

UNIVERSIDADE TECNOLÓGICA FEDERAL DO PARANÁ

MIRIAM CRISTINA DA SILVA GOMES

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* POR *SPRAY DRYING* EMPREGANDO PECTINA E CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE COMO AGENTES ENCAPSULANTES

MEDIANEIRA

2023

MIRIAM CRISTINA DA SILVA GOMES

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* POR *SPRAY DRYING*
EMPREGANDO PECTINA E CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE
COMO AGENTES ENCAPSULANTES**

**Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* by *spray drying* using pectin
and whey protein concentrate as encapsulating agents**

Dissertação apresentada como requisito para obtenção do
título de Mestre em Tecnologia de Alimentos da Universidade
Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).
Orientadora: Prof^a. Dr^a. Deisy Alessandra Drunkler

MEDIANEIRA

2023



[4.0 Internacional](https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/)

Esta licença permite que outros remixem, adaptem e criem a partir do seu trabalho para fins não comerciais, desde que atribuam o devido crédito e que licenciem as novas criações sob termos idênticos. Conteúdos elaborados por terceiros, citados e referenciados nesta obra não são cobertos pela licença.



MIRIAM CRISTINA DA SILVA GOMES

MICROENCAPSULAÇÃO DE LACTOBACILLUS ACIDOPHILUS POR SPRAY DRYING EMPREGANDO PECTINA E CONCENTRADO PROTEICO DE SORO DE LEITE COMO AGENTES ENCAPSULANTES

Trabalho de pesquisa de mestrado apresentado como requisito para obtenção do título de Mestre Em Tecnologia De Alimentos da Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR). Área de concentração: Tecnologia De Alimentos.

Data de aprovação: 27 de Abril de 2023

Dra. Deisy Alessandra Drunkler, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Eliane Colla, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Dra. Luciana Oliveira De Farina, Doutorado - Universidade Estadual do Oeste do Paraná (Unioeste)

Dra. Rosana Aparecida Da Silva Buzaneilo, Doutorado - Universidade Tecnológica Federal do Paraná

Documento gerado pelo Sistema Acadêmico da UTFPR a partir dos dados da Ata de Defesa em 27/04/2023.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por permitir e me dar força, perseverança na realização desse sonho que é a conclusão do mestrado.

Agradeço ao meu esposo Fabiano, meus filhos, Bruno e Fabiane, e à minha neta Yasmin Gabrielly, o apoio deles foram fundamentais para que eu chegasse até ao final do curso.

Aos Professores do Programa de Pós-Graduação em Tecnologia de Alimentos, em especial a minha orientadora profa. Dra. Deisy A. Drunkler, por ter aceitado o desafio de orientar-me, com sabedoria, conhecimento, contribuições e paciência. À senhora meu respeito e gratidão.

Aos professores Ilton José Baraldi, Eliane Colla, Márcia Bortolomeu Agostini, Aziza Kamal Genena, pelo empréstimo de materiais e equipamentos.

À professora Dra. Eliane Colla, Professora Dra. Rosana Buzanello e a professora Dra. Luciana Fariña pelas contribuições a esse trabalho.

Agradeço também a todos os colegas da universidade que me auxiliaram, Luíza, Thiago, Carol Marconi, em especial, a Sthefanie Moura e a Luci Emi Ogava que estavam comigo sempre e pelo ombro amigo nos momentos difíceis.

Agradecimento especial a Marinêz Souza, e ao seu esposo Juliano, pela receptividade, amizade e apoio durante o período de desenvolvimento desta pesquisa.

Agradeço imensamente a amiga Mayara Chaves, pelo apoio e compreensão por minha ausência no trabalho.

Não posso deixar de agradecer as amigas: Adélia Sedano, Georgina Aparecida, Maria José Avanci pelas ausências nos nossos encontros de amigas.

Muito obrigada ao Instituto Federal de Mato Grosso do Sul (IFMS), pela oportunidade de afastamento para a realização deste curso.

Agradecimento especial às empresas Cp Kelco Brasil S.A. e Renner Nutrição S.A, pela doação de Pectina ATM e BTM e WPC 80, respectivamente.

Agradeço à CEANMED – Central Analítica Multiusuário da Universidade Tecnológica Federal do Paraná - Campus Medianeira, Paraná, Brasil, pelos ensaios realizados; ao Laboratório Multiusuário do Campus Londrina (LabMult-LD) da UTFPR, pelas análises de Analisador de Tamanho de Partículas - DLS (Lisersizer 500, ANTON PAAR), e aos técnicos da UTFPR, em especial a Daneysa Lahis Kalschne, Paula

Marasca Oro e a Patrícia Dias Gamero, pelos ensinamentos compartilhados nas análises nos laboratórios.

Agradecimentos à Universidade Federal da Integração Latino-Americana (UNILA) e ao Laboratório Multiusuário Engenheira Enedina Alves Marques (LEAM), pelas análises de microscopia eletrônica de varredura (MEV).

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior).

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001”.

RESUMO

O aumento da consciência nutricional tem impulsionado a procura e o consumo de alimentos funcionais. Dentre estes, destacam-se os probióticos, definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades diárias e adequadas, conferem benefícios à saúde humana. Entretanto, esses microrganismos são sensíveis a condições adversas e para exercerem seus efeitos precisam continuar metabolicamente viáveis até o intestino. Assim, estratégias para a manutenção da viabilidade dos probióticos vêm sendo desenvolvidas, dentre elas, a microencapsulação, sugerida como um método promissor para a proteção dos probióticos. Ademais, a escolha dos agentes encapsulantes é essencial, pois o material utilizado contribui para a eficiência da microencapsulação e a estabilidade das microcápsulas. Como as características físico-químicas dos agentes encapsulantes se diferenciam, opta-se, frequentemente, pela combinação de materiais, buscando melhores resultados. O objetivo foi avaliar a técnica de microencapsulação por *spray drying*, empregando pectina e concentrado proteico de soro de leite como agentes encapsulantes sobre a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus*. Foram produzidas microcápsulas com diferentes concentrações de pectina (ATM ou BTM) e concentrado proteico de soro (CPS): T1 = 1:7 ATM:CPS; T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS; T3 = 1:7 BTM:CPS e T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS, e avaliadas quanto à eficiência da microencapsulação, a viabilidade do material encapsulado no suco gástrico e intestinal *in vitro*, e durante o armazenamento (sob refrigeração $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ e temperatura ambiente $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), nos tempos 0, 15, 30, 45, 60 e 90 dias. As microcápsulas foram caracterizadas quanto a morfologia e propriedades físico-químicas. A eficiência de encapsulação variou entre 80,91% (T4) e 91,72% (T2). A viabilidade das microcápsulas, após as condições simuladas do trato digestório, foi de 80,63% (T2) seguida de 79,96% (T3) e 71,65% (T4), indicando bom desempenho dos tratamentos das microcápsulas na proteção dos probióticos. Quando armazenadas a $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, o T2 preservou a viabilidade probiótica por mais tempo (90 dias), enquanto que, à temperatura ambiente ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), T3 e T4 mantiveram a viabilidade bacteriana por até 60 dias, comparados a T2, cuja viabilidade foi até 45 dias. A morfologia das microcápsulas apresentou-se com formato esférico e algumas concavidades. Os valores de atividade de água variaram entre $0,35 \pm 0,05$ e $0,51 \pm 0,01$; de umidade entre $4,38 \pm 0,05\%$ e $5,83 \pm 0,20\%$; de solubilidade entre 74,61% e 82,06%; e de higroscopicidade entre 9,47% e 12,28%. Na Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier, os espectros demonstraram as características dos agentes encapsulantes após o *spray drying*. Considerando os melhores resultados obtidos quanto a manutenção da viabilidade probiótica em condições gastrointestinais simuladas e sob condições de estocagem, destacaram-se as microcápsulas com T2 e T3, especialmente T3. De modo geral, verificou-se ser viável a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* com os agentes encapsulantes empregados, visto que a eficiência de encapsulação foi adequada e que a viabilidade às condições gastrointestinais simuladas, à estocagem em temperatura ambiente e refrigerada, foram favoráveis quanto à preservação dos probióticos, na maioria dos tratamentos avaliados.

Palavras-chave: viabilidade de células; digestibilidade *in vitro*; probióticos.

ABSTRACT

The Increase in nutritional awareness has driven the demand for and consumption of functional foods. Among these, probiotics stand out, defined as live microorganisms that, when administered in adequate daily amounts, confer benefits to human health. However, these microorganisms are sensitive to adverse conditions and to exert their effects they need to remain metabolically viable until the intestine. Thus, strategies for maintaining the viability of probiotics have been developed, among them, microencapsulation, suggested as a promising method for protecting probiotics. Furthermore, the choice of encapsulating agents is essential, as the material used contributes to the efficiency of microencapsulation and the stability of microcapsules. As the physicochemical characteristics of encapsulating agents are different, a combination of materials is often chosen, seeking better results. The objective was to evaluate the microencapsulation technique by *spray drying*, using pectin and whey protein concentrate as encapsulating agents on the viability of *Lactobacillus acidophilus*. Microcapsules were produced with different concentrations of pectin (ATM or BTM) and whey protein concentrate (CPS): T1 = 1:7 ATM:CPS; T2 = 0.5:7.5 ATM:CPS; T3 = 1:7 BTM:CPS and T4= 0.5:7.5 BTM:CPS, and evaluated for the efficiency of microencapsulation, the viability of the encapsulated material in gastric and intestinal juice in vitro, and during storage (under refrigeration $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$ and room temperature $25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), at times 0, 15, 30, 45, 60 and 90 days. The microcapsules were characterized in terms of morphology and physical-chemical properties. The encapsulation efficiency varied between 80.91% (T4) and 91.72% (T2). The viability of the microcapsules, after the simulated digestive tract conditions, was 80.63% (T2) followed by 79.96% (T3) and 71.65% (T4), indicating good performance of the microcapsule treatments in protecting the probiotics. When stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$, T2 preserved probiotic viability longer (90 days), while at room temperature ($25\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 1$), T3 and T4 maintained bacterial viability for up to 60 days, compared to T2, whose viability was up to 45 days. The morphology of the microcapsules presented a spherical shape and some concavities. Water activity values varied between 0.35 ± 0.05 and 0.51 ± 0.01 ; humidity between $4.38 \pm 0.05\%$ and $5.83 \pm 0.20\%$; solubility between 74.61% and 82.06%; and hygroscopicity between 9.47% and 12.28%. In Spectroscopy in the Infrared Region by Fourier Transform, the spectra demonstrated the characteristics of encapsulating agents after spray drying. Considering the best results obtained regarding the maintenance of probiotic viability in simulated gastrointestinal conditions and under storage conditions, microcapsules with T2 and T3, especially T3, stood out. In general, the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with the encapsulating agents used was found to be feasible, since the encapsulation efficiency was adequate and the viability of the simulated gastrointestinal conditions, storage at room and refrigerated temperatures, were favorable in terms of preservation. of probiotics, in most of the evaluated treatments.

Keywords: cell viability; in vitro digestibility; probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Esquema do processo de secagem por <i>spray drying</i>.....	23
Figura 2 – Curva de crescimento do <i>Lactobacillus acidophilus</i>.....	37
Figura 3 – Micrografias das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> obtidas por <i>spray drying</i> com escala de 2 µm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite.....	44
Figura 4 – Micrografias das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> obtidas por <i>spray drying</i> com escala de 10 µm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite.....	45
Figura 5 – Micrografias das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> obtidas por <i>spray drying</i> com escala de 20 µm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite.....	46
Figura 6 – Espectros de FTIR dos agentes encapsulantes, do microorganismo livre e das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> obtidas por <i>spray drying</i> utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite	57

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Concentrações das substâncias componentes das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i>.....	32
Tabela 2 - Composição das soluções de estoque utilizadas no preparo dos fluidos digestivos	36
Tabela 3 - Eficiência da encapsulação para os diferentes tratamentos de microencapsulação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite produzidos por spray drying	38
Tabela 4 - Caracterização quanto à atividade de água, umidade, solubilidade e higroscopicidade das microcápsulas de <i>Lactobacillus acidophilus</i> produzidas por diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de <i>spray drying</i>	41
Tabela 5 - Diâmetro médio das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i> obtidas por <i>spray drying</i> dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite	47
Tabela 6 - Viabilidade de células de <i>Lactobacillus acidophilus</i> livres e microencapsuladas (Log UFC g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de <i>spray drying</i> nas condições gastrointestinais simuladas.....	48
Tabela 7 - Viabilidade de células de <i>Lactobacillus acidophilus</i> livres e microencapsuladas (Log UFC.g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de <i>spray drying</i> em condições de estocagem refrigerada e à temperatura ambiente	52
Tabela 8 - Síntese dos resultados obtidos.....	60

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REVISÃO DA LITERATURA	16
3.1	Probióticos	16
3.1.1	<i>Lactobacillus</i> sp.....	18
3.2	Microencapsulação	20
3.2.1	<i>Spray drying</i>	22
3.3	Agentes encapsulantes	25
3.3.1	Pectina ATM e BTM	26
3.3.2	Concentrado Proteico de Soro de Leite.....	28
4	MATERIAL E MÉTODOS	30
4.1	Curva de Crescimento do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
4.2	Ativação do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	30
4.3	Preparo da suspensão e microencapsulação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> empregando a técnica de <i>spray drying</i>	31
4.4	Enumeração do <i>L. acidophilus</i> e determinação da eficiência da encapsulação	32
4.5	Caracterização química e físico-química das microcápsulas	33
4.6	Caracterização morfológica das microcápsulas e distribuição do tamanho	34
4.7	Sobrevivência de <i>Lactobacillus acidophilus</i> livre e microencapsulado armazenados em temperatura de refrigeração e ambiente	34
4.8	Análise dos grupos funcionais da estrutura química e das interações químicas dos materiais encapsulantes e encapsulados por Espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)	35
4.9	Sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado nos fluidos gástrico e intestinal simulados	35
4.10	Análise estatística	36
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	37
5.1	Curva de Crescimento do <i>Lactobacillus acidophilus</i>	37

5.2	Eficiência de microencapsulação de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	38
5.3	Caracterização química e físico-química das microcápsulas de <i>L. acidophilus</i>... ..	40
5.4	Morfologia das microcápsulas de <i>Lactobacillus acidophilus</i>	44
5.5	Sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado nos fluidos gástrico e intestinal simulados	48
5.6	Sobrevivência de <i>L. acidophilus</i> livre e microencapsulado armazenados em temperatura de refrigeração e ambiente	52
5.7	Análise dos grupos funcionais da estrutura química e das interações químicas dos materiais encapsulantes e encapsulados por Espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR).....	57
5.8	Síntese dos resultados obtidos	59
6	CONCLUSÃO	61
	REFERÊNCIAS.....	62

1 INTRODUÇÃO

A crescente prevalência de doenças relacionadas a hábitos de vida não saudáveis na sociedade atual promoveu o desenvolvimento da ciência alimentar e da nutrição, uma vez que o aumento da consciência nutricional entre os consumidores levou a uma tendência atual para uma alimentação saudável e racional influenciando, ao mesmo tempo, o setor de alimentos funcionais (SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Alimentos funcionais são alimentos processados industrialmente ou naturais que apresentam em sua composição moléculas biologicamente ativas desejáveis que, quando consumidos regularmente dentro de uma dieta diversificada em níveis eficazes, têm efeitos potencialmente positivos na saúde, podendo reduzir os riscos de uma ou mais doenças, indo além da nutrição básica. Os principais critérios de inclusão de uma determinada alegação funcional de um ingrediente ou alimento em um rótulo alimentar são a segurança alimentar, o livre acesso sem necessidade de prescrição médica (ou aconselhamento médico) e a comprovação de benefícios à saúde quando regularmente consumidos em uma dieta balanceada (GRANATO *et al.*, 2020; SHARIFI-RAD *et al.*, 2020).

Dentre os compostos com propriedades funcionais destacam-se os probióticos, que podem ser definidos como microrganismos vivos que podem fornecer benefícios à saúde ao melhorar o equilíbrio microbiano intestinal do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas. Esses benefícios para a saúde incluem minimizar os sintomas relacionados a intolerância à lactose, imunomodulação, efeito de redução do colesterol, redução de distúrbios gastrointestinais, incluindo diarreia associada a antibióticos, modulação da microbiota e atividade metabólica no intestino (motilidade e absorção), impacto na inflamação intestinal, aumento da taxa de erradicação do patógeno gástrico *Helicobacter pylori*, modulação da função cerebral, modulação potencial dos fatores de risco para o desenvolvimento de câncer, promoção da homeostase metabólica por meio de seus mecanismos biológicos no corpo, produção de ácidos graxos de cadeia curta, vitaminas, enzimas, ácidos orgânicos e peptídeos antimicrobianos (PLAZA-DIAS *et al.*, 2019; MAHMOUD *et al.*, 2020; YU *et al.*, 2020; YOHA *et al.*, 2022).

Os benefícios dos probióticos para a saúde incentivam seu amplo uso em setores como a indústria alimentícia, farmacêutica e cosmética. Para exercer esses benefícios à saúde, a cultura probiótica precisa chegar metabolicamente viável ao

intestino. Entretanto, os probióticos sofrem inevitavelmente estresses severos durante o processamento, armazenamento e passagem de alimentos pelo trato gastrointestinal superior (ŠIPAILIENĖ; PETRAITYTĖ, 2018; LOPES *et al.*, 2020; MA *et al.*, 2021).

Desta forma, existe a preocupação de que muitos produtos probióticos comerciais não exerçam adequadamente seus efeitos, além do que mesmo que atinjam o cólon podem não serem capazes de se estabelecer como parte da microbiota intestinal (YAO *et al.*, 2020).

Sendo assim, a formulação de probióticos pode ser desafiadora, uma vez que a viabilidade do produto deve ser mantida durante o desenvolvimento bem como após o consumo. Por esse motivo, a elaboração de produtos probióticos mais resistentes está recebendo grande interesse nos últimos anos, assim como os processos de formulação que não são prejudiciais ao organismo (DODOO *et al.*, 2017; YOHA *et al.*, 2022).

Dentre os métodos existentes que visam à maior resistência destes produtos, a microencapsulação foi proposta como um meio eficaz de proteger os probióticos da degradação. Um sistema de microencapsulação eficaz deve manter a estabilidade dos probióticos durante o armazenamento, protegê-los das condições adversas no trato gastrointestinal superior, liberá-los no cólon e, posteriormente, promover sua capacidade de desenvolvimento nas superfícies da mucosa (YAO *et al.*, 2020; SHORI, 2017).

Existem diversos métodos para a microencapsulação de probióticos, como emulsificação, separação de fases, liofilização, extrusão e atomização entre outros. A atomização, secagem por pulverização ou *spray drying*, se destaca por apresentar baixo custo operacional, alto rendimento no processo e industrialmente é o de maior aplicabilidade (NUNES *et al.*, 2018).

Além disso, a escolha do agente encapsulante é uma etapa importante para a microencapsulação, pois o material utilizado tem impacto direto na eficiência da microencapsulação, na estabilidade e na adequação da microcápsula. Considerando o fato de que as características físico-químicas dos agentes encapsulantes se diferenciam, opta-se, na maioria das vezes, pela utilização de uma combinação de materiais, a fim de se obter melhores resultados de eficiência e rendimento na microencapsulação. Nesse aspecto, os agentes encapsulantes mais relevantes são materiais como polissacarídeos e proteínas (PEREIRA *et al.*, 2018; AKBARBAGLU *et al.*, 2021).

