



UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de
Alimentos

**Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus*
utilizando extrato de soja e maltodextrina**

Leidiane A. Acordi Menezes

Medianeira

2015

Leidiane A. Acordi Menezes

Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando extrato de soja e maltodextrina

Dissertação apresentada ao programa de Pós Graduação em Tecnologia de Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná, como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre em Tecnologia de Alimentos.

Medianeira

2015

Orientadora
Professora Dra. Deisy Alessandra Drunkler

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação

M543m Menezes, Leidiane A. Acordi.

Microencapsulação de lactobacillus acidophilus utilizando extrato de soja e maltodextrina. / Leidiane A. Acordi Menezes. – 2015.
87 f. : il. ; 30 cm.

Orientadora: Deisy Alessandra Drunkler.

Dissertação (Mestrado) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. Medianeira, 2015.

Inclui bibliografias.

1. Probióticos. 2. Proteínas. 3. Alimentos – Dissertações. I. Drunkler, Deisy Alessandra, orient II. Universidade Tecnológica Federal do Paraná. Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD: 664 - Ed. 22

Biblioteca Câmpus UTFPR Medianeira
Marci Lucia Nicodem Fischborn 9/1219



Ministério da Educação
Universidade Tecnológica Federal do Paraná
Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos
PPGTA



TERMO DE APROVAÇÃO

Microencapsulação de *Lactobacillus Acidophilus* Utilizando Extrato Aquoso de Soja e Maltodextrina

Por

Leidiane Andreia Acordi Menezes

Esta dissertação foi apresentada as quatorze horas, do dia vinte e sete de fevereiro de dois mil e quinze, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Tecnologia de Alimentos, Linha de Pesquisa Processos Tecnológicos na Indústria de Alimentos, no programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, da Universidade Tecnológica Federal do Paraná. A candidata foi arguida pela Banca Examinadora composta pelos professores abaixo assinados. Após a deliberação, a Banca Examinadora considerou o trabalho aprovado.

Prof^a. Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler (Orientador – PPGTA)

Prof^a. Dr^a. Cristiane Canan (Membro Interno – PPGTA)

Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt (Membro Externo – UTFPR)

Prof^a. Dr^a. Mônica Lady Fioresi (Membro Externo – UNIOESTE)

A Folha de Aprovação assinada encontra-se na Coordenação do Programa.

AGRADECIMENTOS

À Profª Drª Deisy Alessandra Drunkler não somente por orientar e apoiar a realização deste trabalho, mas também pela amizade, paciência e confiança.

À minha família, em especial à minha mãe Maria Alice e à minha irmã Lu, que são minha maior fonte de inspiração, por acreditarem na minha caminhada, muito mais que eu mesma. Obrigada pelo amor e pela força que me impulsiona a continuar.

Ao Prof. Dr. Paulo Rodrigo Stival Bittencourt, pelas contribuições e solicitude.

À Profª Drª Elídia A. Velter Ferri pela paciência e auxílio com as análises de Microscopia Eletrônica de Varredura.

Aos professores componentes da banca examinadora pelas correções e sugestões pertinentes ao aprimoramento deste trabalho;

Aos docentes do Programa de Pós-graduação em Tecnologia de Alimentos da UTFPR, em especial às professoras Drª Eliane Colla, Drª Angela Claudia Rodrigues, Drª Cristiane Canan e Drª Saraspathy N. T. Gama de Mendonça, cujos ensinamentos foram muito além do conhecimento científico.

Aos colegas de laboratório Carlos, Nayra e Marivane pelo auxílio nas análises.

À Mariana, Fernanda, Catiussa, Denise, Crislaine e Ruth sem as quais o trabalho seria muito mais árduo e bem menos divertido. Obrigada pela amizade e pela imensa ajuda; aprendizado, incentivo e alegria constantes.

Aos demais amigos, com quem dividi altos e baixos e que me proporcionaram muitos momentos felizes.

A todos que de alguma forma estiveram comigo durante este período, aos quais não conseguirei nomear, mas que contribuíram com seu companheirismo e afeto, muito obrigada.

RESUMO GERAL

A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de partículas, pela qual são obtidas pequenas cápsulas. Dentre os métodos de microencapsulação, o *spray drying* destaca-se por ser uma técnica simples e barata, que tem sido estudada com o objetivo de melhorar a sobrevivência de microrganismos probióticos incorporados em alimentos.

Entretanto, a proteção oferecida pelo método de *spray drying* às células probióticas depende, dentre outros fatores, do material empregado na formação das microcápsulas, que deve manter o microrganismo ativo até o momento do consumo, protegendo-o de condições hostis de produção e estocagem do alimento, bem como durante sua passagem pelo trato digestório.

As proteínas vegetais, em especial soja, ervilha, milho, trigo e girassol tem ganhado destaque por serem materiais renováveis e de baixo custo, além de possuírem diversas propriedades funcionais, sendo consideradas potencialmente adequadas para o uso como material de parede na microencapsulação de componentes ativos. As proteínas de soja têm se destacado na indústria de alimentos como o melhor substituto para proteínas de origem animal, devido às suas propriedades funcionais e ao seu alto valor nutricional. O extrato de soja é composto em maior proporção por proteínas e carboidratos, contendo também oligossacarídeos que podem atuar como prebióticos no estímulo do crescimento de microrganismos.

Além da composição do material de parede, as condições de processo nas quais ocorre a microencapsulação exercem importante influência sobre a viabilidade da bactéria encapsulada. Diante disso, o estudo objetivou a otimização da microencapsulação por *spray drying* de *L. acidophilus* La-5, utilizando extrato de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes, por meio da seleção das condições ótimas de temperatura de entrada do ar de secagem, razão maltodextrina/extrato de soja na composição do material de parede e vazão de alimentação do sistema, a fim de maximizar a sobrevivência do microrganismo à microencapsulação, bem como caracterizar as microcápsulas obtidas e acompanhar a viabilidade celular durante armazenamento refrigerado. Os efeitos das variáveis sobre a sobrevivência do microrganismo foram estudados por meio da aplicação de planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

As microcápsulas foram submetidas às análises de tamanho e morfologia, umidade, atividade de água, higroscopicidade e Espectrometria na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR). O comportamento térmico das partículas foi avaliado por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Termogravimetria (TG). O estudo da estabilidade das microcápsulas compreendeu a enumeração de células viáveis de *L.*

acidophilus e a determinação da atividade de água das amostras durante 45 dias de armazenamento a 4°C.

O rendimento máximo da microencapsulação foi de 83% e as condições de processo que permitiram maior viabilidade celular corresponderam à temperatura de entrada de ar de 87°C, razão maltodextrina/extrato de soja de 2:3 (m:m) e vazão de alimentação de 0,54 L.h⁻¹. O modelo obtido com aplicação do DCCR foi validado experimentalmente.

As variáveis empregadas no planejamento experimental tiveram efeito significativo sobre o rendimento da microencapsulação e sobre as características físicas do pó obtido. Proporções de extrato de soja superiores às de maltodextrina na composição do material de parede foram favoráveis à sobrevivência da cultura. Por outro lado, temperaturas de entrada de ar e vazões de alimentação elevadas diminuíram o rendimento da microencapsulação. A temperatura do ar de secagem e a vazão também reduziram a atividade de água e a umidade das microcápsulas, enquanto a maltodextrina melhorou as propriedades higroscópicas das partículas.

As microcápsulas apresentaram diâmetro médio entre 4,97 µm e 8,82 µm, formato arredondado e superfície irregular com presença de concavidades e achatamentos, características comuns a produtos secos por *spray drying*.

Por meio das análises de DSC, TG e FTIR verificou-se uma possível interação entre os agentes encapsulantes e as células de *L. acidophilus*. As partículas foram termicamente estáveis em temperaturas abaixo de 100°C e os resultados sugeriram que as microcápsulas podem proteger os microrganismos frente ao calor e a desidratação.

Durante o período de armazenamento, a redução da viabilidade celular de *L. acidophilus* foi menor nas microcápsulas que continham maior proporção de extrato de soja na composição do material de parede. A atividade de água manteve-se dentro dos valores recomendados em todos os tratamentos até o trigésimo dia de estocagem. Ao final do período de estocagem, as microcápsulas produzidas nas condições ótimas apontadas pelo planejamento experimental apresentaram atividade de água apropriada e viabilidade celular elevada, indicando que o extrato de soja, associado à maltodextrina, é um material de parede eficiente na manutenção da viabilidade de *L. acidophilus* e um potencial agente encapsulante para o desenvolvimento de microcápsulas de probióticos com alta estabilidade.

Palavras-chaves: *Spray drying*, probióticos, estabilidade, proteínas vegetais.

GENERAL ABSTRACT

Microencapsulation is a particle coating technology, whereby smaller capsules are obtained. Among the microencapsulation methods, the spray drying is distinguished by being simple and inexpensive technique, that has been studied with the aim of improving the survival of probiotic microorganisms incorporated into foods.

However, the protection offered by spray drying to the probiotic cells depends, among other factors, on the material used in the formation of microcapsules, which should keep the active microorganism until the time of consumption, protecting it from hostile conditions of production and storage of food, and during their passage through the digestive tract.

Vegetable proteins, especially soy, pea, maize, wheat and sunflower has gained prominence because they are low-cost and renewable materials, in addition to having different functional properties are considered potentially suitable for use as wall material in the microencapsulation of active compounds . Soy proteins have been prominent in the food industry as the best substitute for animal protein due to its functional properties and its high nutritional value. The soybean extract powder is composed in major proportion of protein and carbohydrates, also containing oligosaccharides that may act as prebiotic stimulation of the growth of microorganisms.

Besides the wall material composition, process conditions under which the microencapsulation happens have an important influence on the viability of encapsulated bacteria. Thus, the study aimed to optimize the microencapsulation by spray drying of *L. acidophilus* La-5, using soybean extract powder and maltodextrin as encapsulating agents, by selecting the optimal conditions of drying air inlet temperature, maltodextrin/soybean extract powder ratio in the composition of the wall material and system feed flow, in order to maximize the microorganism survival to the microencapsulation, as well as characterize the microcapsules and monitor cell viability during storage. The effects of the variables on the survival of the microorganism were studied through the application of experimental design, Central Composite Rotatable Design (CCRD).

The microcapsules were submitted to analysis of size and morphology, moisture content, water activity, hygroscopicity and Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR). The thermal behavior of the particles was evaluated by Differential Scanning Calorimetry (DSC) and Thermogravimetry (TG). The study of the microcapsules stability included the enumeration of viable cells of *L. acidophilus* and determining the water activity of the samples for 45 days storage at 4 ° C.

The maximum yield of the microencapsulation was 83% and the process conditions that allow higher cell viability corresponded to 87°C air inlet temperature, maltodextrin/soy extract powder ratio 0.67 (w.w⁻¹) and feed flow rate of 0.54 L.hr⁻¹. The adequacy of the model obtained through the CCRD was validated experimentally.

The variables used in the experimental design had a significant effect on the yield microencapsulation and on the physical characteristics of powder obtained. Soy extract ratios superior to maltodextrin in the wall material composition were favorable to the survival of the culture. On the other hand, high air inlet temperatures and feed flow rate decreased the yield of microencapsulation. The drying air temperature and the feed flow rate also reduced water activity and moisture of the microcapsules, while the maltodextrin improved the hygroscopic properties of the particles.

The microcapsules had a mean diameter of 4.97 µm and 8.82 µm, rounded shape and irregular surface with presence of concavities and flattening, common characteristics of dried products by spray drying.

Through the DSC, TG and FTIR analyzes it was observed a possible interaction between the agents encapsulating and the cells of *L. acidophilus*. The particles are thermally stable at temperatures below 100°C and the results suggested that microcapsules can protect microorganisms against heat and dehydration.

During the storage period, the reduction in cellular viability of *L. acidophilus* was lower in microcapsules containing a higher proportion of soybean extract in the composition of the wall material. The water activity was within the recommended values in all treatments until the thirtieth day of storage

At the end of the storage period, the microcapsules produced in optimal conditions indicated by the experimental design showed appropriate water activity and high cell viability, indicating that soybean extract, combined with maltodextrin is an effective wall material in keeping the viability of *L. acidophilus* and a potential encapsulating agent for the development of probiotics microcapsules with high stability.

Key-words: Spray drying, probiotics, stability, vegetable protein.

APRESENTAÇÃO

Esta dissertação é composta por 03 (dois) artigos científicos.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

MENEZES, Leidiane, A. A.; DRUNKLER, Deisy A. The use of vegetable protein as microencapsulating agentes. *Journal of Food Engineering*.

ARTIGO CIENTÍFICO 2

MENEZES, Leidiane, A. A.; FERRI, Elídia A. Vetter; BITTENCOURT, Paulo R. S. DRUNKLER, Deisy A. Otimização da microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* com extrato de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes por *spray drying*.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

MENEZES, Leidiane, A. A.; DRUNKLER, Deisy A. Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com extrato de soja e maltodextrina durante armazenamento.

ARTIGO CIENTÍFICO 1

The use of vegetable protein as microencapsulating agents

Leidiane Andreia Acordi MENEZES¹, Deisy Alessandra DRUNKLER¹

¹Program of Postgraduate in Food Technology (PPGTA), Federal Technological University of Parana (UTFPR), 4232, Zip code 85884-000, Medianeira, Parana, Brazil; leidianeacordi@gmail.com; deisydrunkler@utfpr.edu.br.

Abbreviations: CO₂, Carbon Dioxide; DHA, Docosahexaenoic acid; EISA, Evaporation-Induced Self-Assembly; GRAS, Generally Recognized As Safe; pH, Potential of Hydrogen, PPI, Pea Protein Isolate; SAS, Supercritical Anti-Solvent Technology; SPI, Soy Protein Isolate.

Abstract

Microencapsulation is a technology capable of packing materials in small capsules formed by a thin film of an edible product called an encapsulating agent. The food industry has primarily used animal proteins for encapsulating; however, vegetable proteins have gained prominence by being renewable, cheap, and have good encapsulating properties. The studies have focused mainly on soy protein and pea, using techniques such as spray drying and coacervation; however, other techniques and different vegetable protein sources have proved suitable for microencapsulation. Several compounds have been microencapsulated by vegetable proteins, including vitamins, fish oil, casein, antimicrobial agents, and flavors, and have proven that these proteins are effective in achieving the objectives of the process, as protection and controlled release of the encapsulated substance, pointing out vegetable proteins as a suitable and promising material for microencapsulation.

Keywords: Coacervation; Spray Drying; Soy protein; Pea protein; Encapsulating.

1. Introduction

The development of the food industry has been pegged to the needs of consumers for products with a longer shelf life, which are endowed with beneficial properties and retain sensory characteristics. This consumer demand, have attracted the attention of the food industry for techniques such as microencapsulation.

Microencapsulation can be defined as a process in which small particles are enveloped by a coating, or incorporated in a homogeneous or heterogeneous matrix, in order to obtain small capsules, thus permitting delayed release of the core or release in particular condition, such as, for example, upon a change in pH after gastric transit, enzymatic activity, time, osmotic force, etc (Gharsallaoui et al., 2007; Venkatesan et al., 2009; Gaggia et al., 2011). The material inside the microcapsule is called the core, while the outer coating is known as the encapsulating, wall material, or membrane. The core may comprise one or more ingredients, whether liquid, solid, or gas, and the wall may be single-layer or double-layer. Generally, the microcapsules have a diameter between micrometers and millimeters, the shape, spherical or irregular, varies according to the technique, the encapsulated material, and the encapsulating agent (Clark, 2002; Gharsallaoui et al., 2007).

Therefore, techniques such as microencapsulation has attracted increasing interest because an extremely wide variety of functionalities can be obtained, including protection and stabilization of the encapsulated material, control of oxidative reactions, controlled release of substances, improved flavors, colors and odors, increasing shelf-life, among others (Gouin, 2004; Peighambardoust, et al., 2011; Cook et al., 2012), as shown in Figure 1. Many substances can be microencapsulated, such as acids, bases, oils, vitamins, salts, gases, amino acids, essential oils, dyes, enzymes, and microorganisms (Desai and Park, 2005; Augustin et al., 2006; Drunkler et al., 2006; Nazzaro et al., 2012).

Figure 1

The wall materials occupy an important role in the efficiency of microencapsulation, highlighting among the most used, the proteins (sodium caseinate, milk protein, whey protein, soy protein, and gelatin) and carbohydrates (modified starch, gum arabic, alginates, carrageenan, pectin, and chitosan) (Kagami et al., 2003; Nazzaro et al., 2012).

The vegetable proteins, particularly soy, pea, corn, wheat, and sunflower have recently gained prominence by being renewable materials, low-cost, and due to an amphiphilic character, availability, biodegradability, and various interesting functional properties, such as gelation, emulsifying capacity, and film formation, are considered potentially suitable for use as wall material in the microencapsulation of active compounds (Nunes et al., 2003; Nesterenko et al., 2013).

Therefore, in this review we present recent studies on the use of vegetable proteins for microencapsulation in the food industry, with respect to the technical process, the encapsulated material, and the microcapsule characteristics.

2. Microencapsulation properties presented by vegetable proteins

According to Wang et al. (2011), most research focuses on animal proteins and little attention is given to vegetable proteins. However, its use in replacing animal protein has several advantages, because they are cheaper, reduce the risk of diseases such as bovine spongiform encephalopathy, and are acceptable to an increasing demand by vegetarian consumers. They are considered less allergenic compared to milk proteins and use in microencapsulation reflects the current “green trend” in the food industry (Jenkins et al., 2007). The increasing interest by the industry is due to the large number of lactose intolerant people or those who must restrict their cholesterol consumption (Granato et al., 2010).

Proteins present microencapsulation properties superior to carbohydrates due to their amphiphilic character, which provides the physicochemical and functional characteristics necessary to encapsulate both hydrophobic and hydrophilic materials (Gharsallaoui et al., 2007; Pereira et al., 2009; Nori et al., 2011). Other properties include mild flavor, high solubility, low viscosity in solution, emulsifying capacity, film formation, and high nutritional value (Duranti, 2006; Madene et al., 2006; Gu et al., 2009). The fact that vegetable proteins are degradable by digestive enzymes and, consequently, allow the controlled release of the core, makes them even more attractive, considering that in recent years, one of the great challenges of microencapsulation consists of finding a wall material safe and compatible that protects and maintains the encapsulated material asset until the time of consumption, and allows for release in appropriate locations of the digestive tract (Chen et al., 2006; Pereira et al., 2009).

Usually the proteins are used in the form of concentrate and isolate protein obtained by solubilization of protein in aqueous saline solutions, with neutral or alkaline pH and subsequent recovery by precipitation, concentration, and separation techniques prior to drying. Factors such as pH, presence or absence of salts, and their concentrations, ionic strength of the medium and electrostatic repulsions influence both the efficiency of extraction and functional properties. Therefore, the protein isolates may be subjected to thermal, chemical, or enzymatic treatment in order to enhance their functional properties, solubility, the capacity of production of foam and emulsions, or remove anti-nutritional compounds (Moure et al., 2006; Rodrigues et al., 2012).

The possibility of physicochemical and enzymatic changes in the protein structure is an important advantage, as it enables the diversification of protein properties, which is

especially interesting in the microencapsulation process by enabling the obtainment of microparticles with new functionalities, different from those obtained with other wall materials (Nesterenko et al., 2014).

3. Main microencapsulation techniques that use vegetable protein as wall material

Most of the microencapsulation techniques are based on modifications of the three original methods: atomization (spray drying), separation of the phases (coacervation), and extraction/solvent evaporation (Dalmoro et al., 2012). Other methods include spray chilling, spray coating, fluidized bed, gelation, centrifugal extrusion, and rotational suspension separation. Each method has particularities and characteristics that allow for implementation in systems based on materials with different mechanical and physicochemical properties. Spray drying and coacervation are the main techniques used for microencapsulation of a wall material comprising vegetable proteins (Kanakdande et al., 2007; Borgogna et al., 2010; Nesterenko et al., 2013b).

The spray drying method, widely used because it is cheap and simple, has been held in the food industry since the 1950s to convert liquids into powders, and protect flavoring oils from oxidation (Gouin, 2004). This is a one-step operation through which a liquid atomized by contacting a fast current of hot air inside the drying chamber becomes powder instantly. During drying, the resulting droplets are dried for a short time in a hot air flow, usually between 150° C and 200° C. Spray drying produces, depending on the feedstock and process conditions, produce a very thin powder (10–50 µm) or particles of relatively large size (2–3 µm) (Gharsallaoui et al., 2007; Gaggia et al., 2011; Peighambardoust et al., 2011).

The choice of the wall material is a factor in the stability and efficiency of microencapsulation by spray drying, the criteria for selection are mainly based on physicochemical properties such as solubility, molecular weight, glass transition, and the ability to disperse and emulsify film formation, due to the influence of these parameters on the degree of retention of core compounds. In addition, costs must also be considered (Gharsallaoui et al., 2007).

The temperatures required for drying can limit the technique when the compound to be encapsulated is heat-sensitive or volatile. Another drawback of spray drying is that if the powder produced is too thin, the microcapsules require additional processing, such as agglomeration, to achieve the appropriate commercial characteristics (Gharsallaoui et al., 2007; Sunny-Roberts and Knorr, 2009; Semyonov et al., 2010; Burgain et al., 2011).

Coacervation comprises the separation of an aqueous polymer solution where a change in the system allows the formation of the shell by a polymer complex (Nazzaro et al., 2012). The process may be simple or complex, based on the separation of the phases of one

or more hydrocolloids, by electrostatic attraction, and the subsequent deposition of the newly formed coacervate phase around the active ingredient (De Kruif et al., 2004; Gouin 2004). In contrast, the simple coacervation method occurs by the precipitation of protein around the core due to the change of pH, temperature, or by the phenomenon salting-out; however, the complex coacervation requires the interaction of two oppositely charged colloids followed by separation into two liquid phases above certain concentrations, both having the same structure, one with a high and one with a low concentration (Cousin et al., 2011; De Kruif et al., 2004; Lazko et al., 2004).

Coacervation stands out as a technique for microencapsulation due to its high viability and possibilities of controlled release core, based on mechanical stress, pH, temperature, and other factors (Gouin, 2004; Huang et al., 2012). Pursuant to Favaro-Trindade et al. (2010), the size of the microcapsules formed by coacervation may vary from 1 μm to 500 μm . It has the disadvantage of limiting the choice of the wall material (Kravolec et al., 2012), which generally comprises globular proteins such as β -lactoglobulin, bovine serum albumin, egg albumin, soy protein, pea protein, and whey protein combined with polysaccharides (De Kruif et al., 2004). Furthermore, the production cost can be higher due to the pH-dependent process and the nature of the protein (Ducel et al., 2004).

According to Gouin (2004), coacervation has some intrinsic advantages and unique characteristics compared to other methods, neither requiring organic solvents nor drastic temperatures, thus becoming an alternative process for the microencapsulation of heat-sensitive compounds to high temperatures and certain organic compounds, which would make vegetable proteins suitable as encapsulating agents, contributing to the expansion of the use of these proteins.

The microencapsulation technique chosen can promote changes in the structural characteristics of the microcapsules, the release of the core, and the yield of microencapsulation.

The size of the microcapsules prepared from vegetable proteins range from 2 μm (Bittencourt et al., 2013) to 100 μm when the technique used was atomization, and 7 μm (Ducel et al., 2004) to 280 μm (Gan et al., 2008) when the process used was lyophilization. For Bittencourt et al. (2013), the size distribution of the particles affects the functional properties because the morphology of the microcapsule influences the controlled release of encapsulated materials due to the particle surface interactions with the medium. In addition, to confer adequate protection and release, the microparticles must be small and uniform in size.

The microcapsules obtained from vegetable proteins may have very different morphologies, depending on the process method. Some showed smooth and uniform surface (Gharsallaoui et al., 2010), while others showed irregular or distorted shapes, and

slightly rough surface, suggesting aggregation of the protein matrixes instead of continuous film formation (Gan et al., 2008), or rounded shape and occurrence of concavities, usually resulting from the atomization process (Favaro-Trindade et al., 2010) as shown in Figure 2.

Figure 2

Regarding the yield and efficiency of microencapsulation, Augustin et al. (2006) and Rusli et al. (2006) have microencapsulated fish and palm oil by atomization from soy protein isolate (SPI) combined with polysaccharides, and obtained encapsulation efficiencies of 80–96%, while Gan et al. (2008), by the lyophilization process, found that the efficiency of microencapsulation of fish oil was 96–98.5% using only SPI. From pea protein, Bittencourt et al. (2013) reached a yield of 32% with ferrous sulfate microencapsulation by atomization, and Pierucci et al. (2006) reached 84% employing ascorbic acid as a core, also by the atomization process. Upper and lower yields were also reported, and are usually directly related to the ratio between core and wall material.

However, other processes may also form microcapsules from vegetable proteins. Wang et al. (2013) used a non-conventional microencapsulation method, Evaporation-Induced Self-Assembly (EISA), and the results demonstrate the effective microencapsulation of lime and citral flavor in the core of the microcapsules formed by corn protein. In this process, dispersions of zein-ethanol 60–90%, and lime/citral-ethanol 60–90%, were combined and dried at room temperature, and droplet formation occurred due to the interfacial tension between the phases and the predominant hydrophobic character of the protein surface and the compound to be encapsulated. The protein forms spheres after evaporation of the solvent, because hydrophobic protein-protein interactions are induced by ethanol evaporation, which becomes the rest of the solvent in hydrophilic conditions and promotes self-assembly in hydrophobic conditions. The particles presented sizes between 120 nm and 2500 nm, and larger diameters were observed when higher amounts of protein were adsorbed on the surface of the core material. Unlike atomization, EISA led to the formation of spherical microcapsules and a smooth surface.

