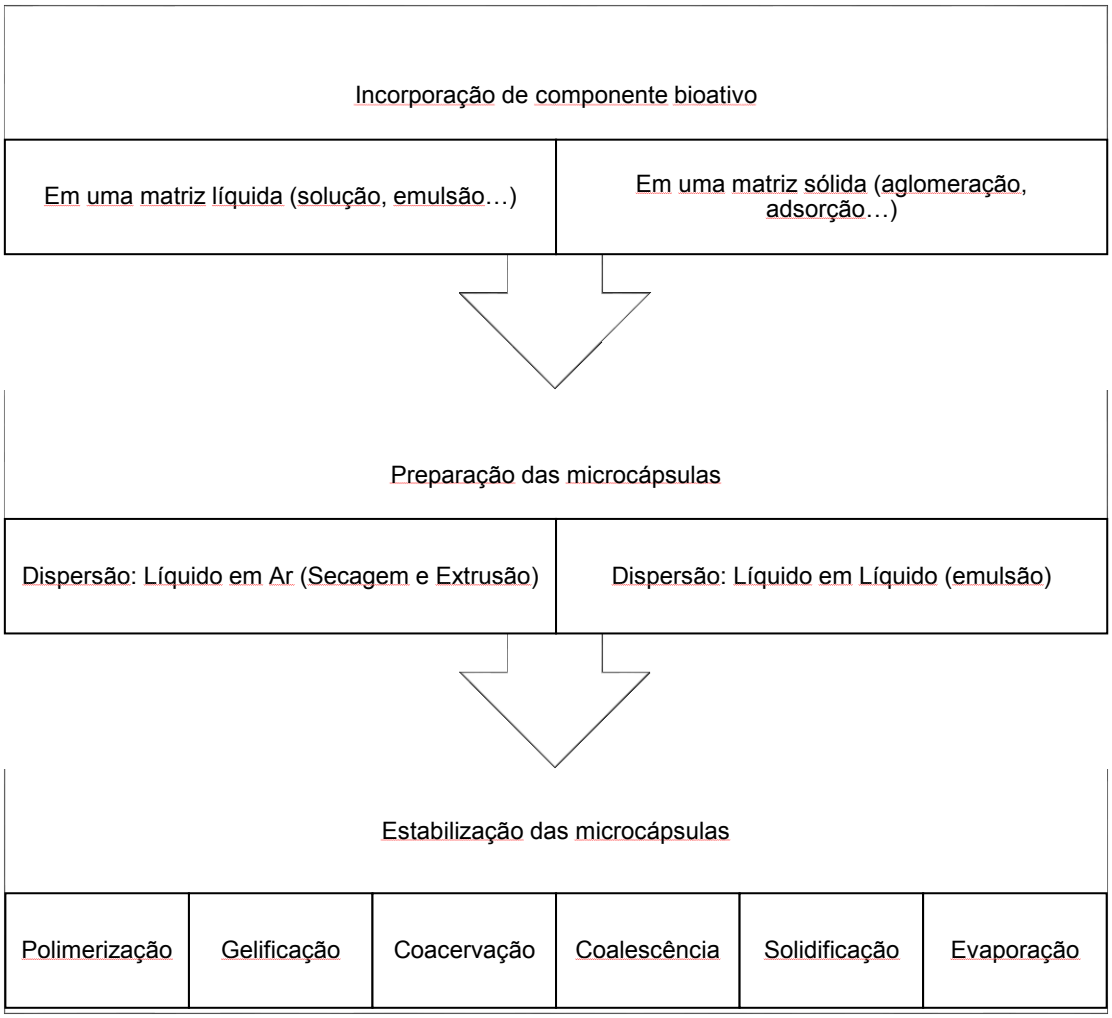

Figura 5 Descrição geral dos passos para produção de microcápsulas.
Fonte: Adaptado de BURGAIN et al. (2011).