Dentre os polissacarídeos e proteínas utilizados na encapsulação por *spray drying*, destacam-se a pectina e o concentrado proteico de soro de leite. A pectina tem sido cada vez mais utilizada como substituta de biomateriais caros para a encapsulação de probióticos devido à sua abundância, preço acessível, caráter aniônico e não tóxico, biocompatibilidade, biodegradabilidade e propriedades bioadesivas, antimicrobianas e antivirais. Ademais, a pectina possui propriedades de gelificação, espessamento e retenção de água, além de poder formar emulsões em baixas concentrações, favorecendo a sua utilização em técnicas de *spray drying* (KOH *et al.*, 2022).

De modo semelhante, as proteínas do soro de leite possuem vantagens funcionais e tecnológicas que as tornam bons agentes encapsulantes, como a habilidade de formar géis, além de estabilidade térmica, propriedades de hidratação e de emulsificação. Ainda, a β -lactoglobulina, a principal proteína do soro de leite, é rica em estrutura rígida de β folha e duas pontes dissulfeto, que conferem ao soro resistência e estabilidade contra a digestão da pepsina, favorecendo a utilização da proteína do soro de leite como agente encapsulante para a liberação controlada de probióticos (MENEZES *et al.*, 2019; KOH *et al.*, 2022).

Ambos os materiais, além das propriedades como agentes encapsulantes, também agregam valor nutricional ao produto, oferecendo diversos benefícios a saúde (MORALES-MEDINA *et al.*, 2022; HENRIQUES *et al.*, 2020). Ademais, as proteínas do soro de leite são um subproduto da indústria de queijos que podem ser responsáveis pela contaminação do ambiente (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Dessa forma, existem diversas vantagens da utilização desse materiais na indústria de alimentos e de produtos lácteos.

Diante do exposto, o objetivo dessa pesquisa foi verificar se através da microencapsulação de *L. acidophilus* com pectina de alto teor de metoxilação e pectina de baixo teor de metoxilação e concentrado proteico de soro de leite por meio da técnica de *spray drying*, seria possível manter a viabilidade deste probiótico e determinar, dentre as concentrações dos agentes encapsulantes analisadas, qual contribuiria para obter os melhores resultados quanto a eficiência de encapsulação e a viabilidade durante o armazenamento e simulação do trato digestório. Justifica-se a importância e o interesse na realização desse estudo diante da fragilidade dos microrganismos probióticos em face a diferentes fatores ambientais externos, bem como a fatores intrínsecos ao organismo humano. Portanto, há necessidade de

garantir sua sobrevivência e de preservar sua capacidade funcional, de modo que a sua administração possa surtir efeitos benéficos à saúde humana.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar o impacto da metodologia de microencapsulação por *spray drying* sobre a viabilidade de *L. acidophilus*, utilizando concentrado proteico de soro de leite e pectina (de alto teor de metoxilação – ATM e baixo teor de metoxilação – BTM) como agentes encapsulantes.

2.2 Objetivos específicos

- Microencapsular *L. acidophilus* através de *spray drying*, empregando pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede, usando parâmetros definidos pela literatura: temperatura 110 °C, vazão 0,40 L/min, fluxo alimentação 0,45 L/min, diâmetro de saída de ar no sistema (1mm).
- Determinar a eficiência da encapsulação;
- Caracterizar as microcápsulas sob o ponto de vista químico e físico-químico quanto a umidade, atividade de água, higroscopicidade, solubilidade, morfologia e tamanho;
- Avaliar a vida útil do microrganismo *L. acidophilus* microencapsulado em temperaturas ambiente (25 °C) e de refrigeração (4 °C) imediatamente após a obtenção deste (0 dia) e após 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento;
- Analisar os grupos funcionais presentes na estrutura química dos agentes encapsulantes das microcápsulas e a interação entre estes por Espectroscopia na Região do Infravermelho por Transformada de Fourier (FTIR);
- Avaliar a digestibilidade *in vitro* do *L. acidophilus* livre e microencapsulado.

3 REVISÃO DA LITERATURA

3.1 Probióticos

Estima-se que, pelo menos, 500 espécies microbianas diferentes, variando de 10^{10} a 10^{11} UFC g^{-1} , estejam distribuídas no cólon humano, embora em uma base quantitativa apenas 10 a 20 gêneros provavelmente predominem. Todos esses microrganismos são aeróbios ou anaeróbios facultativos, como *Bacteroides*, *Eubacterium*, *Bifidobacterium*, *Peptostreptococcus*, *Enterobacteriaceae*, estreptococos, clostrídios, coliformes e lactobacilos (CHAIKHAM *et al.*, 2012). Dentre estes, destacam-se *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Enterococcus*, *Saccharomyces boulardii* e *Escherichia coli* (YU *et al.*, 2020; PLAZA-DIAS *et al.*, 2019).

Dentre os microrganismos benéficos presentes na microbiota, destacam-se os probióticos. Este termo, que significa “para a vida”, foi mencionado pela primeira vez no início dos anos 1950 pelo cientista alemão Werner Kollath para definir a importância das substâncias ativas que eram essenciais para o desenvolvimento de uma vida saudável (SANTACROCE; CHARITOS; BOTTALICO, 2019).

A definição proposta pela *Food and Agriculture Organization* (FAO) e pela *World Health Organization* (WHO) descreve probióticos como grupo de microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (HILL *et al.*, 2014). Ademais, a manutenção da frequência de consumo dos probióticos também é um fator importante para a obtenção dos efeitos desejados, uma vez que a administração oral de 10^6 a 10^7 unidades formadoras de colônias (UFC) de bactérias probióticas por grama (g) é necessária para resultar nos efeitos benéficos à saúde (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013; ATRAKI; AZIZKHAN, 2021).

Os probióticos são tipicamente espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, que geralmente são fornecidos como culturas liofilizadas ou são atomizados e adicionados diretamente aos alimentos (AGUDELO-CHAPARRO *et al.*, 2021; BARRO *et al.*, 2021; FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Os probióticos são importantes no contexto da alimentação funcional, pois a atividade metabólica da microbiota intestinal produz uma grande variedade de metabólitos essenciais, como vitaminas endógenas, ácidos graxos de cadeia curta e neurotransmissores, como serotonina e ácido gama-aminobutírico (GABA)

(HEMARAJATA; VERSALOVIC, 2013; GUIDA *et al.*, 2020). São essenciais na saúde do trato digestório, mantendo a microbiota intestinal normal. Produzem citocinas e quimiocinas, previnem a inflamação do intestino, fornecem proteção às células epiteliais e regulam os anticorpos, inibem a adesão de bactérias patogênicas à mucosa intestinal, aumentam a imunidade, modulando o sistema imunológico e modulam a função cerebral (MAHMOUD *et al.*, 2020; AGUDELO-CHAPARRO *et al.*, 2021; BARRO *et al.*, 2021).

Como consequência da ação dos probióticos, pode ocorrer redução da intolerância à lactose, redução do nível de colesterol plasmático e da pressão arterial, atividade anticarcinogênica e aumento do valor nutricional dos alimentos (CHAIKHAM *et al.*, 2012). São eficazes em aumentar a biodisponibilidade de zinco, cálcio, cobre, ferro, manganês, fósforo entre outros elementos (DAFE *et al.*, 2017). Também inibem a atividade do *Helicobacter pylori* e podem ser usados no tratamento de alergias alimentares e na prevenção de diarreia aguda (DAFE *et al.*, 2017; MAHMOUD *et al.*, 2020; AGUDELO-CHAPARRO *et al.*, 2021; FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Porém, sua viabilidade e sobrevivência dependem de fatores relacionados ao estresse ambiental, como temperatura, ambiente ácido do sistema digestivo e bile, aumento da concentração de certos íons ou depleção de nutrientes e oxigênio que, por sua vez, dependem de diversos outros fatores. Esses incluem a cepa utilizada, interação entre as espécies presentes e sensibilidade a metabólitos produzidos por outras bactérias concorrentes, condições de cultivo, produção de H₂O₂ devido ao metabolismo bacteriano, acidez final do produto, concentração de ácidos láctico e acético, disponibilidade de nutrientes, promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcar (efeito de pressão osmótica), oxigênio dissolvido e permeação de oxigênio através da embalagem, nível de inoculação, temperatura de incubação, tempo de fermentação e temperatura de armazenamento (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014; TERPOU *et al.*, 2019).

Como é sugerido que aproximadamente 10⁶ a 10⁷ UFC g⁻¹ por dia de probióticos devam ser consumidos, várias abordagens científicas são realizadas para melhorar e sustentar a viabilidade celular microbiana, como seleção de cepas, tecnologias de imobilização, desenvolvimento de simbióticos etc. Entre eles, a imobilização celular em vários carreadores, incluindo sistemas de matriz de carreadores compostos, recentemente atraiu interesse visando proteger os probióticos de diferentes tipos de reações (por exemplo, pH e tratamentos térmicos).

Da mesma forma, para entregar com sucesso os probióticos no intestino grosso, as células devem sobreviver ao processamento e armazenamento de alimentos e resistir às condições adversas encontradas no trato digestório superior. Assim, a seleção adequada de probióticos e sua entrega efetiva continua sendo um desafio tecnológico com foco especial em sustentar a viabilidade da cultura probiótica no produto formulado (TERPOU *et al.*, 2019).

É fato que alimentos funcionais probióticos estão com alta demanda no mercado. Em geral, iogurtes e produtos lácteos fermentados são utilizados como veículos para esse tipo de microrganismo bioativo. Contudo, tem havido um interesse crescente na incorporação de cepas probióticas em outros tipos de matrizes não lácteas, especialmente para consumidores que sofrem de intolerância à lactose, são alérgicos à caseína, consumidores veganos ou para aqueles cujos problemas estão associados a produtos lácteos. Diante disso, vários estudos recentes têm relatado a aplicação de probióticos microencapsulados para incorporação de cepas probióticas em queijos e em produtos não lácteos, como suco de frutas, maionese, manteiga, carne e produtos de panificação. Assim, a associação de probióticos em novas matrizes vem se tornando uma opção cada vez mais atrativa para a indústria alimentícia (AGUDELO-CHAPARRO *et al.*, 2021; ALBUQUERQUE *et al.*, 2021).

Outra forma de administração de probióticos é por meio de cápsulas, comprimidos ou como sachês em pó, disponíveis comercialmente em farmácias. Nesse formato, os probióticos também são bastante procurados em busca dos variados benefícios já citados (JÄGER *et al.*, 2019).

3.1.1 *Lactobacillus* sp.

Lactobacillus fazem parte do grupo das bactérias ácido-lácticas, que são geralmente descritas como microrganismos Gram-positivos, desprovidos de citocromos e preferindo condições anaeróbicas, apesar de serem aerotolerantes, exigentes, tolerantes a ácidos e estritamente fermentativos, produzindo ácido lático a partir do processo de fermentação da lactose como principal produto (FREIRE *et al.*, 2021).

Na indústria de alimentos, são capazes de fazer a conversão de carboidratos do meio fermentativo em ácido láctico, tendo como principal função nos alimentos a acidificação destes produtos até um pH próximo a 4,0, o que impede o

desenvolvimento de bactérias indesejáveis pela produção de ácidos orgânicos. Seu efeito antimicrobiano ajuda na manutenção da qualidade do produto processado, suprimindo o crescimento tanto de microrganismos deteriorantes, quanto de bactérias potencialmente patogênicas (FRAKOLAKI *et al.*, 2021; FREIRE *et al.*, 2021).

Algumas cepas de *Lactobacillus* são consideradas probióticas, dentre estas os *Lactobacillus acidophilus*, apresentam maior resistência ao baixo pH e melhor adaptabilidade ao leite e outros substratos alimentares. No entanto, suas propriedades e os benefícios obtidos não dependem apenas do gênero, mas também da cepa, pois cada cepa é única e, portanto, suas características devem ser conhecidas (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Lactobacillus acidophilus é uma das espécies microbianas probióticas mais significativas comercialmente, com várias cepas comumente usadas como culturas probióticas em todo o mundo nas indústrias de laticínios e suplementos alimentares, devido ao seu longo histórico de segurança e efeitos de promoção da saúde propostos, juntamente com sua capacidade de produção industrial. Sua sobrevivência no ambiente intestinal depende de seus mecanismos adaptativos a condições extremas, incluindo alteração de pH, presença de ácidos biliares, compostos antimicrobianos e enzimas hidrolíticas e sua capacidade de utilizar um amplo repertório de carboidratos e outras fontes de nutrientes no intestino (GOH; BARRANGOU; KLAENHAMMER, 2021).

Um dos potenciais modos de ação dos *Lactobacillus acidophilus* é alterar a composição bacteriana intestinal, aumentando o número de lactobacilos durante o consumo e diminuindo o número de microrganismos patogênicos. Mas, para funcionar adequadamente, essas bactérias devem ser capazes de suportar os ambientes adversos encontrados no estômago e no intestino delgado do hospedeiro para atingir o intestino grosso e exercer seus efeitos benéficos (CHAIKHAM *et al.*, 2012). Por isso, técnicas como microencapsulação e enriquecimento com substâncias prebióticas são propostas para sua proteção (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Afinal, estabelecer uma barreira física entre os probióticos e o ambiente externo, como no caso do encapsulamento, é uma abordagem eficaz para aumentar sua viabilidade durante o processamento, armazenamento e resistência dentro do alimento e do corpo. Nos últimos anos, o encapsulamento tem se tornado atrativo para a indústria de alimentos como uma ferramenta eficaz para a liberação controlada de substâncias encapsuladas, como os probióticos, para proteção contra os fatores

ambientais, limitando a reatividade com estimulantes químicos, físicos e mecânicos (LEYLAK *et al.*, 2021).

3.2 Microencapsulação

A microencapsulação é um método promissor para proteger as células probióticas contra as condições adversas que elas podem enfrentar (BARRO *et al.*, 2021). A técnica consiste em um processo no qual as células probióticas são incorporadas a uma matriz ou membrana encapsulante, que promove sua proteção contra a degradação por fatores ambientais (YAO *et al.*, 2020; SHORI, 2017). Pode ser definida como um processo físico, químico ou mecânico para aprisionar uma substância (agente ativo) em um material adequado (agente encapsulante) para produzir partículas com uma membrana semipermeável fina, mas forte, com diâmetros de alguns nanômetros a alguns milímetros (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

No processo de microencapsulação, pequenas partículas, ou seja, a substância encapsulada, recebem a denominação de núcleo ou princípio ativo, podendo estar na forma sólida ou líquida. Estas são rodeadas por um agente encapsulante (adequado para aplicações em alimentos) chamado de revestimento, membrana, invólucro, cápsula, material transportador, fase externa ou matriz. Formam, assim, pequenas cápsulas, cuja estrutura é relativamente simples, consistindo em uma pequena esfera com uma parede uniforme em torno dela. Visa aumentar a efetividade de muitos compostos, por promover uma barreira física entre o componente do núcleo e os outros componentes do produto, contendo danos ou perdas celulares e controlando sua liberação no intestino, ao mesmo tempo (PEREIRA *et al.*, 2018; FRAKOLAKI *et al.*, 2021), além de aumentar a estabilidade e viabilidade das células probióticas em diferentes condições de calor/umidade durante o processamento e tempo de armazenamento (DAFE *et al.*, 2017).

Observa-se que a tecnologia de encapsulamento de células probióticas atende a um requisito importante: elas devem permanecer viáveis, ativas e em número considerável. Diante disso, constata-se que a encapsulação de culturas probióticas traz muitos benefícios, tais como: os probióticos em carreadores são protegidos de fatores externos e têm maior capacidade de sobreviver ao tempo e condição de armazenamento e também a condições como pH baixo, presença de enzimas

digestivas e sais biliares no trato gastrointestinal humano (KRUNIĆ; OBRADOVIĆ; RAKIN, 2019).

A encapsulação dos probióticos deve ser realizada em condições amenas sob pH moderado e baixos níveis de oxigênio. A agitação deve ser controlada, enquanto o tamanho das partículas deve ser ajustado para proteger as bactérias e, simultaneamente, evitar efeitos negativos nas características sensoriais dos produtos (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Devido a isso, há alguns problemas a serem avaliados nesse processo. Durante a microencapsulação, um obstáculo principal é o diâmetro das células bacterianas (1 - 5 μm) ou as partículas de uma cultura liofilizada (mais de 100 μm), que pode inviabilizar a aplicação da microencapsulação e limitar o carregamento para pequenas partículas e, assim, a manutenção da viabilidade das células (FRAKOLAKI *et al.*, 2021). O tamanho da partícula é um fator importante, uma vez que grânulos grandes podem produzir textura arenosa no produto, enquanto partículas pequenas demais não oferecem proteção suficiente para as bactérias. Portanto, os probióticos devem ser aprisionados em uma faixa limitada de tamanhos de partículas para minimizar os problemas associados à sobrevivência celular e textura dos alimentos (MOGHANJOUGI *et al.*, 2021).

Outros parâmetros são as propriedades físico-químicas das células, as condições durante o processo de microencapsulação, o tamanho e a densidade de partículas necessários para incorporação adequada em alimentos e as condições de armazenamento dos encapsulados antes de sua inclusão na matriz alimentícia. Além disso, as condições durante o processamento dos alimentos e armazenamento dos produtos antes do consumo, o mecanismo de liberação e as limitações de custo também devem ser levados em consideração (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Além disso, os produtos encapsulados devem ser armazenados em temperaturas baixas (entre 4 °C e temperatura ambiente 25 °C) para garantir a sobrevivência das bactérias (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Entre suas vantagens estão: estabilizar o material encapsulado; controlar reações oxidativas; liberar o material ativo de forma controlada; mascarar sabores, cores ou odores indesejáveis; reduzir a toxicidade do material ativo; prolongar a vida útil; e proteger compostos de valor nutricional, como é o caso dos probióticos (PEREIRA *et al.*, 2018).

Portanto, a microencapsulação promove a liberação controlada e otimiza o fornecimento dos probióticos no local de ação, potenciando a eficácia da respectiva cepa probiótica. Esse processo também impede esses microrganismos de se multiplicarem nos alimentos, o que poderia alterar suas características sensoriais. Além disso, a matriz alimentar de encapsulação deve oferecer proteção durante seu processamento térmico, além de também atuar como protetora durante o armazenamento e no estômago, até que o probiótico seja entregue no trato gastrointestinal (SILVA *et al.*, 2015b).

Cabe ressaltar que o mecanismo de liberação dos probióticos no sistema intestinal irá depender da tecnologia e dos materiais de parede utilizados e de fatores como: alterações de pH, agentes quelantes, ação enzimática, tempo e força osmótica (GEBARA *et al.*, 2013; FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Existem diferentes métodos que podem ser utilizados para a produção de microcápsulas que, em geral, podem ser divididos em três grupos, segundo Vaniski, Corti e Drunkler (2017):

- 1) Físico-químicos: coacervação simples ou complexa (separação de fase aquosa), evaporação emulsão solvente (separação por fase orgânica), emulsão solidificação, envolvimento lipossômico;
- 2) Métodos físicos: *spray drying*, *spray coating*, *spray chilling*, gelificação iônica, leite fluidizado, extrusão, centrifugação com múltiplos orifícios, co-cristalização, liofilização;
- 3) Métodos químicos: polimerização interfacial, inclusão molecular.