Lyophilization is also used to form microcapsules from soy protein (Dianawati et al., 2013), corn (Quispe-Condori et al., 2011), chickpeas, and lentils (Karaca et al., 2013). The particles have sizes between 2.36 μm and 4.33 μm , and rough, irregular, and porous surface. Quispe-Condori et al. (2011) compared the spray and freeze-drying techniques and observed that the morphology of the capsules was dependent on the type of process. While the technique of spray drying formed spheres of varied sizes, lyophilization produces small spheres, but more uniformly sized and agglomerated, concluding that the atomization technique is more suitable with corn protein, because the particles formed by lyophilization

had excessive amounts of oil on the surface, promoting agglomeration and reducing the microencapsulation efficiency; under the same conditions these ranged from 78.7% to 89.6% for the first and 32.7% to 59.7% for the second.

The Supercritical Anti-Solvent Technology (SAS) was used to promote the formation of microcapsules using corn protein as wall material and lysozyme as a core. SAS is an analogous technique to spray drying, which permits the formation of dry particles in only one step when bioactive compounds are co-precipitated with a polymer, and thus microencapsulated within the polymer matrix. In this process, the mixture of co-solvent and polymer is sprayed continuously in supercritical CO₂ (which acts as an anti-solvent) and then the co-solvent present in atomized droplets is extracted by CO₂ and the polymer precipitates into micro- and nanoparticles due to insolubility in CO₂. The particle sizes ranged from 2 µm to 50 µm, and smooth surface but irregular, and the yield was 46.5% (Zhong et al., 2009). In a previous study, the solvent used was changed, and the microcapsules were smaller (80–500 nm), spherical, and more uniform, which can be attributed to the shorter time of solvent extraction (Zhong et al., 2008).

The double emulsification process, followed by enzymatic gelation, was employed by Conto et al. (2013) for the microencapsulation of lipophilic compounds with soy protein as the wall material. Transglutaminase enzyme was used as a crosslinking agent to convert protein into more stable forms, which lead to an increase in its industrial applications by promoting improvement in mechanical strength and heat resistance of the microcapsules formed, which have irregular and rough morphology similar to those obtained by atomization and size varying between 44 µm and 57 µm. The microencapsulation yield was relatively low; between 35% and 54%, obtained when a smaller proportion of core was encapsulated by a larger amount of wall material, and this could have been higher if the pH of the system had been changed to increase the solubility of the protein. Ortiz et al. (2009) affirms that the pH of solutions of SPI can be adjusted to obtain the maximum solubility of the protein.

Davidov-Pardo et al. (2008), working with soy protein isolate obtained by the same process, amounts to 65% of microencapsulation yield. The method was also used by Cho et al. (2003) to encapsulate fish oil. Microcapsules had a rough surface that was attributed to the droplets originally present on the surface, and were lost during the microencapsulation process. Davidov-Pardo et al. (2008) emphasize that a double emulsification technique followed by enzymatic gelation is a very cheap method, however is still more expensive than drying by spray drying.

4. Vegetable proteins and encapsulated materials

Vegetable proteins most frequently used as wall material is obtained from soy, pea, corn, and cereals, such as wheat (Nesterenko et al., 2013). Proteins extracted from sunflower, lentil, and barley have also been studied as encapsulating agents, although on a smaller scale and with some peculiarities.

4.1. Soy proteins

The soy (*Glycine max* (L.) Merrill) is one of the main expanding oil crops. It is characterized as an important commodity in the Brazilian economy, but its production and consumption worldwide are highlighted due to the versatility and wide global reach (Smaling et al., 2008). The soy seed contains 35% to 40% protein, which 50% to 90% correspond to globulins, divided between glycine and β -conglycinin. These proteins have shown good emulsifying, gelling capacity, and surfactants (Ruiz-Henestrosa et al., 2007; Gu et al., 2009).

Regarding the application as encapsulating material, soy proteins are the best substitute for animal protein (Tang and Li, 2013). Studies have mainly applied soy protein isolate produced from defatted soy flour by an alkaline extraction, followed by precipitation in acid medium, which contains approximately 90% protein and constitutes the most important source of vegetable proteins used in the food industry (Huang et al., 2012).

The core protection against oxidative degradation is one of the greatest challenges to make a good encapsulating agent. Davidov-Pardo et al. (2008) compared the lipid oxidation core of microcapsules formed from four different wall materials, including SPI, methylcellulose, whey protein concentrate, and calcium-gelatin casein, and the treatment containing SPI showed a lower rate of oxidation. The encapsulated material, fish oil, was added to breads and sensory quality evaluated, and the analysis pointed to SPI as the material which less altered the characteristics of bread.

Microcapsules containing orange oil were produced by Jun-Xia et al. (2011), employing the coacervation technique from the combination of SPI and gum arabic, and it was found that the optimum pH was 4.0 and the ideal core/wall material proportion was 1:1. Although the yield was low, 10% (or 20% with the addition of saccharose), the flavor components are retained in the microcapsules, which indicate a good protection for the core material.

Deng et al. (2014) demonstrated the effectiveness of using SPI as the encapsulating agent for β -carotene. By the atomization process, microcapsules employing SPI and modified starch were produced both in combination. The study demonstrated that soy protein isolate was able to protect the β -carotene degradation during storage, yet showing higher microencapsulation efficiency (35.4%) when compared to treatment produced with only modified starch (20.9%).

The sensorial characteristics of the core material were also aimed at other studies involving plant proteins as wall material. Propolis extract microencapsulation by complex coacervation with SPI preserved the functionality of the compound, as well as provided controlled release in addition to the advantages of obtaining it in powder form, alcohol-free, stable, and with flavor and aroma more pleasant. The particles showed sizes of 10 μm to 90 μm , and the microencapsulation efficiency was 72% to 66%, decreasing with the increase in the concentration of the material used (Nori et al., 2011).

The protection and the controlled release of compounds with functional activity also have increased the interest in microencapsulation. Curcumin, studied by Tapal and Tiku (2012), has anti-inflammatory, anti-rheumatic, and anti-angiogenic properties, but has limited use due to its low water solubility and poor bioavailability. In the study, curcumin was encapsulated by spray drying using SPI. The formed microcapsules were spherical with irregular surface and sizes between 2 μm and 10 μm , and it were able to increase curcumin solubility as well as preserve its antioxidant activities during passage through the digestive tract.

Soy protein has also been studied as wall material for casein hydrolysate microencapsulation, with the aim to reduce the bitter taste and reduce the hygroscopicity. The particles exhibited a rounded shape and size of 9–11 μm when produced only with SPI (Ortiz et al., 2009), 10–18 μm when prepared with the addition of pectin, and 16–24 μm when soy protein was associated with gelatin (Mendanha et al., 2009; Favaro-Trindade et al., 2010). In all cases, casein hygroscopicity decreased satisfactorily and, according to sensory evaluation, the capsules were effective in alleviating its bitter taste.

Preservation of microorganism viability is also one of the targets of the microencapsulation process. Chávez and Ledebøer (2007) evaluated soy and skimmed milk powder proteins associated to carbohydrates (gum Arabic, maltodextrin, lactose, trehalose, and sucrose) as wall materials for the probiotic microorganism *Bifidobacterium lactis* Bb-12 microencapsulation. Tests have shown that microencapsulation with SPI increased culture viability, and compared to maltodextrin, resulted in best survival rates during storage, displaying similar behavior to the combination of skimmed milk powder proteins and gum arabic.

Dianawati et al. (2013) employed the SPI along with glycerol, mannitol, or maltodextrin compared to sodium caseinate, and whey protein concentrate and skim milk to the *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulation by freeze drying, and found that associated with mannitol, soy protein was more effective in protecting *Bifidobacterium* compared to other encapsulating agents, but the effectiveness has decreased during exposure to digestive tract simulated conditions.

In order to improve the SPI functionality, some techniques may be employed. Gan et al. (2008) shows that cross-linking decreased material solubility, but increased stability, making it more suitable for the controlled release of the core, since the capsules prepared showed greater retention of the encapsulated materials and longer storage life, indicating therefore, that such modifications can be made in order to obtain the desired characteristics from the SPI, in accordance with the microencapsulation purpose and the material to be encapsulated.

Ultrasonic treatments, described by Tang et al. (2009), were capable of increasing the solubility of the protein, making it a more promising material. According to Jiang et al. (2009), the SPI may have improved emulsifying activity if the proteins are partially unfolded prior to emulsification. In this regard, the ultrasonic treatment increased the soy protein emulsifying capacity and improved the microencapsulation efficiency. Liu et al. (2011) showed that interaction by the complex coacervation between soy globulin and chitosan is influenced by pH and temperature, thus from the direction of these conditions, protein solubility can be improved.

Tang and Li (2013a) studied how the addition of lactose and the pre-heating treatment (95°C, 15 min) influences the microencapsulation properties and stability of spray-dried emulsions of soy protein isolate. In general, thermal pre-treatment significantly improved the retention efficiency, the re-dispersion behavior, the emulsifying ability, and powder's thermal stability. The additional mixture with lactose increased process efficiency and improved dissolution behavior, and such conditions can be utilized to improve the properties of SPI microencapsulation. In another study, Tang and Li (2013b) observed various parameters of spray drying and found that the proportion of core/wall was the most important factor to affect the properties of SPI microcapsules.

Enzymatic and chemical modifications of SPI by Nesterenko et al. (2012, 2014) improved the properties for use in α -tocopherol (hydrophobic) and ascorbic acid (hydrophilic) microencapsulation by atomization, and the changes have improved surface properties of the protein. The acylation improved the amphiphilic character of the SPI and its affinity with hydrophobic substances, increasing the α -tocopherol and reducing the ascorbic acid microencapsulation efficiency as compared with native SPI, while the cationization increased protein solubility and improved ascorbic acid microencapsulation efficiency, indicating that these modifications can improve microencapsulation if driven according to the core material. The results indicate that the SPI can be a good substitute for sodium caseinate and for whey milk proteins, because it showed similar microencapsulation properties.

4.2. Pea proteins

Pea proteins (*Pisum sativum*) are mainly composed of two major globulins, called legumin and vicilin. Convicilin is the third protein fraction that occurs in minor amounts (Elmer et al., 2011). The pea globulin is considered less allergenic than other plant protein sources and its employment would, therefore, represent an advantage over the others (Ducel et al., 2004).

The properties of pea proteins are usually widely examined in combination with other materials, such as polysaccharides. Liu et al. (2009) investigated the effects of pH, mixing ratio of the biopolymer, and salt concentration on the performance of the pea protein isolate (PPI) associated with gum arabic by coacervation, finding the maximum yield conditions of the complex in 2:1 polysaccharide-protein ratio at pH 3.6 and in the absence of added salts. Elmer et al. (2011) studied the complex coacervation of PPI with chitosan. The formation of soluble complexes occurred at pH around 4.7 for all mixing ratios, and this is important data due to the low plant protein solubility, considered one of the main limiting factors in its use in microencapsulation replacing animal proteins that are relatively more soluble. Other studies have also demonstrated the formation of complexes by the combination of pea protein and carboxymethyl cellulose and maltodextrin (Pierucci et al., 2006), gum arabic (Klassen and Nickerson, 2012) or alginates (Klemmer et al., 2012), enhancing the use for microcapsule production.

Ducel et al. (2004) and Gharsallaoui et al. (2010) encapsulated commercial mixtures of triglycerides using pea protein combined with polysaccharides such as gum arabic, maltodextrin, and pectin. Microcapsule sizes ranged from 2 μm to 97 μm , and were influenced by changes in pH of the system and by the composition of the wall material. The particles showed irregular or rounded shape, and smooth or rough surface, depending on the technique employed; polysaccharides addition improved the encapsulating properties in both cases.

Pereira et al. (2009) evaluated the use of protein isolates from pea and cowpea (*Vigna unguiculata*) Brazilian cultivars in order to obtain ascorbic acid microparticles by spray drying. The microcapsules presented yield differences that may be related to the fact that the pea vicilin is more proteolysed than the cowpea, leading to exposure of charged amino acids from the protein molecule, enhancing interactions with the core material. The maltodextrin addition was able to improve the yield from 69% to 85%, unlike the effect exerted by the pH decrease, leading to a slight drop in efficiency (79%). The results were as satisfactory as compared to other encapsulating agents, and with these substances high retention in the core is essential to the viability of industrial applications.

Flavors microencapsulation from pea protein was studied by Gharsallaoui et al. (2012) using the technique of multilayer emulsions prepared with maltodextrin and pectin, followed by spray drying. The pectin was able to protect the protein from secondary structure

denaturation by heat, and this effect, coupled with the two-layered wall, may have been responsible for the high retention of aromatic compounds shown by the encapsulating material.

4.3 Corn protein

The protein content of different varieties of corn is around 6 to 12%. About 75% of protein is contained in the endosperm and the rest is distributed amongst the germ and bran. Due to the solubility in different solvents, the maize protein fraction is divided into four classes, and zein and glutelin represent the larger fractions. Zein is the major storage protein of corn and belongs to the class known as prolamins, specifically occurring in cereals, and has been used in the food industry for its anti-microbial and gelling activities, and ability to form tough coatings with excellent flexibility and compressibility. It is soluble in alcohol, insoluble in water, abundant, and has a mild taste (Shukla and Cheryan, 2001). According to Zhong et al. (2008), low protein solubility in water assists in maintaining the integrity of aqueous food products during processing and storage, thus increasing their safety and quality. Therefore, such features can be used for the development of delivery systems whose stability is required during the shelf life of a product.

Chen and Subirade (2009) produced microspheres (15–25 μm) of zein and soy protein isolate by cold-set gelling. Soy microspheres showed earlier release of the core, while zein showed slower release. Both characteristics exhibited potential for application in the microencapsulation processes, and the combination of both proteins resulted in better microencapsulation.

Studies found that zein is a safe (GRAS) and low-cost material, efficient in encapsulation of various substances, and can be used for various purposes, such as controlled release and core protection (Xiao et al., 2011; Xue et al., 2013).

Torres Guiner et al. (2010) evaluated the encapsulation of omega 3 fatty acid–DHA in microcapsules formed by zein, and found that the fatty acid encapsulated showed a slower degradation rate, 2.5 times lower compared to un-encapsulated. Moreover, the DHA-zein capsules were more stable to moisture and temperature, as well as the microencapsulation provided a reduction in the release of unpleasant tasting compounds. The microencapsulation of lipid material by zein, such as flax oil, studied by Quispe-Condori et al. (2011) may increase the oxidative stability thereof.

Antimicrobial compounds such as nisin, thymol, and lysozyme have been recently encapsulated using zein as wall material (Zhong et al., 2009; Zhong and Jin, 2009; Xiao et al., 2011; Xiao and Zong, 2011), and the results indicated corn protein as an effective encapsulating agent able to promote the compound controlled release, improving its action

during the shelf life of the food matrix to which it was added. Furthermore, microencapsulation would result in greater antimicrobial efficacy by minimizing interactions with the food matrix, which could increase the shelf life of the product and ensure safety. The prolonged compound release is mainly due to molecular interactions between the antimicrobial agent and zein.

In the work of Xue et al. (2013), zein microcapsules were able to protect the lycopene during storage and passage through the stomach, releasing it into the intestine, where zein were degraded by microorganisms, which allows lycopene to exert the beneficial health effects, showing that corn protein can be used as a coating material to develop a commercially viable system of low-cost and food grade, with an microencapsulation efficiency reaching 92%.

Zein solubility was conveniently used by Xu and Zhang (2014) for microencapsulating corn starch by spray drying. The formed particles were spherical in shape and composed of multiple starch granules whose size reduced as the proportion of the core was increased. Microencapsulation improved thermal resistance, slow digestion properties and sensory acceptability of starch, which allows its use as a food ingredient for postprandial glycemic control.

4.4 Wheat Protein

Wheat gluten is a water insoluble protein with emulsifying and foaming properties, is a byproduct of the wheat starch industry, and relatively inexpensive (Linares et al., 2001; Liao et al., 2012). Wheat gluten microspheres were prepared by Liao et al. (2012) for fish oil microencapsulation, rich in omega-3 fatty acid from the double-emulsion technique, followed by heat-polymerization. To reduce protein allergenicity, de-amidation was performed by heating the gluten acid, a step that also improves the emulsion and foaming properties. Microcapsules have protected fish oil oxidation, increasing its stability during storage and providing adequate core release in simulated digestive processes. The microencapsulation efficiency varied from 36% to 82% according to the gluten concentration and the core/encapsulating agent proportion.

The potential application of gliadin in complex coacervation was studied by Ducel et al. (2004) in combination with gum arabic. The optimization process for encapsulating a mixture of triglycerides occurred at pH 3, a condition in which the oil was completely encapsulated, with a protein-polysaccharide ratio of 50:50. The authors also compared the same conditions for pea protein microencapsulation and observed that the amount of polysaccharide required for the formation of microcapsules was greater than the concentration required for gliadin. The particle size ranged from 10 μm to 50 μm , depending

on the pH and the concentration of polysaccharide, and the ovoid shape showed. The wheat protein was also able to form coacervates with carboxymethylcellulose, reaffirming its potential use as wall material.

4.5 Barley Protein

Barley is abundant and affordable protein source, with protein content around 8% to 30% (Yalcin et al., 2008). Hordein and glutelin are the two major storage proteins in barley endosperm (35%–55% and 35%–40%, respectively), while albumin and globulin proteins are mostly in the bran and germ (Finnie and Svensson, 2009). Hordein and glutelin are highly hydrophobic and have good emulsion and film formation capabilities (Wang et al., 2011).

Wang et al. (2011) microencapsulated fish oil from barley protein by spray drying. The microcapsules showed high microencapsulation efficiency (93%–100%) and low moisture content (0.75%–0.90%). Microencapsulation was capable of protecting the oil against oxidation, making barley ideally suited for use in food systems, because tests have confirmed its successful application in milk and yogurt.

4.6 Chickpea Protein and Lentil

Potential use of protein isolates from chickpea and lentil as encapsulating agents is suggested by their surfactant and emulsifier properties, highlighted by Boye et al. (2010), Karaca et al. (2011) and Joshi et al. (2012), and reaffirmed by Aryee and Nickerson (2012), whose results demonstrate the interaction between the lentil protein isolate and gum arabic, observed by complex coacervation technique.

Flaxseed oil was microencapsulated by spray drying (Karaca et al., 2013a) and freeze-drying (Karaca et al., 2013b), employing as wall material the protein isolates from chickpea and lentil, associated with maltodextrin. In spray drying, lentil protein promoted higher microencapsulation efficiency (88%) compared to chickpea (86.3%). In contrast, the microcapsules of both proteins obtained by freeze-drying showed the microencapsulation efficiency of approximately 83%. In both processes, the protein isolates provided oxidation protection to the linseed oil during the storage period at room temperature, being also efficient for trapping and delivery of oil in the digestive tract, with most of the microcapsule content released under simulated intestinal conditions, suggesting that the lentil and chickpea protein-based microencapsulation could lead to increased use of flaxseed oil and plant proteins in food and bioproducts as well as prevent their degradation and promote its effects in the human body.

4.7 Sunflower Proteins

Proteins represent the major component of sunflower seed (*Helianthus annuus* L.) after oil extraction. The defatted sunflower flour contains about 20–40% crude protein, mainly composed of four different fractions: 40% to 90% of globulins, 10% to 30% of albumin, and two fractions of glutelin and prolamins present in small amounts. They possess interesting functional properties such as gelling, foaming, solubility and emulsifying capacity, which can be compared to soy protein (Gonzalez-Perez and Vereijken, 2007).

According to Nesterenko et al. (2013b), proteins extracted from sunflower seeds can be efficiently used for the microencapsulation of hydrophobic substances using spray drying. Enzymatic hydrolysis and/or acylation were used in order to improve functionality. In the study, the wall material for α -tocopherol microencapsulation comprised sunflower proteins. Core retention ranged from 62% to 100%, and the microcapsules showed sizes of 7 μm to 27 μm . There was a decrease in core retention after enzymatic hydrolysis of proteins, and improvement in the process efficiency after acylation, similar to that exhibited by soy proteins in a previous study (Nesterenko et al., 2012). Still it was highlighted that sunflower proteins prove to be an effective wall material compared to the proteins extracted from soy.

4.8 Other vegetable proteins with favorable properties for use as wall material

In addition to the proteins extracted from plants already studied as wall material, other potential sources have not yet been utilized in the microencapsulation of food ingredients. Laine et al. (2011) observed that the bran protein of modified oat, specifically de-amidated oat protein, has an excellent capability of forming stable emulsions that can be suitable for microencapsulation.

Kimura et al. (2008) reported that bean 7S globulin (*Phaseolus kidney*) has emulsifying and stabilizing capabilities suitable for lipophilic ingredients microencapsulation. Protein isolate properties from three different varieties of beans (*Phaseolus kidney*, *Phaseolus red* and *Phaseolus mung*) were tested and compared to SPI by Liu et al. (2014). Although bean protein isolates demonstrate poorer microencapsulation capacity compared to soy protein, changes in its surface structure may favor the use, because such proteins exhibit interesting properties for use as wall material.

Rodrigues et al. (2012) emphasize that canola protein isolate has interesting features such as gelling and emulsifying, and enhances its use in the industry as being a cheap raw material. In the study of Uruakpa and Arntfield (2005), the interfacial properties of mixtures using canola protein isolate and hydrocolloids such as carrageenan and guar gum were improved by interaction conditions and chemical treatment, making these systems suitable

for food emulsions acquisition and stabilization, being harnessed for use in microencapsulation.

Nesterenko et al. (2013a) suggest that rice and oat proteins also have potential application in microencapsulation, with characteristics such as low cost, good solubility, formation of foams, and emulsions capacity. Moreover, association to polysaccharides and chemical changes may favor its use as wall material.

Overall, research demonstrates that new proteins can be tested as encapsulating agents; however, further studies need to be conducted to verify the behavior of such materials in microcapsule formation and in meeting the needs in relation to the core.

5. Final Considerations

Studies show that the use of various plant proteins as an encapsulating agent is feasible, safe, and effective for the microencapsulation of a huge range of materials; and therefore, consistent with a suitable alternative to animal proteins in the development of biocompatible and low-cost biodegradable microcapsules. Factors such as protein source, technique employed, process conditions and changes in protein structure influence microcapsule characteristics and process efficiency. Furthermore, compliance with various purposes that are desirable to encapsulate particular components is also dependent on these variables.

Most studies evaluate microencapsulation efficiency and characterize microcapsules with respect to size and shape and have shown the feasibility of the use of vegetable proteins as wall material, for different techniques, considering that the microcapsules showed yield, physical and release core characteristics satisfactory in relation to the objective of the process. However, there is still little information in terms of storage (core stability and protection) and consumption (core release at appropriate time and locations), necessary for the effective performance of the encapsulated compound) including the application of microcapsules in new products and their stability during the product shelf life.

Microencapsulation of compounds by proteins from plant sources is a trend in the food industry and opens a new path for specific applications, and for the development of innovative delivery systems and functional foods with unique properties and added value.

References

Augustin, M. A., Sanguansri, L., Bode, O. (2006). Maillard reaction products as encapsulants for fish oil powders. *Journal of Food Science*, 71 (2), 25–32.

Aryee, F. N. A., Nickerson, M. T. (2012). Formation of electrostatic complexes involving mixtures of lentil protein isolates and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 48 (2), 520–527.

Bittencourt, L. L., Pedrosa, C., Sousa, V. P., Pierucci, A. P., Citelli, M. (2013). Pea protein provides a promising matrix for microencapsulating iron. *Plant Foods for Human Nutrition*, 68 (4), 333–339.

Borgogna, M., Bellich, B., Zorzin, L., Lapasin, R., Cesàro, A. (2010). Food microencapsulation of bioactive compounds: Rheological and thermal characterisation of non-conventional gelling system. *Food Chemistry*, 122 (2), 416–423.

Boye, J., Zare, F., Pletch, A. (2010). Pulse proteins: processing, characterization, functional properties and applications in food and feed. *Food Research International*, 43 (2), 414–431.

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, 104 (4), 467–483.

Chávez, B. E., Ledebøer, A. M. (2007). Drying of Probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology: An International Journal*, 25 (7-8), 1193–1201.

Chen, L.Y., Remondetto, G. E., Subirade, M. (2006). Food protein-based materials as nutraceutical delivery systems. *Trends in Food Science & Technology*, 17 (5), 272–283.

Chen, L., Subirade, M. (2009). Elaboration and characterization of soy/zein protein microspheres for controlled nutraceutical delivery. *Biomacromolecules*, 10 (12), 3327–3334.

Cho, Y. H., Shim, H. K., Park, J. (2003). Encapsulation of Fish Oil by an Enzymatic Gelation Process Using Transglutaminase Cross-linked Proteins. *Journal of Food Science*, 68 (9), 2717–2723.

Clark, J. P. (2002). Food encapsulation: capturing one substance by another. *Food Technology*, 56 (11), 63–65.

Conto, L. C., Grosso, C. R. F., Gonçalves, L.A.G. (2013). Chemometry as applied to the production of OMEGA-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. *Food Science and Technology*, 53 (1), 218–224.

Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., Khutoryanskiy, V. V. (2012). Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162 (1), 56–67.

Cousin, F., Gummel, J., Combet, S., Boué, F. (2011). The model Lysozyme–PSSNa system for electrostatic complexation, similarities and differences with complex coacervation. *Advances in Colloid and Interface Science*, 167 (1–2), 71–84.

Dalmoro, A., Barba, A. A., Lamberti, G., Grassi, M., D'amore, M. (2012). Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, 80 (3), 471–477.

Davidov-Pardo, G., Rocchia, P., Salgado, D., Leon, A. E., Pedroza-Islas, R. (2008). Utilization of different wall materials to microencapsulate fish oil evaluation of its behavior in bread products. *American Journal of Food Technology*, 3 (6), 384–393.

De Kruif, C. G., Weinbreck, F., De Vries, R. (2004). Complex coacervation of proteins and anionic polysaccharides. *Current Opinion in Colloid & Interface Science*, 9 (5), 340–349.

Deng, X., Chen, Z., Huang, Q., Fu, X., Tang, C. (2014). Spray-drying microencapsulation of β -carotene by soy protein isolate and/or OSA-modified starch. *Journal of Applied Polymer Science*, 131 (12), 1–10.

Desai, K. G. H., Park, H. J. (2005). Recent developments in microencapsulation of food ingredients. *Drying Technology Journal*, 23 (7), 1361–1394.

De Vos, P., Faas, M. M., Spasojevic, M., Sikkema, J. (2010). Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, 20 (4), 292–302.

Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N. P. (2013). Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. *Food Research International*, 51 (2), 503–509.

Ducel, V., Richard, J., Saulnier, P., Popineau, Y., Boury, F. (2004). Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: application to the microencapsulation of oil droplets. *Colloids and Surfaces*, 232 (2-3), 239–247.

Duranti, M. (2006). Grain legume proteins and nutraceutical properties. *Fitoterapia*, 77 (2), 67–82.

Drunkler, D. A., Fett, R., Luiz, M. T. B. (2006). Avaliação da estabilidade de betalainas em extrato de beterraba (*Beta vulgaris* L.) com ciclodextrinas. *Boletim do Centro de Pesquisa e Processamento de Alimentos*, 24 (1), 259–276.

Elmer, C., Karaca, A. C., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2011). Complex coacervation in pea protein isolate–chitosan mixtures. *Food Research International*, 44 (5), 1441–1446.

Favaro-Trindade, C. S., Santana, A. S., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Netto, F. M. (2010). The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. *Food Hydrocolloid*, 24 (4), 336–340.

Finnie, C., Svensson, B. (2009). Barley seed proteomics from spots to structures. *Journal of Proteomics*, 72 (3), 315–324.

Gaggia, F., Gioia, D. D., Baffoni, L., Biavati, B. (2011). The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (1), S58–S66.

Gan, C.Y., Cheng, L.H., Easa, A.M. (2008). Evaluation of microbial transglutaminase and ribose cross-linked soy protein isolate-based microcapsules containing fish oil. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 9 (4), 563–569.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2007). Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food Research International*, 40 (9), 1107–1121.

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Beney, L., Chambin, O., Voilley, A., Saurel, R. (2012). Properties of spray-dried food flavours microencapsulated with two-layered membranes: Roles of interfacial interactions and water. *Food Chemistry*, 132 (4), 1713–1720.

Gharsallaoui, A., Saurel, R., Chambin, O., Cases, E., Voilley, A., Cayot, P. (2010). Utilisation of pectin coating to enhance spray-dry stability of pea protein-stabilised oil-in-water emulsions. *Food Chemistry*, 122 (2), 447–454.

Gonzalez-Perez, S., Vereijken, J. M. (2007). Sunflower proteins: overview of their physicochemical, structural and functional properties. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 87 (12), 2173–2191.

Gouin, S. (2004). Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. *Trends in Food Science and Technology*, 15 (7–8), 330–347.

Granato, D., Ribeiro, J. C. B., Castro, I. A., Masson, M, L. (2010). Sensory evaluation and physicochemical optimization of soy-based desserts using response surface methodology. *Food Chemistry*, 121 (3), 899–906.

Gu, X., Campbell, L. J., Euston, S. R. (2009). Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. *Food Research International*, 42 (8), 925–932.

Huang, G. Q., Sun, Y. T., Xiao, J. X., Yang, J. (2012). Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan. *Food Chemistry*, 135 (2), 534–539.

Jenkins, J. A., Breiteneder, H., Mills, E. N. (2007). Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 120 (6), 1399–1405.

Jiang, J., Chen, J., Xiong, Y. L. (2009). Structural and emulsifying properties of soy protein isolate subjected to acid and alkaline pH-shifting processes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (16), 7576–7583.

Joshi, M., Adhikari, B., Aldred, P., Panozzo, J. F., Kasapis, S., Barrow, C. J. (2013). Interfacial and emulsifying properties of lentil protein isolate. *Food Chemistry*, 134 (3), 1343–1353.

Jun-Xia, X., Hai-Yan, Y., Jian, Y. (2011). Microencapsulation of sweet orange oil by complex coacervation with soybean protein isolate/gum Arabic. *Food Chemistry*, 125 (4), 1267–1272.

Kagami, Y., Sugimura, N., Fujishima, N., Matsuda, K., Kometani, T., Matsumura, Y. (2003). Oxidative stability, structure and physical characteristics of microcapsules formed by spray drying of fish oil with protein and dextrin wall materials. *Journal of Food Science*, 68 (7), 2248–2255.

Kanakdande, D., Bhosale, R., Singhal, R. (2007). Stability of cumin oleoresin microencapsulated in different combination of gum Arabic, maltodextrin and modified starch. *Carbohydrate Polymers*, 67 (4), 536–541.

Karaca, A. C., Nickerson, M. T., Low, N. H. (2011). Lentil and chickpea protein stabilized emulsions: Optimization of emulsion formulation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59 (24), 13203–13211.

Karaca, A. C., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2013). Encapsulation of flaxseed oil using a bench-top spray dryer for legume protein-maltodextrin microcapsule preparation. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 61 (21), 5148–5155.

Karaca, A. C., Nickerson, M. T., Low, N. H. (2013). Microcapsule production employing chickpea or lentil protein isolates and maltodextrin: Physicochemical properties and oxidative protection of encapsulated flaxseed oil. *Food Chemistry*, 139 (1–4), 448–457.

Kimura, A., Fukuda, T., Zhang, M., Motoyama, S., Maruyama, N., Utsumi, S. (2008). Comparison of physicochemical properties of 7S and 11S globulins from pea, Fava bean, cowpea, and French bean with those of soybean – French bean 7S globulin exhibits excellent properties. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56 (21), 10273–10279.

Klassen, D. R., Nickerson, M. T. (2012). Effect of pH on the formation of electrostatic complexes within admixtures of partially purified pea proteins (legumin and vicilin) and gum Arabic polysaccharides. *Food Research International*, 46 (1), 167–176.

Klemmer, K. J., Waldner, L., Stone, A., Low, N. H., Nickerson, M. T. (2012). Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. *Food Chemistry*, 130 (3), 710–715.

Kralovec, J. A., Zhang, S., Zhang, W., Barrow, C. J. (2012). A review of the progress in enzymatic concentration and microencapsulation of omega-3 rich oil from fish and microbial sources. *Food Chemistry*, 131 (2), 639–644.

Laine, P., Toppinen, E., Kivelä, R., Taavitsainen, V. M., Knuutila, O., Sontag-Strohman, T., Jouppilaa, K., Lopenena, J. (2011). Emulsion preparation with modified oat bran: Optimization of the emulsification process for microencapsulation purposes. *Journal of Food Engineering*, 104 (4), 538–547.

Lazko, J., Popineau, Y., Legrand, J. (2004). Soy glycinin microcapsules by simple coacervation method. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 37 (1–2), 1–8.

Liao, L., Luo, Y., Zhao, M., Wang, Q. (2012). Preparation and characterization of succinic acid deamidated wheat gluten microspheres for encapsulation of fish oil. *Colloids Surf B Biointerfaces*. 92 (2012), 305–314.

Linares, E., Larre, C., Popineau, Y. (2001). Freeze- or spray-dried gluten hydrolysates. 1. Biochemical and emulsifying properties as a function of drying process. *Journal of Food Engineering*, 48 (2), 127–135.

Liu, C., Yang, X. Q., Lin, M. G., Zhao, R. Y., Tang, C. H., Luo, L., Liu, L. (2011). Complex coacervation of chitosan and soy globulins in aqueous solution: a electrophoretic mobility and light scattering study. *International Journal of Food Science & Technology*, 46 (7), 1363–1369.

Liu, F., Chen, Z., Tang, C. H. (2014). Microencapsulation properties of protein isolates from three selected Phaseolus legumes in comparison with soy protein isolate. *Food Science and Technology*, 55 (1), 74–82.

Liu S., Low, N.H., Nickerson, M. T. (2009). Effect of pH, salt, and biopolymer ratio on the formation of pea protein isolate-gum arabic complexes. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 57 (4), 1521–1526.

Madene, A., Jacquot, M., Scher, J., Desobry, S. (2006). Flavour encapsulation and controlled release – a review. *International Journal of Food Science & Technology*, 41 (1), 1–21.

Mauguet, M.C., Legrand, J., Brujes, L., Carnelle, G., Larre, C., Popineau, Y. (2002). Gliadin matrices for microencapsulation processes by simple coacervation method. *Journal of Microencapsulation*, 19 (3), 377–384.

Mendanha, D.V., Ortiz, S. E. M., Favaro-Trindade, C. S., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E.S., Thomazini, M. (2009). Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. *Food Research International*, 42 (8), 1099–1104.

Moure, A., Sineiro, J., Domínguez, H., Parajó, J. C. (2006). Functionality of oilseed protein products: a review. *Food Research International*, 39 (9), 945–963.

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 23 (2), 182–186.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2012). Influence of soy protein's structural modifications on their microencapsulation properties: α -Tocopherol microparticle preparation. *Food Research International*, 48 (2), 387–396.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2013). Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. *Industrial Crops and Products*, 42 (2013), 469–479.

Nesterenko, A., Alric, I., Silvestre, F., Durrieu, V. (2014). Comparative study of encapsulation of vitamins with native and modified soy protein. *Food Hydrocolloids*, 38 (2014), 172–179.

Nori, M. P., Favaro-Trindade, C. S., Alencar, S. M., Thomazini, S. M., Balieiro, J.C.C. (2010). Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. *Food Science and Technology*, 44 (2), 429–435.

Nunes, M. C., Batista, P., Raymundo, R., Alves, M. M., Sousa, I. (2003). Vegetable proteins and milk puddings. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, 31 (1–4), 21–29.

Ortiz, S. E. M., Mauri, A., Monterrey-Quintero, E. S., Trindade, M. A., Santana, A. S., Favaro-Trindade, C. S. (2009). Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. *Food Science and Technology*, 42 (5), 919–923.

Peighambaroust, S. H., Tafti, A. G., Hesari, J. (2011). Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. *Trends in Food Science & Technology*, 22 (5), 215–224.

Pereira, H. V. R., Saraiva, K. P., Carvalho, L. M. J., Andrade, L. R., Pedrosa, C., Pierucci, A. P. T. R. (2009). Legumes seeds protein isolates in the production of ascorbic acid microparticles. *Food Research International*, 42 (1), 115–121.

Pierucci, A. P. T. R., Andrade, L. R., Baptista, E. B., Volpato, N. M., Rocha-Leao, M. H. M. (2006). New microencapsulation system for ascorbic acid using pea protein concentrate as coat protector. *Journal of Microencapsulation*, 23 (6), 654–662.

Quispe-Condori, S., Saldana, M. D. A., Temelli, F. (2011). Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. *Food Science and Technology*, 44 (9), 1880–1887.

Rascon, M. P., Beristain, C. I., Garcia, H. S., Salgado, M. A. (2010). Carotenoid retention and storage stability of spray-dried paprika oleoresin using gum Arabic and soy protein isolate as wall materials. *Food Science and Technology*, 44 (2), 549–557.

Rodrigues, I., Coelho, J., Carvalho, M. (2012). Isolation and valorisation of vegetable proteins from oilseeds plants: methods, limitations and potential. *Journal of Food Engineering*, 109 (3), 337–346.

Ruiz-Henestrosa, V. P., Sanchez, C. C., Escobar, M. M. Y., Jimenez, J. J. P. Rodríguez, F. M., Patino, J. M. R. (2007). Interfacial and foaming characteristics of soy globulins as a function of pH and ionic strength. *Colloids and Surfaces*, 309 (1-3), 202–215.

Rusli, J. K., Sanguansri, L., Augustin, M. A. (2006). Stabilization of oils by microencapsulation with heated protein–glucose syrup mixtures. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 83 (11), 965–972.

Semyonov, D., Ramon, O., Kaplun, Z., Levin-Brener, L., Gurevich, N., Shimoni, E. (2010). Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. *Food Research International*, 43 (1), 193–202.

Shukla, R., Cheryan, M. (2001). Zein: the industrial protein from corn. *Industrial Crops and Products*, 13 (2001), 171–192.

Smaling, E. M. A., Roscoe, R., Lesschen, J. P., Bouwman, A. F., Comunello, E. (2008). From forest to waste: assessment of the Brazilian soybean chain, using nitrogen as a marker. *Agriculture, Ecosystems and Environment*, 128, 185–197.

Sultana, K., Godward, G., Reynolds, N. (2000). Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. *International Journal of Food Microbiology*, 62 (1–2), 47–55.

Sunny-Roberts, E. O., Knorr, D. (2009). 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*, 19 (4), 209–214.

Tang, C. H., Li, X. R. (2013a). Microencapsulating properties of soy protein isolate: influence of preheating and/or blending with lactose. *Journal of Food Engineering*, 117 (3), 281–290.

Tang, C. H., Li, X. R. (2013b). Microencapsulation properties of soy protein isolate and storage stability of the correspondingly spray-dried emulsions. *Food Research International*, 52 (1), 419–428.

Tomaro-Duchesneau, C., Saha, S., Malhotra, M., Kahouli, I., Prakash, S. (2013). Microencapsulation for the Therapeutic Delivery of Drugs, Live Mammalian and Bacterial Cells, and Other Biopharmaceuticals: Current Status and Future Directions. *Journal of Pharmaceutics*, 2013, 1-19.

Tang, C. H., Wang, X. Y., Yang, X. Q., Li, L. (2009). Formation of soluble aggregates from insoluble commercial soy protein isolate by means of ultrasonic treatment and their gelling properties. *Journal of Food Engineering*, 92 (4), 432-437.

Tapal, A., Tiku, P. K. (2012). Complexation of curcumin with soy protein isolate and its implications on solubility and stability of curcumin. *Food Chemistry*, 130 (4), 960–965.

Torres-Giner, S., Martinez-Abad, A., Ocio M. J., Lagaron, J. M. (2010). Stabilization of a nutraceutical omega-3 fatty acid by encapsulation in ultrathin electrosprayed zein prolamine. *Journal of Food Science*, 75 (6), 69–79.

Uruakpa, F. O., Arntfield, S. D. (2005). Emulsifying characteristics of commercial canola protein–hydrocolloid systems. *Food Research International*, 38 (6), 659–672.

Venkatesan, P., Manavalan, R., Valliappan, K. (2009). Microencapsulation: A vital technique in novel drug delivery system. *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*, 1 (4), 26-35.

Wang, R., Tian, Z., Chen, L. (2011). A novel process for microencapsulation of fish oil with barley protein. *Food Research International*, 44 (9), 2735–2741.

Wang, Y., Su, C. P., Schulmerich, M., Padua, G. W. (2013). Characterization of core–shell structures formed by zein. *Food Hydrocolloids*, 30 (2), 487–94.

Xiao, D., Davidson, P. M., Zhong, Q. (2011). Release and antilisterial properties of nisin from zein capsules spray-dried at different temperatures. *Food Science and Technology*, 44 (10), 1977-1985.

Xiao, D., Zhong, Q. (2011). In vitro release kinetics of nisin as affected by Tween 20 and glycerol co-encapsulated in spray-dried zein capsules. *Journal of Food Engineering*, 106 (1), 65–73.

Xu, H., Zhang, G. (2014). Slow digestion property of microencapsulated normal corn starch, *Journal of Cereal Science*, 60 (1), 99–104.

Xue, F., Li, C., Liu, Y., Zhu, X., Pan, S., Wang, L. (2013). Encapsulation of tomato oleoresin with zein prepared from corn gluten meal. *Journal of Food Engineering*, 119 (3), 439–445.

Yalçın, E., Çelik, S., İbanoğlu, E. (2008). Foaming properties of barley protein isolates and hydrolysates. *European Food Research and Technology*, 226 (5), 967–974.

Zhong, Q., Jin, M. (2009). Zein nanoparticles produced by liquid–liquid dispersion. *Food Hydrocolloids*, 23 (8), 2380–2387.

Zhong, Q., Jin, M., Davidson, P. M., Zivanovic, S. (2009). Sustained release of lysozyme from zein microcapsules produced by a supercritical anti-solvent process. *Food Chemistry*, 115 (2), 697–700.

Zhong, Q., Jin, M., Xiao, D., Tian, H., Zhang, W. (2008). Application of supercritical anti-solvent techniques for syntheses of delivery systems of bioactive food components. *Food Biophysics*, 3 (2), 186–190.

Highlights

- We review the use of vegetable proteins as wall material for microencapsulation.
- Different vegetable protein sources are studied, in particular soy and pea proteins.
- The encapsulating properties of vegetable proteins are reported.
- The techniques employed and the encapsulated materials are described.
- The characterization and application of the microcapsules are discussed.

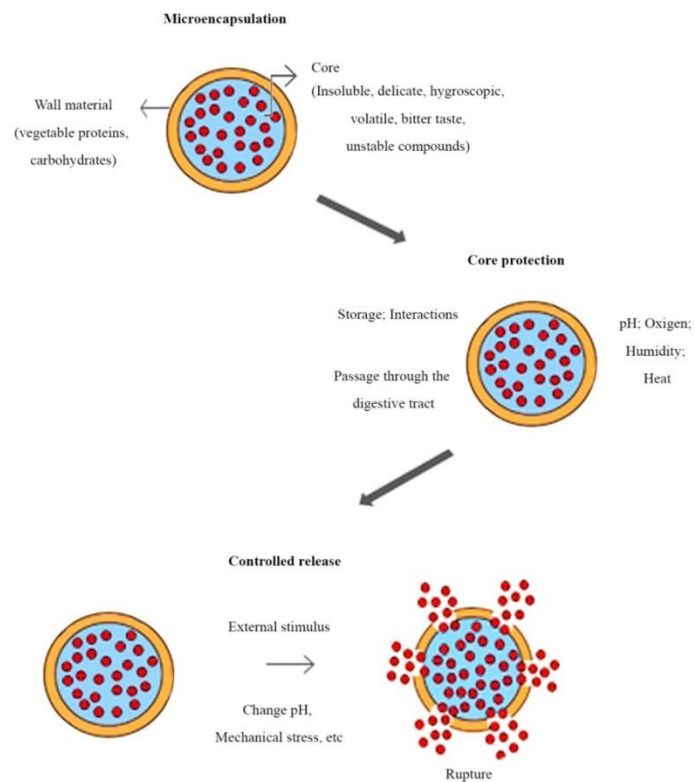


Figure 1. General aspects of Microencapsulation (Redrawn from Tomaro-Duchesneau et al., 2013).

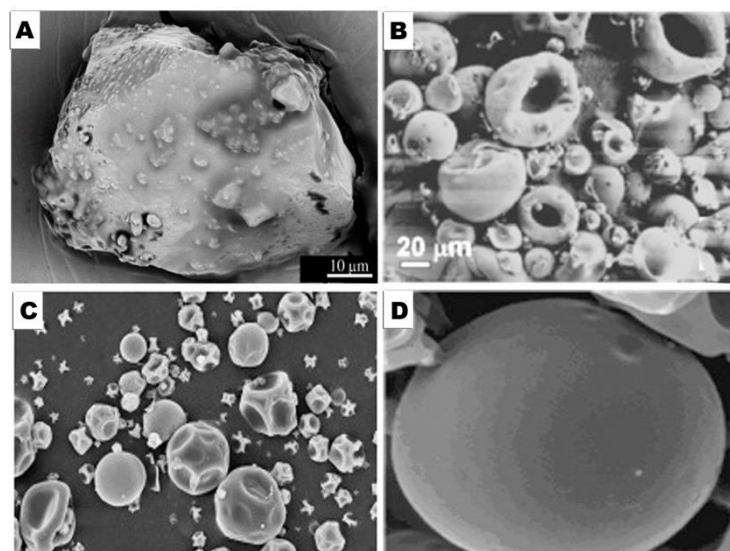


Figure 2. Morphological characteristics of microcapsules produced by different methods of microencapsulation (a) emulsification/lyophilization; (b) Supercritical Anti-Solvent Technology; (c) spray drying; (c) complex coacervation (Gan et al., 2008; Zhong et al., 2008; Favaro-Trindade et al., 2010; Jun-Xia et al., 2011).

ARTIGO CIENTÍFICO 2

Otimização da microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* com extrato de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes por *spray drying*

Leidiane Andreia Acordi MENEZES¹, Paulo Rodrigo Stival BITTENCOURT², Elídia A. Vetter FERRI³, Deisy Alessandra DRUNKLER¹,

¹Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Medianeira, Avenida Brasil 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil; leidianeacordi@gmail.com; deisydrunkler@utfpr.edu.br.

²Programa de Pós-Graduação em Tecnologias Ambientais (PPGTAMB), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Medianeira, Avenida Brasil 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil; paulob@utfpr.edu.br.

³Departamento de Coordenação de Química (COQUI), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Pato Branco, Via do Conhecimento km 01, Fraron, CEP 85503-390, Pato Branco, Paraná, Brasil; eferri@utfpr.edu.br.

RESUMO

A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de partículas que permite a formação de microcápsulas e tem sido estudada como alternativa na manutenção da viabilidade de microrganismos probióticos incorporados em alimentos. O objetivo deste estudo foi otimizar a microencapsulação de *L. acidophilus* La-5 por *spray drying*, utilizando extrato de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes. Para tanto, aplicou-se planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR), com três variáveis (temperatura de entrada do ar de secagem, razão maltodextrina/extrato de soja na composição do material de parede e vazão de alimentação do sistema). A caracterização das microcápsulas compreendeu as análises de morfologia e tamanho de partícula, umidade, atividade de água, higroscopicidade, TG, DSC e FTIR. O planejamento experimental permitiu a determinação da faixa ótima para a viabilidade do probiótico, com rendimento de 83% (temperatura de entrada de ar de 82°C a 89°C, razão maltodextrina/extrato de soja de 2:3 m:m a 1:0,93 m:m e vazão de 0,52 a 0,57 L.h⁻¹). O aumento na proporção de extrato de soja na composição do material de parede favoreceu a

sobrevivência do microrganismo à microencapsulação, enquanto a maltodextrina melhorou as propriedades de secagem das partículas. As variáveis de processo afetaram significativamente o rendimento e as características físicas das microcápsulas, que apresentaram diâmetro médio entre 4,97 μm e 8,82 μm , formato arredondado e presença de concavidades na superfície. A seleção das condições ótimas de *spray drying* permitiu a obtenção de microcápsulas com atividade de água (0,3) e umidade adequadas (~5%) e rendimento de processo satisfatório (~83%). As análises térmicas e de FTIR sugeriram a ocorrência de possíveis interações entre os agentes encapsulantes e ainda que as microcápsulas podem proteger as células microbianas frente à desidratação e ao aquecimento.

Palavras-chave: *Spray drying*, probióticos, proteínas vegetais.

ABSTRACT

The microencapsulation is a particles coating technology, which enables the formation of microcapsules and has been studied as an alternative to maintaining the viability of probiotic microorganisms incorporated into foods. The objective of this study was to optimize the microencapsulation of *L. acidophilus* La-5 by spray drying, using soybean extract powder and maltodextrin as encapsulating agents. Therefore, it was applied an experimental design Central Composite Rotatable Design (CCRD), with three variables (drying air inlet temperature, maltodextrin/soy extract ratio from and feed flow rate), taking as dependent variable the encapsulation yield. The characterization of the microcapsules involved the analysis of morphology and particle size, moisture, water activity, hygroscopicity, DSC, TG and FTIR. The experimental design allowed the determination of optimal values for the viability of the probiotic, with a microencapsulation yield of 83% (drying air inlet temperature from 82°C to 89°C, maltodextrin/soy extract ratio 2:3 a 1:0,93 (m:m) and feed flow rate from 0,52 to 0,57 L.hr⁻¹). The increase in the soy extract ratio in the composition of the wall material improved the survival of the microorganism to the microencapsulation, while maltodextrin improved the drying properties of the particles. The process variables significantly affected the microencapsulation yield and physical characteristics of the microcapsules, which had a mean diameter of 4.97 μm and 8.82 μm , rounded shape and presence of concavities on the surface. The selection of the atomization optimum conditions allowed to obtain microcapsules with adequate water activity (~0,3) and moisture content (5%) and satisfactory process yield (~83%). The FTIR and thermal analysis suggested the occurrence of possible interactions between encapsulating agents and that the microcapsules can protect the microbial cells front to the heating and dehydration.

Keywords: Spray drying, probiotics, vegetable proteins.