2.9.1 Emulsificação

O princípio da emulsão é baseado na relação entre a fase contínua (geralmente um óleo vegetal) e uma fase descontínua (solução com células vivas e um hidrocolóide), além da adição de um agente emulsionante ou tensoativo. Para encapsulamento numa emulsão, um emulsionante e surfactante são necessários. Um agente de solidificação (cloreto de cálcio) é então adicionado à emulsão. Técnicas de filtração são comumente utilizadas para a separação das

cápsulas ao final do processo. O método possui algumas vantagens como aplicação em processos industriais e alta taxa de sobrevivência dos microrganismos, além disso, as partículas obtidas tem um diâmetro pequeno, mas a principal desvantagem é que fornece um grande intervalo de tamanho e forma (BURGAIN et al., 2011).

2.9.2 Coarcervação

A coacervação tem sido utilizada na microencapsulação de células microbianas e também na encapsulação de aromas, enzimas, dentre outros. Trata-se de uma separação de fases de um ou de vários hidrocolóides de uma solução polimérica em torno de um material do núcleo que está suspenso no mesmo meio reacional. O método de coacervação simples é dependente de condições como pH, força iônica, temperatura e estrutura das macromoléculas. A coacervação complexa depende principalmente do pH e a concentração de polímero (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016).

A grande desvantagem da coacervação está na dificuldade em obter cápsulas com tamanhos pequenos e, por isso, menos ênfase tem sido dada às técnicas de coacervação na produção de microcápsulas contendo probióticos (RAMOS et al., 2018).

2.9.3 Secagem por Atomização (*Spray Drying*)

A secagem por atomização é considerada um bom método de preservação a longo prazo para culturas probióticas. O conceito de secagem por atomização foi patenteado por Samuel Percy em 1872, e sua aplicação industrial na produção de leite e detergente iniciou na década de 1920. A velocidade de secagem e a capacidade de produção contínua são muito úteis para a secagem de grandes quantidades de culturas iniciadoras. Desde então, diversas pesquisas tem sido relatadas sobre a secagem por atomização de bactérias com baixas perdas de viabilidade celular, a fim de superar as dificuldades envolvidas no manuseio e manutenção das culturas líquidas (GODERSKA, 2012; ECKERT et al., 2017; NUNES et al., 2018).

O processo envolve a dispersão do material do núcleo, formando uma emulsão ou dispersão, seguida da homogeneização do líquido e, logo após, ocorre a atomização da mistura na câmara de secagem (Figura 6). Isso leva à

evaporação do solvente, quando as gotículas entram em contato com o ar quente sob condições controladas de temperatura e fluxo de ar (MARTÍN et al., 2015).

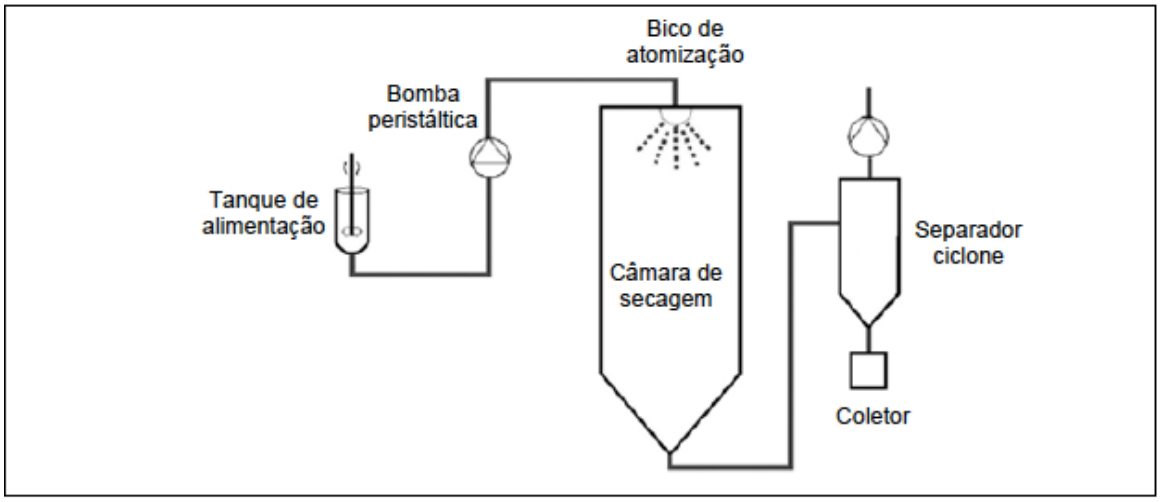

Figura 6 Ilustração da secagem por atomização.
Fonte: Adaptado de MARTÍN et al. (2015).