A escolha do método irá depender do tamanho desejado da microcápsula e da aplicação que será dada à mesma, bem como do mecanismo de liberação e das propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

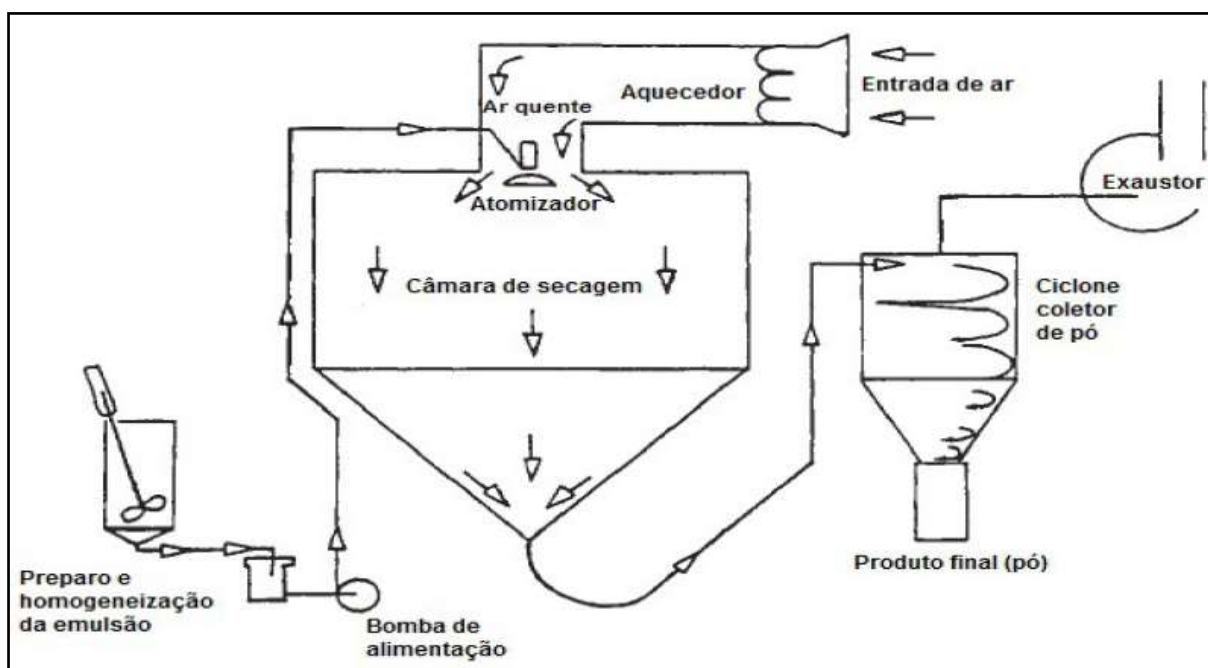
3.2.1 *Spray drying*

O *spray drying* é o método de microencapsulação com maior potencial, principalmente para modificar as condições durante a secagem por pulverização, para controlar o tamanho e a forma da partícula. Possui baixo custo, potencial de larga escala, alta estabilidade probiótica e baixa quantidade de degradação celular durante

a secagem, se o processo e os parâmetros de formulação forem otimizados corretamente (BARRO *et al.*, 2021).

A aplicação da técnica de *spray drying* para a microencapsulação possui quatro etapas (Figura 1): (1) preparo; (2) homogeneização da solução; (3) aspersão da solução; (4) desidratação da solução atomizada (secagem) (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

Figura 1 - Esquema do processo de secagem por *spray drying*



Fonte: Carmo; Fernandes; Borges (2015).

No preparo da suspensão é feita a seleção do agente encapsulante e, em seguida, o mesmo é hidratado em água. Na sequência, é adicionado o ingrediente a ser encapsulado (ou núcleo) ao agente encapsulante hidratado, o qual será bombeado para a câmara de secagem do *spray drying*, para passar pelo processo de atomização e secagem. A atomização de um líquido consiste na formação de inúmeras gotículas do mesmo, com o intuito de otimizar a transferência de calor e massa entre o líquido e o ar aquecido, através do aumento da superfície de contato entre os dois componentes. Para realização dessa etapa, pode-se utilizar pressão ou energia centrífuga, através de atomizadores de pressão, bico duplo fluido, sônico, pneumático ou de disco giratório, sendo os dois últimos os mais comumente aplicados (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

É o processo pelo qual o produto é transformado do estado fluido para o estado sólido (em forma de pó), dentro de uma câmara, onde é feita a dispersão de gotículas do material que, por sua vez, entram em contato com um gás aquecido, geralmente o ar, que as desidrata (CARMO; FERNANDES; BORGES, 2015).

Trata-se de uma boa alternativa para produção em larga escala de culturas microbianas em pó com baixo teor de umidade, fornece maior estabilidade de armazenamento que culturas congeladas ou frescas, boa viabilidade e funcionalidade quando submetidas a testes simulados em condições gastrointestinais e a possibilidade de armazenamento à temperatura ambiente (MACIEL *et al.*, 2014).

Durante o processo de *spray drying*, as células probióticas são submetidas ao calor e desidratação, o que pode danificar a membrana celular ou, em casos extremos, inativar completamente a cultura do probiótico. Por sua vez, esse risco pode ser controlado ajustando-se os parâmetros do processo de secagem, como temperatura de saída, taxa de alimentação, temperatura de entrada, tempo de secagem e meio de secagem (BARRO *et al.*, 2021).

Como os probióticos são sensíveis ao calor, o processo de *spray drying* (a secagem por pulverização) é otimizado para ser suave o suficiente para evitar danificá-los, ao mesmo tempo que é suficientemente eficiente para produzir um pó com teor de umidade abaixo de 4% e atividade de água inferior a 0,3, o que é necessário para a estabilidade de armazenamento (VESTERLUND; SALMINEN; SALMINEN, 2012).

Mas, ainda que haja ampla demanda por probióticos de baixo custo, o uso da técnica de *spray drying* como produção padrão é desafiador, devido ao risco de impacto negativo na integridade celular dos probióticos durante a secagem (se não for otimizado corretamente) e a redução resultante na estabilidade das bactérias encapsuladas durante o envelhecimento do produto. O dano celular que pode ser induzido pelo calor está principalmente associado a mudanças no estado físico das membranas como, por exemplo: transição de fase cristalina para gel, modificação da fluidez do citoplasma, peroxidação da bicamada da membrana lipídica, modificação estrutural de construções macromoleculares (desdobramento de proteínas ou ácidos nucleicos) e alteração de outros processos biológicos nas células (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013).

Diante disso, é de fundamental importância a escolha adequada do material de parede do transportador (agente encapsulante), para a sobrevivência do probiótico

através da técnica de *spray drying*. Afinal, a concentração de sólidos totais da alíquota do transportador, bem como a presença de ingredientes que podem induzir uma diminuição significativa da temperatura de fusão das micropartículas, afetam criticamente a integridade estrutural das membranas citoplasmáticas e controlam a pressão osmótica que leva à ruptura das membranas. Por essa razão, materiais que garantem boa capacidade de encapsulamento e conferem características funcionais de pó aceitáveis (como porosidade, capacidade de fluxo livre, antiaglomerante e boas propriedades de umectação e dispersão) são frequentemente escolhidos como agente encapsulante de suporte, além de outros ingredientes que exibem propriedades térmicas com características protetoras, como dissacarídeos (lactose, sacarose ou trealose), dextrose ou poliois (manitol, sorbitol), ou agem como estimulantes de crescimento probióticos (fruto e galacto-oligossacarídeos) (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013).

3.3 Agentes encapsulantes

Conseguir fornecer e manter a quantidade mínima necessária de células probióticas viáveis para conferir quaisquer efeitos positivos à saúde é um grande desafio, considerando sua sensibilidade ao processamento, armazenamento e envio (BARRO *et al.*, 2021). Isso porque, para apresentar a funcionalidade probiótica ideal, essas bactérias devem sobreviver através do trato gastrointestinal em altas populações, atingindo 10^6 a 10^7 UFC g^{-1} no ponto de entrega, até o final da vida útil do produto (FRAKOLAKI *et al.*, 2021).

Não bastasse isso, a incorporação de microrganismos probióticos vivos em produtos alimentícios também apresenta dificuldades, principalmente devido à suscetibilidade do probiótico a vários fatores, como temperatura, oxigênio, atividade de água e pressão osmótica, valor de pH, etc. (BARRO *et al.*, 2021). Se as condições de armazenamento não forem ideais, podem ocorrer mudanças de estado físico, desencadeando reações bioquímicas e enzimáticas que afetam negativamente a sobrevivência bacteriana (BEHBOUDI-JOBBEHDAR *et al.*, 2013).

Para mitigar esses problemas, técnicas e materiais de parede para encapsulamento têm sido amplamente aplicados para aumentar a viabilidade de bactérias probióticas em produtos alimentícios e sua sobrevivência no trato digestório durante a ingestão (CHAIKHAM *et al.*, 2012).

O material usado para a microencapsulação de probióticos deve ser biocompatível, permeável a nutrientes e metabólitos, para fornecer condições ideais para a funcionalidade das células aprisionadas, e biodegradável para garantir a liberação das células aprisionadas no cólon hospedeiro. Vários agentes encapsulantes têm sido investigados para o processo de microencapsulação de probióticos, incluindo polissacarídeos originados de algas marinhas (K-carragena, alginato), de plantas (pectina, amido e seus derivados, goma arábica), de bactérias (gelana, xantana) e de proteínas animais (concentrado proteico de soro de leite, gelatina) (MAHMOUD *et al.*, 2020).

3.3.1 Pectina ATM e BTM

Polímeros de carboidratos, incluindo quitosana, alginato, k-carragena, amido, gelatina e pectina, têm sido vastamente utilizados como matrizes de encapsulamento promissoras para formulações probióticas. Dentre estes, a pectina é um importante heteropolissacarídeo encontrado nas paredes celulares primárias de plantas terrestres. É resistente as enzimas gástricas ou intestinais, como protease e amilase, que são ativas no trato gastrointestinal superior (DAFE *et al.*, 2017).

A pectina é um polissacarídeo aniônico constituído, predominantemente, de polímeros lineares de ácido α -(1-4)-D-galacturônico com açúcares neutros como L-raminose inseridos ou anexados às cadeias principais (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Os principais componentes polissacarídeos da pectina são homogalacturonanA (HG), ramnogalacturonanA (RG-I) e ramnogalacturonanA II (RG-II), sendo o HG o polissacarídeo mais abundante na pectina (representando ~ 65%) e contém cerca de 100 resíduos de ácido galacturônico que é metilado na parte carboxila. Os monossacarídeos nas cadeias laterais também podem ser parcialmente metilados. Possui uma ampla gama de fontes, como cítricos, maçã, beterraba, abóbora e maracujá (DU *et al.*, 2022).

É importante explicar que HG e RG-II contribuem para o grau de esterificação metílica (DM) da pectina, que depende da fonte de pectina e das condições de extração. De acordo com o DM, a pectina é dividida em baixa metoxilação ($DM < 50\%$ - ou baixo teor de metoxilas - BTM) e alta metoxilação ($DM \geq 50\%$ - ou alto teor de metoxilas - ATM). Assim, pectinas de diferentes fontes ou com diferentes DM podem ter propriedades funcionais diversas. Por exemplo, as propriedades de gelificação da

pectina são refletidas pela reticulação das cadeias de polissacarídeos de ácido galacturônico em uma rede. A pectina ATM estabiliza a área de conexão através da interação hidrofóbica do grupo éster metílico e da ligação de hidrogênio entre o grupo carboxila e o grupo hidroxila, enquanto a gelificação da BTM é geralmente formada pela conexão de grupos carboxila ionizados com cátions bivalentes (DU *et al.*, 2022).

Devido às características eletrostáticas e de formação de géis, a pectina se apresenta como um bom agente encapsulante (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Pode ser utilizada na microencapsulação de compostos bioativos ou como auxiliar de secagem, em conjunto com outras substâncias carreadoras, para secagem de produtos (AKBARBAGLU *et al.*, 2021).

Além disso, a pectina pode ser facilmente digerida por pectinases geradas pela microbiota colônica. Esta vantagem significativa a torna um veículo promissor para fins de entrega de probióticos. Além de ser um ingrediente funcional de alto valor em alimentos, a pectina tem ganhado atenção fundamental para encapsulamento de probióticos em produtos alimentícios por possuir características como baixo custo, não toxicidade e biocompatibilidade (DAFE *et al.*, 2017).

Estudos têm demonstrado que a pectina e o concentrado proteico de soro de leite formam complexos com estruturas e funções específicas por meio de interações não covalentes e covalentes, e esses complexos também mostraram potencial de aplicação no campo da alimentação, medicina e biologia. Enquanto, por um lado, o concentrado proteico é rico nutricionalmente e possui excelentes funções nesse sentido, por outro é sensível às mudanças nas condições ambientais. Já a pectina é um polissacarídeo aniônico com uma ampla gama de fontes, com uma estrutura relativamente estável. O complexo formado por ambos apresenta propriedades funcionais ricas, como propriedades emulsificantes, gelificantes, estabilidade ao calor, solubilidade e atividade biológica, o que melhora seu potencial e eficácia sendo utilizado como materiais de parede na aplicação em microencapsulação (DU *et al.*, 2022).

Do mesmo modo, a combinação entre pectina e concentrado proteico de soro de leite também tem se mostrado eficiente para a utilização como materiais de parede, conforme observado no estudo de Yasmin *et al.* (2019), no qual a encapsulação de probióticos com pectina e CPS por gelificação iônica propiciou maior resistência dos microrganismos aos fluidos gástrico e intestinal *in vitro* bem como maior preservação dos probióticos durante estocagem refrigerada em comparação às células livres.

3.3.2 Concentrado Proteico de Soro de Leite

As proteínas lácteas oferecem propriedades funcionais adequadas para serem utilizadas como agentes encapsulantes na microencapsulação. Entre essas propriedades estão: sabor suave, alta solubilidade, baixa viscosidade em solução e boa emulsificação e propriedades de formação de película (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017). Possuem atividade anfílica, biológica e emulsificante, formabilidade de filme e alta cobertura. São amplamente utilizadas no encapsulamento de vários compostos bioativos, como os probióticos (AKBARBAGLU *et al.*, 2021). Por suas boas características, apresentam excelentes propriedades de encapsulação e podem ser aplicadas para materiais encapsulados voláteis e não-voláteis (VANISKI; CORTI; DRUNKLER, 2017).

O uso de proteínas do soro do leite como agentes protetores de probióticos tem ganhado cada vez mais interesse, pois essas proteínas são veículos naturais que melhoram a viabilidade dos probióticos e podem ser utilizadas para promover proteção para microrganismos probióticos durante o trânsito gastrointestinal e como sistemas de liberação no trato intestinal, devido às suas características estruturais e físico-químicas (GEBARA *et al.*, 2013; AGUDELO-CHAPARRO *et al.*, 2021).

O concentrado proteico de soro de leite é uma mistura de proteínas globulares isoladas do soro de leite como subproduto na produção de queijo (KRUNIĆ; OBRADOVIĆ; RAKIN, 2019). Suas principais proteínas são a β -lactoglobulina (β -LG) e a α -lactalbumina (α -LA).

A proteína de soro de leite tem sítios de ligação que podem se ligar ao íon cálcio. A capacidade das proteínas do soro de formar géis e microcápsulas sem o uso de tratamento térmico severo e quaisquer produtos químicos as torna um material atraente para aplicações de entrega controlada na indústria de alimentos, bem como um transportador eficaz para a proteção de organismos probióticos usados em alimentos funcionais (KRUNIĆ; OBRADOVIĆ; RAKIN, 2019). No entanto, a associação (adição) com polissacarídeos (através de interação não covalente/covalente) é um meio eficaz de melhorar suas propriedades hidrofílicas na temperatura de desnaturação (DU *et al.*, 2022).

Estudos, como o de Krunić, Obradović e Rakin (2019) e de Xie *et al.* (2022), já comprovaram a eficácia do concentrado proteico de soro de leite como agente

encapsulante para probióticos, sendo útil como transportador e fornecendo proteção satisfatória, com bons resultados de taxa de sobrevivência e viabilidade celular.

4 MATERIAL E MÉTODOS

A cultura probiótica *L. acidophilus* LA3 foi obtida de empresa especializada no ramo. O concentrado proteico de soro de leite com 80% de proteínas (*Whey Protein Concentred* – WPC 80%) foi cedido gentilmente pela empresa Sooro Renner Nutrição S.A.; a pectina com baixo teor de metoxilação - BTM e a pectina de alto teor de metoxilação - ATM foram cedidas pela empresa Cp Kelco (Brasil S.A.). O extrato de bile suíno, a pepsina da mucosa estomacal de suínos (≥ 400 U/mg proteína), e a pancreatina de pâncreas de suínos, foram adquiridos da Sigma-Aldrich Brasil Ltda.

Os reagentes empregados foram de qualidade analítica e os meios de cultura foram de padrão microbiológico aceitável.

4.1 Curva de Crescimento do *Lactobacillus acidophilus*

Com o objetivo de identificar a fase logarítmica do *Lactobacillus acidophilus* foi feita uma curva de crescimento, de acordo com Menezes (2015). A cultura em proporção de 1% m.v⁻¹ foi ativada em caldo-MRS antes de iniciar a determinação da densidade óptica (DO). Uma alíquota foi retirada após a inoculação, considerada como tempo zero do ensaio, e determinou-se a absorbância a 600nm em espectrofotômetro UV-vis (PerkinElmer, Lambda XLS, Beaconsfield, Reino Unido). O cultivo foi mantido em estufa a 37 °C e o crescimento celular monitorado periodicamente em intervalos de 2 horas fazendo-se a leitura da absorbância até 16 horas. Os dados obtidos foram aplicados na obtenção da curva de crescimento com a finalidade de estipular o tempo necessário para que a cultura atingisse a fase estacionária (09 horas).

4.2 Ativação do *Lactobacillus acidophilus*

A cultura do *L. acidophilus*, na proporção de 1% (m.v⁻¹), foi adicionada em caldo MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha) e foram incubados em estufa incubadora B.O.D (403-3D, Nova Ética, Brasil) a 37 °C \pm 1 °C por 9 horas. Após atingir a fase exponencial, o *Lactobacillus acidophilus* foi centrifugado a 3000 rpm por 10 min a 4 °C e o sobrenadante foi, então, descartado e lavado por duas vezes com solução de água peptonada 0,1%.

4.3 Preparo da suspensão e microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* empregando a técnica de *spray drying*

Para a definição das concentrações de CPS e pectina a serem utilizadas foi realizado um levantamento bibliográfico de estudos que utilizaram os mesmos agentes encapsulantes ou materiais semelhantes para a encapsulação de probióticos ou de outras substâncias por *spray drying*, considerando-se aspectos metodológicos como concentração dos agentes encapsulantes, agente encapsulado, temperatura de entrada, fluxo de alimentação e vazão de ar (SLAVUTSKY *et al.*, 2016; ECKERT *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2018; BORDINI *et al.*, 2019; MOGHBELI *et al.*, 2019; CANCINO-CASTILHO *et al.*, 2020).

Com base nesses estudos foram realizados testes preliminares com diferentes concentrações de CPS e pectina, utilizando proporções de pectina ATM ou BTM e CPS de 1:7, 2:8, 3:9, sob temperatura de entrada de 110 °C. Entretanto, as maiores concentrações inicialmente propostas resultaram em soluções de alta viscosidade, impossibilitando a passagem pelo atomizador. Ademais, fatores inerentes às condições do local de realização do estudo, como as mudanças de clima e de temperatura ambiente, podem ter influenciado os resultados preliminares obtidos, por impactarem no processo de *spray drying*, uma vez que fatores como alterações na umidade relativa do ambiente provocadas pelo clima, levava a aglomeração das partículas secas afetando negativamente a formação das microcápsulas.

Diante disso, foram feitos testes e adaptações até a obtenção das concentrações finais utilizadas no presente estudo.

O microrganismo foi suspenso nas soluções de pectina (ATM ou BTM) e concentrado proteico de soro de leite, preparados conforme metodologia proposta por Cancino-Castillo *et al.* (2020), com modificações (Tabela 1), onde os diferentes tipos de pectina (ATM e BTM) e o concentrado proteico de soro foram dissolvidos em água destilada esterilizada, seguida de agitação magnética à 37 °C ± 1 °C (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil) por 30 minutos, até completa dissolução e hidratação.