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados regularmente e, em quantidade adequada, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2006). Tais bactérias conferem diversos benefícios ao hospedeiro, entre eles

aumento da imunidade; redução da população de agentes patógenos devido à sua atuação como barreira intestinal, à competição por nutrientes e pelos sítios de adesão e à produção de compostos antimicrobianos; melhoria das funções digestivas e, por conseguinte, auxílio no tratamento de doenças diarreicas; efeitos anti-inflamatórios e antioxidantes; auxílio no tratamento de alergia alimentar; redução do colesterol sérico; além de possuírem propriedades anticarcinogênicas (SHAH, 2007).

No entanto, a sensibilidade destes microrganismos tem contribuído para que a sua sobrevivência em concentrações suficientes quando incorporados aos alimentos seja o maior obstáculo para a sua aplicação na indústria alimentícia (ANNAN; BORZA; HANSEN, 2008), indicando a necessidade da aplicação de técnicas como a microencapsulação, apontada como um método promissor na proteção de bactérias probióticas (CHAMPAGNE et al., 2011).

No processo de formação de microcápsulas, o revestimento externo é conhecido como agente encapsulante ou material de parede e ocupa importante papel na eficiência do processo, que tem como grande desafio a seleção de um material de parede seguro e compatível, que proteja e mantenha o material encapsulado ativo até o momento do consumo e possibilite a sua chegada ao destino fisiológico. Os agentes encapsulantes mais empregados são as proteínas (caseinato de sódio, proteínas de leite e do soro do leite) e os carboidratos (goma arábica, alginatos, carragena, pectina, quitosana) (GHARSALLAOUI et al., 2007; NAZZARO et al., 2012). A maltodextrina, por sua vez, tem sido associada a proteínas como agente encapsulante por melhorar as propriedades de secagem (ANEKELLA; ORSAT, 2013).

As proteínas da soja tem se caracterizado como o melhor substituto para as proteínas de origem animal como material de parede, devido à sua renovabilidade, baixo-custo, elevado valor nutricional, propriedades funcionais como a gelificação, a capacidade de emulsificação e formação de filmes e da sua menor alergenicidade em comparação às proteínas do leite (GU; CAMPBELL; EUSTON, 2009; TANG; LI, 2013; NESTERENKO et al., 2013). O extrato de soja em pó contém aproximadamente 40% de proteína, 13% de lipídios, 16% de fibras, 20% de carboidratos e seu conteúdo de sólidos totais é de aproximadamente 90%. Todos os componentes das sementes de soja estão presentes no extrato, incluindo compostos funcionais tais como isoflavonas e fibras alimentares solúveis e insolúveis, além de oligossacarídeos e minerais como cálcio e ferro (NILUFER-ERDIL et al., 2012).

Atualmente, o *spray drying*, devido à simplicidade e ao baixo custo, é uma das técnicas mais empregadas para encapsular bactérias probióticas (PEIGHAMBARDoust; TAFTI; HESARI, 2011). De acordo com Corcoran et al. (2004), Schutyser et al. (2012) e Anekella; Orsat, (2013), além da interação entre a bactéria e o material de parede, o impacto da microencapsulação por *spray drying* está associado aos parâmetros de processo

(temperatura de entrada e saída de ar, vazão de alimentação, design da câmara de secagem, etc.), aos processos termodinâmicos (transferência de calor e massa na desidratação das gotículas), à cinética de secagem e às condições biológicas da bactéria encapsulada (espécie, adaptação a condições de estresse e fase de crescimento).

Diante do exposto, o presente trabalho teve como objetivo otimizar o processo de microencapsulação por *spray drying* do microrganismo *Lactobacillus acidophilus* utilizando como agentes encapsulantes extrato aquoso de soja e maltodextrina, por meio da aplicação de planejamento experimental do tipo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para o estudo da influência das condições de processo sobre o rendimento da microencapsulação e as características das microcápsulas.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS* (La-5)

A curva de crescimento de *L. acidophilus* La-5 (Chr. Hansen, Valinhos, Brasil) foi determinada de acordo com Anekella; Orsat (2013) com adaptações. A cultura em proporção de 1% (m:v) foi adicionada em caldo MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) e incubada em incubadora do tipo *Shaker* (SL-221, Solab, Piracicaba, Brasil) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 16 horas a 110 rpm. O crescimento bacteriano foi acompanhado a cada hora, por meio da técnica de turbidimetria, medida pela densidade óptica em espectrofotômetro UV-vis (Lambda XLS, Perkin Elmer) a 600 nm, para cada diluição seriada, correlacionada com logaritmo da contagem bacteriana, obtido por enumeração de células viáveis em meio MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) por plaqueamento em profundidade e incubação a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas em jarras anaeróbicas contendo Anaerobac[®] (Probac, São Paulo, Brasil) (ICMSF, 1982). Os dados obtidos foram aplicados na obtenção da curva de crescimento do microrganismo, com o intuito de estipular o tempo necessário para que a cultura atingisse a fase estacionária.

2.2. OTIMIZAÇÃO DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO DE *L. ACIDOPHILUS* (La-5) POR *SPRAY DRYING*

O processo de microencapsulação foi realizado de acordo com o DCCR de 2³, visando à otimização da resposta rendimento da microencapsulação e tendo como variáveis a temperatura de entrada do ar na câmara de secagem, com temperaturas compreendidas entre 70°C e 100°C; a razão maltodextrina/extrato de soja na suspensão de *spray drying*, cujas proporções variaram de 1:50 (m:m) à 2,4:1 (m:m); e a vazão de entrada da amostra no *spray dryer*, que variou de 0,45 L.h⁻¹ à 0,65 L.h⁻¹. O planejamento foi realizado com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos.

A cultura probiótica de *L. acidophilus* (1% m:v) foi inoculada em caldo MRS e incubada a 37°C ± 1°C até atingir a fase estacionária (12 horas). A seguir, a biomassa do probiótico foi recolhida por centrifugação (3000 g a 4°C durante 10 minutos) de acordo com Pispán; Hewitt; Stapley (2013) para posterior adição à suspensão de *spray drying*.

O extrato de soja (Jasmine, Curitiba, Brasil) e a maltodextrina (ED 20, Maltogill®, Cargill, São Miguel do Iguaçu, Brasil) foram dispersos em água estéril até obtenção de suspensões com concentração de sólidos totais de 200 g.L⁻¹ ± 2 g.L⁻¹, preparadas em cada tratamento de acordo com o delineamento experimental (Tabela 1) e homogeneizadas em banho ultrassônico (37°C ± 2°C, frequência 80 kHz, potência 100 W, 15 minutos) (Elma®, Elmasonic P120H, São Paulo, Brasil). Em seguida, as suspensões foram adicionadas de 1% (m:v) da cultura de em fase estacionária e novamente homogeneizadas por um minuto em agitador magnético à temperatura ambiente (25°C ± 1°C) (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil).

As suspensões foram submetidas à secagem em *spray dryer* de escala laboratorial (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, Brasil), mantidas sob agitação à temperatura ambiente e alimentadas para a câmara de secagem por meio de bomba peristáltica sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem (2 - 4 kgf.cm⁻²), vazão de ar comprimido (35 kgf.cm⁻²) e diâmetro de saída do ar no sistema (1 mm) com bico duplo fluído. As partículas em pó produzidas foram coletadas na base do ciclone e armazenadas em recipiente de vidro hermeticamente fechados, previamente esterilizados e mantidas sob refrigeração a 4°C ± 1°C durante a realização das análises.

2.2.1 Determinação do Rendimento do Processo de Microencapsulação por *Spray Drying*

A influência das variáveis estudadas sobre a viabilidade celular foi determinada com base no rendimento da microencapsulação (*Encapsulation Yield* – EY %), calculado por meio da Equação 1 (PICOT; LACROIX, 2004):

$$EY = (N/N_0) * 100 \quad (1)$$

Onde:

N_0 : número de células viáveis na suspensão de *spray drying*

N : número de células viáveis no pó obtido, ambos expressos em log UFC.g⁻¹

A enumeração das células viáveis foi realizada de acordo com o método descrito por Fritzen-Freire et al. (2012), com adaptações. Para enumeração dos microrganismos microencapsulados, as células foram primeiramente liberadas das microcápsulas homogeneizando-se 0,1 g das microcápsulas em 9,9 mL de tampão fosfato (0,1 mol.L⁻¹, pH 7,0) em agitador magnético (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. Posteriormente, foram feitas as respectivas diluições seriadas e o plaqueamento em profundidade em ágar MRS, em triplicata. As placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (Anaerobac®, Probac, São Paulo, Brasil) a 37°C ± 1°C por 48 horas. A contagem de células viáveis foi expressa em Log de unidades formadoras de colônia por grama (log UFC.g⁻¹).

2.2.2 Validação do modelo proposto pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para Otimização da Microencapsulação

Utilizando a metodologia de superfície de resposta, a relação entre as variáveis foi expressa matematicamente na forma de um polinômio de segunda ordem da resposta em função dos fatores experimentais. A partir da análise das superfícies de resposta e curvas de contorno obtidas a partir da realização do DCCR, observou-se a região ótima para a maior sobrevivência celular ao processo de *spray drying* e os valores críticos do modelo que maximizariam a resposta. Para a validação experimental da resposta prevista pelo modelo proposto foi realizado um ensaio em triplicata, nas condições otimizadas por meio do DCCR.

2.3 PROPRIEDADES FÍSICAS DAS MICROCÁPSULAS

2.3.1 Morfologia e Tamanho das Partículas

As características morfológicas e o tamanho médio das microcápsulas foram observados por microscopia eletrônica de varredura (TM 3000 Tabletop Scanning Electron Microscope, HITACHI, Schaumburg, Estados Unidos). Para calcular os diâmetros médios,

120 partículas de cada amostra de microcápsulas foram medidas (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

2.3.2 Atividade de Água, Umidade e Higroscopicidade das Microcápsulas

A atividade de água das microcápsulas foi determinada em equipamento analisador de atividade de água (Aqualab® 4TE, Decagon, São Paulo, Brasil) após a estabilização das microcápsulas a 25°C por 30 minutos. A umidade foi determinada por secagem em estufa a 102°C \pm 2°C até peso constante (AOAC, 2005). A higroscopicidade dos pós das microcápsulas foi determinada seguindo a metodologia proposta por Fritzen-Freire et al. (2012).

2.3.3 Análise do Comportamento Térmico das Microcápsulas de *L. acidophilus* La-5 por Calorimetria Diferencial de Varredura (DSC) e Análise Termogravimétrica (TGA)

Os microrganismos nas formas livre e microencapsulada e os materiais de parede foram submetidos às análises de DSC e TG seguindo a metodologia descrita por Fritzen-Freire et al. (2012), com algumas modificações. Para obtenção das curvas de DSC, 2,0 mg (\pm 0,2 mg) de amostra foram acondicionadas em cadinhos de alumínio selados, aquecidos de 30°C a 300°C, com razão de aquecimento de 10°C.min⁻¹ e mantidos sob fluxo constante de N₂ (20 mL.min⁻¹). As curvas de TG foram obtidas sob as mesmas condições experimentais, no entanto, acondicionando-se 4,0 mg (\pm 0,2 mg), de cada amostra em cadinhos de alumínio. O equipamento STA 6000 (*Simultaneous Thermal Analyser*, PerkinElmer Frontier) foi previamente calibrado com padrão de referência de índio.

2.3.4 Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR)

Os espectrogramas das amostras na região do infravermelho foram obtidos com o FTIR *PerkinElmer Frontier Spectrum 100* (PerkinElmer Frontier), utilizando o modo de refletância total atenuada (UATR), no intervalo de número de onda de 4000-600 cm⁻¹, com resolução de 4 pontos por cm⁻¹. Amostras dos materiais encapsulantes, das células livres e

das microcápsulas foram inseridas sobre o leitor do equipamento para caracterização por meio do espectro gerado em computador. Os espectros e dados obtidos por infravermelho foram analisados pelo *software OriginPro 8.0* para verificação da interação entre os materiais encapsulantes e encapsulados.

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando detectado diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% ou 10% de significância, ao Teste de *Tukey studentized*, utilizando o programa computacional *Statistica 11.0* (Statsoft Inc., Tulsa, OK). Para avaliar o efeito das variáveis sobre as respostas foi realizada a análise de efeitos. O programa também foi usado para gerar as superfícies de resposta obtidas a partir da realização do DCCR. A adequacidade dos modelos foi avaliada através de Análise de Variância (ANOVA).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 CURVA DE CONCENTRAÇÃO BACTERIANA DE *LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS*

A fase estacionária de crescimento da cultura de *L. acidophilus* La-5 teve início após 12 horas de ativação, momento a partir do qual a contagem variou de 10,24 log UFC.g⁻¹ a 10,42 log UFC.g⁻¹ e a densidade óptica de 0,40 u.a a 0,42 u.a, no intervalo de tempo avaliado. A relação entre densidade óptica_(600 nm) e Log UFC.g⁻¹ (y) foi dada empiricamente pela Equação 2. Este resultado está de acordo com os estudos de Anekella; Orsat (2013) e de Pisman; Hewitt; Stapley (2013), nos quais a cultura de *L. acidophilus* atingiu a fase estacionária após 13 horas e entre 10 horas e 15 horas de incubação em caldo MRS a 37°C, respectivamente.

$$y = 6,3709.x + 8,0251 \quad (2) \quad (R^2 = 0,90)$$

Segundo Pispan; Hewett; Stapley (2013), em cada fase de crescimento da população de bactérias, as células têm diferenças fisiológicas que poderiam afetar a resistência ao calor. Estudos tem apontado a fase estacionária como o período no qual a sobrevivência da cultura é mais elevada durante a secagem por *spray drying* em comparação às fases log e lag (CORCORAN et al., 2004; MORGAN et al., 2006; RANADHEERAA et al., 2015).

De acordo com Morgan et al. (2006), a fase estacionária induz a várias modificações na fisiologia das células, devido ao esgotamento das fontes de carbono e nutrientes disponíveis, que por sua vez desencadeiam respostas às condições de estresse para permitir a sobrevivência da população bacteriana. Essa resposta de sobrevivência também protege a célula em outras condições adversas, tais como desidratação e temperaturas elevadas.

3.2 OTIMIZAÇÃO DA MICROENCAPSULAÇÃO DE *L. ACIDOPHILUS* (La-5) POR *SPRAY DRYING*

3.2.1 Influência das Variáveis de Processo no Rendimento da Microencapsulação de *L. acidophilus* por *Spray Drying*

A matriz dos ensaios realizados com os valores reais e codificados das variáveis estudadas, bem como a resposta rendimento da microencapsulação está descrita na Tabela 1, juntamente com os dados de redução de viabilidade.

O rendimento variou de 56,06% (ensaio 4) a 83,79% (ensaio 16). Os pontos centrais (ensaios 15, 16 e 17) apresentaram os maiores valores para a resposta (média = 82,63%) e variação relativamente pequena em se tratando de processos que envolvem microrganismos, indicando boa repetibilidade do estudo.

Tais resultados foram superiores aos encontrados por Chávez; Ledebøer (2007), que atingiram 44% de rendimento, ao microencapsular *B. lactis* Bb12 em isolado proteico de soja e maltodextrina, empregando temperatura de secagem de 80°C, e por Lapsiri, Bhandari; Wanchaitanawong (2012) na microencapsulação de *L. plantarum* utilizando proteína isolada de soja e trealose, cujo rendimento foi de 57,7%. Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) obtiveram rendimento de 69,9% empregando temperatura de entrada de ar de 134°C e vazão de entrada de 7,14 mL.min⁻¹. na microencapsulação de *L. acidophilus* NCIMB 701748 utilizando maltodextrina, proteína de soro de leite e glicose, enquanto Yonekura et al.

(2014), sob as mesmas condições, alcançaram rendimento de 58,87% à 96,78%, adicionando hidroximetilcelulose, quitosana e alginato de sódio ao material de parede.

Tabela 1. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com variáveis de processo, Rendimento da Microencapsulação e Redução da Viabilidade celular.

Ensaio	Temperatura de entrada do ar de secagem (°C) (x_1)	Razão		Rendimento da microencapsulação (%)	Redução de viabilidade (Ciclos log)
		Maltodextrina/ Extrato de Soja (m:m) (x_2)	Vazão de entrada ($L \cdot h^{-1}$) (x_3)		
1	-1 (76)	-1 (1:2)	-1 (0,49)	76,03 ± 0,35	2,92 ± 0,09 ^d
2	+1 (94)	-1 (1:2)	-1 (0,49)	78,39 ± 0,24	2,63 ± 0,09 ^{d,e,f}
3	-1 (76)	+1 (2:1)	-1 (0,49)	70,84 ± 0,21	3,56 ± 0,12 ^c
4	+1 (94)	+1 (2:1)	-1 (0,49)	56,06 ± 0,25	5,37 ± 0,05 ^a
5	-1 (76)	-1 (1:2)	+1 (0,61)	72,51 ± 0,33	3,36 ± 0,01 ^c
6	+1 (94)	-1 (1:2)	+1 (0,61)	79,63 ± 0,54	2,48 ± 0,09 ^{e,t}
7	-1 (76)	+1 (2:1)	+1 (0,61)	76,07 ± 1,08	2,92 ± 0,09 ^d
8	+1 (94)	+1 (2:1)	+1 (0,61)	72,57 ± 0,21	3,35 ± 0,11 ^c
9	-1,68 (70)	0 (1,2:1)	0 (0,55)	77,23 ± 0,67	2,78 ± 0,14 ^{d,e}
10	+1,68(100)	0 (1,2:1)	0 (0,55)	76,67 ± 0,42	2,85 ± 0,07 ^{d,e}
11	0 (85)	-1,68 (1:50)	0 (0,55)	76,34 ± 0,53	2,89 ± 0,08 ^d
12	0 (85)	+1,68 (2,4:1)	0 (0,55)	66,00 ± 0,38	4,15 ± 0,07 ^b
13	0 (85)	0 (1,2:1)	-1,68 (0,45)	80,45 ± 0,83	2,39 ± 0,16 ^{g,t}
14	0 (85)	0 (1,2:1)	+1,68 (0,65)	72,99 ± 0,31	3,29 ± 0,07 ^c
15	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)	80,45 ± 1,06	2,02 ± 0,17 ^{g,h}
16	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)	83,79 ± 0,81	2,12 ± 0,26 ^h
17	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)	83,65 ± 0,59	1,99 ± 0,13 ^h

^(t)Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Como pode ser observado na tabela 1, os tratamentos correspondentes aos pontos centrais foram aqueles nos quais a redução da viabilidade foi menor, em média, 2,04 ciclos log. Em contrapartida, as microcápsulas com maiores reduções na viabilidade da cultura foram obtidas pelos ensaios 4 e 12, que apresentaram reduções de 5,37 ciclos log e 4,15 ciclos log, respectivamente.

Os coeficientes de regressão obtidos pelo planejamento estão apresentados na Tabela 2.

Tabela 2. Coeficientes de regressão para a resposta Rendimento da Microencapsulação (%) de *L. acidophilus* La-5 por *spray drying*.

Fatores	Efeito	Coef.de regressão	Erro padrão	Valor t	P-valor
Média	82,74	82,74	2,16	38,27	0,0000*
X ₁ (L)	-1,43	-0,71	1,02	-0,70	0,5044
X ₁ (Q)	-4,78	-2,39	1,12	-2,14	0,0699*
X ₂ (L)	-7,09	-3,54	1,02	-3,49	0,0101*
X ₂ (Q)	-8,86	-4,43	1,12	-3,97	0,0054*
X ₃ (L)	1,01	0,51	1,02	0,50	0,6328
X ₃ (Q)	-4,94	-2,47	1,12	-2,21	0,0627*
X ₁ X ₂	-6,94	-3,47	1,33	-2,62	0,0346*
X ₁ X ₃	4,01	2,01	1,33	1,51	0,1741
X ₂ X ₃	6,01	3,00	1,33	2,26	0,0580*

X₁= Temperatura de entrada do ar de secagem (°C); X₂= razão maltodextrina/extrato de soja (m:m); X₃= vazão de entrada (L.h⁻¹); *p≤0,10; L - termo linear; Q - termo quadrático.

Observa-se que foram significativos o termo quadrático da variável temperatura de entrada do ar de secagem, os termos quadrático e linear da variável razão maltodextrina/extrato de soja e o termo quadrático da variável vazão de entrada, além dos efeitos de interação entre temperatura de entrada do ar e razão maltodextrina/extrato de soja e entre razão maltodextrina/extrato de soja e vazão de entrada. A Equação 3 representa o modelo quadrático do Rendimento da Microencapsulação de *L. acidophilus* La-5 em função das variáveis estudadas:

$$\text{Rendimento (\%)} = 82,74 - 0,71.x_1 - 2,39.x_1^2 - 3,54.x_2 - 4,43.x_2^2 + 0,51.x_3 - 2,47.x_3^2 - 3,47.x_1.x_2 + 2,01.x_1.x_3 - 3,00.x_2.x_3 \quad (3)$$

A análise de variância (ANOVA) apresentada na Tabela 3 permitiu corroborar a significância do modelo obtido.

Tabela 3. Análise de Variância (ANOVA) do modelo quadrático para resposta rendimento da microencapsulação.

Fonte de variação	Soma de quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (MQ)	F _{calculado}	F _{tabelado}	p-valor
Regressão	629,41	9	69,93	4,97	2,72	0,0231
Resíduos	98,54	7	14,08			
Falta de Ajuste	91,39	5	18,28	5,11	9,29	0,1717
Erro puro	7,15	2	3,57			
Total	727,95	16				

$R^2 = 86,46\%$

O percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 86,46\%$), considerando a variabilidade inerente aos bioprocessos (HAALAND, 1989). Além disso, o valor de $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p=0,0231$) e apresentou-se superior ao valor de F_{tabelado} , demonstrando que o modelo ajustou-se bem aos dados experimentais. O valor de $F_{\text{calculado}}$ para a falta de ajuste foi menor que o de F_{tabelado} , o que indica que a falta de ajuste não foi significativa ($p=0,1717$) e reafirma o adequado ajuste do modelo. Portanto, o modelo obtido foi apropriado para avaliar, na faixa estudada, o comportamento do rendimento da microencapsulação, frente à variação das condições de temperatura de entrada do ar de secagem, razão entre os dois agentes encapsulantes e vazão de entrada no *spray dryer*, sendo possível construir as superfícies de resposta da Figura 1.

Observou-se, pela análise das superfícies de resposta e das curvas de contorno geradas pelo modelo, que foi possível atingir uma faixa ótima para o maior rendimento da microencapsulação, onde a sobrevivência do microrganismo ao processo foi superior e cujas condições aproximaram-se do ponto central, correspondendo à temperatura de entrada do ar de 82°C a 89°C, razão maltodextrina/extrato de soja de 2:3 a 1:0,93 (m:m) e vazão de entrada da suspensão de alimentação de 0,52 L.h⁻¹ a 0,57 L.h⁻¹.

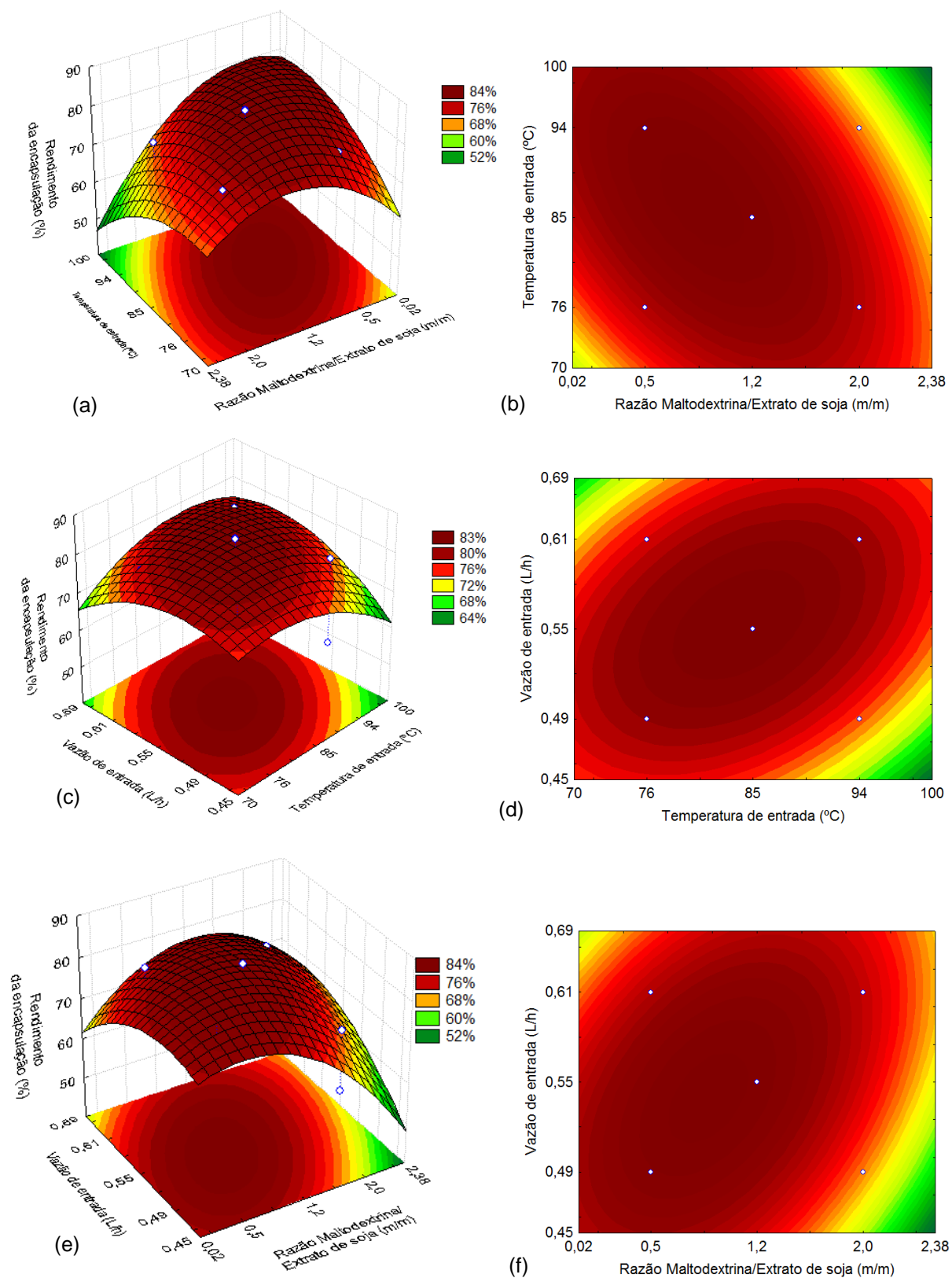


Figura 1. Superfícies de resposta e curvas de contorno para a resposta rendimento da microencapsulação em função da temperatura de entrada do ar de secagem e da razão maltodextrina/extrato de soja (a) e (b); da vazão de entrada e da temperatura de entrada do ar (c) e (d); da vazão de entrada e da razão maltodextrina/extrato de soja (e) e (f).