Cabe salientar que é um processo único em que as partículas são formadas ao mesmo tempo em que são secas. Portanto, muito adequado para a produção contínua de sólidos secos em pó a partir de matérias-primas líquidas. O produto final da secagem por atomização deve obedecer a padrões de qualidade precisos, relacionados à distribuição do tamanho de partícula, umidade residual, densidade aparente e formato de partícula. Tanto a taxa de evaporação da água quanto a temperatura das gotículas contendo as células microbianas têm um efeito significativo na sobrevivência durante a secagem (GODERSKA, 2012).

A fim de minimizar a morte celular, o efeito dos parâmetros de secagem deve ser bem compreendidos (entrada e saída de ar, vazão de ar, umidade relativa, tempo de permanência, agentes protetores) com intuito de otimizar o processo e assegurar a sobrevivência das bactérias. A secagem pode causar danos à parede celular e aos componentes celulares, especialmente membrana citoplasmática e proteínas, o que resulta em lesão e inativação celular afetando negativamente a produtividade e as características da cultura seca e, portanto, deve ser minimizada (GODERSKA, 2012; DAS et al., 2014).

2.10 Tipos de Materiais Encapsulantes

Sistemas baseados no uso de açúcares, proteínas ou a combinação destes, são utilizados durante o processo de secagem por atomização a fim de otimizar a proteção de microrganismos contra ambientes adversos. A desidratação celular pode provocar sérios efeitos nos fosfolipídios de membrana como a transformação do líquido cristalino em ácidos graxos em fase de gel, o que aumenta permeabilidade da membrana (DIANAWATI; MISHRA; SHAH, 2016).

Entre os polissacarídeos, o alginato é comumente utilizado na microencapsulação, pela sua natureza não tóxica, baixo custo, facilidade para desenvolver cápsulas fortes e por conta disso, tem sido muito utilizado na imobilização de probióticos (PEANPARKDEE; IWAMOTO; YAMAUCHI, 2016). É relatado que polissacarídeos estabilizam as cadeias de proteínas e membranas de macromoléculas celulares no estado seco, por meio de ligações de hidrogênio ao invés das moléculas de água (GODERSKA, 2012).

Proteínas do leite, como as proteínas do soro e caseína, podem ser utilizadas na microencapsulação de probióticos, produzindo um gel de alta densidade que pode proteger microrganismos. Considerando as condições do estômago, essas proteínas são capazes de proporcionar um valor de pH local mais alto dentro da matriz proteica da cápsula, provocado pela capacidade de tamponamento das proteínas. As proteínas são capazes de formar ligações intracelulares estáveis, que auxiliam na viabilidade celular durante o processo de microencapsulação (RAMOS et al., 2018).

Interações hidrofóbicas podem ocorrer entre a inulina e as proteínas do soro. A fração de caseína é composta por duas subunidades α_{s1} e α_{s2} ambas contendo regiões hidrofóbicas (α_{s1} com 3 regiões hidrofóbicas e α_{s2} com terminal C hidrofóbico), indicando que a fração da α-caseína é de natureza hidrofóbica. A inulina, por sua vez, forma uma α-hélice em solução e pode conter um centro hidrofóbico que a α-caseína pode se ligar. Outra interação possível é a formação de complexo carbonil-amino que ocorre entre a inulina e a α-caseína (SCHALLER-POVOLNY; SMITH., 2002). Ainda assim, mais estudos são necessários para elucidar as interações entre as duas moléculas.

2.10.1 Soro de queijo

O soro de queijo é um líquido verde-amarelado resultante da precipitação e remoção da caseína no processo de fabricação de queijo. A precipitação da caseína leva a formação de dois tipos de soro: ácido (pH 5,0) obtido após a fermentação ou adição de ácidos e o doce (pH=6,0-7,0) resultante da adição de enzimas proteolíticas como a quimosina. O tipo de leite utilizado na produção do queijo (vaca, ovelha, cabra, búfala ou outro mamífero) também influencia nas características do soro. A composição do soro bovino é de 70-80% de lactose, 9% de proteínas, 8-20% de minerais e outros componentes menores como peptídeos hidrolisados, lipídeos e bactérias (CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; TAVARES et al., 2014).