Tabela 1 – Concentrações das substâncias componentes das microcápsulas de *L. acidophilus*

Tratamentos	Descrição
T1	<i>Lactobacillus acidophilus</i> revestido com Pectina ATM 1% m/m + concentrado proteico do soro de leite (CPS) 7% m/m
T2	<i>Lactobacillus acidophilus</i> revestido com Pectina ATM 0,5% m/m + concentrado proteico do soro de leite (CPS) 7,5% m/m
T3	<i>Lactobacillus acidophilus</i> revestido com Pectina BTM 1% m/m + concentrado proteico do soro de leite (CPS) 7% m/m
T4	<i>Lactobacillus acidophilus</i> revestido com Pectina BTM 0,5% m/m + concentrado proteico do soro de leite (CPS) 7,5% m/m

Fonte: Autoria própria (2023).

O processo de microencapsulação foi realizado conforme Nunes *et al.* (2018), com modificações, utilizando-se o equipamento *spray drying*, de escala laboratorial (SDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, SP, Brasil), onde as suspensões acrescidas do probiótico (Tabela 1) foram mantidas sob agitação constante à temperatura ambiente 25 °C e alimentadas para a câmara de secagem por meio de bomba peristáltica, sob condições constantes de pressão do compressor 2-4 kgf cm⁻², temperatura do ar de entrada 110 °C; vazão: 0,40 L/min; fluxo de alimentação: 0,45 L/h e diâmetro de saída do ar no sistema (1 mm) com bico duplo fluído. As micropartículas foram coletadas na base do ciclone e armazenadas sob refrigeração (4 °C ± 1 °C) e temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C).

4.4 Enumeração do *L. acidophilus* e determinação da eficiência da encapsulação

A enumeração do *L. acidophilus* livre e microencapsulado, e a eficiência de encapsulação - EE (Equação 1 – Eq. 1), seguiram as metodologias propostas por Corti, Bittencourt e Drunkler (2017), com adaptações.

Para a enumeração do probiótico na suspensão, foi realizada diluição seriada em água peptonada a 0,1%. Enquanto para as microcápsulas, 0,1 g (pó) foram adicionadas em 9,9 mL água peptonada a 0,1% e agitados em vórtex (LSM 56/4, Logen, Brasil) até total rompimento das microcápsulas (5 min) e, a seguir, realizada as diluições seriadas. Em ambos os casos, o plaqueamento foi em profundidade utilizando ágar MRS (De Man Rogosa and Sharpe, Merck, Darmstadt, Alemanha). As placas foram incubadas invertidas em jarras de anaerobiose em estufa incubadora

B.O.D (403-3D, Nova Ética, Brasil), a 37 ± 1 °C por 72 horas. O resultado foi expresso em log UFC.g⁻¹.

$$\% EE = (N / N_0) \times 100 \quad (\text{Equação 1}).$$

Onde: N é o número de células viáveis (log UFC. g⁻¹) liberadas pelas microcápsulas e N₀ é o número de células viáveis (log UFC. g⁻¹) livres na solução de alimentação antes do processo.

4.5 Caracterização química e físico-química das microcápsulas

A umidade foi determinada por gravimetria à 105 °C até peso constante (AOAC, 2007).

A atividade de água (aw) foi determinada de acordo com Arslan *et al.* (2015), em equipamento determinador de atividade de água (Aqualab® 4TE, Decagon, São Paulo, Brasil).

A higroscopicidade dos pós foi realizada de acordo com o método proposto por Pinto (2016). As microcápsulas (cerca de 1 g) foram colocadas num dessecador com solução saturada de cloreto de sódio (75,3% RH) a 25 °C. Após uma semana (7 dias) as amostras foram pesadas e a sua higroscopicidade foi expressa como g de água absorvida por 100 g de sólidos secos (g/100 g⁻¹). A higroscopicidade foi calculada gravimetricamente através da Equação 2.

$$\text{Higroscopicidade (g água/ 100 g de 100 e produto)} = 100 \times \frac{M_f - M_i}{M_i} \quad (\text{Equação 2}).$$

Onde: *M_i* e *M_f* correspondem a massa da amostra (g) antes e após o acondicionamento em umidade relativa de 75%.

A solubilidade das microcápsulas em água foi determinada de acordo com o procedimento estabelecido por Nascimento (2018). Dissolveu-se 0,100 g de microcápsulas produzidas em 10 mL de água destilada e agitou-se a solução com agitador magnético (752A, Fisatom, São Paulo, Brasil à temperatura ambiente (25 °C ± 1 °C) por 10 min. A solução foi centrifugada a 3500 rpm, durante 10 minutos, a 4 °C.

Retirou-se uma alíquota do sobrenadante (aproximadamente 2 mL) e colocou-se em placa de Petri previamente seca em estufa, resfriada em dessecador e pesada. A placa foi levada para a estufa a 105 ± 3 °C por 5 horas. Após esse tempo, a placa de Petri foi retirada da estufa, deixada resfriar em dessecador e pesada novamente. A Solubilidade (%) foi calculada como sendo a percentagem de sobrenadante seco em relação à quantidade de pó inicialmente adicionado.

$$\text{Solubilidade \%} = \frac{P_f}{P_i} \cdot 100 \quad (\text{Equação 3}).$$

Onde: P_i e P_f correspondem o peso inicial, e peso final.

4.6 Caracterização morfológica das microcápsulas e distribuição do tamanho

A caracterização morfológica das microcápsulas foi realizada empregando Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (SILVA, 2021). As amostras foram colocadas em uma fita adesiva dupla face de carbono fixada em um suporte (*stub*) e metalizada com ouro-paládio por 1min30s até chegar numa espessura de 6-9 nm, aproximadamente, utilizando-se o *sputter SC7620 Quorum Mini Sputter Coater/Glow Discharge System*. O microscópio eletrônico de varredura utilizado foi o Zeiss EVO-MA10, operando em voltagem de 10 kV.

O diâmetro médio das microcápsulas foi determinado por espalhamento de luz dinâmico utilizando equipamento *Litersizer 500*, com ângulo em *backscatter*, usando água como solvente, 25 °C e célula de quartzo. Os valores calculados sob a distribuição de tamanhos em intensidade e o diâmetro médio foi determinado com base na intensidade da luz dispersa do material (MALVERN, 2011).

4.7 Sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado armazenados em temperatura de refrigeração e ambiente

A avaliação da sobrevivência do probiótico microencapsulado e livre foi realizada logo após a obtenção (0 dia) e após 15, 30, 45, 60 e 90 dias de armazenamento em incubadora BOD com controle de temperatura a 4 °C e a 25 °C, em frasco âmbar fechado, na presença de oxigênio e ausência da luz, por contagem

de células viáveis (ALBADRAN *et al.*, 2015), e a redução da viabilidade de *L. acidophilus* expressa ciclos Log (AVILA-REYES *et al.*, 2014).

$$\text{VR \%} = \text{Log } N_0 - N \quad (\text{Equação 4}).$$

Onde: VR = Redução de viabilidade; N é o número de células viáveis (log UFC. g⁻¹) durante os tempos especificados de armazenamento e N₀ é o número de células viáveis (log UFC. g⁻¹) no tempo 0.

4.8 Análise dos grupos funcionais da estrutura química e das interações químicas dos materiais encapsulantes e encapsulados por Espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) foi realizada com as microcápsulas, os materiais de parede e o microrganismo livre para verificar a ocorrência de interações químicas (eletroestática, hidrofóbica) entre os materiais encapsulantes e encapsulados, seguindo a metodologia descrita por Araújo *et al.* (2020), utilizando acessório de Refletância Total Atenuada (ATR) (Spectrum 100s Perkin Elmer), no intervalo de número de onda de 4000-600 cm⁻¹, com resolução de 4 pontos por cm⁻¹.

4.9 Sobrevivência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado nos fluidos gástrico e intestinal simulados

A resistência do *L. acidophilus* nas formas livre (grânulos secos) e microencapsulados, em sistemas do fluido gástrico e intestinal simulado (FGIS), foi avaliada de acordo com a metodologia proposta por Bora *et al.* (2021), com adaptações. As microcápsulas e as células livres foram submetidas aos fluidos digestivos, que foram preparados utilizando soluções estoque de KCl, KH₂PO₄, KH₂PO₄₃, NaHCO₃, NaCl, MgCl₂ (H₂O₆), (NH₄)₂CO₃, HCl, H₂O, previamente determinados na literatura (MINEKUS *et al.*, 2014; BORA *et al.*, 2021) (Tabela 2).

Tabela 2 - Composição das soluções de estoque utilizadas no preparo dos fluidos digestivos

Tabela 2 Componentes	Concentração de estoque (M)	SSF (pH 7,0) Concentração (mM)	SGF (pH 3,0) Concentração (mM)	SIF (pH 7,0) Concentração (mM)
KCL	0,5	20,1	6,9	6,8
KH ₂ PO ₄	0,5	8,7	0,9	0,8
NaHCO ₃	1	23,6	25	91
NaCl	2	-	47,2	38,4
MgCl ₂	0,15	0,3	0,12	0,33
(NH ₄) ₂ CO ₃	0,5	0,12	0,5	-

O volume final foi ajustado para 500 mL com água destilada para cada fluido simulado. SSF = Fluido Salivar Simulado, SGF = Fluido Gástrico Simulado, SIF = Fluido Intestinal Simulado.

Fonte: BORA et al. (2021).

Na fase salivar as amostras foram misturadas com o SSF (1:1, m /m) em tubos *Falcon* 50 mL, e o pH ajustado para 7 usando solução de NaOH 1,0 M, em seguida foi acondicionada em incubadora do tipo *Shaker* (SL-221, Solab, Piracicaba, Brasil) a 37 °C ± 1 °C sob agitação constante a 85 rpm durante 2 minutos. Em seguida, o SGF (1:1 (v / v) e uma solução de pepsina suína (3,8 mg/mL) foram adicionados a fase oral. A mistura foi ajustada para pH 3 usando uma solução de HCl (1,0 M) e incubada a 37 °C por 2 h com agitação constante a 85 rpm. Em seguida, o quimo gástrico obtido foi misturado com SIF (1:1 v / v), extrato de bile suína (37,8 mg/mL) e pancreatina suína (16,25 mg/mL). O quimo intestinal resultante foi incubado (37 °C, pH 7) por 2 h. Ao final de cada etapa, alíquotas de cada amostra (1 mL) foram diluídas em 9 mL de água peptonada estéril 0,1%, e agitadas em vortex por 30 segundos. A contagem bacteriana foi realizada em placas seguindo a metodologia proposta por Corti, Bittencourt e Drunkler (2017).

4.10 Análise estatística

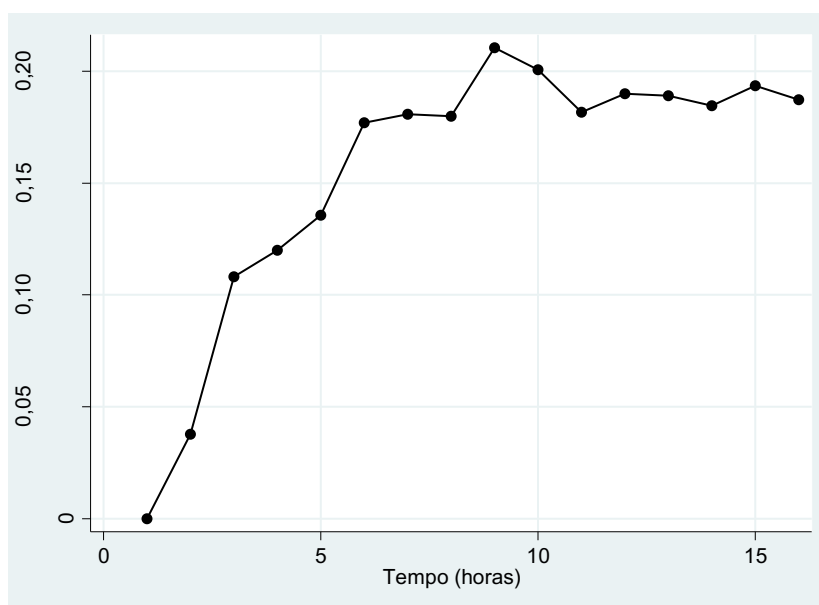
Os resultados obtidos foram submetidos à Análise de Variância (ANOVA) e, quando detectadas diferenças significativas entre os tratamentos ao nível de 5% de significância, ao Teste de *Tukey*, utilizando o programa computacional *Statistica 7.0* (Statsoft Inc., Tulsa, USA).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de Crescimento do *Lactobacillus acidophilus*

Na Figura 2 observa-se a curva de crescimento do *Lactobacillus acidophilus*.

Figura 2 - Curva de crescimento do *Lactobacillus acidophilus*



Fonte: Autoria própria (2023).

A população bacteriana possui quatro fases de crescimento, que são: fase lag, fase log, fase estacionária e fase de morte celular. Em cada fase de crescimento, as células têm diferenças fisiológicas que podem afetar a resistência ao calor (PISPAN; HEWETT; STAPLEY, 2013). A fase estacionária é compreendida como o período no qual a sobrevivência da cultura é mais alta durante a secagem por *spray drying* em relação às fases log e lag (CORCORAN *et al.*, 2004; MORGAN *et al.*, 2006; RANADHEERA *et al.*, 2015).

A fase estacionária promove várias alterações na fisiologia celular, em decorrência do esgotamento das fontes de carbono e nutrientes disponíveis, que por sua vez desenvolvem respostas às condições de estresse para permitir a sobrevivência das bactérias. Essa resposta de sobrevivência também protege a célula

em outras condições adversas, como por exemplo desidratação e altas temperaturas (MORGAN *et al.*, 2006).

É recomendado que para a microencapsulação de microrganismos por *spray drying* que as bactérias estejam em fase estacionária de crescimento celular, devido à taxa de proliferação reduzida, menor atividade fisiológica e aumento da resistência ao estresse além de que as células na fase estacionária exibem melhor capacidade de sobrevivência quando comparado a da fase log (GOLOWCZYC *et al.*, 2010; MAHMOUD *et al.*, 2020).

É possível observar na Figura 2 que no tempo de 9 horas ocorre maior taxa de crescimento do *Lactobacillus acidophilus*, em vista que neste momento os microrganismos encontram-se no início da fase estacionária.

No presente estudo, as bactérias atingiram a fase estacionária após 9 horas de incubação. Resultado semelhante foi observado no estudo de Carvalho (2018), no qual a fase estacionária de *L. acidophilus* foi atingida após 9 horas de incubação.

5.2 Eficiência de microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus*

Na Tabela 3 estão expressos os resultados da contagem de células viáveis antes e após a passagem pelo o *spray drying*, bem como, os percentuais de eficiência de encapsulação dos quatro tratamentos.

Tabela 3 - Eficiência da encapsulação para os diferentes tratamentos de microencapsulação de *L. acidophilus* utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite produzidos por *spray drying*

Tratamentos	Células viáveis (log UFC g ⁻¹)		
	Antes do <i>Spray drying</i>	Após o <i>Spray drying</i>	EE (%)
T1	9,75 ± 1,01 ^a	8,47 ± 0,86 ^a	86,87 ± 0,10 ^{ab}
T2	9,75 ± 1,01 ^a	8,93 ± 1,17 ^a	91,72 ± 1,96 ^a
T3	9,74 ± 1,01 ^a	8,00 ± 0,63 ^a	82,50 ± 1,82 ^b
T4	9,75 ± 1,01 ^a	7,90 ± 0,89 ^a	80,91 ± 1,02 ^b

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de significância (Teste de Tukey). T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

A contagem de células viáveis após o *spray drying* variou entre 7,90 log UFC g⁻¹ a 8,93 log UFC g⁻¹, de modo que não foi observada diferença significativa entre os tratamentos após o *spray drying*.

Os percentuais da eficiência de microencapsulação variaram entre 80,91 ± 1,02% (T4) a 91,72 ± 0,10% (T2), demonstrando-se adequada para todos os tratamentos, indicando que os agentes encapsulantes empregados auxiliaram na estabilidade térmica dos probióticos durante o processo de *spray drying*.

Observa-se que o T2 apresentou maior eficiência de microencapsulação quando comparado aos T3 e T4 (p<0,05); porém, não houve diferença em relação ao T1 (p>0,05) que não diferiu, também, dos tratamentos T3 e T4. Os resultados sugerem uma maior eficiência de encapsulação obtida com a utilização de pectina ATM em comparação à pectina BTM.

No presente estudo, a eficiência de microencapsulação obtida para os tratamentos T1 e T2 foram maiores do que a eficiência observada no estudo de Gebara *et al.* (2013), que obtiveram valores médios de 84,35 ± 0,60% ao produzirem microcápsulas de pectina BTM amidada e proteína do soro de leite para encapsulação de *Lactobacillus acidophilus La5* por gelificação ionotrópica. Por outro lado, os tratamentos T3 e T4, que também empregaram pectina BTM, apresentaram valores de eficiência de microencapsulação semelhantes no estudo de Gebara *et al.* (2013).

Moghanjougi *et al.* (2021), encontraram valores de eficiência de microencapsulação iguais ou superiores a 92% ao produzirem microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus La5* por emulsão utilizando alginato de sódio e pectina ATM como materiais de parede. Tais valores foram semelhantes aos obtidos no presente estudo para T2, no qual também se utilizou pectina ATM como material de parede. De modo semelhante, Bordini *et al.* (2021), ao produzirem microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* por *spray drying* utilizando isolado de soro de leite e pectina (os autores não especificam o grau de esterificação da pectina utilizada), observaram eficiência de encapsulação de 99,05%, valor superior ao encontrado no presente estudo para o T2.

No estudo de Yasmin *et al.* (2019), no qual foram produzidas microcápsulas de *Bifidobacterium longum BL-05* com diferentes proporções de CPS e pectina (os autores não especificam qual o grau de esterificação da pectina utilizada), pelo método de extrusão, a eficiência de encapsulação obtida variou de 88,87% a 93,23%, valores próximos aos observados no presente estudo.

Por outro lado, He *et al.* (2021), ao produzirem microcápsulas de *Lactobacillus casei* por gelificação externa utilizando pectina BTM, observaram valores de eficiência menores aos do presente estudo para T3 e T4, de em média 61%.

Os complexos formados entre proteínas e polissacarídeos fornecem maior proteção química e estabilidade molecular ao probiótico, devido às propriedades espessantes dos polissacarídeos e as propriedades estabilizadoras das proteínas. Esses complexos são formados pelas interações entre as regiões catiônicas de superfícies de proteínas com grupos aniônicos de cadeias polissacarídicas, resultando na formação de complexos solúveis, em valores de pH iguais ao ponto isoelétrico. Ademais, os polissacarídeos contribuem para a manutenção da bicamada lipídica da membrana celular das bactérias, reduzindo o estresse osmótico e fornecendo proteção térmica durante o processo de secagem (MOGHBELI *et al.*, 2020; MUHAMMAD *et al.*, 2021).

A estabilidade dos complexos formados entre polissacarídeos e proteínas depende de diversos fatores, dentre os quais, destaca-se a proporção entre as quantidades de proteínas e polissacarídeos empregadas, bem como o tipo de polissacarídeo (MOGHBELI *et al.*, 2020). A pectina ATM é considerada mais eficiente para a utilização no processo de encapsulação por possuir maior peso molecular e maior poder de gelificação, além de contribuir para a produção de menores partículas (MOGHANJOUGI *et al.*, 2021; BERTRAND *et al.*, 2016; KOWALSKA *et al.*, 2022).