A análise de variância aplicada aos resultados da matriz do planejamento está apresentada no Diagrama de Pareto (Figura 2).

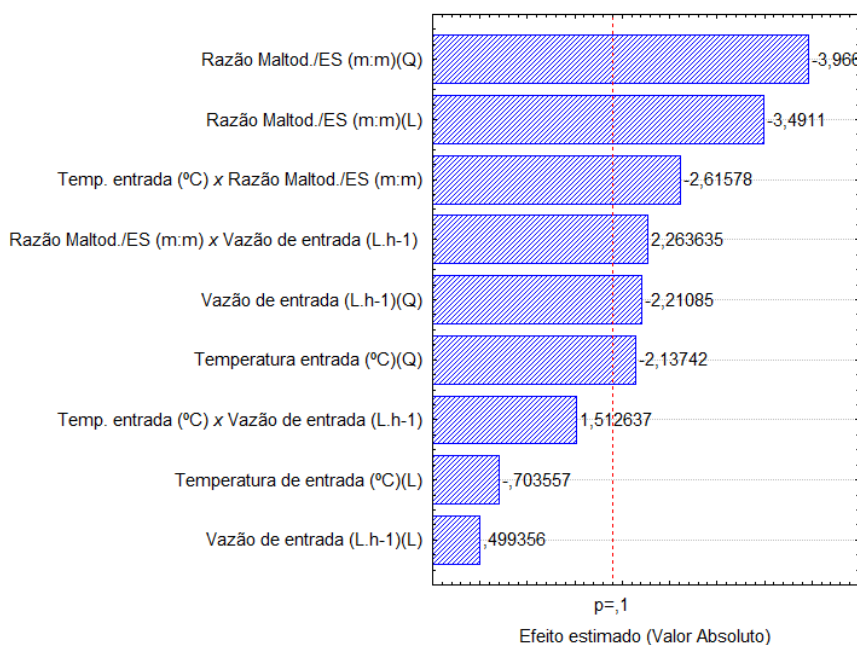


Figura 2. Diagrama de Pareto para a resposta rendimento da microencapsulação (%) de *L. acidophilus* em função da temperatura de entrada do ar de secagem (°C), da razão maltodextrina/extrato de soja (m:m) e da vazão de entrada (L.h⁻¹).

Observa-se que a razão maltodextrina/extrato de soja, termos quadrático e linear, foi a variável que influenciou de forma mais significativa a resposta. Os efeitos estimados negativos demonstram que quando a quantidade de maltodextrina é superior à de extrato de soja na composição do material de parede, o número de células viáveis diminui, dentro da faixa estudada, indicando que o extrato de soja proporcionou efeito protetor adicional às células. De acordo com Chávez; Ledebøer (2007), a maltodextrina pode apresentar efeito positivo ou não sobre a sobrevivência de probióticos, dependendo da combinação com outro material de parede e da concentração utilizada.

Em cinco dos seis ensaios (tratamentos 4, 12, 3, 5, 8 e 14) nos quais a redução da viabilidade foi mais elevada, a quantidade de maltodextrina era superior à de extrato de soja na composição do material de parede, como pode ser observado na Tabela 1. Por outro lado, nos tratamentos onde a redução da viabilidade foi menor, a proporção de maltodextrina/extrato de soja era equivalente à dos pontos centrais (1,2) ou inferior (0,5). Tal efeito pode estar relacionado à presença dos oligossacarídeos rafinose e estaquiose no extrato de soja, que podem proteger às células frente ao calor (ANN et al., 2007) e ao maior

teor de proteínas presentes nas suspensões de alimentação que continham maior proporção de extrato de soja. De acordo com Wang et al. (2004), as proteínas criam uma interface entre o núcleo e o ar durante o *spray drying* que pode proteger as células, pois com a desnaturação proteica ocorre o aumento da rigidez da microcápsula, formando uma barreira contra o contato com água e oxigênio.

Considerando-se que a região otimizada correspondeu ao ponto central, pode-se inferir que a quantidade de extrato de soja presente na suspensão de *spray drying* foi fundamental para a sobrevivência da cultura e que quantidades superiores de maltodextrina em relação à quantidade de extrato de soja não foram favoráveis à sobrevivência do microrganismo.

A análise do Diagrama de Pareto ainda permitiu verificar que além dos efeitos de interação, foram significativos os termos quadráticos das variáveis vazão de entrada e temperatura de entrada, apresentando efeito estimado negativo, o que demonstra que o aumento dos valores de temperatura e de vazão levou a uma maior redução no rendimento do processo, dentro da faixa estudada.

Os resultados corroboram com os dados obtidos por Wang et al. (2004), que observaram que a sobrevivência de bactérias ácido lácticas, incluindo *L. acidophilus*, ao processo de *spray drying* de extrato aquoso de soja fermentado, foi maior quando temperaturas mais baixas foram empregadas. Segundo Anekella; Orsat (2013) temperaturas elevadas durante o processo podem provocar danos às membranas celulares dos probióticos, afetando a sua sobrevivência durante o processo. Os danos celulares induzidos pelo calor têm sido associados principalmente a alterações no estado físico das membranas, como desidratação e ruptura devido à remoção de água; modificações estruturais das proteínas e ácidos nucleicos, inclusive desnaturação do DNA e RNA; peroxidação lipídica e alterações de processos biológicos das células (CORCORAN et al., 2008; SANTIVARANGKNA; KULOZIK; FOERST, 2008; FU; CHEN, 2011).

O aumento da temperatura de secagem também provocou declínio na contagem de células viáveis de *L. paracasei* e *L. salivarius* no trabalho de Gardiner et al. (2000) e de *L. plantarum* no estudo de Lapsiri; Bhandari; Wanchaitanawong (2012), que observaram ainda que a sobrevivência era dependente também da estirpe bacteriana. Para estirpes mais termossensíveis, como *L. acidophilus*, as temperaturas empregadas devem ser ainda mais brandas, em torno de 70°C para o ar de saída (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005) equivalente, neste estudo, a temperatura de 90°C para o ar de entrada, coincidindo com a faixa de temperatura otimizada pelo DCCR. De acordo com Li et al. (2006), temperaturas de secagem, frequentemente acima de 100°C, são a causa mais provável da redução da sobrevivência dos probióticos ao *spray drying*, bem como as velocidades rápidas de

processo, dependentes da vazão de entrada da suspensão a ser atomizada na câmara de secagem.

Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) observaram que reduções na temperatura de entrada estavam associadas a um aumento no rendimento do processo, relatando também que sob temperaturas altas, vazões mais elevadas aumentaram a sobrevivência da cultura, porém em condições de temperaturas mais baixas, o aumento da vazão provocou maior mortalidade dos microrganismos, resultados semelhantes aos observados neste estudo. A vazão de entrada é um fator determinante na sobrevivência da cultura e velocidades excessivamente elevadas ou reduzidas podem diminuir o rendimento do processo, como afirmam Chávez; Ledebøer (2007).

3.2.2 Validação Experimental do Modelo Proposto pelo Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para Otimização da Microencapsulação

Segundo Rodrigues; Lemma (2009), a indicação de uma faixa ótima das variáveis é mais interessante do que apenas um valor pontual, visto que se pode admitir uma variação nas concentrações das variáveis estudadas ao redor dos valores ótimos, mantendo-se ainda o processo na condição otimizada, no entanto, faz-se necessário a realização de ensaios nas condições definidas após a análise de superfície de resposta, para validação experimental da resposta prevista pelo modelo proposto.

As condições selecionadas para a validação foram referentes aos valores críticos apontados pelo modelo, que maximizariam a resposta dentro da faixa otimizada, equivalentes à temperatura de entrada de ar de secagem de $87^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$, razão maltodextrina/extrato de soja de 2:3 (m:m) e vazão de entrada de $0,54 \text{ L.h}^{-1}$, predizendo um valor máximo teórico para o rendimento da microencapsulação de 83,55%. O rendimento observado experimentalmente foi de $82,95 \pm 1,22\%$, com desvio relativo de -0,72%. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa ($p \geq 0,05$) entre a resposta observada e a resposta predita, assim, o valor médio obtido experimentalmente esteve dentro do intervalo de confiança, calculado em nível de 95%, validando o modelo proposto pelo delineamento experimental.

3.3 MORFOLOGIA E TAMANHO DAS PARTÍCULAS

Nas figuras 3a e 3b são exibidas as micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus*.

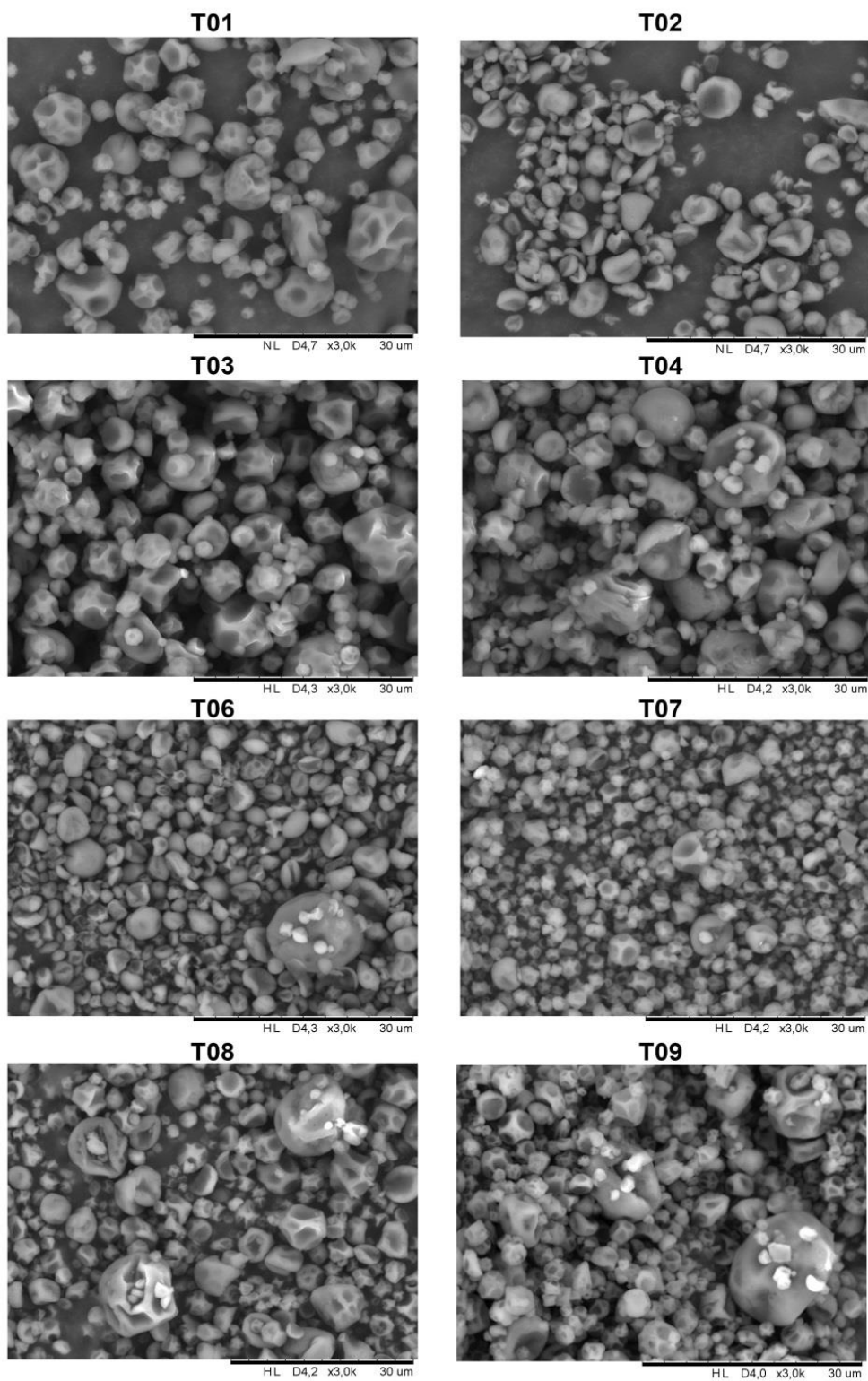


Figura 3a. Micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* de acordo com DCCR (tratamentos 1 a 9).

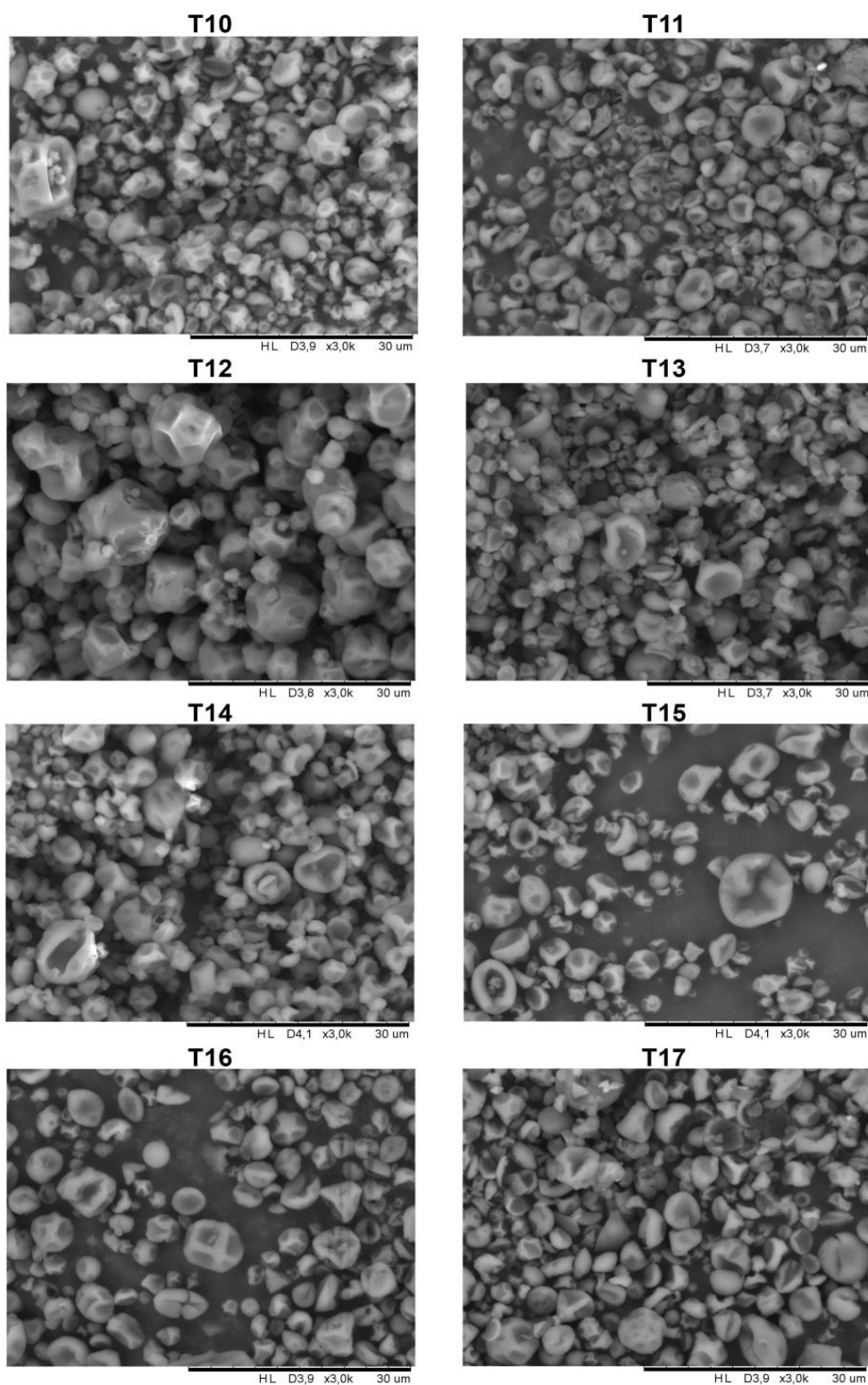


Figura 3b. Micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* de acordo com DCCR (tratamentos 10 a 17).

As análises não foram realizadas no ensaio 5 em razão da pequena quantidade de pó obtido, devido à adesão do material às paredes da câmara de secagem.

Não foram observadas células livres do microrganismo, confirmando a microencapsulação da bactéria. As partículas apresentaram formato arredondado e superfície irregular, com presença de concavidades e achatamentos, que são características de produtos submetidos à secagem por *spray drying* (FÁVARO-TRINDADE et al., 2010) e atribuídas ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à rápida evaporação das gotas de líquido (SAÉNZ et al., 2009). Frascareli et al. (2012) relataram que concavidades ou achatamentos na superfície das microcápsulas são resultado das temperaturas de secagem e conferem aos pós resistência à fratura mecânica e à permeabilidade de substâncias. Por outro lado, Lian; Hsiao; Chou (2002) associaram tal característica ao tipo de agente encapsulante empregado e a denominaram “efeito bola murcha” (*flat ball effect*).

Aspectos morfológicos semelhantes foram observados por Fávaro-Trindade et al. (2010) e Tang; Li (2013) em microcápsulas produzidas com isolado proteico de soja por *spray drying*. Saavedra et al. (2015) verificaram a presença de rugosidades na superfície de microcápsulas produzidas com isolado proteico de soja e maltodextrina, individualmente ou combinados.

Foram observadas diferenças na aparência externa das microcápsulas. Nos ensaios com maior proporção de extrato de soja no material de parede, as partículas apresentaram superfície com menos rugosidades, o que pode estar relacionado ao teor de proteínas do extrato de soja, como observado por Tang; Li (2013), que verificaram que o aumento da proporção de proteína na formação das microcápsulas poderia minimizar o encolhimento e, conseqüentemente, as concavidades das superfícies das partículas.

Com exceção do ensaio 12, as microcápsulas apresentaram paredes livres de fissuras e rupturas, o que garante maior proteção ao material microencapsulado e menor permeabilidade de gases, como descrito por Fritzen-Freire et al. (2012). De acordo com Tang; Li (2013), quantidades superiores de proteína em relação a carboidratos na composição do material de parede podem evitar a ruptura da estrutura.

O diâmetro médio apresentado pelas partículas variou de $4,97 \mu\text{m} \pm 2,33 \mu\text{m}$ (tratamento 13) a $8,82 \mu\text{m} \pm 4,07 \mu\text{m}$ (tratamento 12) (Tabela 4). Tais resultados são compatíveis com os descritos por Ortiz et al. (2009), que verificaram diâmetro médio de $9,18 \mu\text{m}$ a $11,32 \mu\text{m}$ em microcápsulas produzidas com isolado proteico de soja. O diâmetro médio das partículas produzidas por Fávaro-Trindade et al. (2010) a partir de isolado proteico de soja e gelatina variou de $10,26 \mu\text{m}$ a $17,72 \mu\text{m}$, enquanto Saavedra et al. (2015) obtiveram microcápsulas elaboradas com isolado proteico de soja e maltodextrina com

diâmetro entre 2 μm e 7 μm , relatando também que a variabilidade de tamanho entre as partículas é uma característica de pós submetidos à secagem em *spray dryer*.

Fang; Bhandari (2010) relataram que o tamanho de microcápsulas obtidas por *spray drying* pode variar de 10 μm a 100 μm , entretanto, microcápsulas muito grandes podem afetar as características sensoriais e de textura do alimento ao qual serão incorporadas, por conseguinte, diâmetros menores que 100 μm são preferidos para a maioria das aplicações (ANNAN et al., 2008).

Em geral, o aumento da vazão provocou redução no tamanho das partículas, enquanto quantidades superiores de maltodextrina levaram à obtenção de microcápsulas com maior diâmetro, embora não ter sido observada diferença estatística entre os tratamentos, em concordância com Anekella (2011), que observou que o aumento na proporção de maltodextrina aumentou a rugosidade e o diâmetro das microcápsulas. Os tratamentos com maior diâmetro médio apresentaram os menores rendimentos, o que foi relatado também por Anekella (2011), que observou que a formação de partículas menores proporcionou a redução dos danos térmicos promovidos pelo *spray drying* às células de *L. acidophilus* microencapsulado em suco de framboesa e maltodextrina.

Tabela 4. Diâmetro médio das microcápsulas de *L. acidophilus* produzidas por *spray drying*

Ensaio	Diâmetro (μm)
1	5,91 \pm 2,20 ^{a,b}
2	5,78 \pm 3,41 ^{a,b}
3	7,95 \pm 4,20 ^{a,b}
4	6,92 \pm 4,44 ^{a,b}
6	5,23 \pm 1,71 ^{a,b}
7	6,56 \pm 4,51 ^{a,b}
8	5,97 \pm 3,14 ^{a,b}
9	5,60 \pm 2,05 ^{a,b}
10	6,06 \pm 2,15 ^{a,b}
11	5,31 \pm 2,09 ^{a,b}
12	8,82 \pm 4,07 ^a
13	5,11 \pm 2,28 ^b
14	5,72 \pm 2,19 ^{a,b}
15	6,69 \pm 3,56 ^{a,b}
16	6,40 \pm 2,18 ^{a,b}
17	6,46 \pm 4,09 ^{a,b}

⁽¹⁾ Médias \pm erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

3.4 ATIVIDADE DE ÁGUA, UMIDADE E HIGROSCOPICIDADE DAS MICROCÁPSULAS

Os ensaios com temperatura de entrada de ar mais elevada e menor vazão de alimentação resultaram em pós com menor atividade de água e umidade, conforme pode ser observado na Tabela 5.

Chávez; Ledebøer (2007) verificaram que as microcápsulas elaboradas com isolado proteico de soja e maltodextrina apresentaram atividade de água de 0,35, enquanto Fávaro-Trindade et al. (2010) observaram valores entre 0,25 e 0,27 para partículas produzidas a partir de isolado proteico de soja e gelatina, resultados que corroboram com encontrados nas microcápsulas produzidas neste estudo.

Segundo Tonon et al. (2009), os valores de atividade de água devem estar próximos de 0,3 após a secagem, para garantir a estabilidade dos pós, uma vez que uma quantidade menor de água livre estará disponível para a flora bacteriana contaminante e para reações bioquímicas, desta forma, as condições empregadas no tratamento 5 não foram adequadas para garantir que a atividade de água estivesse dentro da faixa recomendada.

A umidade das microcápsulas variou de 2,30% à 7,11% e os valores são compatíveis com os resultados obtidos por Chávez; Ledebøer (2007), que encontraram valores de 5,07% à 7,51% em microcápsulas produzidas com proteína isolada de soja associada à carboidratos, como a maltodextrina (temperatura de secagem de 80°C) e aos de Behboudi-Jobbehdar et al. (2013), que obtiveram teores de umidade de 1,7% a 5,4% em microcápsulas produzidas a partir de maltodextrina e proteína de leite concentrada (120°C – 160°C). No trabalho realizado por Wang et al. (2004), o pó obtido pela secagem de extrato aquoso de soja contendo probióticos apresentou umidade de 4,2% a 10,6% e aumentou à medida em que a temperatura diminuiu. De acordo com Chávez; Ledebøer (2007), o conteúdo de umidade dos pós deve ser de no máximo 5%, para assegurar a estabilidade das microcápsulas. Portanto, os tratamentos 3 e 5 não foram adequados em relação a este parâmetro.

As microcápsulas obtidas com menor quantidade de maltodextrina apresentaram-se mais higroscópicas (Tabela 5) que as demais, enquanto os tratamentos 4, 12, 7 e 3 foram os menos higroscópicos. Portanto, a maltodextrina auxiliou nas propriedades de secagem da suspensão de *spray drying*, afetando significativamente a higroscopicidade dos pós. Nos tratamentos 11 e 5 houve perda de material durante a secagem, devido à alta higroscopicidade e adesão às paredes do *spray dryer*.