O soro de queijo é amplamente disponível, natural e seguro para ser administrado em alimentos (GRAS). É considerado uma matriz de alto valor biológico e com boas propriedades sensoriais. A estrutura anfifílica da maioria das proteínas do leite confere excelente propriedades de superfície. Sua capacidade de adsorver em interfaces de óleo/água permite a estabilização de emulsões a partir da influência da sua estrutura, flexibilidade, estado de agregação, pH, força iônica (particularmente de íons cálcio) e temperatura, sendo muito utilizado como agentes emulsionante promovendo estabilidade da superfície da partícula (LIVNEY, 2010).

Deve-se considerar como um aspecto importante na encapsulação o controle do conteúdo e a acessibilidade às enzimas digestivas e, consequentemente, a biodisponibilidade. A matriz formada pelas proteínas do leite, com ou sem componentes adicionais, podem formar uma barreira contra a difusão dos compostos encapsulados, evitando o acesso interno de enzimas gástricas (LIVNEY, 2010; TAVARES et al., 2014).

Cabe salientar que o soro de queijo se descartado de maneira incorreta, pode gerar uma carga altamente poluente devido a sua elevada composição orgânica, especialmente por seu conteúdo de lactose e proteína, além do volume representativo gerado. Atualmente, os processos de valorização do soro de queijo constituem a opção preferencial para tratar esse subproduto e uma das suas aplicações é o seu uso como agente encapsulante (ILHA et al., 2015).

Nesse contexto, *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foi microencapsulado pela técnica de *spray drying* utilizando como materiais encapsulantes o soro, retentado e o permeado do soro de queijo. Os resultados

mostraram que os soros lácteos protegeram as células bacterianas das altas temperaturas utilizadas no *spray drying*. Além disso, após 56 dias de armazenamento a 20 ^{0}C, todas as amostras de microcápsulas apresentaram contagem de células viáveis acima de 6 log UFC.g^{-1} (ECKERT et al., 2017). *Bifidobacterium* Bb-12 foi microencapsulado com soro de queijo e quando adicionado em uma sobremesa láctea, a contagem probiótica permaneceu acima de 7 log UFC.g^{-1} por seis semanas, demonstrando que o soro de queijo é um agente encapsulante promissor (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

2.10.2 Oligossacarídeos

Os oligossacarídeos não digeríveis são definidos como carboidratos naturais contendo de 3-10 unidades de monossacarídeos, lineares ou ramificados, conectados por ligações β e/ou 35α-glicosídicas. Carboidratos cujas unidades de monossacarídeos são frutose, galactose, glicose e/ou xilose são reconhecidas como as principais classes de oligossacarídeos funcionais disposníveis atualmente (ZHAO et al., 2017).

Os oligossacarídeos não digeríveis são carboidratos de baixo peso molecular de natureza intermediária entre açúcares simples e polissacarídeos. Podem ser obtidos por extração direta a partir de fontes naturais ou produzidos por processos químicos que hidrolisam polissacarídeos ou por síntese enzimática e química a partir de dissacarídeos (MUSSATO & MANCILHA, 2007). São aplicados para diversos fins como nutrientes, produtos farmacêuticos, alimentos para animais, cosméticos, agentes imunoestimulantes e compostos prebióticos que incorporam 13 classe de oligossacarídeos não digeridos produzidos comercialmente, mostrando funções bifidogênicas (ZHAO et al., 2017).

Oligossacarídeos como por exemplo, lactulose e inulina podem ser incorporados com probióticos (sistema simbiótico) para melhorar a viabilidade dos probióticos. No entanto, a estabilidade do processo de microrganismos probióticos nem sempre é ideal e, por conta disso, a microencapsulação pode ser aplicada para manter a viabilidade celular (IRAVANI; KORBEKANDI; MIRMOHAMMADI, 2015).