Sugere-se que para atingir os benefícios propiciados pelo consumo de probióticos, o produto deve fornecer ao menos 10^6 UFC g⁻¹ de células viáveis (TERPOU *et al.*, 2019). Desta forma, os resultados do presente estudo demonstram que após o processo de secagem por *spray drying*, as microcápsulas apresentam altas contagens sugerindo que a microencapsulação apresentou eficiência satisfatória no processo de atomização para todos os tratamentos avaliados.

5.3 Caracterização química e físico-química das microcápsulas de *L. acidophilus*

Na Tabela 4 são mostrados os resultados quanto às características químicas e físico-químicas das microcápsulas.

Tabela 4 – Caracterização quanto à atividade de água, umidade, solubilidade e higroscopicidade das microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* produzidas por diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de *spray drying*

Tratamentos	Atividade de água	Umidade (%) (g/ 100g)	Solubilidade (%)	Higroscopicidade (%)
T1	0,51 ± 0,01 ^a	5,83 ± 0,20 ^a	82,06 ± 0,86 ^a	9,47 ± 1,08 ^b
T2	0,35 ± 0,05 ^c	4,38 ± 0,05 ^b	76,38 ± 1,12 ^b	10,78 ± ,70 ^{ab}
T3	0,43 ± 0,11 ^b	5,46 ± 0,61 ^a	78,23 ± 3,56 ^{ab}	11,04 ± 0,58 ^{ab}
T4	0,36 ± 0,03 ^c	4,42 ± 0,24 ^b	74,61 ± 2,08 ^b	12,28 ± 1,45 ^a

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais na mesma coluna não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade (Teste de Tukey). T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

A atividade de água influencia a viabilidade do microrganismo encapsulado, pois os probióticos podem permanecer metabolicamente ativos em elevada atividade de água. Portanto, a promoção da baixa atividade de água das microcápsulas é importante uma vez que aumenta a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento, justamente por reduzir o seu metabolismo (SILVA *et al.*, 2018).

Os valores de atividade de água obtidos para as micropartículas de pectina e CPS do presente estudo variaram entre 0,35 e 0,51, de modo que algumas microcápsulas exibiram valores superiores aos esperados para micropartículas obtidas através de *spray drying*, que seriam entre 0,15 e 0,30 (NUNES *et al.*, 2018). Bordini *et al.* (2021) reportam que valores de atividade de água menores do que 0,30 seriam ideais por aumentar a estabilidade do produto seco, devido à menor quantidade de água livre disponível para reações bioquímicas, conferindo ao produto maior vida útil.

Em estudo de Jantzen, Göpel e Beermann (2013), ao produzirem microcápsulas de *Lactobacillus reuteri* por *spray drying* utilizando caseína hidrolisada, obtiveram valores de atividade de água entre 0,25 e 0,27.

Possivelmente, a menor atividade de água observada em T2 e T4 (Tabela 4) esteja relacionada à maior quantidade de proteína do que de pectina na formulação e, conseqüentemente, às características funcionais do CPS, como as suas propriedades de ligação com a água, por apresentar maior quantidade de grupos hidrofílicos em relação à pectina (MOHAMMADI *et al.*, 2016; KUSIO *et al.*, 2020).

Quanto aos dados de umidade, verificou-se que T2 e T4 apresentaram percentuais significativamente inferiores quando comparados aos demais tratamentos

($p < 0,05$). Nos resultados observados no presente estudo, a umidade das microcápsulas parece ser dependente da razão proteína: polissacarídeo, devido às diferenças observadas entre as microcápsulas com menor e maior quantidade de CPS.

Os valores de umidade observados variaram entre 4,38% e 5,83%, estando dentro da faixa de umidade considerada ideal para um bom armazenamento de microcápsulas produzidas por *spray drying*, que seria em torno de 4% a 7% (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2013). Ainda, Muhammad *et al.* (2021) sugerem que o conteúdo ideal de umidade residual para produtos obtidos por *spray drying* deveria ser menor do que 5%, pois representaria uma maior vida útil. A maioria das microcápsulas apresentaram valores de umidade próximos a 5%, no presente estudo.

Por outro lado, Bordini *et al.* (2021) relataram valor de umidade média de 3,40% ($\pm 0,01$) para microcápsulas de *Pediococcus pentosaceus* P107 produzidas por *spray drying* utilizando proteína do soro de leite e pectina, empregando temperaturas inicial e final de 100 °C e 68 °C, respectivamente, representando um valor de umidade inferior aos observados no presente estudo. Do mesmo modo, Moghbeli *et al.* (2020) obtiveram valores de umidade entre 1,40% e 3,40% para pó de tâmaras encapsulado produzido por *spray drying* utilizando pectina e CPS como materiais de parede, representando valores de umidade igualmente inferiores aos observados no presente estudo. Enquanto, Behboudi-Jobbehdar *et al.* (2013) verificaram que as microcápsulas com *L. acidophilus*, produzidas com maltodextrina, CPS e carreador de D-glicose, apresentaram de 1,7% a 5,4% de umidade. No estudo em que avaliaram a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying* usando goma arábica, maltodextrina e glicerol, como material de parede o teor de umidade das micropartículas variou de 4,60% a 5,71% semelhante ao observado no presente trabalho (NUNES *et al.*, 2018).

Assim como a atividade de água, o conteúdo de umidade das micropartículas influencia fortemente a estabilidade do produto e pode influenciar também a viabilidade dos probióticos durante o armazenamento, o qual constitui um dos parâmetros de qualidade considerados para pós produzidos contendo células de probióticos (GUERIN *et al.*, 2017). É importante destacar que, além do material de parede, a atividade de água e a umidade de partículas produzidas por *spray drying* também são parâmetros influenciados pela temperatura de entrada e de saída no momento da secagem (DADI *et al.*, 2019; BARRO *et al.*, 2021).

A solubilidade é uma variável importante para aplicação em matriz alimentícia considerada uma característica que impacta na qualidade da reconstituição no processo de dissolução do produto (SELOMULYA; FANG, 2013).

No presente estudo, quanto aos resultados de solubilidade, verificou-se que o T1 apresentou maior solubilidade em relação ao T2 e T4, mas não em comparação a T3. Por outro lado, não foram observadas diferenças entre T2, T3 e T4. A solubilidade variou entre 74,61% e 82,06%.

Os valores de solubilidade das microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 produzidas por *spray drying* variaram entre 84,73 e 89,35% (BARAJAS-ÁLVAREZ; GONZÁLEZ-ÁVILA; ESPINOSA-ANDREWS, 2021), resultados similares foram obtidos no estudo de microencapsulação de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, em que os valores de solubilidade variaram entre 77,57% e 89,60% (RODRÍGUEZ-RESTREPO; GIRALDO; RODRÍGUEZ-BARONA, 2017).

Em relação a higroscopicidade, verificou-se que não houve diferença entre T1, T2 e T3, e apenas o T4 apresentou diferença significativa em relação ao T1. Os valores variaram entre 9,47% e 12,28% entre os tratamentos. A higroscopicidade está ligada à estabilidade física, química e microbiológica do produto pois consiste na capacidade de absorção da umidade atmosférica com formação grumos (OLIVEIRA; COSTA; AFONSO, 2014; JAYA; DAS, 2004). Quando um produto apresenta elevado percentual de higroscopicidade, isso afeta negativamente o rendimento do processo, a coleta do material e a estabilidade microbiológica do produto (SANTOS, 2013). Além disso, está diretamente relacionada à presença de grupos hidroxila, capazes de se ligar à água mediante o estabelecimento de pontes de hidrogênio entre as moléculas de água nas regiões amorfas ou cristalina do pó (MEDEIROS *et al.*, 2007; SOUZA, 2020).

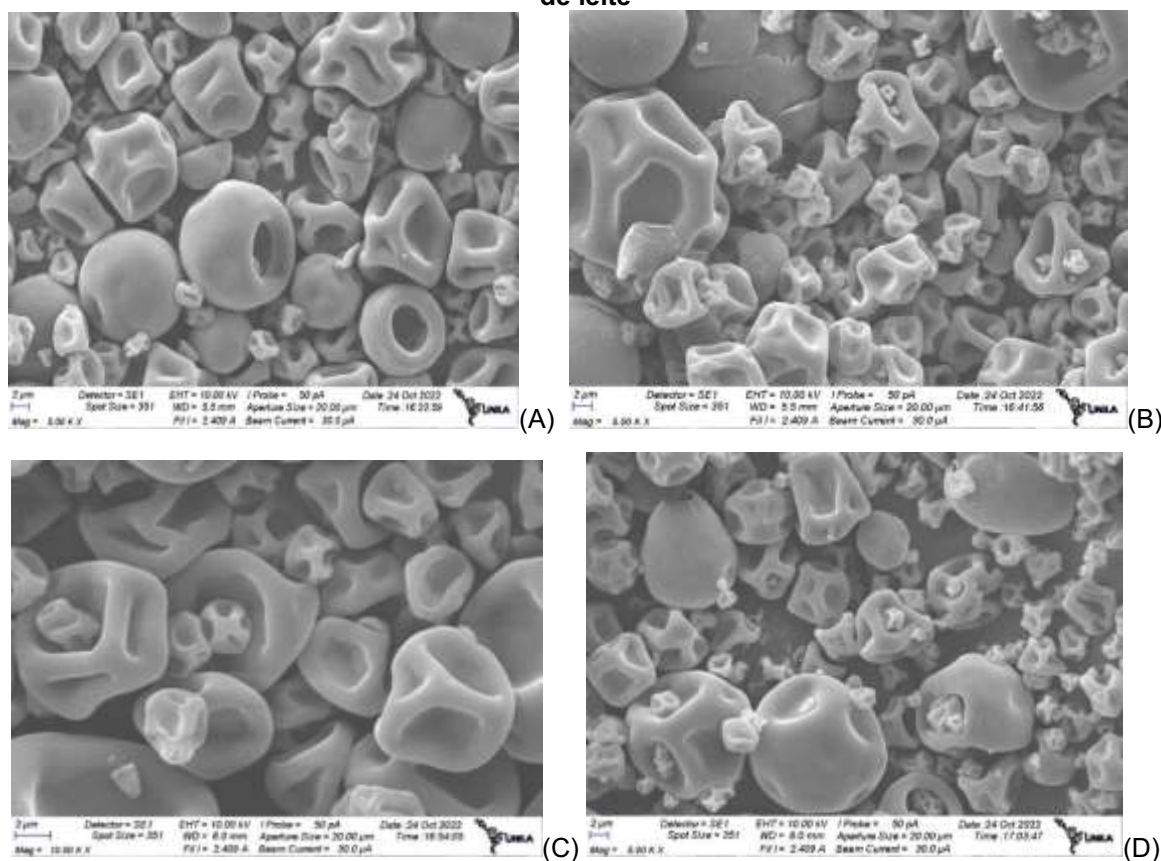
No estudo de Barajas-Álvarez; González-Ávila; Espinosa-Andrews (2021), a higroscopicidade das microcápsulas de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 foi entre 9,55 e 13,97%, semelhante ao observado no presente estudo. Yonekura *et al.* (2014), ao realizarem a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 por *spray drying*, obtiveram o percentual de higroscopicidade entre 11,63 e 15,73%. Valores inferiores de higroscopicidade (8,13 a 8,36%) foram observados em microencapsulação de *Lactiplantibacillus plantarum* por *spray drying* usando maltodextrina, farinha de batata-doce, pectina e gelatina como agentes encapsulantes (COSTA *et al.*, 2023).

Possivelmente, a maior higroscopicidade observada no presente estudo deve-se a presença do CPS nas microcápsulas, uma vez que possui propriedades hidrofílicas (KUSIO *et al.*, 2020; MOHAMMADI *et al.*, 2016), o que poderia favorecer a absorção de água e consequente aumento da higroscopicidade.

5.4 Morfologia das microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus*

Nas Figuras 3, 4 e 5 são apresentadas as micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus*, com escalas de 2 μm , 10 μm e 20 μm e ampliação de 5.000, 2.500 e 500 vezes, respectivamente. Verificou-se que a morfologia das microcápsulas foi bastante similar entre os tratamentos, de modo que não foi observada a presença de células bacterianas não encapsuladas e as microcápsulas apresentaram um formato redondo, sem rachaduras ou fissuras e algumas concavidades ou áreas achatadas, correspondentes às características típicas de produtos obtidos pela técnica de *spray drying* (NUNES *et al.*, 2018).

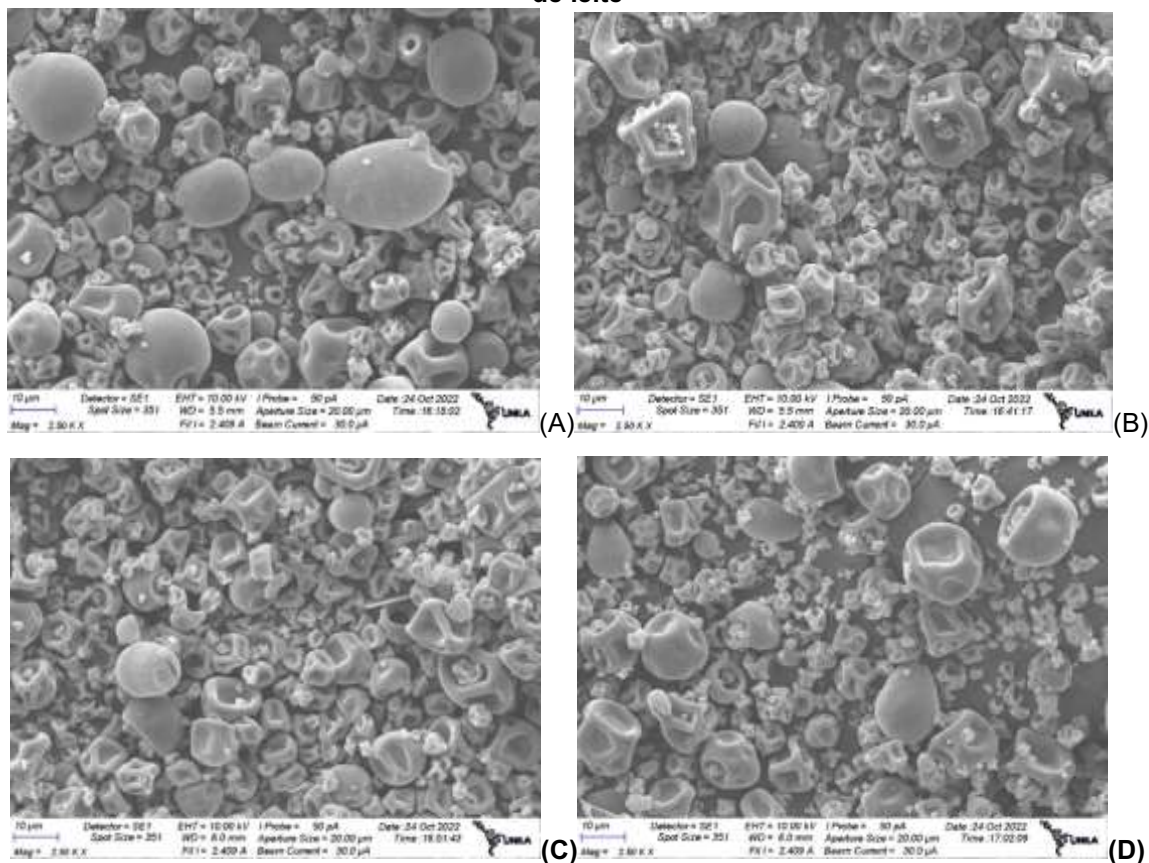
Figura 3 – Micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* com escala de 2 μm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite



A: T1 - 1:7 ATM:CPS (m/m). B: T2 - 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). C: T3 - 1:7 BTM:CPS (m/m). D: T4 - 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria Própria (2023).

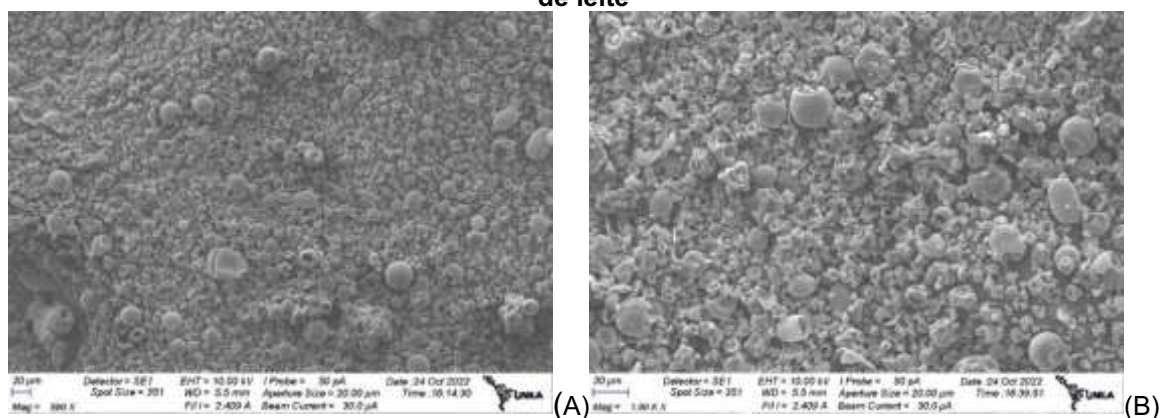
Figura 4 – Micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* com escala de 10 µm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite

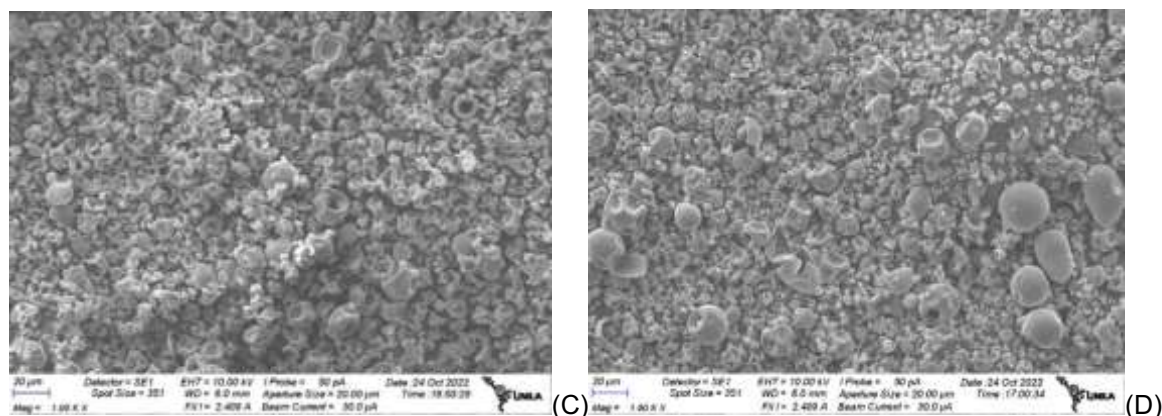


A: T1 - 1:7 ATM:CPS (m/m). B: T2 - 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). C: T3 - 1:7 BTM:CPS (m/m). D: T4 - 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria Própria (2023).

Figura 5 – Micrografias das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* com escala de 20 µm dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite





A: T1 - 1:7 ATM:CPS (m/m). B: T2 - 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). C: T3 - 1:7 BTM:CPS (m/m). D: T4-0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria Própria (2023).

A formação de concavidades ou áreas achatadas geralmente estão relacionadas ao uso de elevadas temperaturas de secagem, que acabam provocando o encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à rápida evaporação das gotas de líquidos (FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2012; BARRO *et al.*, 2021).