Fávaro-Trindade et al. (2010) obtiveram valores superiores de higroscopicidade para microcápsulas compostas por isolado proteico de soja e gelatina, de 23,27% à 46,46% e relataram que as variações nas concentrações dos agentes encapsulantes não afetaram a

higroscopicidade. Todavia, Tonon et al. (2008) e Anekella; Orsat (2013) demonstraram em seus estudos sobre o pó de açaí e framboesa obtidos por secagem em *spray dryer* que há uma relação direta de menores valores de higroscopicidade com o aumento da concentração de maltodextrina. Teores elevados de higroscopicidade não afetam apenas o rendimento do processo, já que dificultam a coleta do material, mas também comprometem a estabilidade microbiológica do produto final (SANTOS, 2013).

Tabela 5. Atividade de água, umidade e higroscopicidade das microcápsulas para o Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR).

Ensaio	Aw	Umidade (g 100g ⁻¹)	Higroscopicidade (g 100g ⁻¹)
1	0,38 ± 0,01 ^{b,c}	4,23 ± 0,43 ^{b,c,d,e,f}	21,34 ± 0,04 ^c
2	0,25 ± 0,01 ^{j,l}	3,86 ± 0,59 ^{c,d,e,f,g}	20,89 ± 0,04 ^d
3	0,37 ± 0,02 ^b	7,01 ± 1,11 ^a	15,22 ± 0,02 ^l
4	0,26 ± 0,01 ^{f,g,h,i}	5,86 ± 0,14 ^{a,b}	13,91 ± 0,11 ⁿ
5	0,52 ± 0,00 ^a	7,11 ± 0,33 ^a	24,22 ± 0,01 ^{a,b}
6	0,29 ± 0,00 ^{l,j}	4,19 ± 0,11 ^{b,c,d,e,f,g}	24,03 ± 0,03 ^b
7	0,34 ± 0,00 ^{d,e,f,g}	3,54 ± 0,42 ^{d,e,f,g}	15,14 ± 0,02 ^l
8	0,31 ± 0,00 ^{g,h,i}	2,56 ± 0,19 ^{e,f,g}	15,92 ± 0,07 ^j
9	0,38 ± 0,01 ^{d,e,t,g,h}	4,48 ± 0,21 ^{b,c,d,e}	19,42 ± 0,02 ^t
10	0,25 ± 0,00 ^l	2,38 ± 0,16 ^{t,g}	19,79 ± 0,08 ^e
11	0,31 ± 0,01 ^{h,i}	2,30 ± 0,22 ^g	24,52 ± 0,03 ^a
12	0,33 ± 0,00 ^{e,t,g,h,i}	5,77 ± 0,79 ^{a,b,c}	14,43 ± 0,07 ^m
13	0,31 ± 0,01 ^b	5,46 ± 0,73 ^{a,b,c,d}	16,46 ± 0,06 ^l
14	0,38 ± 0,04 ^{c,d,e,t}	3,58 ± 0,46 ^{d,e,f,g}	17,27 ± 0,19 ^h
15	0,35 ± 0,02 ^{c,d,e}	2,59 ± 0,21 ^{e,t,g}	17,17 ± 0,04 ^h
16	0,33 ± 0,01 ^{c,d}	2,31 ± 0,42 ^{t,g}	17,62 ± 0,28 ^g
17	0,35 ± 0,01 ^{c,d}	2,85 ± 0,13 ^{e,t,g}	17,41 ± 0,20 ^{g,h}

⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Os resultados obtidos permitiram calcular os coeficientes de regressão apresentados na Tabela 6. Em relação à atividade de água, observa-se que os termos lineares das variáveis temperatura de entrada do ar de secagem e vazão de entrada foram estatisticamente significativos ao nível de 5% de probabilidade ($p \leq 0,5$). Quanto à umidade, foram significativas as variáveis da temperatura de entrada (linear), vazão de entrada (quadrático) e a interação entre a vazão de entrada e razão maltodextrina/extrato de soja.

Tabela 6. Coeficientes de regressão para atividade de água e umidade das microcápsulas de *L. acidophilus*.

Fatores	Efeito	Coef. de regr.	Erro padrão	Valor t	P-valor	Efeito	Coef. de regr.	Erro padrão	Valor t	P-valor
		<i>Atividade de Água</i>					<i>Umidade</i>			
Média	0,34	0,34	0,01	36,24	0,0000*	2,54	2,54	0,56	4,53	0,0027*
X ₁ (L)	-0,09	-0,04	0,01	-9,74	0,0000*	-1,31	-0,65	0,53	-2,48	0,0419*
X ₁ (Q)	-0,02	-0,01	0,01	-2,18	0,0657	0,91	0,46	0,58	1,58	0,1590
X ₂ (L)	0,00	0,00	0,01	0,08	0,9419	0,79	0,40	0,53	1,51	0,1749
X ₂ (Q)	-0,02	-0,01	0,01	-1,79	0,1164	1,34	0,67	0,58	2,31	0,0539
X ₃ (L)	0,03	0,01	0,01	2,95	0,0213*	-0,98	-0,49	0,53	-1,87	0,1040
X ₃ (Q)	0,00	0,00	0,01	0,13	0,8971	1,69	0,84	0,58	2,91	0,0225*
X ₁ X ₂	0,02	0,01	0,01	2,13	0,0703	0,29	0,15	0,69	0,42	0,6845
X ₁ X ₃	0,02	0,01	0,01	1,95	0,0916	-0,59	-0,30	0,69	-0,86	0,4157
X ₂ X ₃	-0,01	-0,01	0,01	-1,03	0,3366	-2,49	-1,25	0,69	-3,62	0,0085*

X₁= Temperatura de entrada do ar de secagem (°C); X₂= razão maltodextrina/extrato de soja (m:m); X₃= vazão de entrada (L.h⁻¹); *p≤0,05; L - termo linear; Q - termo quadrático.

A análise de variância (ANOVA) para atividade de água e umidade está representada na Tabela 7.

Tabela 7. Análise de Variância (ANOVA) do modelo quadrático para os parâmetros atividade de água e umidade das microcápsulas.

Fonte de variação	Soma de quadrados (SQ)	Graus de liberdade (GL)	Quadrado médio (MQ)	F _{calculado}	F _{tabelado}	p-valor	R ² (%)
Regressão	0,033	9	0,004	13,40	3,68	0,0012	94,51
Resíduos	0,002	7	0,000				
Falta de Ajuste	0,002	5	0,0003	4,58	19,30	0,1890	
Erro puro	0,000	2	0,0001				
Total	0,035	16					
Regressão	35,004	9	3,889	4,11	3,68	0,0379	84,09
Resíduos	6,625	7	0,946				
Falta de Ajuste	6,483	5	1,297	18,30	19,30	0,0536	
Erro puro	0,142	2	0,071				
Total	41,628	16					

Em ambos os casos, como o $F_{\text{calculado}}$ para a regressão foi significativo ($p= 0,01$ e $p= 0,037$), sendo maior que o F_{tabelado} , a falta de ajuste não foi significativa e o percentual de variação explicada pelo modelo foi adequado ($R^2 = 94,51\%$ e $84,09\%$), portanto, pode-se concluir que os modelos (Equações 4 e 5) ajustaram-se bem aos dados experimentais, para as respostas atividade de água e umidade.

$$\text{Atividade de água} = 0,34 - 0,04.x_1 + 0,01.x_3 \quad (4)$$

$$\text{Umidade (g.100.g}^{-1}\text{)} = 2,54 - 0,65.x_1 - 0,46.x_1^2 - 0,40.x_2 - 0,67.x_2^2 - 0,49.x_3 - 0,84.x_3^2 - 0,15.x_1x_2 - 0,30.x_1x_3 - 1,25.x_2x_3 \quad (5)$$

Estes modelos foram gerados com a finalidade de testar o ajuste dos dados experimentais e verificar qual a influência das variáveis de processo sobre as respostas, no entanto, para a otimização da microencapsulação e validação, foi considerado o modelo gerado para a resposta rendimento da microencapsulação (equação 3), uma vez que esta era resposta a qual se desejava otimizar e que as condições ótimas para o rendimento, determinadas pelo modelo, apresentaram boas características de atividade de água, umidade e higroscopicidade.

A temperatura de secagem apresentou efeito negativo sobre a atividade de água e a umidade das microcápsulas, de forma que valores inferiores foram obtidos com temperaturas superiores, ao contrário do efeito apresentado pela vazão de entrada da suspensão de alimentação no *spray dryer*, pois o aumento da vazão aumentava também a resposta para ambos os parâmetros (Figura 4). Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) também verificaram que a temperatura de entrada do ar de secagem e a vazão de alimentação apresentaram efeito significativo no teor de água das microcápsulas e que o aumento nos valores de temperatura de entrada e a redução da vazão de alimentação resultou em pós com maior atividade de água e umidade.

Os dados obtidos corroboram com os resultados relatados por Chávez; Ledebor (2007), ao reafirmarem que a atividade de água e a umidade são consequências diretas das condições empregadas no processo de secagem.

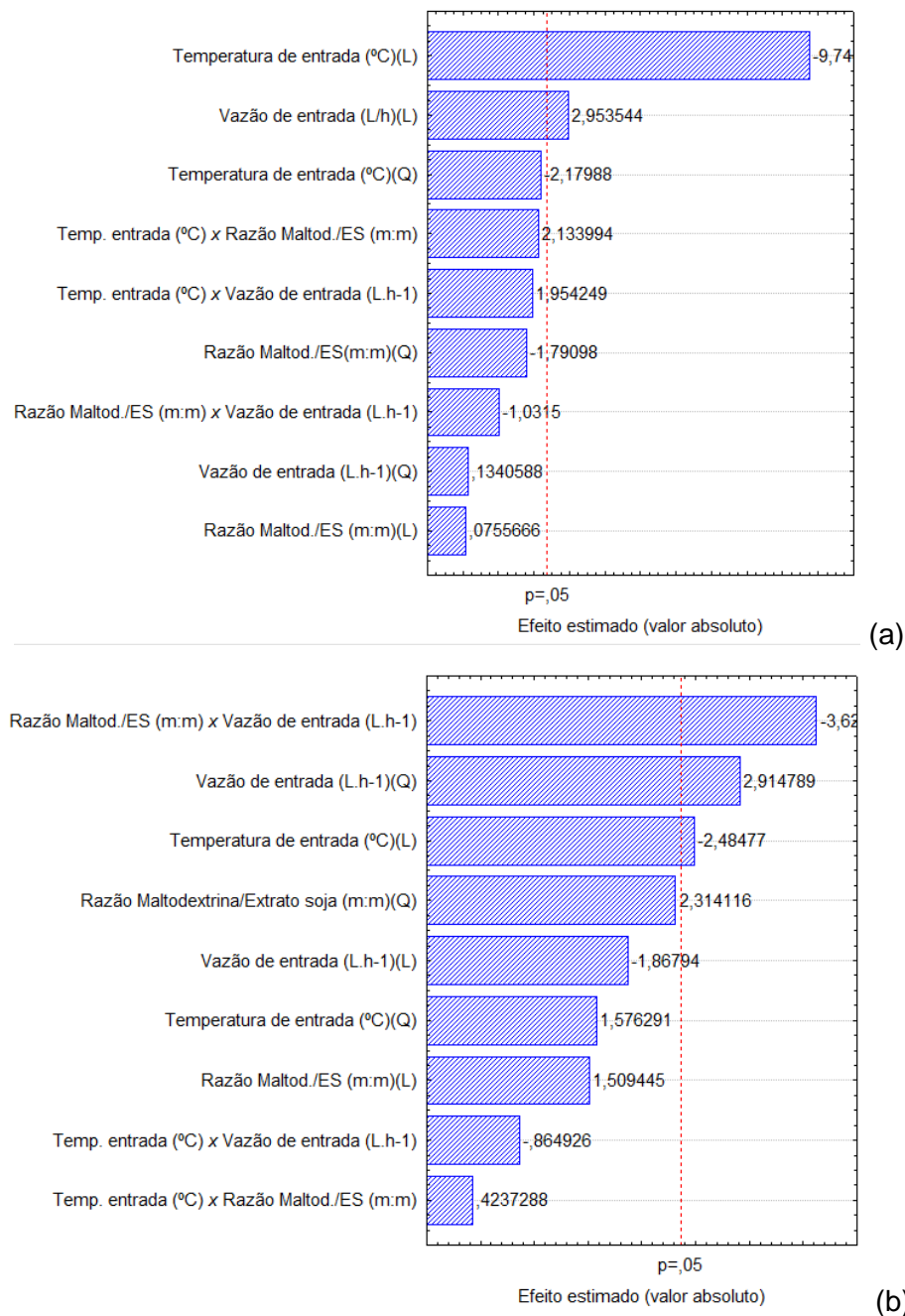


Figura 4. Diagrama de Pareto para atividade de água (a) e umidade (b) das microcápsulas de *L. acidophilus* em função da temperatura de entrada do ar (°C), da razão maltodextrina/extrato de soja (m:m) e da vazão de entrada ($L.h^{-1}$).

3.5 COMPORTAMENTO TÉRMICO DAS MICROCÁPSULAS

Nas Figuras 5 e 6 são representadas as curvas termogravimétricas e de DSC para os agentes encapsulantes, para as células livres do microrganismo e para as microcápsulas

obtidas nos ensaios 11 - razão maltodextrina/extrato de soja de 1:50 (m:m); 12 - razão maltodextrina/extrato de soja 2,4:1 (m:m) e 15 - ponto central, razão maltodextrina/extrato de soja 1,2:1 (m:m); os ensaios 11 e 12 foram selecionados por conterem, respectivamente, a menor e a maior proporção entre maltodextrina e extrato de soja empregados no planejamento e o ensaio 15, por conter razão intermediária entre os dois agentes encapsulantes.

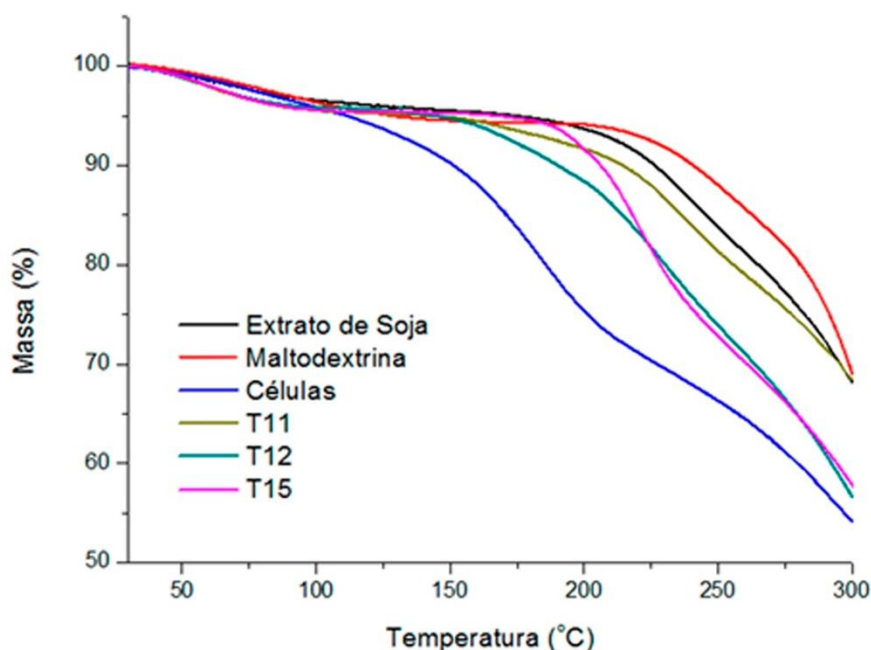


Figura 5. Curvas Termogravimétricas para extrato de soja, maltodextrina, células livres de *L. acidophilus* e microcápsulas obtidas nos ensaios 11, 12 e 15.

O estágio inicial de perda de massa pode ser atribuído à evaporação de água e compostos voláteis das amostras, como gás carbônico, sendo que decréscimos de massa acentuados só iniciaram em temperaturas superiores a 100°C; abaixo dessa faixa de temperatura, as perdas de massa foram inferiores a 5%.

As microcápsulas produzidas com maior proporção de extrato de soja (tratamentos 11 e 15) apresentaram temperatura de degradação superior à das microcápsulas do tratamento 12, o que sugere que concentrações superiores de extrato de soja formariam microcápsulas mais estáveis à degradação térmica. Além disso, observou-se que quanto menor o diâmetro das microcápsulas, maior a estabilidade térmica, uma vez que as partículas do tratamento 12 apresentaram diâmetro médio de 8,82 μm e degradação mais acelerada, seguidas das microcápsulas dos tratamentos 15 (6,69 μm) e 11 (5,31 μm). Tal

comportamento também foi descrito por Anekella (2011), que relatou que partículas menores e mais uniformes apresentavam maior estabilidade.

Os estágios de perda de massa das células livres ocorreram em temperaturas inferiores às das partículas. Na faixa de 150°C, as células livres já haviam perdido mais de 10% da massa, o que ocorreu nas microcápsulas somente em temperaturas próximas a 200°C. Portanto, a sobreposição das curvas permitiu verificar que as microcápsulas apresentaram temperatura de degradação superior à das células, o que pode indicar maior estabilidade, quando comparadas ao *L. acidophilus* na forma livre.

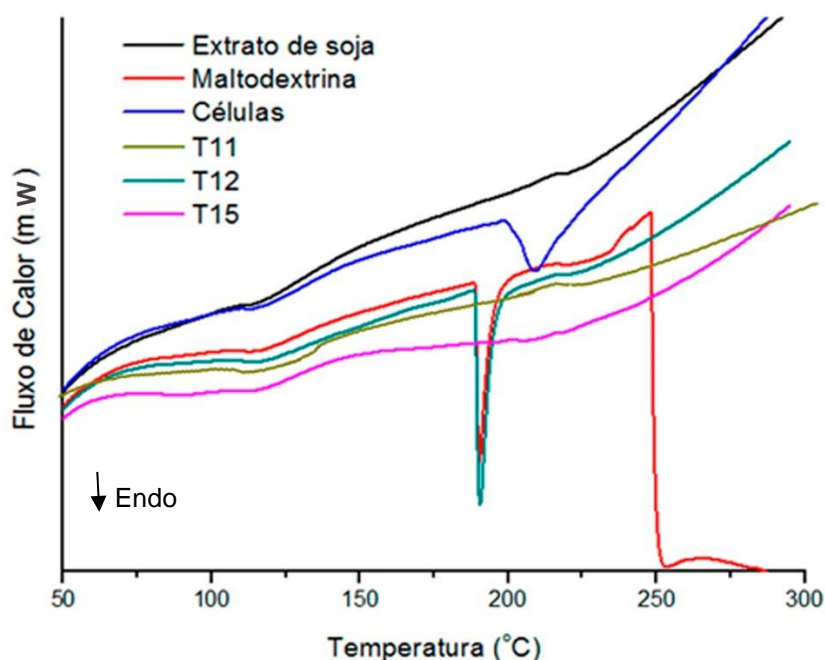


Figura 6. Curvas de DSC para extrato de soja, maltodextrina, células livres e microcápsulas dos tratamentos 11, 12 e 15.

Verificou-se que as partículas apresentaram ao menos dois eventos térmicos (Figura 6). O primeiro ocorreu em temperaturas entre 100°C e 125°C e, de acordo com Sawada et al. (2010), pode estar relacionado à quebras de ligações de hidrogênio e alterações na estrutura das proteínas da soja.

O segundo evento térmico foi observado na faixa de 200°C a 230°C para todas as partículas, exceto para as obtidas no tratamento 12 e, pode estar correlacionado à perda de massa mais significativa observada nas curvas termogravimétricas das amostras. A amostra do tratamento 12, cujo material de parede era composto em maior proporção por

maltodextrina, apresentou um segundo evento térmico entre 175°C e 200°C, com características similares ao apresentado pela maltodextrina, o que não foi evidenciado nas amostras dos tratamentos 11 e 15. Santos (2013) relatou a ocorrência de um pico endotérmico à 175°C e o atribuiu à fusão da estrutura cristalina da maltodextrina. O terceiro evento térmico observado para a amostra de maltodextrina, próximo a 250°C, pode ser atribuído à degradação do material e também foi verificado por Santos (2013).

A temperatura de degradação de *L. acidophilus* na forma livre compreendeu a faixa de 200°C a 215°C, o que foi confirmado pela perda de massa acentuada observada na curva termogravimétrica da amostra. O pico de degradação térmica do extrato de soja foi observado em temperaturas próximas a 315°C (dados não publicados). Fayad (2010) observou no isolado proteico de soja, um evento à 322°C e o atribuiu à degradação proteica. Não foram verificados eventos térmicos que pudessem ser relacionados à degradação das microcápsulas, na faixa estudada, o que sugere que o material microencapsulado é mais estável que as células livres frente ao calor.

Não foram observados eventos térmicos significativos em temperaturas inferiores à 100°C, sugerindo que as microcápsulas são estáveis à faixa de temperatura na qual seriam aplicadas em alimentos, uma vez que temperaturas acima de 50°C não são usuais em produtos que contenham microrganismos, devido à sua termossensibilidade, indicando que as microcápsulas podem ser submetidas ao processamento habitual sem que ocorram alterações de fase e, conseqüentemente, modificações em sua estrutura.

Segundo Fu; Chen (2011), a presença de componentes no material de parede, que possam induzir a modificações na estrutura das micropartículas, tem sido apontada como fator negativo na sobrevivência de microrganismos, por alterar a integridade das membranas citoplasmáticas e a pressão osmótica do meio, levando ao rompimento das membranas. A integridade das membranas celulares pode ser perdida em transições de fase, que são responsáveis pelo aumento da fluidez das membranas, provocando danos letais às células, entretanto, tais transições não foram observadas nas partículas produzidas.

O perfil de degradação térmica e as curvas de DSC apresentados pelas partículas diferiram dos verificados para os agentes encapsulantes, podendo ser indicativo da formação de estruturas com características térmicas diferentes, após o processo de *spray drying*, nas quais interações entre os materiais de parede e as células podem ter ocorrido. As propriedades térmicas das amostras sugerem ainda que as microcápsulas podem proteger os microrganismos probióticos frente à desidratação e ao aquecimento, pois se degradaram em temperaturas superiores às das células livres.

3.6 ESPECTROSCOPIA NA REGIÃO DO INFRAVERMELHO POR TRANSFORMADA DE FOURIER (FTIR)

Os espectros obtidos para as células livres, para os agentes encapsulantes e para as microcápsulas dos ensaios 11 - Razão maltodextrina/extrato de soja de 1:50 (m:m), 12 - Razão maltodextrina/extrato de soja 2,4:1 (m:m) e 15 - pontos centrais, razão maltodextrina/extrato de soja 1,2:1 (m:m) estão representados na Figura 7.

O espectro da maltodextrina apresentou picos na região entre 1150 cm^{-1} , 1080 cm^{-1} e 1000 cm^{-1} , correspondentes ao estiramento da ligação C – O e à deformação angular das ligações duplas dos grupamentos CH e CH₂, provenientes de carboidratos, conforme já relatado por Krishnaiah; Sarbatly; Nithyanadam (2012). Outros picos presentes nas amostras na região entre 900 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} podem ser assinalados como vibrações da ligação C – O e vibrações de estiramento da ligação C – O – C de carboidratos como a glicose (FRAGOSO et al., 2011), presentes na maltodextrina. Tais bandas foram observadas na maltodextrina e com maior intensidade nas microcápsulas dos ensaios 15 e 12, elaboradas com maior teor de maltodextrina e com menor intensidade nas microcápsulas do ensaio 11, que continha menos de 2% (m:m) de maltodextrina na composição do material de parede.

No espectro do extrato de soja, observaram-se as bandas de absorção características da proteína de soja, correspondentes à amida I, amida II e amida III. A posição da banda da amida I ocorre na região entre $1700\text{-}1600\text{ cm}^{-1}$, atribuída principalmente ao estiramento das ligações C=O e C=N; a banda da amida II na região de $1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$ (deformação N-H e estiramento C-N) e a banda da amida III, na região de 1300 cm^{-1} (estiramento vibracional das ligações C-N e flexões N-H). Na região do infravermelho, as frequências de bandas devido às vibrações amida I, II e III são sensíveis à alterações na estrutura secundária das proteínas (PIETRZAK; MILLER, 2005; CAIRES et al., 2008; JENALIB, 2014). Essas bandas foram evidentes também no ensaio 11, elaborado com maior proporção de extrato de soja, porém com diferente intensidade. Nos demais ensaios, observou-se deslocamento das bandas características da proteína de soja, sugerindo uma possível interação entre os componentes estudados. Com exceção do ensaio 11, os espectros das microcápsulas não apresentaram a banda relacionada à amida I, que segundo Liu et al. (2008) é a mais sensível à alterações na estrutura secundária das proteínas.