Oligossacarídeos possuem excelentes efeitos promotores de crescimento em microrganismos probióticos *in vitro.* Por exemplo, microencapsular

Bifidobacterium longum com uma mistura de oligossacarídeos de origem vegetal induziu acentuadamente a alta sobrevivência de probióticos sob exposição a ambientes adversos (LIAO et al., 2018).

Rajam; Anandharamakrishnan (2015) demonstraram em seu estudo que o uso de frutooligossacarídeos em combinação com proteínas isoladas do soro de queijo efetivamente melhoraram a eficiência de encapsulação de *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) utilizando a técnica de *spray drying*. Os autores sugerem que a composição do material de parede da microcápsula forma um revestimento protetor na parede celular da bactéria pela substituição parcial de sítios de moléculas de água durante a secagem, o que contribui para a prevenção da ruptura da membrana celular e aumento da viabilidade do microrganismo.

A inulina tem atraído muito a atenção de pesquisadores em virtude dos benefícios de natureza prebiótica, mas devido à sua baixa capacidade de hidrólise, quando presente no TGI, pode ser utilizada na preparação de microcápsulas resistentes às variações de pH (FERNANDES et al., 2016).

Contudo, as práticas de aplicação de oligossacarídeos como agentes encapsulantes para a microencapsulação na proteção de probióticos raramente foram realizados até o momento.

2.11 Principais Métodos de Avaliação de Microcápsulas

A eficiência da bactéria encapsulada pode ser avaliada por vários métodos, tais como viabilidade e estabilidade do microrganismo, morfologia da partícula, concentração de células viáveis, propriedades de difusão, eficiência de encapsulação, conteúdo de umidade, atividade de água, dentre outros. A viabilidade de microrganismos encapsulados pode ser mensurada inoculando as microcápsulas em soluções adequadas que promovam o rompimento da cápsula e exposição total da bactéria, seguida pela contagem padrão em placas utilizando ágar de Man, Rogosa and Sharpe (MRS). A superfície da microcápsula pode ser avaliada em relação ao diâmetro médio da partícula utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV). A estabilidade das bactérias encapsuladas pode ser determinada armazenando-as em diferentes temperaturas durante diferentes períodos de tempo e, em seguida, calculando o número de células viáveis. A eficiência de encapsulação confere uma ideia sobre

o percentual de células que mantiveram viabilidade após a processo (KAVITAKE et al., 2018).

Ainda, é possível avaliar a tolerância na passagem da microcápsula ao TGI simulado e para isso, submete-se o microrganismo microencapsulado em uma solução de diferentes pH contendo pepsina, em diferentes tempos, simulando o fluido gástrico. Além disso, verifica-se a tolerância ao fluido intestinal, colocando-se a microcápsula em contato com uma solução contendo pancreatina com presença e ausência de sais biliares (FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Alguns trabalhos também avaliam a resistência da microcápsula aos diferentes tratamentos térmicos, simulando condições de processamento de aplicação em alimentos (NUNES et al., 2018).

3 Objetivos

3.1. Objetivo geral

Produzir microcápsulas de *L. lactis* subsp. *lactis* R7 por *spray drying* utilizando como material encapsulante soro de queijo e inulina, aplicadas em diferentes matrizes alimentares.

3.2. Objetivos específicos

Microencapsular *L. lactis* subsp. *lactis* R7 por *spray drying* utilizando a combinação de soro de queijo e inulina como material encapsulante, bem como;

Avaliar a eficiência de encapsulação, rendimento do processo após a secagem e viabilidade ao armazenamento em diferentes temperaturas;

Determinar a sobrevivência ao TGI simulado *in vitro*, a resistência ao tratamento térmico e morfologia das microcápsulas;

Aplicar *L. lactis* subsp. *lactis* R7 livre e microencapsulado em matrizes alimentares e avaliar a viabilidade celular durante o armazenamento a 4 ^{0}C;

Verificar a capacidade de acidificação do meio ao longo do período de armazenamento;

Avaliar a persistência ao TGI simulado e a resistência térmica.