A morfologia observada das microcápsulas no presente estudo é benéfica, pois pode-se observar a proteção dos probióticos (Figura 3). No estudo de Nunes *et al.* (2018), as microcápsulas de *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium* Bb-12 produzidas por *spray drying*, utilizando goma arábica, maltodextrina e glicerol, apresentaram morfologia semelhante à observada no presente estudo, de formato redondo e apresentando concavidades. Resultados semelhantes também foram observados por Fritzen-Freire *et al.* (2012), que ao microencapsularem células de *Bifidobacterium* Bb-12 por *spray drying* com leite desnatado e prebióticos, obtiveram microcápsulas de diversos tamanhos e de formato esférico com concavidades.

O tamanho das partículas também é um importante fator a ser considerado, pois partículas de tamanho grande podem atribuir uma textura arenosa às microcápsulas quando adicionadas em produtos alimentícios. São consideradas microcápsulas partículas com tamanhos entre 1 µm e 1000 µm, como o tamanho das micropartículas pode afetar a eficiência de microencapsulação, os diâmetros menores que 100 µm são preferidos para uma melhor proteção do agente encapsulado contra o trato gastrointestinal (MOGHANJOUGI *et al.*, 2021).

Na Tabela 5 são apresentados os diâmetros médios das microcápsulas de *L. acidophilus*.

Tabela 5 – Diâmetro médio das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* dos diferentes tratamentos utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite

Tratamentos	Diâmetro Médio (μm)
T1	1,25 \pm 0,16 ^a
T2	0,37 \pm 0,02 ^b
T3	0,43 \pm 0,02 ^b
T4	0,44 \pm 0,02 ^b

Médias \pm erro padrão seguidas por letras iguais, na mesma coluna, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade (Teste de Tukey). T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Aatoria Própria (2022)

Barro *et al.* (2021), ao produzirem microcápsulas de *Lactobacillus helveticus* por *spray drying* utilizando goma arábica e maltodextrina, obtiveram partículas com tamanho médio de 2,60 μm , ou seja, superior ao tamanho observado para as microcápsulas do presente estudo.

Enquanto, Silva *et al.* (2018) obtiveram microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 com diâmetro médio de $\leq 10,62 \pm 4,64 \mu\text{m}$. No estudo em que foi desenvolvido microcápsulas de probióticos obtidas pela secagem em *spray drying* usando proteína do farelo de arroz e maltodextrina como agente encapsulante, o diâmetro das microcápsulas variou de $4,92 \pm 0,35 \mu\text{m}$ a $7,06 \pm 0,36 \mu\text{m}$ (VANISK *et al.*, 2017).

Um resultado similar ao presente estudo, foi relatado por Kamil *et al.* (2020) ao avaliar microencapsulação do *Lactobacillus plantarum* Dad-13 por *spray drying*, usando leite desnatado e sacarose como agentes encapsulantes em que suas microcápsulas apresentaram diâmetro médio de 0,28 e 0,30 μm .

Maiores concentrações de agentes encapsulantes provocam um aumento proporcional do tamanho das partículas, devido ao aumento da quantidade de material empregada (PIÑÓN-BALDERRAMA *et al.*, 2020). Por outro lado, partículas pequenas podem não garantir proteção suficiente ao material encapsulado. Sendo assim, o equilíbrio do tamanho das partículas é importante para minimizar a perda de probióticos bem como aspectos sensoriais desagradáveis de microencapsulados produzidos por *spray drying* (MOGHANJOUGI *et al.*, 2021; BARRO *et al.*, 2021).

Sugere-se que, juntamente com a forma das microcápsulas, o tamanho pode determinar também as propriedades de fluxo do produto, o que é considerado um parâmetro importante para o processamento de alimentos. Ademais, a redução do

tamanho das partículas introduz vários fatores de melhora do bioadesivo, que consiste na melhora da capacidade da microcápsula de permanecer por mais tempo no trato gastrointestinal, aumentando sua eficácia, incluindo o aumento da força adesiva e o tempo de trânsito gastrintestinal prolongado, bem como pode aumentar potencialmente a biodisponibilidade de certos bioativos, aumentando a absorção gastrointestinal (COGUETTO *et al.*, 2016).

5.5 Sobrevivência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado nos fluidos gástrico e intestinal simulados

Na Tabela 6 estão os resultados da análise de viabilidade das microcápsulas e da célula livre de *Lactobacillus acidophilus* às condições gastrointestinais simuladas.

Tabela 6 – Viabilidade de células de *Lactobacillus acidophilus* livres e microencapsuladas (Log UFC g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de *spray drying* nas condições gastrointestinais simuladas.

Tempo (Min)	pH	Célula livre	T1	T2	T3	T4
0	-	9,75±1,01 ^{aA}	8,46±0,83 ^{aAB}	8,93±1,16 ^{aAB}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}
Fase Oral 2	7,0	6,93±1,18 ^{bA}	4,15 ± 3,23 ^{bB}	7,35 ± 0,85 ^{bA}	6,81± 1,05 ^{abAB}	7,10 ± 0,86 ^{aA}
Gástrica 120	3,0	5,91±0,03 ^{bA}	0,88 ± 2,16 ^{cB}	7,12 ± 0,85 ^{bA}	6,83 ± 0,88 ^{abA}	5,37 ± 2,75 ^{aA}
Intestinal 120	7,0	0,00 ^{cB}	0,00 ^{cB}	7,20 ± 0,80 ^{bA}	6,42 ± 1,08 ^{bA}	5,66 ± 2,91 ^{aA}
% de sobrevivência	-	0,00 ^c	0,00 ^c	80,63%	79,96%	71,65%

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade (Teste de Tukey). T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5: 7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5: 7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

O processo de microencapsulação favoreceu maior sobrevivência ao *L. acidophilus* durante à passagem pelas condições do trato digestório *in vitro* quando comparada à célula livre, com exceção do T1, cuja viabilidade foi menor do que a da célula livre na fase gástrica ($p < 0,05$) e não apresentou viabilidade mínima na fase intestinal.

Com relação aos demais tratamentos, T2 apresentou maior viabilidade quando comparado à T4 nas fases oral, gástrica e intestinal ($p < 0,05$) e não diferiu de T3. Por outro lado, T3 apresentou melhor viabilidade em relação à T4 na fase intestinal ($p < 0,05$). A taxa de sobrevivência para os tratamentos T2, T3 e T4 foram de 80,63%,

79,96% e 71,65%, respectivamente, indicando que T2 e T3 foram mais eficazes na preservação dos probióticos ao longo da digestão simulada.

Na fase intestinal, observa-se que as concentrações de células viáveis restantes em T2, T3 e T4 representam quantidades suficientes de bactérias para a colonização intestinal e consequente obtenção dos benefícios à saúde proporcionados pela ingestão de probióticos, uma vez que, para tal efeito, são necessárias ao menos 10^6 UFC g^{-1} de células viáveis (TERPOU *et al.*, 2019).

Os resultados do presente estudo corroboram outros estudos da literatura científica, que também demonstraram a eficiência da microencapsulação na proteção dos probióticos sob condições gastrointestinais simuladas. No estudo de Gebara *et al.* (2013), ao analisarem a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* La5 microencapsulados em pectina BTM amidada e em pectina BTM amidada e soro de leite por gelificação ionotrópica sob condições gastrointestinais simuladas, com pH entre 1,2 e 3,0, bem como sob condições intestinais simuladas, com pH de 7, os autores observaram viabilidade após encapsulamento de $8 \log$ UFC g^{-1} , sem diferença significativa entre os tratamentos, representando um valor bem próximo à viabilidade observada para T2 e T3 nas fases gástrica e intestinal do presente estudo.

Além disso, Gebara *et al.* (2013) observaram que a viabilidade das células encapsuladas em pectina, após simulação das condições gastrointestinais, foi maior do que naquelas encapsuladas com pectina e soro de leite, demonstrando que a adição de pectina BTM na matriz polimérica beneficia a taxa de sobrevivência probiótica.

Sun *et al.* (2014), ao produzirem microcápsulas de isolado proteico de soja e pectina ATM pelo método de mudança cíclica de pH, observaram que a viabilidade dos probióticos nas microcápsulas que atingiram o intestino delgado foi de $3 \log$ UFC/mL, sendo maior do que a viabilidade observada para as bactérias livres. No presente estudo, a viabilidade dos probióticos encapsulados também foi significativamente maior comparada à viabilidade da célula livre.

Em estudo de Li *et al.* (2019), ao avaliarem a eficiência de encapsulação de *Bifidobacterium breve* CICC6182 em pectina BTM, produzidas pelo método por reticulação iônica, quanto à viabilidade em exposição simulada a fluidos gastrointestinais, verificaram que, após a exposição, a viabilidade dos probióticos encapsulados diminuiu apenas em $1,76 \log$ UFC g^{-1} comparada à $4,82 \log$ UFC g^{-1} de bactérias livres. Resultados similares foram observados para T2, T3 e T4 no presente

estudo, nos quais a redução da viabilidade dos probióticos foi mínima nas fases gástrica e intestinal comparadas à célula livre.

De modo semelhante, em estudo de He *et al.* (2021) que objetivaram verificar o efeito da encapsulação de diferentes *Lactobacillus* em dois tipos de pectinas BTM, utilizando o método de gelificação externa, os resultados obtidos demonstraram que as microcápsulas produzidas à base de pectina BTM promoveram proteção significativa aos probióticos encapsulados nos testes de digestão gástrica simulada, por meio do estímulo à formação de biofilme pelas bactérias, de modo que a viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* variou de 8,36 a 8,54 log UFC g⁻¹. No final da digestão intestinal, as microcápsulas de *L. acidophilus* à base de pectina quase mantiveram a mesma viabilidade celular em comparação com a digestão gástrica.

A pectina BTM apresenta elevada resistência química, conforme demonstrado em estudo de Gruskiene, Krivorotova e Sereikaite (2017), com o objetivo de avaliar a estabilidade proteolítica de partículas de nisina encapsuladas em inulina ou pectina, no qual verificou-se que a estabilidade das partículas esteve relacionada ao grau de esterificação da pectina, uma vez que àquelas desenvolvidas com pectina BTM foram as que apresentaram maior estabilidade proteolítica. Tal propriedade da pectina BTM pode ter favorecido a maior resistência probiótica comparada à célula livre sob condições gastrointestinais *in vitro* observadas em T3 e T4 no presente estudo, bem como pode explicar o melhor desempenho de T3 em comparação à T4, uma vez que T3 foi produzida com maiores concentrações de pectina BTM.

A densa rede de hidrogel formada pela combinação de soro de leite com pectina promove a redução da taxa de difusão das microcápsulas, consequentemente reduzindo a exposição do microrganismo ao meio ácido do suco gástrico (BORDINI *et al.*, 2021). Entretanto, a formação e a estabilidade dos complexos entre proteínas e polissacarídeos podem ser afetadas por fatores como pH, força iônica, pela razão da proporção entre a quantidade de proteína e polissacarídeo, pela densidade de carga do biopolímero e pelas condições de produção, como temperatura, cisalhamento e tempo de agitação (AGUILAR *et al.*, 2015).

No presente estudo, todas as microcápsulas foram produzidas dentro das mesmas condições. Contudo, considerando o fato de que T1 não apresentou resultados favoráveis quanto à digestibilidade *in vitro*, diferentemente dos demais tratamentos, sugere-se que a estabilidade da microcápsula de pectina ATM esteja mais fortemente relacionada à razão proteína:polissacarídeo, particularmente à maior

quantidade de CPS, do que a microcápsula de pectina BTM, pois melhores resultados foram observados quando maiores quantidades de CPS foram empregadas, como no caso do T2, nas condições estudadas.

Este resultado corrobora o que foi observado no estudo de Morales *et al.* (2021), no qual houve maior estabilidade da pectina ATM com maiores concentrações de CPS. Ao avaliarem a influência do grau de metoxilação da pectina na estabilidade de complexos com pectina e isolado proteico de soro de leite como nanocarreadores de luteína, verificaram que o emprego de menor quantidade de pectina ATM propiciou a estabilização das misturas e reduziu o tamanho das partículas. As concentrações testadas foram de 4:0, 4:1, 4:2, 4:3, 4:4 e 0:4 de isolado proteico de soro de leite: pectina ATM, de modo que a concentração de 4:1 apresentou maior estabilidade.

Portanto, a proporção do biopolímero é importante para a estabilização das partículas e os complexos entre pectina ATM e proteínas precisariam ter uma maior quantidade de proteína para estabilizar o sistema (MORALES *et al.*, 2021).

No presente estudo, apenas o T2 apresentou desempenho igualmente satisfatório na eficiência de encapsulação e nos testes de viabilidade em condições gastrointestinais simuladas. Por outro lado, apesar do T1 ter apresentado uma boa eficiência de encapsulação, não apresentou viabilidade mínima de probióticos na simulação da passagem pelo trato gastrointestinal, o que demonstra a importância da realização de testes de digestibilidade para a avaliação da capacidade da microcápsula de preservar os agentes encapsulados de modo que os probióticos possam cumprir seu papel no organismo.

Reforçando a ideia de que, apesar de ser descrita por alguns autores como mais eficiente no processo de encapsulação do que a pectina BTM, a eficiência da pectina ATM seria dependente da quantidade de proteína, visto que apesar do T1 ter apresentado uma boa eficiência de encapsulação, não apresentou viabilidade mínima de probióticos na simulação da passagem pelo trato gastrointestinal. Tal fato demonstra também a importância da realização de testes de digestibilidade além dos testes de eficiência de encapsulação, para a avaliação da capacidade da microcápsula em preservar os agentes encapsulados ao longo do trato digestivo, de modo que os probióticos possam cumprir seu papel no organismo.

De modo geral, os resultados observados quanto à viabilidade após a simulação da passagem pelo trato gastrointestinal, no presente estudo, demonstraram que os agentes encapsulantes empregados, na maioria dos tratamentos, foram

eficientes a ponto de garantir a entrega da quantidade mínima necessária de probióticos à microbiota intestinal a fim de obter os benefícios para a saúde atribuídos à sua ingestão.

5.6 Sobrevivência de *L. acidophilus* livre e microencapsulado armazenados em temperatura de refrigeração e ambiente

Na Tabela 7 pode-se observar os resultados da análise de viabilidade em condições de estocagem em temperatura de refrigeração (4 °C) e em temperatura ambiente (25 °C) da célula livre e das células microencapsuladas, por meio dos 3 tratamentos avaliados. Diante do fato de que o T1 não apresentou resultados favoráveis na digestibilidade, este tratamento não foi incluído nesta análise.

Tabela 7 – Viabilidade de células de *Lactobacillus acidophilus* livres e microencapsuladas (Log UFC.g⁻¹) em diferentes concentrações de pectina e concentrado proteico de soro de leite pelo método de *spray drying* em condições de estocagem refrigerada e à temperatura ambiente

Refrigeração a 4 ° C				
Tempo (dias)	Célula livre	T2	T3	T4
0	9,75 ± 1,01 ^{aA}	8,94 ± 1,16 ^{aAB}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}
15	6,40 ± 0,05 ^{bA}	7,26 ± 0,63 ^{bA}	7,07 ± 0,65 ^{aA}	6,92 ± 0,40 ^{bA}
30	5,63 ± 0,2 ^{bB}	7,09 ± 1,24 ^{bA}	7,51 ± 0,65 ^{aA}	7,20 ± 0,64 ^{abA}
45	0,00 ^{cC}	6,54 ± 0,68 ^{bA}	7,58 ± 0,65 ^{aA}	7,09 ± 0,35 ^{abB}
60	0,00 ^{cC}	7,17 ± 0,66 ^{bA}	7,14 ± 0,70 ^{aA}	7,28 ± 0,35 ^{abA}
90	0,00 ^{cC}	6,70 ± 0,54 ^{bA}	0,00 ^b	0,00 ^c
Ambiente a 25 °C				
Tempo (dias)	Célula livre	T2	T3	T4
0	9,75 ± 1,01 ^{aA}	8,94 ± 1,16 ^{aAB}	8,03 ± 0,63 ^{aB}	7,90 ± 0,88 ^{aB}
15	0,00 ^{cB}	6,91 ± 0,19 ^{abA}	7,26 ± 1,05 ^{abA}	7,33 ± 0,91 ^{abA}
30	0,00 ^{cB}	6,39 ± 0,63 ^{bA}	6,89 ± 1,12 ^{bA}	6,18 ± 0,94 ^{bA}
45	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cB}	6,25 ± 0,80 ^{bA}	6,57 ± 0,47 ^{bA}
60	0,00 ^c	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cC}
90	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cC}	0,00 ^{cC}

Médias ± erro padrão seguidas por letras iguais, minúsculas na mesma coluna e maiúsculas na mesma linha, não diferem significativamente entre si ao nível de 5% de probabilidade (Teste de Tukey). T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

Observou-se que a célula livre apresentou redução mais expressiva ao longo do tempo de armazenamento quando comparada aos probióticos microencapsulados, não havendo viabilidade mínima após 45 dias sob temperatura de refrigeração e após 15 dias de estocagem a 25 °C. Ou seja, em ambas as condições de armazenamento, a célula livre apresentou menor viabilidade que as microencapsuladas.

Dessa forma, observou-se que todos os tratamentos avaliados apresentaram maior eficácia na preservação dos probióticos ao longo do tempo, tanto em estocagem refrigerada como à temperatura ambiente, em relação à célula livre. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram obtidos por Coghetto *et al.* (2016), que ao avaliarem a eficácia de microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* em alginato de sódio ou em matrizes de alginato de sódio e pectinas cítricas obtida por *electrospraying*, observaram que a sobrevivência das células sob estocagem refrigerada (4 °C ± 1 °C) por 21 dias foi de cerca de 9 log UFC mL⁻¹ para células encapsuladas, ao passo que para células livres foi de cerca de 1 log UFC mL⁻¹.

De modo semelhante, Arepally *et al.* (2020), ao microencapsularem células de *Lactobacillus acidophilus* por *spray drying* com o intuito de produzir um pó probiótico utilizando 20% de maltodextrina e diferentes concentrações de goma arábica, verificaram que a viabilidade das células armazenadas por 12 semanas sob refrigeração de 4 °C e em temperatura ambiente de 25 °C, foi de 6,05 log UFC g⁻¹ e 1,24 log UFC g⁻¹, respectivamente, de modo que a viabilidade das células encapsuladas foi maior do que a das células livres, bem como as microcápsulas submetidas ao ambiente refrigerado apresentaram maior viabilidade do que àquelas submetidas à temperatura ambiente.

No estudo de Yasmin *et al.* (2019), as microcápsulas de *B. longum* BL-05, produzidas com 2,5% de CPS e 1,5% de pectina pelo método de extrusão, demonstraram redução mínima (1,72 ciclos log) da viabilidade probiótica após 28 dias de estocagem refrigerada à 4 °C. No presente estudo, todos os tratamentos analisados também apresentaram redução mínima da viabilidade bacteriana sob estocagem refrigerada. Ademais, de modo semelhante ao presente estudo, no trabalho de Yasmin *et al.* (2019), as células livres apresentaram redução expressiva de 7,27 ciclos log, sendo significativamente maior quando comparada aos probióticos microencapsulados.

No presente estudo, a redução de células viáveis também foi mais expressiva para a célula livre bem como para os probióticos microencapsulados submetidos à

temperatura ambiente, quando comparados àqueles submetidos à temperatura de refrigeração, não sendo mais observada viabilidade mínima a partir dos 60 dias de estocagem. Entretanto, a microencapsulação contribuiu para a preservação da contagem de probióticos ao longo do tempo em ambas as condições de armazenamento em relação à célula livre.

Conseguir manter a viabilidade de bactérias probióticas em alimentos ao longo do armazenamento é um desafio constante, especialmente em ambiente não refrigerado (BATISTA *et al.*, 2015). Quando a secagem por *spray drying* é utilizada, é comum que uma grande parte da atividade probiótica seja perdida após algumas semanas de armazenamento à temperatura ambiente (MENEZES *et al.*, 2013).