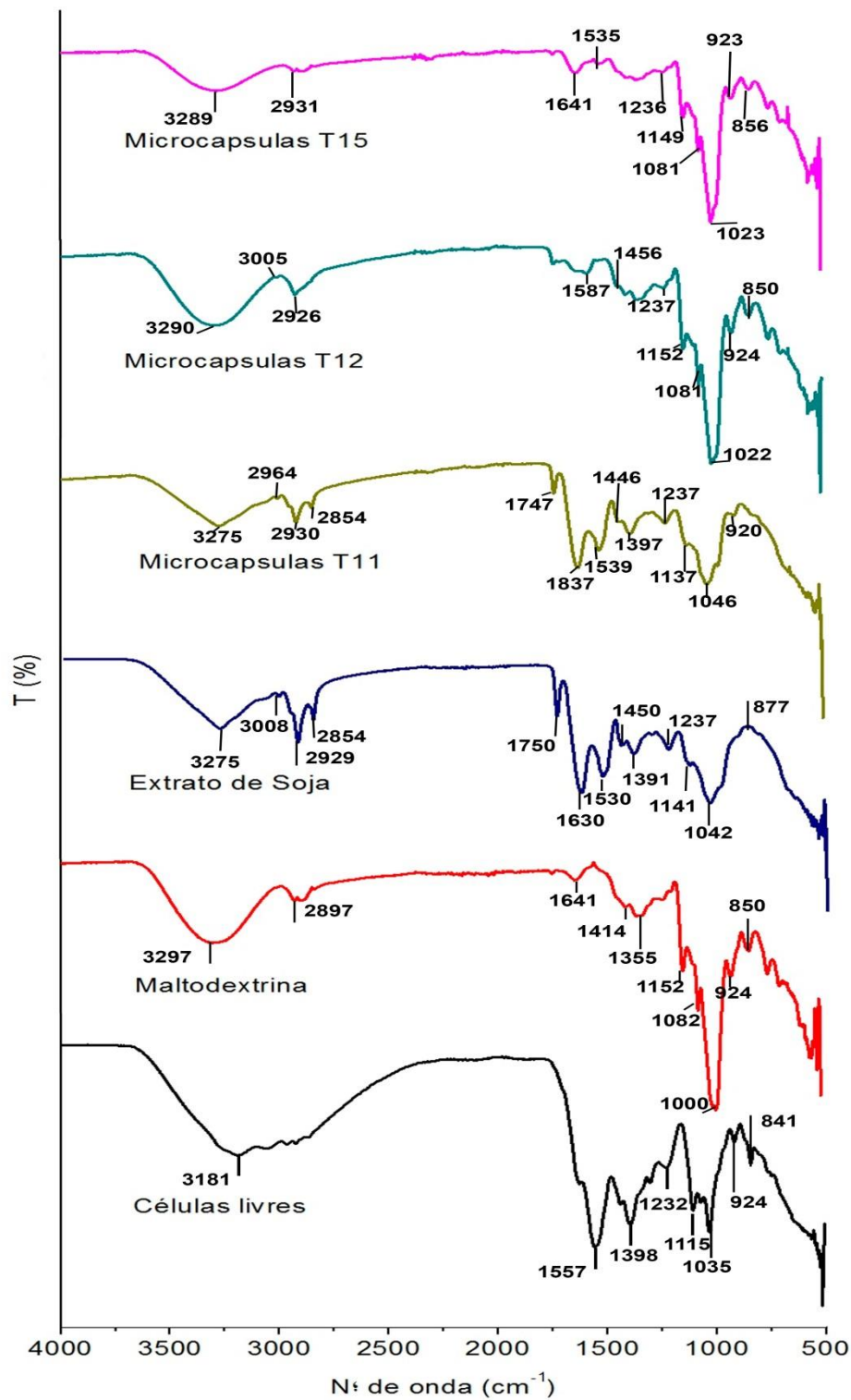


Figura 7. Espectros FTIR das células livres de *L. acidophilus*, da maltodextrina, do extrato de soja e das microcápsulas obtidas nos ensaios 11, 12 e 15.

Os picos próximos a 3000 cm⁻¹, mais intensos no extrato de soja e nas microcápsulas do ensaio 11, são atribuídos ao estiramento simétrico e assimétrico da

ligação C – H do grupamento metil, conforme já mencionado por He; Rodriguez-Saona; Giusti, (2007).

A banda larga que aparece entre 3000 cm^{-1} - 3700 cm^{-1} em todas as amostras, e em menor intensidade nas amostras atomizadas, está relacionada às ligações de hidrogênio, estiramento da ligação O – H de carboidratos, ácidos carboxílicos e água (HE; RODRIGUEZ-SAONA; GIUSTI, 2007).

As microcápsulas apresentaram na região $1200\text{-}900\text{ cm}^{-1}$ os picos característicos dos carboidratos presentes no extrato de soja e na maltodextrina (PIETRZAK; MILLER, 2005), porém com intensidades diferentes das observadas nos materiais de parede. Por outro lado, as partículas não apresentaram as principais bandas características do espectro das células de *L. acidophilus*, o que pode ser indicativo de interação entre as células e os materiais de parede, bem como de maior estabilidade das microcápsulas.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A otimização das condições de *spray drying* permitiu a obtenção de microcápsulas com alta concentração de células viáveis e atividade de água, higroscopicidade e umidade adequadas. As modificações nas variáveis de processo afetaram significativamente as características físicas das partículas e aumentaram em aproximadamente 50% o rendimento do processo, indicando que os danos térmicos e osmóticos às células probióticas podem ser minimizados pela utilização do planejamento experimental.

As micrografias comprovaram a microencapsulação do *L. acidophilus* e a formação de microcápsulas de formato arredondado, superfície irregular e com presença de concavidades típicas de produtos submetidos ao *spray drying*. Os diâmetros médios das partículas situaram-se dentro da faixa apropriada para aplicação em alimentos.

As análises térmicas e de FTIR indicaram uma possível interação entre os agentes encapsulantes e o microrganismo, pela formação de estruturas com propriedades térmicas e características diferentes. As curvas de DSC e TG sugeriram ainda que as microcápsulas são estáveis às temperaturas de processamento de alimentos que contenham probióticos e podem proteger o *L. acidophilus* da desidratação e do aquecimento.

Os dados obtidos demonstram a viabilidade da utilização do extrato de soja como material de parede para a microencapsulação de probióticos, como alternativa às proteínas de origem animal, possibilitando a obtenção de microcápsulas com alta concentração de células probióticas e características físicas apropriadas para a incorporação em alimentos funcionais.

5 REFERÊNCIAS

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 399–409, jun-set. 2005.

ANEKELLA, K. **Microencapsulation of probiotics (Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus rhamnosus) in raspberry powder by spray drying: optimization and storage stability studies**. 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biorecursos) Faculty of Agricultural and Environmental Sciences - McGill University, Québec, Canada, 2011.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 17-24, jan. 2013.

ANN, E. Y.; KIM, Y.; OH, S., IMM, J.-Y.; PARK, D.-J.; HAN, K. S.; KIM, S. H. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n.4, p. 411–419, abr. 2007.

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, n. 2, p. 184-193, mar. 2008.

AOAC. American Organization Of Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18. ed. Arlington: AOAC, 2005.

BARBOSA-CANOVAS, G.V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality**. Nova Iorque: Springer, 2005.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology: An International Journal**, v. 31, n.11, p. 1274-1283, mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

CAIRES, A. R. L.; TEIXEIRA, M. R. O.; SUAREZ, Y. R.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy. **Applied Spectroscopy**, v. 62, n. 9, p. 1044-1047, out. 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER N. J.; ROY D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61-84, jan. 2005.

CHAMPAGNE, C. P.; ROSS, R. P.; SAARELA, M.; HANSEN, K. F.; CHARALAMPOPOULOS, D. M. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, n. 3, p. 185–193, out. 2011.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7-8, p. 1193-1201, jul. 2007.

CORCORAN, B. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 5, p. 1024–1039, mai. 2004.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated. **Current Pharmaceutical Design**, v. 14, n.14, p. 1382–1399, jan. 2008.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of *Bifidobacterium longum* 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 503–509, mai. 2013.

FAYAD, S. M. **Obtenção e caracterização de micro e nanopartículas a base de proteína isolada de soja**. 2010. 101 f. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2010.

FANG, Z.; BHANDARI, B. **Encapsulation of polyphenols - a review**. Trends Food Sci. Technol., v. 21, n.10, p. 510-523, out. 2010.

FAO/WHO. **Probióticos en los alimentos**. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, 2006. 45p. Disponível em: <<ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf>> Acesso 02 nov. 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTER, E. S., TRINDADE, M. A., NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336–340, jun. 2010.
FRAGOSO, S.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BUSTO, O.; MESTRES, M. Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening. **Resultados da pesquisa. Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 59, n. 6, p. 2175-2183, mar. 2011.

FRASCARELI, E. C.; SILVA, V. M.; TONON, R. V.; HUBINGER, M. D. Effect of process conditions on the microencapsulation of coffee oil by spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 3, p. 413-424, jul. 2012.

FRITZEN-FREIRE; C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. B.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of *bifidobacteria* by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 306-312, jan. 2012.

FU, N.; CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Research International**, v.44, n. 7, p. 1127–1149, 2011.

GAGGIA, F.; GIOIA, D. D.; BAFFONI, L.; BIAVATI, B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. S58–S66, nov. 2011.

GARDINER, G. E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M. A. E.; 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, n. 6, p. 2605–2615, jun. 2000.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107 - 1121, nov. 2007.

GU, X.; CAMPBELL, L. J.; EUSTON, S. R. Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels. **Food Research International**, v. 42, n. 8, p. 925–932, out. 2009.

HAALAND, P. D. **Experimental design in biotechnology**. New York: Marcel Dekker Inc.,1989. 243p.

HE, J.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M. Midinfrared spectroscopy for juice authentication-rapid differentiation of commercial juices. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 55, n.11, p. 4443-4452, mai. 2007.

HOU, J-W.; YU,R-C.; CHOU, C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Interncional**. v.33. n. 5, p. 393-397, jun. 2000.

ICMSF. International Commission of Microbiological Specifications for Foods. **Microorganisms in foods. Their significance and methods of enumeration**. 2. ed. Toronto: University of Toronto Press, 1982.

JENALIB. Image Library of Biological Macromolecules. **Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR)**. Disponível em: < http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html.html > . Acesso em: 10 dez. 2014.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying. **Chemical Engineering Research and Design**, v. 90, n. 5, p. 662-632, mai. 2012.

LAPSIRI, W.; BHANDARI, B.; WANCHAITANAWONG P. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. **Drying Technology**, v. 30, n. 13, p. 1407–1412, set. 2012.

LI, X. M.; LIN, S. X. Q.; CHEN, X. D.; CHEN, L. Z.; PEARCE, D. Inactivation kinetics of probiotic bacteria during the drying of single milk droplets. **Drying Technology**, v. 24, n. 6, p. 695–701, fev. 2006.

LIAN W.C., HSIAO H.C., CHOU C.C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v.74, n. 34, p. 79-86, set. 2002.

LIU, Y.; YANG, Z.; DU, J.; YAO, X.; LEI, R.; ZHENG, X. Interaction of curcumin with intravenous immunoglobulin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study. **Immunobiology**, v. 213, n.8, p. 651-661, out. 2008.

MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v.106, n. 4, p. 1406-1416, fev. 2008.

MORGAN, C. A.; HERMAN, N.; WHITE, P. A.; VESEY, G., Preservation of microorganisms by drying: a review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, n.2, p. 183–193, ago. 2006.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182–186, abr. 2012.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, mar. 2013.

NILUFER-ERDIL, D.; SERVENTI, L.; BOYACIOGLU, D.; VODOVOTZ, Y. Effect of soy milk powder addition on staling of soy bread. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1132–1139, abr. 2012.

ORTIZ, S. E. M., MAURI, A., MONTERREY-QUINTERO, E. S., TRINDADE, M. A., SANTANA, A. S., FAVARO-TRINDADE, C. S. Production and properties of casein hydrolysate microencapsulated by spray drying with soybean protein isolate. **Food Science and Technology**, v. 42, n.5, p. 919–923, nov. 2009..

PEIGHAMBARDoust, S. H.; TAFTI, A. G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 5, p. 215–224, mai. 2011.

PICOT, A., LACROIX, C. Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**. v. 14, n. 6, p. 505-515, jun.2004.

PIETRZAK, L. N.; MILLER, S. S. Microchemical structure of soybean seeds revealed in situ by ultraspatially resolved synchrotron Fourier transformed infrared microspectroscopy. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 24, p. 9301-9311, nov. 2005.

PISPAN, S.; HEWITT, C. J.; STAPLEY, A. G. F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n.4, p362-369, out. 2013.

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, n. 2, p. 773- 780, mar. 2015.

RANADHEERA, S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk C. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 155–159, jan. 2015.

RODRIGUES, M. I.; IEMMA, A. F. **Planejamento de experimentos e otimização de processos**. 2ª ed. Campinas: Casa do Espírito Amigo Fraternidade Fé e amor, 2009.

SAAVEDRA, J. P.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; LARTUNDO-ROJAS, L.; GARIBAY-FEBLES, V.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.; ALAMILLA-BELTRÁN, L. Microstructural properties and distribution of components in microparticles obtained by spray-drying. **Journal of Food Engineering**, v. 152, n. 2015, p.105–112, fev. 2015.

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, n. p. 616- 622., ago. 2009.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n. 1, p. 1-13, jul. 2008.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SAWADA, M. M. **Estudo da viabilidade técnica da substituição de hexano por etanol no processo de extração de óleo de soja: cinética de extração e índices de qualidade**. 2012. 128 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Engenharia de Alimentos) - Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2012.

SCHUTYSER, A. I. M.; PERDANA, J.; BOOM, R. M. Single droplet drying for optimal spray drying of enzymes and probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 27, n.2, p. 73–82, out. 2012.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 193–202, jan. 2010.

SHAH, N. P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, n. 11, p. 1262–1277, nov. 2007.

TANG, C-H.; LI, X-R. Microencapsulation properties of soy protein isolate: Influence of preheating and/or blending with lactose. **Journal of Food Engineering**, v. 117, n. 3, p. 281–290, ago. 2013.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influence of process conditions on the physicochemical properties of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced by spray drying. **Journal of Food Engineering**, v. 88, n. 3, p. 411–418, out. 2008.

TONON, R. V.; BRABET, C.; HUBINGER, M. D. Influência da temperatura do ar de secagem e da concentração de agente carreador sobre as propriedades físico-químicas do suco de açai em pó. **Food Science and Technology**, v. 29, n. 2, abr-jun. 2009.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n.3, p. 209–217, ago. 2004.

YONEKURA, L.; SUN, H; SOUKOULIS, C.; FISK, I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n.100, p. 205–214, jan. 2014.

ARTIGO CIENTÍFICO 3

Estabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com extrato de soja e maltodextrina durante armazenamento

Leidiane Andreia Acordi MENEZES¹, Deisy Alessandra DRUNKLER¹

¹Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos (PPGTA), Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), Câmpus Medianeira, Avenida Brasil 4232, Parque Independência, CEP 85884-000, Medianeira, Paraná, Brasil; leidianeacordi@gmail.com; deisydrunkler@utfpr.edu.br.

RESUMO

A microencapsulação tem sido aplicada com o intuito de preservar a viabilidade de microrganismos probióticos durante o processamento e estocagem de alimentos. O objetivo do presente estudo foi avaliar a viabilidade celular de *L. acidophilus* La-5 microencapsulado por *spray drying*, utilizando extrato de soja e maltodextrina como agentes encapsulantes, durante armazenamento refrigerado. No processo de microencapsulação, aplicou-se planejamento experimental do tipo DCCR com três variáveis (temperatura de entrada do ar de secagem, razão maltodextrina/extrato de soja e vazão de alimentação do sistema). A sobrevivência do microrganismo foi determinada ao longo de 45 dias de armazenamento refrigerado (4°C), juntamente com a atividade de água das partículas. Os resultados demonstraram que as variáveis de processo influenciaram o conteúdo de água das microcápsulas e a sobrevivência do *L. acidophilus* microencapsulado. Em 12 dos 17 ensaios estudados, o número de células viáveis manteve-se satisfatório durante o período de estocagem ($> 8 \log \text{ UFC.g}^{-1}$). Observou-se que a alta sobrevivência do microrganismo ao processo de *spray drying* não garantiu elevada viabilidade ao longo do armazenamento. As microcápsulas produzidas pelas condições correspondentes aos pontos centrais do planejamento experimental apresentaram elevada concentração de células viáveis ($>9 \log \text{ UFC.g}^{-1}$) e atividade de água adequada ($<0,6$) por todo o período de armazenamento, indicando que o extrato de soja é um eficiente agente encapsulante no desenvolvimento de microcápsulas de *L. acidophilus*, com grande potencial para aplicação em alimentos funcionais.

Palavras-chave: *Spray drying*, probióticos, vida-útil, proteínas de soja.

ABSTRACT

Microencapsulation has been applied in order to preserve the viability of probiotic microorganisms during processing and storage of food. The objective of this study was to

assess cell viability of *L. acidophilus* La-5 microencapsulated by spray drying using soybean extract powder and maltodextrin as encapsulating agents, during refrigerated storage. In the process of microencapsulation, was applied experimental design Central Composite Rotatable Design (CCRD) type, with three variables (drying air inlet temperature, maltodextrin/soy extract ratio in the wall material composition and the system feed flow rate). Survival of the microorganism was determined over 45 days of refrigerated storage (4 ° C), together with the water activity of the particles. The results showed that the process variables had influence the water content of the microcapsules and survival of *L. acidophilus* microencapsulated. On 12, to 17 trials studied, the number of viable cells remained satisfactory during the storage period ($> 8 \log \text{UFC.g}^{-1}$). It was observed that the high survival the microorganism to the spray drying process did not ensure high viability during storage. The microcapsules produced by the conditions corresponding to the central points of the experimental design showed high concentration of viable cells ($> 9 \log \text{CFU g}^{-1}$) and adequate water activity (< 0.6) throughout the storage period, indicating that the extract soybean is an efficient encapsulating agent in the development of *L. acidophilus* microcapsules, with great potential for application in functional foods.

Keywords: Spray drying, probiotics, shelf-life, soy protein.

1 INTRODUÇÃO

O termo probiótico refere-se aos microrganismos vivos, que ao serem administrados regularmente e em quantidade adequada, conferem diversos benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2006). Contudo, para que um probiótico possa exercer tais efeitos sobre a saúde humana, deve ser incorporado em alimentos sem perder a viabilidade e a funcionalidade. Para isso, é necessário que se mantenha estável durante a produção, a distribuição e a estocagem do alimento, bem como durante a passagem através do trato digestório, chegando vivo, bioativo e em quantidades elevadas ao intestino, seu local de ação (SEMYONOV et al., 2010).

Nos últimos anos, a demanda crescente por alimentos funcionais tem levado à indústria alimentícia a desenvolver e aprimorar produtos que contenham bactérias probióticas. Entretanto, as técnicas utilizadas para preservar a viabilidade desses microrganismos costumam oferecer proteção ineficiente às células e, por esta razão, limitam a sua incorporação em alimentos. Neste sentido, a microencapsulação tem sido apontada como uma alternativa promissora para assegurar a viabilidade de probióticos incorporados em alimentos, protegendo-os em ambientes e condições hostis (SEMYONOV et al., 2010; GAGGIA et al., 2011).

Durante o processo de microencapsulação, um filme polimérico denominado agente encapsulante reveste o material a ser encapsulado, promovendo a formação de microcápsulas. A técnica de microencapsulação por *spray drying* é amplamente utilizada na indústria alimentícia, devido ao elevado rendimento, baixo custo e a simplicidade do

processo (GHARSALLAOUI et al., 2007). No entanto, a extensão da proteção oferecida pela microencapsulação às células probióticas depende, principalmente, da seleção das condições operacionais e do material utilizado como agente encapsulante, uma vez que a secagem pode promover danos aos microrganismos e conseqüentemente reduzir a estabilidade das bactérias ao longo da vida útil do produto (BEHBOUDI-JOBBEHDAR et al. 2013). Além do material de parede, a temperatura aplicada durante a secagem e a vazão de alimentação do *spray dryer* estão entre os fatores mais impactantes na viabilidade de microrganismos submetidos a técnica de *spray drying* (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007; ANEKELLA; ORSAT, 2013).

As proteínas de origem láctea e os carboidratos como goma arábica, alginato e carragena são os principais materiais de parede utilizados na microencapsulação (NAZZARO et al., 2012). No entanto, a substituição das proteínas de origem animal é atrativa para a indústria alimentícia em razão do baixo custo e das propriedades nutricionais e tecnológicas das proteínas de fontes vegetais, como a soja (NESTERENKO et al. 2013). O extrato de soja em pó contém aproximadamente 40% de proteína, 13% de lipídios, e 20% de carboidratos (NILUFER-ERDIL et al., 2012). A maltodextrina, por sua vez, tem sido associada a proteínas como agente encapsulante por melhorar as propriedades de secagem das partículas (ANEKELLA; ORSAT, 2013).

Dada a importância do agente encapsulante e das condições de processo na sobrevivência de microrganismos probióticos microencapsulados, o objetivo deste estudo foi verificar o efeito da razão entre extrato de soja e maltodextrina na composição do material de parede, da temperatura de secagem e da vazão de alimentação do *spray dryer* na viabilidade de *L. acidophilus* La-5 microencapsulado e nas características das microcápsulas durante período de armazenamento refrigerado.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 MICROENCAPSULAÇÃO DE *L. ACIDOPHILUS* POR *SPRAY DRYING*

A microencapsulação foi realizada de acordo com planejamento experimental do tipo DCCR de 2³, com seis pontos axiais e três repetições no ponto central, totalizando 17 experimentos (Tabela 1), tendo como variáveis a temperatura de entrada do ar na câmara de secagem, com temperaturas compreendidas entre 70°C e 100°C; a razão maltodextrina/extrato de soja no material de parede, cujas proporções variaram de 1:50

(m:m) a 2,4:1 (m:m) e a vazão de entrada da amostra no *spray dryer*, que variou de 0,45 L.h⁻¹ à 0,65 L.h⁻¹.

Tabela 1. Matriz do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) com variáveis de processo, Rendimento da Microencapsulação e Redução da Viabilidade celular.

Ensaio	Temperatura de entrada do ar de secagem (°C) (x ₁)	Razão Maltodextrina/ Extrato de Soja (m:m) (x ₂)	Vazão de entrada (L.h ⁻¹) (x ₃)
1	-1 (76)	-1 (1:2)	-1 (0,49)
2	+1 (94)	-1 (1:2)	-1 (0,49)
3	-1 (76)	+1 (2:1)	-1 (0,49)
4	+1 (94)	+1 (2:1)	-1 (0,49)
5	-1 (76)	-1 (1:2)	+1 (0,61)
6	+1 (94)	-1 (1:2)	+1 (0,61)
7	-1 (76)	+1 (2:1)	+1 (0,61)
8	+1 (94)	+1 (2:1)	+1 (0,61)
9	-1,68 (70)	0 (1,2:1)	0 (0,55)
10	+1,68(100)	0 (1,2:1)	0 (0,55)
11	0 (85)	-1,68 (1:50)	0 (0,55)
12	0 (85)	+1,68 (2,4:1)	0 (0,55)
13	0 (85)	0 (1,2:1)	-1,68 (0,45)
14	0 (85)	0 (1,2:1)	+1,68 (0,65)
15	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)
16	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)
17	0 (85)	0 (1,2:1)	0 (0,55)

A cultura probiótica (1% m:v) foi inoculada em caldo MRS e incubada a 37°C ± 1°C por 12 horas, até atingir a fase estacionária (dados não publicados). A seguir, a biomassa do probiótico foi recolhida por centrifugação (3000 g a 4°C durante 10 minutos) de acordo com Pispán; Hewitt; Stapley (2013) para posterior adição à suspensão de *spray drying*. A contagem inicial de *L. acidophilus* em todos os tratamentos antes da microencapsulação foi igual para todos os tratamentos (12,20 log UFC.g⁻¹).

O extrato de soja (Jasmine, Curitiba, Brasil) e a maltodextrina (ED 20, Maltogill®, Cargill, São Miguel do Iguaçú, Brasil) foram dispersos em água estéril até obtenção de suspensões com concentração de sólidos totais de 200 g.L⁻¹ ± 2 g.L⁻¹, preparadas em cada tratamento de acordo com o delineamento e homogêneas em banho ultrassônico (37°C ± 2°C, frequência 80 kHz, potência 100 W, 15 minutos) (Elma®, Elmasonic P120H, São

Paulo, Brasil). Em seguida, as suspensões de *spray drying* foram adicionadas de 1% (m:v) da cultura de *L. acidophilus* La-5 em fase estacionária e novamente homogeneizadas por um minuto em agitador magnético à temperatura ambiente ($25^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$) (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil).

As suspensões foram submetidas à secagem em *spray dryer* de escala laboratorial (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, Brasil), sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem ($2 - 4 \text{ kgf.cm}^{-2}$), vazão de ar comprimido (35 kgf.cm^{-2}) e diâmetro de saída do ar no sistema (1 mm) com bico duplo fluído. As partículas em pó produzidas foram coletadas na base do ciclone e armazenadas em recipiente de vidro hermeticamente fechados, previamente esterilizados e mantidas sob refrigeração a $4^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ durante 45 dias.

2.2 ATIVIDADE DE ÁGUA DAS MICROCÁPSULAS

A atividade de água das partículas foi determinada quinzenalmente ao longo do período de estocagem em equipamento analisador de atividade de água (Aqualab® 4TE, Decagon, São Paulo, Brasil) após a estabilização das microcápsulas a 25°C por 30 minutos.