4 Capítulo I. Artigo

Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying

Artigo publicado LWT - Food Science and Technology
(Fator de Impacto 3.129)
Qualis 2016 em Ciência dos Alimentos: A1

LWT - Food Science and Technology 115 (2019) 108411

Contents lists available at ScienceDirect

LWT - Food Science and Technology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/lwt

Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by spray drying

Michele Dutra Rosolen[a], Fernanda Weber Bordini[a], Patrícia Diaz de Oliveira[a,b], Fabrício Rochedo Conceição[b], Ricardo Scherer Pohndorf[c], Ângela Maria Fiorentini[a], Wladimir Padilha da Silva[a], Simone Pieniz[a,d,*]

[a] Agroindustrial Science and Technology Department, Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, RS, Brazil
[b] Biotechnology Unit, Technology Development Center, Federal University of Pelotas, Campus Capão do Leão, RS, Brazil
[c] Center of Technological Development/Water Resources Engineering, Federal University of Pelotas, Campus Anglo, Pelotas, RS, Brazil
[d] Nutrition Department, Faculty of Nutrition, Federal University of Pelotas, Campus Anglo, Pelotas, RS, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
Heat treatment
Gastrointestinal tract
Viability
Probiotics
Microencapsulation
Storage time

ABSTRACT

This study was conducted to characterize autochthonous *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 (*L. lactis* R7) microencapsulated with whey and inulin by spray drying and evaluate the microencapsulation's ability to protect against adverse conditions. Symbiotic microcapsules produced by spray drying showed high viability (13.0 log CFU.g^{-1}) and high encapsulation yield (94.61%). The viable cell counts of the microcapsules remained stable for 6 months of storage (> 8.0 log CFU.g^{-1}), at the different temperatures analyzed. Microencapsulation showed protection of *L. lactis* R7 through a simulated gastrointestinal tract passage, as well as at the temperatures applied in the thermal resistance test. The thermal analyses evidenced the protection conferred by the encapsulating material because no endothermic peak of free cells was observed in the thermogram of the microcapsules. The study demonstrated that the combination of inulin and whey as encapsulating materials was adequate and effective in the microencapsulation process by spray drying, with potential application in foods.

5 Capítulo II. Manuscrito

Survival of microencapsulated *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 applied in different food matrices

Manuscrito submetido ao periódico Journal of Food Engeneering
(Fator de Impacto 3.62)
Qualis 2016 em Ciência dos Alimentos: A1

6 Considerações Finais

SIGILOSO

7 Referências

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Probióticos : **Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas**, [s. l.], p. 1–14, 2017.

AGUILAR-TOALÁ, J. E. et al. Postbiotics: An evolving term within the functional foods field. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 75, p. 105–114, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2018.03.009>

ALMADA, C. N. De et al. Trends in Food Science & Technology Paraprobiotics : Evidences on their ability to modify biological responses , inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science & Technology**, [s. l.], v. 58, p. 96–114, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.09.011>

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

ANDRADE, J. C. et al. Production of conjugated linoleic acid by food-grade bacteria: A review. **International Journal of Dairy Technology**, [s. l.], v. 65, n. 4, p. 467–481, 2012.

ARAYA, M. et al. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. **Joint FAO/WHO Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**, [s. l.], p. 1–11, 2002.

BARCELLOS, I. et al. In vivo action of Lactococcus lactis subsp . lactis isolate (R7) with probiotic potential in the stabilization of cancer cells in the colorectal epithelium. **Process Biochemistry**, [s. l.], n. December, p. 1–7, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2019.12.008>

BEIRÃO-DA-COSTA, S. et al. Inulin potential for encapsulation and controlled delivery of Oregano essential oil. **Food Hydrocolloids**, [s. l.], n. December, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2013.03.009>

BIELECKA, M. Probiotics in Food. [s. l.], p. 413–426, 2006. Disponível em: <http://www.crcnetbase.com/doi/abs/10.1201/9781420009613.ch16>

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

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, [s. l.], v. 445–446, p. 385–396, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2012.12.038>

CASTEL, V.; RUBIOLO, A. C.; CARRARA, C. R. Brea gum as wall material in the microencapsulation of corn oil by spray drying: Effect of inulin addition. **Food Research International**, [s. l.], v. 103, n. March 2017, p. 76–83, 2018.