Diferentemente do que acontece no armazenamento à temperatura ambiente, o armazenamento de células probióticas em temperaturas próximas ou acima de 0 °C reduz a velocidade de reações químicas prejudiciais, ao passo que a estocagem não refrigerada favorece a oxidação de lipídios de membrana e desnaturação de proteínas que levam à degradação de macromoléculas em células bacterianas, reduzindo a viabilidade (AREPALLY *et al.*, 2020).

Outra questão que explica o decréscimo nas contagens de microrganismos viáveis com o passar dos dias em estocagem à temperatura ambiente é que eles são metabolicamente ativos dentro das microcápsulas, produzindo ácidos metabólicos e bacteriocinas e/ou a perda de substratos (PEDROSO *et al.*, 2012).

Por outro lado, a estabilidade dos probióticos microencapsulados aumenta com a diminuição da temperatura. A explicação para tal é que os microrganismos ficam mantidos em estado latente, evitando rearranjos no agente encapsulante, impedindo, dessa forma, sua exposição inadequada, promovendo um aumento da vida útil das microcápsulas. Assim, temperaturas próximas a 0 °C melhoram os índices de viabilidade celular, pois temperaturas mais baixas reduzem as taxas de reações químicas que são prejudiciais para os microrganismos, tais como a oxidação (SILVA *et al.*, 2015a).

Ademais, ao considerar a redução log entre os tratamentos bem como ao longo do tempo de armazenamento de cada microcápsula, observou-se que T2 apresentou maior resistência sob temperatura refrigerada, uma vez que não foram mais observadas reduções significativas de ciclos log das bactérias após 15 dias de armazenamento sob refrigeração, mantendo a viabilidade dos probióticos até 90 dias de armazenamento. Por outro lado, no armazenamento à temperatura ambiente, T3 e

T4 apresentaram melhor desempenho em relação à T2, uma vez que se observou viabilidade até 60 dias de armazenamento, diferentemente de T2, cuja viabilidade mínima foi mantida apenas até 45 dias de estocagem (Tabela 7). Ao comparar a viabilidade entre cada tratamento ao longo tempo, apenas T4 apresentou significativamente maior viabilidade probiótica em relação a T2 após 45 dias de estocagem refrigerada. Esses resultados podem indicar que a pectina BTM talvez promova maior estabilidade à microcápsula à temperatura ambiente.

A estabilidade de uma microcápsula depende fortemente das mudanças físicas e químicas influenciadas pelas condições de armazenamento, como luz, oxigênio, umidade, temperatura etc. (HOYOS-LEYVA *et al.*, 2018). Sendo assim, a avaliação da estabilidade de armazenamento abrange a estabilidade física, que inclui, além de outros parâmetros, a capacidade de retenção adequada do produto do núcleo, bem como a estabilidade química, que consiste na resistência à processos químicos de degradação, como a oxidação. De modo geral, a pectina BTM é mais estável do que a pectina ATM, o que pode ser atribuído ao seu baixo grau de esterificação. A pectina é conhecida por se decompor por meio de processos de esterificação e despolimerização, podendo ocorrer a hidrólise de ésteres metílicos gerando grupos carboxílicos livres e, conseqüentemente, reduzindo a estabilidade a longo prazo (SMISTAD *et al.*, 2012).

Em estudo de Zhou *et al.* (2014), ao produzirem lipossomas de vitamina C revestidos por pectina ATM ou pectina BTM, observou-se que tanto em estocagem refrigerada (4 °C) como em armazenamento à temperatura ambiente (25 °C) ao longo de dez semanas, a pectina BTM apresentou melhor estabilidade físico-química em comparação à pectina ATM e maior potencial zeta (parâmetro que avalia a estabilidade de partículas à longo prazo) propiciando melhor proteção à vitamina C contra processos de degradação, como oxidação e vazamento de material ao longo do período de armazenamento.

Ainda, Smistad *et al.* (2012), ao investigarem o potencial de diferentes pectinas na estabilização de lipossomas em temperaturas de 4 °C, 25 °C e 35 °C, a pectina ATM apresentou um potencial zeta mais negativo sob armazenamento à 35 °C, indicando menor estabilidade, ao passo que o mesmo não foi observado para pectina BTM.

Assim, o melhor desempenho em preservar a viabilidade probiótica à temperatura ambiente observado para T3 e T4 em relação à T2 pode ser explicado

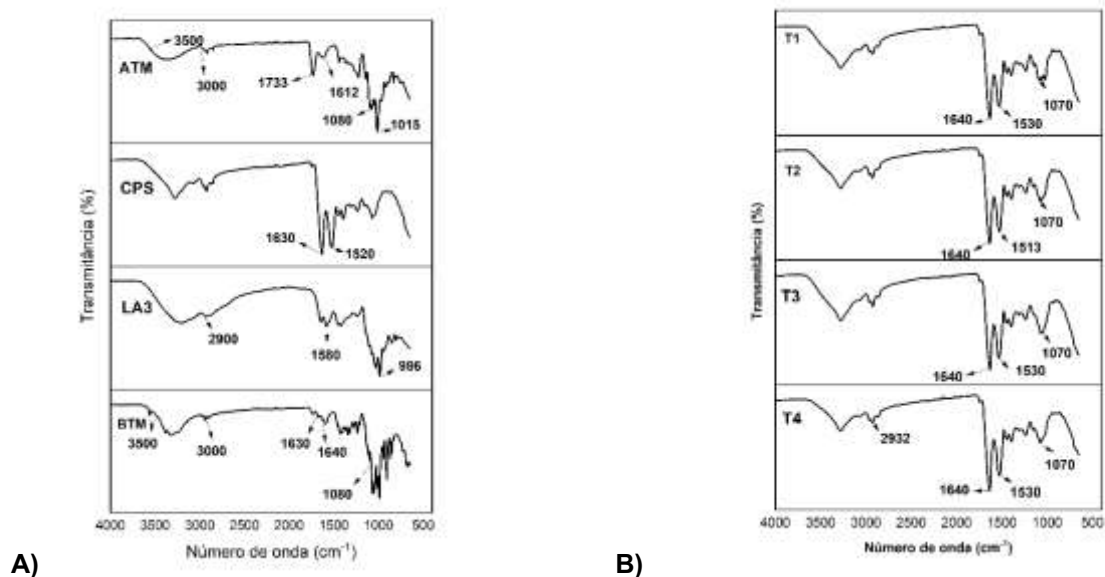
pela maior estabilidade da pectina BTM em relação à pectina ATM, uma vez que, conforme descrito anteriormente, a temperatura ambiente aumenta a velocidade de reações químicas, enzimáticas e microbiológicas, que favorecem a deterioração das microcápsulas, como oxidação de lipídios e degradação de proteínas (AREPALLY *et al.*, 2020). Dessa forma, a maior estabilidade da pectina BTM contribuiria para a maior resistência das microcápsulas a esses fenômenos, preservando a viabilidade probiótica. É importante destacar também que T3 e T4 poderiam ser armazenados tanto em refrigeração como em temperatura ambiente, pois as diferenças na contagem de probióticos ao longo do tempo foram praticamente iguais nas duas temperaturas de estocagem.

Dessa forma, com os resultados sobre viabilidade sob estocagem refrigerada e à temperatura ambiente observados no presente estudo, verificou-se que as microcápsulas com pectina BTM podem favorecer melhor a proteção dos probióticos ao longo do tempo, bem como que a estocagem à temperatura ambiente configurou-se como um desafio à preservação dos probióticos encapsulados, uma vez que a perda da viabilidade foi mais expressiva do que na estocagem refrigerada em todos os tratamentos do presente estudo.

5.7 Análise dos grupos funcionais da estrutura química e das interações químicas dos materiais encapsulantes e encapsulados por Espectroscopia de absorção na região de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Na Figura 6 pode ser visto os espectros de infravermelho dos agentes encapsulantes e do microorganismo livre, bem como também dos tratamentos realizados (T1, T2, T3, T4).

Figura 6 – Espectros de FTIR dos agentes encapsulantes, do microorganismo livre e das microcápsulas de *L. acidophilus* obtidas por *spray drying* utilizando pectina e concentrado proteico de soro de leite



A: agentes encapsulantes e *L. acidophilus*. B: T1 - tratamento com concentração de 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 - tratamento com concentração 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 - tratamento com concentração 1:7 BTM:CPS (m/m). T4- tratamento com concentração 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

Quanto à pectina, no presente estudo, pode-se observar (Figura 6) as bandas largas na região entre 3000 cm^{-1} a 3500 cm^{-1} , que correspondem aos estiramentos dos grupos O-H. As bandas agudas observadas entre 2900 cm^{-1} a 2930 cm^{-1} correspondem ao alongamento dos grupamentos C-H. As bandas observadas entre 1630 cm^{-1} e 1640 cm^{-1} correspondem ao estiramento assimétrico de COO^- , as bandas entre 1520 cm^{-1} e 1530 cm^{-1} resultam do estiramento simétrico de COO^- e as bandas próximas a 1080 cm^{-1} representam as duplas ligações de C=O ou C=C (MOGHBELI *et al.*, 2020). Espectros semelhantes aos verificados no presente estudo para a pectina também foram observados por Sousa *et al.* (2017).

Em relação aos diferentes graus de metoxilação, as bandas em 1744 cm^{-1} e 1630 cm^{-1} são geralmente observadas para diferenciar as pectinas ATM e BTM, correspondendo ao estiramento do grupo carboxílico (COO^-) e ao estiramento da ligação C=O do grupo éster carbonila, respectivamente (ZHOU *et al.*, 2014; KYOMUGASHO *et al.*, 2015). Conforme pode ser visualizado na Figura 7, observou-se maior transmitância em 1733 cm^{-1} do que em 1630 cm^{-1} nos espectros de pectina ATM, o que é característico da pectina de alto grau de esterificação. Por outro lado, observaram-se bandas similares em 1744 cm^{-1} e em 1630 cm^{-1} nos espectros de

pectina BTM, de modo que a transmitância foi inferior em 1744 cm^{-1} do que em 1630 cm^{-1} .

Quanto ao CPS, as bandas observadas entre 1600 cm^{-1} e 1700 cm^{-1} representam a região amida I, que representa o estiramento dos grupamentos C=O da estrutura peptídica, enquanto as bandas entre 1495 cm^{-1} e 1580 cm^{-1} representam a amida II, à flexão da ligação N-H e o estiramento C-N (DROSOU; KROKIDA; BILIADERIS, 2018).

Na Figura 6, pode-se verificar que as bandas são similares entre os 4 tratamentos, sugerindo que durante o processo de *spray drying*, houve a preservação da estrutura dos agentes encapsulantes empregados.

Ademais, os espectros para o *L. acidophilus* observados no presente estudo mostram as bandas correspondentes aos componentes celulares da bactéria, como as faixas entre 3000 cm^{-1} a 2800 cm^{-1} , correspondentes aos ácidos graxos da membrana celular bacteriana; as faixas entre 1800 cm^{-1} a 1500 cm^{-1} , correspondentes às amidas de proteínas e peptídeos; as faixas entre 1500 cm^{-1} a 1200 cm^{-1} , correspondentes à mistura de proteínas e ácidos graxos e as faixas entre 1200 cm^{-1} a 900 cm^{-1} , correspondentes à polissacarídeos dentro da parede celular (OUST *et al.*, 2004).

Quanto aos espectros das microcápsulas, em todos os tratamentos do presente estudo, foi observado um pico agudo próximo a 1640 cm^{-1} em todos os tratamentos. O aumento do valor da transmitância na região amida I de 1630 cm^{-1} , observado no espectro do CPS, para 1640 cm^{-1} no espectro das microcápsulas, indica as interações intermoleculares nas zonas de junção e estabilização da rede de gel, o que demonstra a possível ligação amida formada entre os grupos amino do CPS e os grupos carboxílicos da pectina, confirmando a formação do complexo CPS-pectina (RAEI; RAFE; SHAHIDI, 2018; ASSADPOUR; JAFARI; MAGHSOUDLOU, 2017). Ademais, foi observado uma banda em 1.234 cm^{-1} , o qual indica a vibração do alongamento da ligação C-N (ZHANG *et al.*, 2022).

Espectro semelhante foi observado em microcápsulas de vitamina B12 produzidas com pectina e CPS por coacervação no estudo de Akbari *et al.* (2022), em que uma banda aguda apareceu em $1654,33\text{ cm}^{-1}$, a qual os autores atribuíram às ligações amida entre pectina e CPS, confirmando a formação do complexo, semelhante ao observado no presente estudo para os 4 tratamentos analisados.

Dessa forma, a atenuação da região Amida II do CPS e o estiramento de COO- da pectina indica que houve interação entre os agentes encapsulantes. Ainda, as bandas características dos agentes encapsulantes são evidentes, indicando que a encapsulação por *spray drying* não afetou negativamente a estrutura dos materiais. Ademais, o fato das imagens de micrografias não revelarem a presença de microorganismos fora das microcápsulas reforça que a encapsulação ocorreu de forma satisfatória, corroborando o resultado obtido na análise de eficiência de encapsulação.

5.8 Síntese dos resultados obtidos

A Tabela 8 mostra a síntese dos resultados obtidos para cada análise dos quatro tratamentos analisados, a fim de avaliar quais tratamentos, dentre todos os aspectos investigados, demonstraram melhor desempenho quanto aos resultados esperados.

Tabela 8 - Síntese dos resultados obtidos

Resultados	T1	T2	T3	T4
Eficiência de encapsulação	Igual a T2, T3 e T4	Igual a T1 Maior T3 e T4	Igual a T1 e T4 Menor que T2	Igual a T1 e T3 Menor que T2
Atividade de água	Maior que todos	Igual a T4 Menor a T1 e T3	Menor que T1 Maior que T2 e T4	Igual a T2 Menor que T1 e T3
Umidade	Igual a T3 Maior que T2 e T4	Igual a T4 Menor que T1 e T3	Igual a T1 Maior que T2 e T4	Igual a T2 Menor que T1 e T3
Solubilidade	Igual a T3 Maior a T2 e T4	Igual a T3 e T4 Menor que T1	Igual a T2 e T4 Menor que T1	Igual a T2 e T3 Menor que T1
Higroscopicidade	Igual a T2 e T3 menor do que T4	Igual a T1, T3 e T4	Igual a T1, T2 e T4	Igual a T2 e T3 Maior do que T1
Viabilidade condições gastrointestinais simuladas	Sem viabilidade na fase intestinal	Maior viabilidade que T4 em todas as fases Não diferiu de T3	Maior viabilidade que T4 na fase intestinal	Menor viabilidade que T2 e T3 na fase intestinal
Viabilidade estocagem refrigerada 4 °C	—	Apresentou viabilidade até 90 dias	Apresentou viabilidade até 60 dias	Apresentou viabilidade até 60 dias
Viabilidade estocagem Temperatura 25 °C	—	Apresentou viabilidade até 30 dias	Apresentou viabilidade até 45 dias	Apresentou viabilidade até 45 dias

T1 = 1:7 ATM:CPS (m/m). T2 = 0,5:7,5 ATM:CPS (m/m). T3 = 1:7 BTM:CPS (m/m). T4 = 0,5:7,5 BTM:CPS (m/m).

Fonte: Autoria própria (2023).

Considerando-se que, dentre todos os aspectos, garantir a preservação dos probióticos contra condições ambientais desfavoráveis para que quantidades suficientes possam atingir a flora intestinal a fim de exercer efeitos no organismo é o critério mais importante a ser cumprido (TERPOU *et al.*, 2019), diante dos resultados observados, verificou-se que os tratamentos T2 e T3, demonstraram maior capacidade de manutenção da viabilidade probiótica nos testes de condições gastrointestinais simuladas e de estocagem sob temperatura ambiente e refrigerada, sendo, portanto, considerados os tratamentos com melhor desempenho, especialmente T3, que apresentou ainda melhor estabilidade sob estocagem em temperatura ambiente.

6 CONCLUSÃO

O presente trabalho demonstrou ser viável à microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* com pectina e CPS por meio da técnica de *spray drying*, uma vez que os resultados obtidos quanto à eficiência de microencapsulação e viabilidade às condições gastrointestinais simuladas, bem como à estocagem em temperatura ambiente e refrigerada, foram favoráveis quanto à preservação dos probióticos para a maioria dos tratamentos empregados.

Ademais, nas condições testadas e em função de todos os resultados observados, as microcápsulas T2 e T3 apresentaram os melhores resultados, em especial T3, uma vez que embora a eficiência tenha sido melhor em T2 e ambas as microcápsulas não tenham diferido quanto à viabilidade sob condições gastrointestinais simuladas, o tratamento T3 apresentou melhor resultado quanto à viabilidade em estocagem, de modo que até 60 dias, T3 poderia ser armazenada tanto sob temperatura refrigerada como em temperatura ambiente, pois não apresentou redução significativa na contagem de células viáveis sob estas condições, diferentemente de T2.

Assim, verifica-se que as microcápsulas produzidas possuem potencial para a entrega de quantidades suficientes de células viáveis para a colonização da flora intestinal e obtenção dos efeitos à saúde proporcionados pela ingestão de probióticos. Ademais, os agentes encapsulantes utilizados, pectina e CPS, são materiais naturais e que agregam valor nutricional ao alimento, propiciando benefícios à saúde e favorecendo o seu emprego na indústria alimentícia. Destaca-se ainda o caráter inovador do trabalho, uma vez que ainda não existem trabalhos que tenham pesquisado a utilização de pectina ATM e BTM juntamente com o CPS para a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus*.

REFERÊNCIAS

AGUILAR, K.C. *et al.* Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v.154, p.17–24, 2015.

AGUDELO-CHAPARRO, J. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 by spray drying using maltodextrin, whey protein concentrate and trehalose. **Food Science and Technology**, id.10820132211020621, p.1-13, 2021.

AKBARBAGLU, Z. *et al.* Spray drying encapsulation of bioactive compounds within protein-based carriers; different options and applications. **Food Chemistry**, v.359, 129965, p.1-13, 2021.

AKBARI, N. *et al.* Encapsulation of Vitamin B12 by Complex Coacervation of Whey Protein Concentrate–Pectin; Optimization and Characterization. **Molecules**, v.27, n. 6130, p.1-16. 2022.

ALBADRAN, H.A. *et al.* Stability of probiotic *Lactobacillus plantarum* in dry microcapsules under accelerated storage conditions. **Food Research International**, v.74, p.208-216, 2015.

ALBUQUERQUE, A.P. *et al.* Utilização de polpa de frutas em pó carregadoras de probióticos como alimento funcional: aspectos gerais e perspectivas. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.24, e2019310, p.1-11, 2021.

AOAC – Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association Analytical Chemists**. 18.ed. Gaithersburg, Maryland: AOAC International, 2007.

ARAÚJO, J.S.F. *et al.* Microencapsulation of sweet orange essential oil (*Citrus aurantium* var. *dulcis*) by liophylization using maltodextrin and maltodextrin/gelatin mixtures: Preparation, characterization, antimicrobial and antioxidant activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.143, p.991-999, 2020.

AREPALLY, D. *et al.* Studies on survivability, storage stability of encapsulated spray dried probiotic powder. **Current Research in Food Science**, v.3, n.1, p.235–242, 2020.

ARSLAN, S. *et al.* Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: *Bouardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v.63, p.685-690, 2015.

ASSADPOUR, E.; JAFARI, S.; MAGHSOUDLOU, Y. Evaluation of folic acid release from spray dried powder particles of pectin?whey protein nano-capsules. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.95, p.238-247, 2017.

ATRAKI, R.; AZIZKHANI, M. Survival of probiotic bacteria nanoencapsulated ithin bipolymers in a simulated gastrointestinal model. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v.72, n.102750, p.1-6, 2021.

AVILA-REYES, S.V. *et al.* Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 423-430, 2014.