2.3 VIABILIDADE DO *L. ACIDOPHILUS* MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO

A viabilidade celular do *L. acidophilus* foi determinada por meio da enumeração de células viáveis no pó das microcápsulas, de acordo com o método descrito por Fritzen-Freire et al. (2012), com adaptações, nos tempos 1, 15, 30 e 45 dias. As células foram primeiramente liberadas das microcápsulas homogeneizando-se 0,1 g das partículas em 9,9 mL de tampão fosfato ($0,1 \text{ mol.L}^{-1}$, pH 7,0) em agitador magnético (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. Posteriormente, foram feitas as respectivas diluições seriadas e o plaqueamento em profundidade em ágar MRS, em triplicata. As placas foram incubadas invertidas em jarras contendo gerador de anaerobiose (Anaerobac®, Probac, São Paulo, Brasil) a $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ por 48 horas. A contagem de células viáveis foi expressa em Log de unidades formadoras de colônia por grama ($\log \text{ UFC.g}^{-1}$).

Os dados de redução da viabilidade durante armazenamento foram expressos em ciclos log como o valor logarítmico da fração de sobrevivência relativa (Equação 1) (ANANTA; VOLKERT; KNORR, 2005).

$$\text{Redução da viabilidade} = \log(N/N_0) \quad (1)$$

Onde:

N: número de células viáveis em um período de armazenamento específico

N_0 : número de células viáveis no início do armazenamento, ambos expressos em log de UFC.g⁻¹

2.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando detectado diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância, ao Teste de *Tukey studentized*, utilizando o programa computacional *Statistica* 11.0 (Statsoft Inc., Tulsa, OK).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 ATIVIDADE DE ÁGUA DAS MICROCAPSULAS DURANTE ARMAZENAMENTO

A atividade de água das microcápsulas está apresentada na tabela 2. As análises não foram realizadas no ensaio 5 no decorrer do período de estocagem em razão da pequena quantidade de pó obtido após o *spray drying*, devido à adesão do material às paredes da câmara de secagem.

O conteúdo de água das partículas sofreu acréscimos acentuados ao longo da estocagem (40% - 100%). Contudo, os valores de atividade de água encontraram-se dentro dos limites para produtos secos por *spray drying* e recomendados para garantir a estabilidade durante o armazenamento (<0,6) (FÁVARO; TRINDADE et al., 2010) em todos

os tratamentos até o 30º dia. No entanto, no 45º dia de armazenamento, os pós produzidos nos ensaios 1, 6, 9 e 11 apresentaram atividade de água superior a 0,6, o que pode comprometer a estabilidade das microcápsulas por torná-las mais susceptíveis às alterações microbiológicas e físico-químicas (MENG et al., 2008). O conteúdo excessivo de água nestes ensaios diminuiu a qualidade dos pós, devido à aglomeração das partículas, dificultando seu manuseio e armazenamento.

Os tratamentos 1, 6 e 11 foram produzidos com menor quantidade de maltodextrina, o que provavelmente está relacionado à elevada atividade de água, uma vez que a maltodextrina é um coadjuvante de secagem que auxilia na manutenção da umidade dos pós durante o armazenamento, diminuindo sua higroscopicidade (ANEKELLA; ORSAT, 2013) enquanto os ensaios 4 e 12, que apresentaram os menores valores para atividade de água ao final do período de armazenamento, continham as maiores proporções de maltodextrina na composição do material de parede. O tratamento 9, que também exibiu elevada atividade de água, foi produzido com a menor temperatura de entrada do ar e tal condição pode ter contribuído para o resultado, pois as partículas submetidas à secagem em temperaturas inferiores apresentaram, em geral, maior atividade de água ao longo de todo o período avaliado.

Tabela 2. Atividade de água das microcápsulas durante o período de armazenamento a 4°C.

Ensaio	1º dia	15º dia	30º dia	45º dia
1	0,38 ± 0,01	0,50 ± 0,01	0,58 ± 0,01	0,61 ± 0,01
2	0,25 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,44 ± 0,00	0,48 ± 0,02
3	0,37 ± 0,02	0,39 ± 0,00	0,46 ± 0,01	0,58 ± 0,04
4	0,26 ± 0,01 ⁱ	0,27 ± 0,00	0,34 ± 0,01	0,36 ± 0,01
5	0,52 ± 0,00	-	-	-
6	0,29 ± 0,00	0,40 ± 0,01	0,50 ± 0,02	0,61 ± 0,02
7	0,34 ± 0,00	0,45 ± 0,01	0,51 ± 0,00	0,54 ± 0,01
8	0,31 ± 0,00	0,50 ± 0,00	0,51 ± 0,04	0,51 ± 0,03
9	0,38 ± 0,01	0,47 ± 0,01	0,52 ± 0,00	0,61 ± 0,01
10	0,25 ± 0,00	0,44 ± 0,01	0,48 ± 0,02	0,55 ± 0,01
11	0,31 ± 0,01	0,47 ± 0,00	0,57 ± 0,01	0,64 ± 0,01
12	0,33 ± 0,00	0,41 ± 0,00	0,43 ± 0,00	0,45 ± 0,00
13	0,31 ± 0,01	0,37 ± 0,00	0,47 ± 0,00	0,51 ± 0,01
14	0,38 ± 0,04	0,39 ± 0,02	0,51 ± 0,00	0,54 ± 0,01
15	0,35 ± 0,02	0,42 ± 0,02	0,43 ± 0,02	0,48 ± 0,01
16	0,33 ± 0,01	0,40 ± 0,02	0,44 ± 0,01	0,49 ± 0,00
17	0,35 ± 0,01	0,41 ± 0,00	0,42 ± 0,03	0,48 ± 0,02

3.2 VIABILIDADE DE *L. ACIDOPHILUS* MICROENCAPSULADO DURANTE ARMAZENAMENTO

O acompanhamento da viabilidade do *L. acidophilus* microencapsulado durante o período de armazenamento está representado na tabela 3.

Tabela 3. Enumeração de células viáveis de *L. acidophilus* microencapsulado com extrato de soja e maltodextrina durante período de armazenamento a 4°C.

Ensaio	1 dia	15 dias	30 dias	45 dias
1	9,27 ± 0,02 ^e	8,66 ± 0,26 ^d	8,60 ± 0,09 ^e	8,42 ± 0,02 ^f
2	9,55 ± 0,03 ^{c,d}	9,33 ± 0,02 ^{a,b,c}	9,09 ± 0,02 ^{c,d}	8,73 ± 0,15 ^e
3	8,64 ± 0,04 ^g	8,62 ± 0,00 ^d	7,95 ± 0,25 ^f	7,84 ± 0,10 ^g
4	6,85 ± 0,01 ⁱ	6,54 ± 0,21 ^f	6,68 ± 0,04 ^g	5,94 ± 0,10 ^j
5	8,86 ± 0,02 ^f	*	*	*
6	9,71 ± 0,01 ^{b,c}	9,54 ± 0,08 ^a	9,49 ± 0,09 ^a	9,44 ± 0,02 ^a
7	9,28 ± 0,13 ^e	9,27 ± 0,07 ^{a,b,c}	9,21 ± 0,01 ^{b,c}	9,14 ± 0,04 ^{b,c}
8	8,85 ± 0,04 ^f	8,45 ± 0,17 ^d	8,35 ± 0,10 ^e	7,45 ± 0,18 ^h
9	9,43 ± 0,08 ^{d,e}	9,48 ± 0,14 ^{a,b}	9,36 ± 0,03 ^{a,b}	9,28 ± 0,05 ^{a,b}
10	9,35 ± 0,01 ^e	9,01 ± 0,05 ^c	8,90 ± 0,05 ^d	8,83 ± 0,16 ^{d,e}
11	9,31 ± 0,05 ^e	9,15 ± 0,02 ^{b,c}	9,14 ± 0,03 ^{b,c,d}	9,01 ± 0,01 ^{c,d}
12	8,06 ± 0,01 ^h	<5 ^g	<5 ^h	<5 ⁱ
13	9,83 ± 0,14 ^a	9,04 ± 0,06 ^c	8,92 ± 0,08 ^d	8,87 ± 0,03 ^{d,e}
14	8,90 ± 0,05 ^f	7,91 ± 0,11 ^e	7,79 ± 0,02 ^f	7,18 ± 0,00 ^j
15	9,80 ± 0,07 ^a	9,11 ± 0,03 ^c	9,04 ± 0,01 ^{c,d}	9,02 ± 0,01 ^{b,c,d}
16	10,25 ± 0,08 ^a	9,15 ± 0,06 ^{b,c}	9,03 ± 0,02 ^{c,d}	9,01 ± 0,00 ^{c,d}
17	10,20 ± 0,06 ^a	9,06 ± 0,01 ^c	9,05 ± 0,01 ^{c,d}	9,04 ± 0,00 ^{b,c,d}

⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

* A redução de viabilidade no ensaio 5 não pôde ser calculada em razão da pequena quantidade de material obtido.

As microcápsulas obtidas no ponto central (15, 16 e 17) e no ensaio 13 apresentaram as contagens mais elevadas no primeiro dia de armazenamento, diferindo estatisticamente dos demais ($p \leq 0,05$), mas não entre si. Tendo em vista que a quantidade de inóculo foi a mesma em todos os tratamentos, observa-se que estes ensaios ofereceram maior proteção às bactérias durante o processo de *spray drying*.

A partir do 15º dia de armazenamento, o número de células viáveis no tratamento 6 apresentou-se superior aos demais até o fim do período de estocagem, seguido dos tratamentos 9, 7 e dos pontos centrais, entre os quais não houve diferença mínima significativa. Ao final do período de avaliação, nestes ensaios as contagens de *L. acidophilus* foram de aproximadamente 9 log UFC.g⁻¹. Com exceção dos tratamentos 4, 8, 12 e 14, os demais ensaios apresentaram contagens superiores a 8 log UFC.g⁻¹, podendo ser considerados adequados para a produção de microcápsulas de *L. acidophilus* nas condições estudadas, quanto à manutenção de células viáveis, durante o período avaliado. De acordo com Champagne; Gardner; Roy (2005), a contagem de bactérias probióticas deve ser de 10⁶ UFC.g⁻¹ a 10⁸ UFC.g⁻¹ para fornecer benefícios à saúde. No entanto, a quantidade mínima de bactérias probióticas viáveis no alimento, segundo a legislação brasileira, deve estar situada entre 10⁸ e 10⁹ Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo (BRASIL, 2008).

Verificou-se redução de viabilidade entre 0,13 ciclos log e 1,72 ciclos log ao final de 45 dias de avaliação, como pode ser observado na Tabela 4.

Tabela 4. Redução da viabilidade (ciclos log) de *L. acidophilus* microencapsulado durante o período de estocagem.

Ensaio	1º-15º dia	15º- 30º dia	30º - 45º dia	1º - 45º dia	Processo – estocagem
1	0,62 ± 0,26 ^{c,d,e}	0,05 ± 0,33 ^b	0,19 ± 0,07 ^c	0,86 ± 0,04 ^{c,d}	3,78 ± 0,10 ^d
2	0,23 ± 0,01 ^{e,f,g}	0,23 ± 0,04 ^b	0,37 ± 0,16 ^{b,c}	0,83 ± 0,18 ^{c,d}	3,46 ± 0,11 ^{d,e}
3	0,02 ± 0,0 ^{f,g}	0,67 ± 0,25 ^a	0,11 ± 0,33	0,80 ± 0,11 ^{c,d}	4,35 ± 0,15 ^c
4	0,31 ± 0,21 ^{e,f,g}	-0,14 ± 0,18 ^b	0,74 ± 0,14 ^{a,b}	0,90 ± 0,10 ^c	6,27 ± 0,12 ^a
6	0,17 ± 0,08 ^{f,g}	0,05 ± 0,02 ^b	0,04 ± 0,10 ^c	0,27 ± 0,02 ^{e,f}	2,75 ± 0,09 ^h
7	0,01 ± 0,20 ^{f,g}	0,06 ± 0,05 ^b	0,06 ± 0,04 ^c	0,13 ± 0,12 ^f	3,05 ± 0,09 ^{f,g,h}
8	0,40 ± 0,14 ^{d,e,f}	0,10 ± 0,10 ^b	0,90 ± 0,24 ^a	1,40 ± 0,20 ^{a,b}	4,75 ± 0,22 ^b
9	-0,05 ± 0,12 ^g	0,12 ± 0,11 ^b	0,09 ± 0,05 ^c	0,15 ± 0,05 ^{e,t}	2,93 ± 0,10 ^{g,h}
10	0,34 ± 0,05 ^{e,f,g}	0,12 ± 0,01 ^b	0,06 ± 0,11 ^c	0,52 ± 0,16 ^{d,e}	3,37 ± 0,20 ^{e,f}
11	0,16 ± 0,02 ^{t,g}	0,01 ± 0,04 ^b	0,13 ± 0,02 ^c	0,30 ± 0,05 ^{e,t}	3,19 ± 0,08 ^{e,t,g}
12*	> 3,06 ^a	-	-	-	-
13	0,79 ± 0,18 ^{b,c,d}	0,12 ± 0,12 ^b	0,05 ± 0,06 ^c	0,96 ± 0,12 ^c	3,35 ± 0,07 ^{e,t}
14	0,99 ± 0,07 ^{b,c}	0,13 ± 0,12 ^b	0,61 ± 0,02 ^{a,b}	1,72 ± 0,06 ^a	5,02 ± 0,05 ^b
15	1,06 ± 0,08 ^b	0,07 ± 0,04 ^b	0,02 ± 0,01 ^c	1,15 ± 0,11 ^{b,c}	3,18 ± 0,07 ^{e,f,g}
16	0,97 ± 0,18 ^{b,c}	0,12 ± 0,08 ^b	0,02 ± 0,02 ^c	1,11 ± 0,23 ^{b,c}	3,23 ± 0,03 ^{e,f,g}
17	1,14 ± 0,05 ^b	0,01 ± 0,02 ^b	0,01 ± 0,01	1,16 ± 0,06 ^{b,c}	3,15 ± 0,08 ^{e,f,g}

⁽¹⁾ Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferiram significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade.

Behboudi-Jobbehdar et al. (2013) relataram redução de 0,9 ciclos log após 30 dias de armazenamento na microencapsulação de *L.acidophilus* NCIMB 701748 por *spray drying* utilizando isolado proteico de soro de leite e maltodextrina como agentes encapsulantes, corroborando com os resultados obtidos. Por outro lado, Chávez; Ledebøer (2007), observaram perdas de viabilidade superiores a 50% após 40 dias de estocagem, utilizando isolado proteico de soja e leite em pó desnatado associados à trealose e maltodextrina, na microencapsulação de *B. lactis* Bb 12.

Comparando-se os ensaios que continham maior proporção de extrato de soja no material de parede (1, 2, 6 e 11) àqueles com maior proporção de maltodextrina (3, 4, 8 e 12), observa-se que a redução da viabilidade durante o período de armazenamento foi menor nas microcápsulas elaboradas com maior teor de extrato de soja. Tal comportamento pode estar relacionado à presença de oligossacarídeos em quantidade superiores nessas partículas. O extrato de soja contém rafinose e estaquiase, que são oligossacarídeos considerados prebióticos, por estimularem o crescimento de microrganismos probióticos (HOU et al., 2000), sendo que o efeito positivo dos oligossacarídeos de soja sobre a viabilidade de probióticos foi relatado por Ann et al. (2007), ao verificarem que a presença de rafinose no material de parede aumentou a sobrevivência de *L. acidophilus* microencapsulado durante o armazenamento, como pode ter ocorrido neste estudo.

Do mesmo modo, a quantidade superior de proteínas da soja pode ter oferecido maior proteção às células nesses tratamentos, pois segundo Wang et al. (2004) e Ying et al. (2010), a desnaturação proteica ocorrida durante o processo de secagem promove o aumento da rigidez das microcápsulas, proporcionando efeito de barreira mais eficaz contra água e quaisquer alterações físicas ou químicas no material, de modo que uma maior viabilidade é esperada durante o armazenamento.

Verificou-se que os tratamentos que empregaram vazões de entrada inferiores ($0,49 \text{ L.h}^{-1}$) apresentaram maior redução da viabilidade durante o armazenamento quando comparados aos tratamentos com vazões superiores ($0,61 \text{ L.h}^{-1}$). Segundo Chávez; Ledebøer (2007), a redução da vazão aumenta o tempo de exposição das células ao calor, o que pode aumentar os efeitos agressivos da secagem.

Barbosa-Canovas et al. (2005) relataram que alterações na vazão afetam as cinéticas de transferência de massa e calor na interface sólido-ar, assim, o aumento da vazão provoca redução da temperatura da superfície das gotículas e, conseqüentemente, pode reduzir o dano físico às membranas celulares. Tal efeito pôde ser visualizado nos ensaios 6 e 7 em comparação aos pontos centrais, pois a perda de viabilidade no armazenamento foi menor nos dois primeiros, submetidos à vazão mais elevada, o que pode ter contribuído para a redução nos danos celulares sofridos pelas bactérias durante a

secagem e, conseqüentemente, favorecido a sobrevivência do microrganismo no período de armazenamento.

Já a pequena redução de viabilidade do tratamento 9 pode ser atribuída à baixa temperatura empregada durante a secagem. Conforme relatado por Chávez; Ledebøer (2007), a temperatura de secagem elevada é um dos principais fatores a contribuir com a redução da viabilidade celular.

No tratamento 12, as reduções de viabilidade foram mais elevadas em todo o período avaliado e o número de células viáveis foi inferior a $5 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ desde o 15º dia de armazenamento. As microcápsulas deste tratamento apresentaram os maiores diâmetros médios e rupturas nas superfícies (dados não publicados), o que pode estar relacionado à baixa sobrevivência do *L. acidophilus*, de acordo com Fritzen-Freire et al. (2012). De maneira geral, tratamentos com diâmetros maiores apresentaram menor sobrevivência celular, assim como descrito por Anekella (2011), que relatou que quanto menores e mais uniformes as partículas, melhor a viabilidade do *L. acidophilus* microencapsulado, o que pôde ter contribuído para a elevada viabilidade do microrganismo no tratamento 6, que apresentou as microcápsulas com menores diâmetros e tamanhos mais homogêneos.

Alguns tratamentos que haviam apresentado contagens levadas logo após o *spray drying* exibiram reduções de viabilidade mais acentuadas ao longo do armazenamento, como verificado para os tratamentos 1, 2, 13, 15, 16 e 17, indicando que a proteção oferecida ao microrganismo durante a microencapsulação pode não se estender pelo período de estocagem, assim como verificado por Chávez; Ledebøer (2007), que testando diversas combinações de material de parede, como proteína isolada de soja e maltodextrina, observaram que a sobrevivência à secagem não foi necessariamente relacionada à sobrevivência durante o armazenamento. Esta diferença pode ser atribuída ao fato de que, embora estejam viáveis logo após o *spray drying*, as células podem ter sido danificadas, o que refletirá na redução da viabilidade somente no decorrer do armazenamento.

Corcoran et al. (2004) obtiveram resultados semelhantes ao microencapsular *L. rhamnosus* e *L. salivarius* por *spray drying*, verificando que a elevada viabilidade celular logo após o processo de microencapsulação não garantiu alta sobrevivência das células durante a estocagem. Segundo os autores, somente a enumeração das bactérias logo após a microencapsulação não é capaz de distinguir células bacterianas danificadas e sem danos, portanto, os testes de armazenamento são necessários para que se conheça efetivamente a capacidade protetora dos agentes encapsulantes e a qualidade dos pós (teor de água, por exemplo), já que ambas as características devem ser consideradas para a otimização da microencapsulação.

Segundo Behboudi-Jobbehdar et al. (2013), recomenda-se a obtenção de condições de secagem por *spray drying* que permitam a máxima viabilidade do probiótico, em

microcápsulas com características estruturais e físico-químicas aceitáveis. Desta forma, embora os tratamentos 6, 9 e 7 tenham apresentado alta viabilidade celular durante a estocagem, a estabilidade dos pós pode ser prejudicada pelos elevados teores de atividade de água encontrados. Portanto, as melhores condições para a produção de microcápsulas a partir de extrato de soja e maltodextrina, dentro da faixa estudada, correspondem aos pontos centrais, pois propiciaram alta sobrevivência das células de *L. acidophilus* ao longo do período de armazenamento e valores de atividade de água dentro dos limites recomendados para manter a estabilidade dos pós obtidos.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As condições ótimas para a produção de microcápsulas corresponderam a faixas de temperatura e vazão intermediárias e proporções superiores de extrato de soja em relação à maltodextrina. A utilização de baixas temperaturas durante o *spray drying* contribuiu para a obtenção de microcápsulas com atividade de água elevada, no entanto, na maioria dos tratamentos, a atividade de água manteve-se dentro dos limites recomendados para garantir a estabilidade microbiológica e físico-química das partículas.

A adição da maltodextrina como coadjuvante favoreceu a manutenção da atividade de água dentro dos valores recomendados para produtos secos por *spray drying*, no entanto, as microcápsulas produzidas com a maior proporção de maltodextrina não foram eficientes em garantir a viabilidade do microrganismo, enquanto microcápsulas que continham concentração de extrato de soja superior à de maltodextrina ofereceram melhor proteção ao *L. acidophilus* durante o período de armazenamento.

Em 12, dos 17 ensaios avaliados, o número de células viáveis foi satisfatório ($> 8 \log \text{UFC.g}^{-1}$) após 45 dias de estudo. Apesar da elevada sobrevivência após o processo de *spray drying*, alguns tratamentos apresentaram acentuada redução da viabilidade celular durante o armazenamento, indicando que os danos sofridos pelas células na etapa de secagem podem prejudicar a sobrevivência do microrganismo somente no decorrer do armazenamento, reafirmando a necessidade do estudo da estabilidade das microcápsulas. Contudo, a viabilidade do *L. acidophilus* microencapsulado foi considerada alta, quando comparada a outros estudos.

O extrato de soja pôde ser considerado um agente encapsulante altamente eficiente na manutenção da viabilidade de *L. acidophilus*, permitindo a obtenção de microcápsulas com atividade de água em níveis seguros e alta concentração de células viáveis durante

todo período de armazenamento, com grande potencial para a aplicação como ingrediente bioativo no desenvolvimento de alimentos funcionais.

5 REFERÊNCIAS

ANANTA, E.; VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, n. 6-9, p. 399–409, jun-set. 2005.

ANEKELLA, K. **Microencapsulation of probiotics (Lactobacillus acidophilus and Lactobacillus rhamnosus) in raspberry powder by spray drying: optimization and storage stability studies**. 2011. 128 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Biorecursos) Faculty of Agricultural and Environmental Sciences - McGill University, Québec, Canada, 2011.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 2, p. 17-24, jan. 2013.

ANN, E. Y.; KIM, Y.; OH, S., IMM, J.-Y.; PARK, D.-J.; HAN, K. S.; KIM, S. H. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n.4, p. 411–419, abr. 2007.

BARBOSA-CANOVAS, G.V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. **Food Powders: Physical Properties, Processing and Functionality**. Nova Iorque: Springer, 2005.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology: An International Journal**, v. 31, n.11, p. 1274-1283, mar. 2013.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Alimentos com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos IX - Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER N. J.; ROY D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61-84, jan. 2005.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, n. 7-8, p. 1193-1201, jul. 2007.

CORCORAN, B. M.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v.96, n. 5, p. 1024–1039, mai. 2004.

FAO/WHO. **Probióticos en los alimentos**. Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, 2006. 45p. Disponível em: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/a0512s/a0512s00.pdf.> Acesso 02 nov. 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; SANTANA, A. S.; MONTERREY-QUINTER, E. S., TRINDADE, M. A., NETTO, F. M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 336–340, jun. 2010.

FRITZEN-FREIRE; C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. B.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of *bifidobacteria* by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n.1, p. 306-312, jan. 2012.

GAGGIA, F.; GIOIA, D. D.; BAFFONI, L.; BIAVATI, B. The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, n. 1, p. S58–S66, nov. 2011.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, n. 9, p. 1107 - 1121, nov. 2007.

HOU, J-W.; YU,R-C.; CHOU, C-C. Changes in some componentes of soymilk during fermentation with bifidobacteria. **Food Research Interncional**. v.33. n. 5, p. 393-397, jun. 2000.

LAPSIRI, W.; BHANDARI, B.; WANCHAITANAWONG P. Viability of *Lactobacillus plantarum* TISTR 2075 in different protectants during spray drying and storage. **Drying Technology**, v. 30, n. 13, p. 1407–1412, set. 2012.

MENG, X. C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; DALY, C.; ROSS, R. P. Anhydrobiotics: the challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v.106, n. 4, p. 1406-1416, fev. 2008.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 182–186, abr. 2012.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness. **Industrial Crops and Products**, v. 42, p. 469-479, mar. 2013.

NILUFER-ERDIL, D.; SERVENTI, L.; BOYACIOGLU, D.; VODOVOTZ, Y. Effect of soy milk powder addition on staling of soy bread. **Food Chemistry**, v. 131, n. 4, p. 1132–1139, abr. 2012.

PICOT, A., LACROIX, C. Encapsulation of *bifidobacteria* in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**. v. 14, n. 6, p. 505-515, jun.2004.

PISPAN, S.; HEWITT, C. J.; STAPLEY, A. G. F. Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n.4, p362-369, out. 2013.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. **Journal of Applied Microbiology**, v.105, n. 1, p. 1-13, jul. 2008.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying**. 2013. 105 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia Industrial) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2013.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 193–202, jan. 2010.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, n.3, p. 209– 217, ago. 2004.

YING, D. Y.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I.; AUGUSTIN, M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG Powders: Relationship of Powder Physical Properties to Probiotic Survival during Storage. **Journal of Food Science**, v. 75, n. 9, p. E588-E594, set. 2010.