CRISTINA, K. et al. LWT - Food Science and Technology Symbiotic microencapsulation to enhance Lactobacillus acidophilus survival. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 89, n. July 2017, p. 503–509, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.11.026>

DAS, A. et al. Microencapsulation of Probiotic Bacteria and its Potential Application in Food Technology. **International Journal of Agriculture, Environment and Biotechnology**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 47, 2014. Disponível em: <http://www.indianjournals.com/ijor.aspx?target=ijor:ijaeb&volume=7&issue=1&

article=007>
DE CASTRO-CISLAGHI, F. P. et al. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, [s. l.], v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>
DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 56, n. 10, p. 1685–1716, 2016.
ECKERT, C. et al. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 82, n. November, p. 176–183, 2017.
FAYED, B. et al. The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt Biocatalysis and Agricultural Biotechnology The application of multi-particulate microcapsule containing probiotic bacteria and inulin nanoparticles in enhancing the probiotic survivability in yoghurt. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, [s. l.], v. 22, n. October, p. 101391, 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2019.101391>
FERNANDES, R. V. de B. et al. Cashew gum and inulin: New alternative for ginger essential oil microencapsulation. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 153, p. 133–142, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2016.07.096>
FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 50, n. 1, p. 39–44, 2013. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2012.07.037>
GEORGE KERRY, R. et al. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.jfda.2018.01.002>
GODERSKA, K. Different Methods of Probiotics Stabilization. **Probiotics**, [s. l.], p. 541–550, 2012.
GONZÁLEZ-FERRERO, C. et al. Encapsulation of probiotics in soybean protein-based microparticles preserves viable cell concentration in foods all along the production and storage processes. **Journal of Microencapsulation**, [s. l.], v. 0, n. 0, p. 1–12, 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1080/02652048.2020.1724203>
GRANATO, D. et al. **Probiotic Food Development : An Updated Review Based on Technological Advancement**. [s.l.] : Elsevier, 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/B978-0-12-812687-5.22271-5>
HILL, D. et al. Recent advances in microbial fermentation for dairy and health. **F1000Research**, [s. l.], v. 6, n. May, p. 751, 2017. Disponível em: <https://f1000research.com/articles/6-751/v1>
HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 63, p. 1–17, 2017.
HUTKINS, R. W. et al. Prebiotics: Why definitions matter. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 37, p. 1–7, 2016.
ILHA, E. C. et al. Lactobacillus paracasei isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey.

European Food Research and Technology, [s. l.], v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.
IRAVANI, S.; KORBEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science and Technology**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 4679–4696, 2015.
KANAUCHI, O.; ANDOH, A. Probiotics and Paraprobiotics in Viral Infection : Clinical Application and Effects on the Innate and Acquired Immune Systems Probiotics and Paraprobiotics in Viral Infection : Clinical Application and Effects on the Innate and Acquired Immune Systems. [s. l.], v. 24, n. 6, 2018.
KAVITAKE, D. et al. Recent developments on encapsulation of lactic acid bacteria as potential starter culture in fermented foods – A review. **Food Bioscience**, [s. l.], v. 21, n. June 2017, p. 34–44, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2017.11.003>
KORCZ, E.; KERÉNYI, Z.; VARGA, L. Dietary fibers, prebiotics, and exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria: potential health benefits with special regard to cholesterol-lowering effects. **Food & Function**, [s. l.], 2018. Disponível em: <http://xlink.rsc.org/?DOI=C8FO00118A>
LEE, H. Y. et al. Synthesis of conjugated linoleic acid by the linoleate isomerase complex in food-derived lactobacilli B. **Guide to Advanced Empirical Software Engineering**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 125301, 2017. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.idairyj.2010.05.003>
LIESE, A. Fermentation of Lactic Acid Bacteria : State of the Art and New. [s. l.], 2016.
LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, [s. l.], v. 15, n. 1–2, p. 73–83, 2010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.cocis.2009.11.002>
MANINI, F. et al. Characterization of lactic acid bacteria isolated from wheat bran sourdough. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 66, p. 275–283, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.10.045>
MARCO, M. L. et al. Health benefits of fermented foods: microbiota and beyond. **Current Opinion in Biotechnology**, [s. l.], v. 44, p. 94–102, 2017.
MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, [s. l.], v. 27, p. 15–25, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>
MOKOENA, M. P. Lactic acid bacteria and their bacteriocins: Classification, biosynthesis and applications against uropathogens: A mini-review. **Molecules**, [s. l.], v. 22, n. 8, 2017.
MORSHEDI, M.; ASL, M. S.; HOSSEINIFARD, E. S. The potential therapeutic effects of the gut microbiome manipulation by synbiotic containing - Lactobacillus plantarum on neuropsychological performance of diabetic rats. **Journal of Translational Medicine**, [s. l.], p. 1–14, 2020. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12967-019-02169-y>
NUNES, G. L. et al. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of Lactobacillus acidophilus encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 89, p. 128–133, 2018. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>
OZYURT ,V. H.; OTLES, S. PROPERTIES OF PROBIOTICS AND ENCAPSULATED PROBIOTICS IN FOOD. **Acta Sci. Pol., Technol. Aliment.**,