BARAJAS-ÁLVAREZ, P.; GONZÁLEZ-ÁVILA, M.; ESPINOSA-ANDREWS, H. Recent advances in probiotic encapsulation to improve viability under storage and gastrointestinal conditions and their impact on functional food formulation. **Food Reviews International**, may, p.1-22, 2021.

BARRO, N.P.R. *et al.* Microencapsulation of Probiotic *Lactobacillus helveticus* with Different Wall Materials by Spray drying. **Biointerface Research in Applied Science**, v.11, n.4, p.11221-11232, 2021.

BATISTA, A.L.D. *et al.* Quality parameters of probiotic yogurt added of glucose oxidase compared to commercial products through microbiological, physical-chemical and metabolic activity analyses. **Food Research International**, v.77, p.627-635, 2015.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S. *et al.* Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology**, v.31, p.1274-1283, 2013.

BERTRAND, M. *et al.* Influence of Pectin on the Stability of Whey Protein Isolate Stabilized Emulsion for Encapsulating Lutein. **Advance Journal of Food Science and Technology**, v.12, n.11, p.617-626, 2016.

BORA, A.F.M.; LI, X.; LIU, L. Physicochemical and functional characterization of newly designed biopolymeric-based encapsulates with probiotic culture and charantin. **Foods**, v.10, n.2677, p.1-20, 2021.

BORDINI, F. W. **Microencapsulação de *Pediococcus pentosaceus* P107 pela técnica de *spray drying* utilizando como material de parede soro de queijo, pectina e xantana.** 2019. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2019.

BORDINI, F.W. *et al.* Influence of different encapsulating materials on the viability of *Pediococcus pentosaceus* P107 microencapsulated by spray drying, **Preprint**, p.1-23, 2021.

CANCINO-CASTILLO *et al.* Effective microencapsulation of *Enterococcus faecium* in biopolymeric matrices using spray drying. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.104, n.22, p.9595-9605, 2020.

CARMO, E.L.; FERNANDES, R.V.B.; BORGES, S.V. Microencapsulação por *spray drying*, novos biopolímeros e aplicações na tecnologia de alimentos. **The Journal of Engineering and Exact Sciences**, v.1, n.2, p.30-44, 2015.

CARVALHO, K. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La 5 com dextrina de mandioca agente encapsulante e aplicação na formulação de preparado sólido para refresco.** 2018. 80f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Medianeira, 2018.

CHAIKHAM, P. *et al.* Activities of free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA5 or *Lactobacillus casei* 01 in processed longan juices on exposure to simulated gastrointestinal tract. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.93, n.9, p.2229-2238, 2012.

COGHETTO, C.C. *et al.* Electrospraying microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. **Journal of Functional Foods**, v.24, p.316-326, 2016.

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, p.1024–1039, 2004.

CORTI, D.; BITTENCOURT, P.R.S.; DRUNKLER, D.A. Use of milk protein and maltodextrin in the microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*: a model approach. **Acta Scientiarum. Technology**, v.39, p.573-577, 2017.

COSTA, N.A. *et al.* Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, in vitro release behavior, storage stability and physicochemical properties. **Food Research International**, v.164, 112367, 2023.

DADI, D.W. *et al.* Effects of spray drying process parameters on the physical properties and digestibility of the microencapsulated product from *Moringa stenopetala* leaves extract. **Cogent Food & Agriculture**, v.5, n. 1690316, p.1-12, 2019.

DAFE, A. *et al.* Investigation of pectin/starch hydrogel as a carrier for oral delivery of probiotic bacteria. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.97, p.536-543, 2017.

DODOO, C.C. *et al.* Targeted delivery of probiotics to enhance gastrointestinal stability and intestinal colonisation. **International Journal of Pharmaceutics**, v.530, n.1-2, p.224-229, 2017.

DROSOU, C.; KROKIDA, M.; BILIADERIS, C.G. Composite pullulan-whey protein nanofibers made by electrospinning: Impact of process parameters on fiber morphology and physical properties. **Food Hydrocolloids**, v.77, p.726-735, 2018.

DU, Q. *et al.* The complex of whey protein and pectin: Interactions, functional properties and applications in food colloidal systems - A review. **Colloids and Surfaces. B, Biointerfaces**, v.210, 112253, p.1-13, 2022.

ECKERT, C. **Bactérias lácticas: avaliação da resistência ao trato gastrintestinal simulado e encapsulamento com soros lácteos**. 2016. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) - Universidade do Vale do Taquari - Lajeado, 2016.

FRAKOLAKI, G. *et al.* A review of the microencapsulation techniques for the incorporation of probiotic bacteria in functional foods. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.61, n.9, p.1515-1536, 2021.

FREIRE, T.T. *et al.* Lactic acid bacteria its characteristics and importance: review. **Research, Society and Development**, v.10, n.11, e513101119964, p.1-19, 2021.

FRITZEN-FREIRE, C.B. *et al.* Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v.45, n.1, p.306-312, 2012.

GEBARA, C. *et al.* Viability of *Lactobacillus acidophilus* La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.51, p.872-878, 2013.

GOH, Y.J.; BARRANGOU, R.; KLAENHAMMER, T.R. *In vivo* transcriptome of *Lactobacillus acidophilus* and colonization impact on murine host intestinal gene expression. **mBio**, v.12, n.1, e03399-20, 2021.

GOLOWCZYC, M.A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, n.1, p.7-12, 2010.

GRANATO, D. *et al.* Functional foods: product development, technological trends, efficacy testing, and safety. **Annual Review of Food Science and Technology**, v.11, p.93-118, 2020.

GRUSKIENE, R.; KRIVOROTOVA, T.; SEREIKAITĖ, J. Nisin-loaded pectin and nisin-loaded pectin-inulin particles: Comparison of their proteolytic stability with free nisin. **LWT - Food Science and Technology**, v.82, p.283-286, 2017.

GUERIN, J. *et al.* *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovation matrices. **Journal of Food Engineering**, v.193, p.10-19, 2017.

GUIDA, F. *et al.* Altered gut microbiota and endocannabinoid system tone in vitamin D deficiency-mediated chronic pain. **Brain, Behavior, and Immunity**, v.85, p.128-141, 2020.

HE, C. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus* in low-methoxyl pectin-based microcapsules stimulates biofilm formation: enhanced resistances to heat shock and simulated gastrointestinal digestion. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.69, p.6281-6292, 2021.

HEMARAJATA, P.; VERSALOVIC, J. Effects of probiotics on gut microbiota: mechanisms of intestinal immunomodulation and neuromodulation. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n.1, p.39-51, 2013.

HENRIQUES, M.H.F. *et al.* Liquid whey protein concentrates as primary raw material for acid dairy gels. **Food Science and Technology**, v.40, n.2, p.361-369, 2020.

HILL, C. *et al.* Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v.11, n.8, p.506-514, 2014.

HOYOS-LEYVA, J.D. *et al.* Physical and chemical stability of L-ascorbic acid microencapsulated into taro starch spherical aggregates by spray drying. **Food Hydrocolloids**, v.83, p.143-152, 2018.

JÄGER, R. *et al.* International Society of Sports Nutrition Position Stand: Probiotics. **Journal of the International Society of Sports Nutrition**, v.16, n.1, 62, 2019.

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**. 115, p.1029-1036, 2013.

JAYA, S.; DAS, H. Effect of maltodextrin, glycerol monostearate and tricalcium phosphate on vacuum dried mango powder properties. **Journal of Food Engineering**, v.63, n.2, p.125-134, 2004.

KAMIL, R.Z. *et al.* Microencapsulation of indigenous probiotic *Lactobacillus plantarum* Dad-13 by spray and freeze-drying: strain-dependent effect and its antibacterial property. **Food Research**, v.4, n.6, p. 2181-2189, 2020.

KOH, W.Y. *et al.* Encapsulated Probiotics: Potential Techniques and Coating Materials for Non-Dairy Food Applications. **Applied Sciences**, v.12, n.19:10005, 2022.

KOWALSKA, E. *et al.* Materials used for the microencapsulation of probiotic bacteria in the food industry. **Molecules**, v.27, n.3321, p.1-19, 2022.

KRASAEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v.57, p.761-766, 2014.

KRUNIĆ, T.Ž.; OBRADOVIĆ, N.S.; RAKIN, M.B. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. **Food Chemistry**, v.293, p.74-82, 2019.

KUSIO, K. *et al.* Effect of whey protein concentrate on physicochemical, sensory and antioxidative properties of high-protein fat-free dairy desserts. **Applied Sciences**, v.10, n.7064, p.1-16, 2020.

KYOMUGASHO, C *et al.* FT-IR spectroscopy, a reliable method for routine analysis of the degree of methylesterification of pectin in different fruit- and vegetable-based matrices. **Food Chemistry**, v.1, n.176, p.82-90, 2015.

LEYLAK, C. *et al.* Optimisation of spray drying parameters for *Lactobacillus acidophilus* encapsulation in whey and gum arabic: its application in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.112, 104865, p.1-17, 2021.

LI, M. *et al.* Preparation of *Bifidobacterium breve* encapsulated in low methoxyl pectin beads and its effects on yogurt quality. **Journal of Dairy Science**, v.102, p.1-12, 2019.

LOPES, L.A.A. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-05 and incorporation in vegan milks: Physicochemical characteristics and survival during storage, exposure to stress conditions, and simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v.135, n.109295, p.1-8, 2020.

MA, J. *et al.* Electro-encapsulation of probiotics in gum Arabic-pullulan blend nanofibres using electrospinning technology. **Food Hydrocolloids**, v.111, n.106381, p.1-28, 2021.

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

MAHMOUD, M. *et al.* Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v.6, n.3, e03541, p.1-14, 2020.

MEDEIROS, S.K. *et al.* Electronic and optical properties of CaCO₃ Calcite, and excitons in Si@ CaCO₃ and CaCO₃@ SiO₂ core-shell quantum dots. **Journal of Physics D: Applied Physics**, v.40, n.18, p.5747, 2007.

MALVERN. **Inform White Paper Dynamic Light Scattering**. Malvern: Malvern Instruments Worldwide, 2011. p.1-6. Disponível em: <[http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003060/\\$file/MRK1764-01_INFORM_DLS%20terms%20defined.pdf](http://www.malvern.com/malvern/kbase.nsf/allbyno/KB003060/$file/MRK1764-01_INFORM_DLS%20terms%20defined.pdf)>. Acesso em: 10 fev. 2023.

MENEZES, L.A.A. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando extrato de soja e maltodextrina**. 2015. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos) – Universidade Tecnológica do Paraná, Medianeira, 2015.

MENEZES, C.R. *et al.* Microencapsulação de probióticos: avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, v.43, n.7, p.1309-1316, 2013.

MENEZES, M.F.S. C. *et al.* Improvement of the viability of probiotics (*Lactobacillus acidophilus*) by multilayer encapsulation. **Ciência Rural**, v.49, n.9, p.1-10, 2019.

MINEKUS, M. *et al.* A standardised static in vitro digestion method suitable for food – An international consensus. **Food & Function**, v.5, p.1113-1124, 2014.

MOGHANJOUGI, Z.M. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and *Bifidobacterium animalis* BB-12 in pectin and sodium alginate: A comparative study on viability, stability, and structure. **Food Science & Nutrition**, v.9, n.9, p.5103-5111, 2021.

MOGHBELI, S. *et al.* A Taguchi approach optimization of date powder production by spray drying with the aid of whey protein-pectin complexes. **Powder Technology**, v.359, p.85-93, 2020.

- MORALES, E.A.C. *et al.* Comparison of low- and high-methoxyl pectin for the stabilization of whey protein isolate as carrier for lutein. **Food Hydrocolloids**, v.113, n.106458, p.1-20, 2021.
- MORALES-MEDINA, R. *et al.* Structure, controlled release mechanisms and health benefits of pectins as an encapsulation material for bioactive food components. **Food & Function**, v.13, p.10870-10881, 2022.
- MORGAN, C.A.; HERMAN, N.; WHITE, P.A.; VESEY, G. Preservation of micro-organisms by drying; A review. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 183-193, 2006.
- MUHAMMAD, Z. *et al.* Resistant starch-based edible coating composites for spray-dried microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, comparative assessment of thermal protection, *in vitro* digestion and physicochemical characteristics. **Coatings**, v.11, n.587, p.1-21, 2021.
- NASCIMENTO, K.M. **Desenvolvimento de microcápsulas de compostos bioativos de barbatimão (*Stryphnodendron adstringens (mart.) coville*) para aplicação em filmes biodegradáveis ativos**. 2018. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Maringá, Maringá, 2018.
- NUNES, G.L. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* la-5 and *Bifidobacterium* bb-12 by spray drying and evaluation of its resistance in simulated gastrointestinal conditions, thermal treatments and storage conditions. **Ciência Rural**, v.48, n.6, p.1-11, 2018.
- OLIVEIRA, G.S.; COSTA, J.M.C.; AFONSO, M.R.A. Caracterização e comportamento higroscópico do pó da polpa de cajá liofilizada. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v.18, n.10, p.1059–1064, 2014.
- OUST, A. *et al.* FT-IR spectroscopy for identification of closely related lactobacilli. **Journal of Microbiological Methods**, v.59, p.149-162, 2004.
- PEDROSO, D.L. *et al.* Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v.26, n.2, p.127-132, 2012.
- PEREIRA, K.C. *et al.* Microencapsulação e liberação controlada por difusão de ingredientes alimentícios produzidos através da secagem por atomização: revisão. **Brazilian Journal of Food Technology**, v.21, e2017083, p.1-9, 2018.
- PIÑÓN-BALDERRAMA, C.I. *et al.* Encapsulation of active ingredients in food industry by spray-drying and nano spray-drying technologies. **Processes**, v.8, n.8, 889, 2020.
- PINTO, S.S. *et al.* Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v.67, p.400-408, 2016.

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 Bioprocess Processing**, v. 91, n. 4, p.362-369, 2013.

PLAZA-DIAZ, J. *et al.* Mechanisms of action of probiotics. **Advances in Nutrition**, v.10, p.S49-S66, 2019.

RAEI, M.; RAFE, A.; SHAHIDI, F. Rheological and structural characteristics of whey protein-pectin complex coacervates, **Journal of Food Engineering**, v.228, p.25-31, 2018.

RANADHEERA, C.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. **Small Ruminant Research**, v.123, n. 1, p.155-159, 2015.

RODRÍGUEZ-RESTREPO, Y.A.; GIRALDO, G.I.; RODRÍGUEZ-BARONA, S. Solubility as a fundamental variable in the characterization of wall material by spray drying of food components: Application to microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *Lactis*. **Journal of Food Process Engineering**, v.40, p.1-8, 2017.

SANTACROCE, L.; CHARITOS, I. A.; BOTTALICO, L. A successful history: probiotics and their potential as antimicrobials. **Expert Review of Anti-Infective Therapy**, v.17, n.8, p.635-645, 2019.

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

SELOMULYA, C.; FANG, Y. Food powder rehydration. In: **Handbook of Food Powders**. Woodhead Publishing Series in Food Science, Technology and Nutrition, 2013. Cap.15, p.379-408.

SOUZA, H.J.B. *et al.* Hygroscopic, structural, and thermal properties of essential oil microparticles of sweet orange added with cellulose nanofibrils. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.44, n.3, p.,1-13. 2020.

SHARIFI-RAD, J. *et al.* Probiotics: Versatile bioactive components in promoting human health. **Medicina (Lithuania)**, v.56, n.9, p.1-30, 2020.

SHORI, A.B. Microencapsulation improved probiotics survival during gastric transit. **HAYATI Journal of Biosciences**, v.24, n.1, p.1-5, 2017.

SMISTAD, G. *et al.* The potential of pectin as a stabilizer for liposomal drug delivery systems. **Carbohydrate Polymers**, v.90, p. 1337–1344, 2012.

SILVA, S.A.D. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactiplantibacillus plantarum* em alginato e gelatina: estudo da produção, caracterização e estabilidade visando aplicação em alimentos**. 2021. Dissertação (Mestrado em Nutrição) – Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2021.

SILVA, M.P. *et al.* Application of spray chilling and electrostatic interaction to produce lipid microparticles loaded with probiotics as an alternative to improve resistance under stress conditions. **Food Hydrocolloids**, v.83, p.109-117, 2018.

SILVA, N.F. *et al.* Caracterização *in vitro* de propriedades probióticas de bactérias ácido lácticas. **Revista Brasileira de Tecnologia Agroindustrial**, v.15, n.1, p.3556-3572, 2021.

SILVA, P.T. *et al.* Microencapsulação de probióticos por spray drying: avaliação da sobrevivência sob condições gastrointestinais simuladas e da viabilidade sob diferentes temperaturas de armazenamento. **Ciência Rural**, v.45, n.7, p.1342-1347, 2015a.

SILVA, T.M. *et al.* Coacervação complexa: uma técnica para a encapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v.37, n.5, p.49-55, 2015b.

ŠIPAILIENĖ, A.; PETRAITYTĖ, S. Encapsulation of probiotics: Proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.10, n.1, p.1-10, 2018.

SLAVUTSKY, A.M. *et al.* Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in a Pilot-Plant Spray-Dryer. Effect of Process Parameters on Cell Viability. **Journal of Food Process Engineering**, v.40, n.2, 2017.

SOUSA, A.L.N. *et al.* Modificação química da pectina do melão caipira (*Cucumis melo var. acidulus*). **Química Nova**, v.40, n.5, p.554-560, 2017.

SUN, Q. *et al.* Preparation and optimization of soy protein isolate–high methoxy pectin microcapsules loaded with *Lactobacillus delbrueckii*. **International Journal of Food Science and Technology**, v.49, p.1287-1293, 2014.

TERPOU, A. *et al.* Probiotics in food systems: significance and emerging strategies towards improved viability and delivery of enhanced beneficial value. **Nutrients**, v.11, n.7, 1591, 2019.

VANISKI, R.; CORTI, D.; DRUNKLER, D.A. Técnicas e materiais empregados na microencapsulação de probióticos. **Brazilian Journal of Food Research**, v.8, n.1, p.156-184, 2017.

VANISK, R. *et al.* Improvement of *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulation viability by spray-drying with rice bran protein and maltodextrin. **Journal of Food Processing and Preservation**, v.45, n.4, p.1-13, 2021.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with *Lactobacillus rhamnosus* GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v.157, n.2, p.319-321, 2012.

XIE, H. *et al.* Whey protein hydrolysates as prebiotic and protective agent regulate growth and survival of *Lactobacillus rhamnosus* CICC22152 during spray/freeze-

drying, storage and gastrointestinal digestion. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, 10.1002/jsfa.12218. Advance online publication.

YAO, M. *et al.* Progress in microencapsulation of probiotics: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v.19, n.2, p.857-874, 2020.

YASMIN, I., *et al.* Development of Whey Protein Concentrate-Pectin-Alginate Based Delivery System to Improve Survival of *B. longum* BL-05 in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.11, p. 413-426, 2019.

YOHA, K.S. *et al.* Targeted delivery of probiotics: perspectives on research and commercialization. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v.14, n.1, p.15-48, 2022.

YONEKURA, L. *et al.* Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fiber by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v.6, p.205-214, 2014.

YU, H. *et al.* Targeting delivery system for *Lactobacillus plantarum* based on functionalized electrospun nanofibers. **Polymers**, v.12, n.7, p.1-12, 2020.

ZHANG, Y. *et al.* Formation and characterization of noncovalent ternary complexes based on whey protein concentrate, high methoxyl pectin, and phenolic acid. **Journal of Dairy Science**, v.105, n.4, p. 2963-2977, 2022.

ZHOU, W. *et al.* Storage stability and skin permeation of vitamin C liposomes improved by pectin coating. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 117, p. 330–337, 2014.