[s. l.], v. 13(4), p. 413–424, 2014.
PAPAGIANNI, M.; AVRAMIDIS, N. Lactococcus lactis as a cell factory: A twofold increase in phosphofructokinase activity results in a proportional increase in specific rates of glucose uptake and lactate formation. **Enzyme and Microbial Technology**, [s. l.], v. 49, n. 2, p. 197–202, 2011. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.enzmictec.2011.05.002>
PEANPARKDEE, M.; IWAMOTO, S.; YAMAUCHI, R. Microencapsulation: a Review of Applications in the Food and Pharmaceutical Industries. **Reviews in Agricultural Science**, [s. l.], v. 4, n. 0, 2016. Disponível em: <http://www.agrsci.jp/ras/article/view/23>
PIQUÉ, N.; BERLANGA, M.; MIÑANA-GALBIS, D. Health Benefits of Heat-Killed (Tyndallized) Probiotics : An Overview. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, p. 1–30, 2019.
RAJ PANDEYA, D.; HONG, S.-T. Lactococcus Lactis: Production and secretion of recombinant protein Review: Lactococcus Lactis: An efficient Gram positive cell factory for the production and secretion of recombinant protein. **Biomedical Research**, [s. l.], v. 23, n. 231, p. 1–7, 2012.
RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of Lactobacillus plantarum (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [s. l.], v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>
RAMOS, P. E. et al. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 58, n. 11, p. 1864–1877, 2018.
SANDERS, M. E. et al. Probiotics and prebiotics in intestinal health and disease: from biology to the clinic. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, [s. l.], 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41575-019-0173-3>
SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, [s. l.], v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.
SCHALLER-POVOLNY, L. A.; SMITH., D. E. Interaction of milk proteins with inulin. **Milchwissenschaft**, [s. l.], v. 57, n. 9–10, p. 494–497, 2002.
SHOAIB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, [s. l.], v. 147, n. October 2017, p. 444–454, 2016.
SONG, A. A. L. et al. A review on Lactococcus lactis: From food to factory. **Microbial Cell Factories**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 1–15, 2017.
TAVARES, G. M. et al. Milk proteins as encapsulation devices and delivery vehicles: Applications and trends. **Trends in Food Science and Technology**, [s. l.], v. 37, n. 1, p. 5–20, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2014.02.008>
TC, P. Fruit juices as probiotic carriers. **J Plant Biotechnol Microbiol**, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 8–10, 2017.
TERPOU, A. et al. Probiotics in Food Systems : Significance and Emerging Strategies Towards Improved Viability and Delivery of Enhanced Beneficial Value. [s. l.], 2019.
YEUNG, T. W. et al. Microencapsulation of probiotics in hydrogel particles: Enhancing: Lactococcus lactis subsp. cremoris LM0230 viability using calcium alginate beads. **Food and Function**, [s. l.], v. 7, n. 4, p. 1797–1804, 2016.

ZABOT, G. L. et al. Replacing modified starch by inulin as prebiotic encapsulant matrix of lipophilic bioactive compounds. **Food Research International**, [s. l.], v. 85, p. 26–35, 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.04.005>

ZANNINI, E. et al. Production, properties, and industrial food application of lactic acid bacteria-derived exopolysaccharides. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [s. l.], v. 100, n. 3, p. 1121–1135, 2016.

7 Apêndice:

SIGILOSO