



UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA



DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÁPSULAS
PROBIÓTICAS CONTENDO *LACTOBACILLUS*
*RHAMNOSUS***

SUSIANY PEREIRA LOPES

RECIFE

2016

SUSIANY PEREIRA LOPES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÁPSULAS
PROBIÓTICAS CONTENDO *LACTOBACILLUS*
*RHAMNOSUS***

Dissertação de mestrado apresentada ao programa de Pós- Graduação em Química como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Química pela Universidade Federal Rural de Pernambuco

Orientador : Luciano Avallone Bueno

Co-orientador: Christine Lamenha Luna Finkler

***Bolsista CAPES**

RECIFE

2016

Ficha Catalográfica

L864d Lopes, Susiany Pereira.
Desenvolvimento e caracterização de cápsulas
probióticos
contendo lactobacillus Rhamnosus / Susiany Pereira
Lopes. –
Recife, 2016.
101 f.: il.

Orientador(a): Luciano Avallone Bueno.
Dissertação (Programa de Pós-Graduação em
Química) –
Universidade Federal Rural de Pernambuco,
Departamento de
Química, Recife, 2016.
Inclui referências.

1. Encapsulação. 2. Alginato. 3. Lactobacilos.
I. Bueno, Luciano Avallone, orientador. II. Título

CDD

SUSIANY PEREIRA LOPES

**DESENVOLVIMENTO E CARACTERIZAÇÃO DE CÁPSULAS
PROBIÓTICAS CONTENDO *LACTOBACILLUS*
*RHAMNOSUS***

DISSERTAÇÃO AVALIADA E APROVADA PELA BANCA EM
11/03/2016

Prof^o Dr. Luciano Avallone Bueno (Departamento de Física da UFRPE)

Orientador

Prof^a Dr^a. Maria Inês Sucupira Maciel (Titular, membro interno, UFRPE)

1º Examinador

Prof^o Dr. Clécio Souza Ramos (Titular, membro interno, UFRPE)

2º Examinador

Prof^a Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler (Titular, membro externo,
UFPE)

Coorientadora

Leandro Finkler (Departamento de Nutrição, membro externo, UFPE)

Suplente

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus por nortear minha vida.
Aos meus pais, principalmente a minha mãe Sonia,
pelo exemplo de incentivo, amor e carinho.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para eu seguir em frente com os meus objetivos e não desanimasse com as dificuldades.

A minha mãe Sonia Pereira que esteve presente me apoiando e me dando forças para que eu continuasse na luta durante essa etapa da minha vida. Obrigada por acreditar em mim, mesmo quando eu não acreditava. Vovê é minha fortaleza é meu tudo.

Ao meu pai, João por tudo que você me proporcionou a chegar até aqui.

A meu noivo Ednilson Barros por sempre está do meu lado em todos os momentos me apoiando nas minhas escolhas. Obrigado pelo o amor e pela paciência principalmente neste período.

Ao meu orientador prof. Dr. Luciano Avallone Bueno, pelos conhecimentos compartilhados, pela liberdade e confiança referente ao trabalho além da oportunidade em fazer parte da sua equipe.

Ao laboratório de Bioprocessos que me acolheu e principalmente ao Gabriel, que estava ali do meu lado para ensinar e tirar todas as minhas dúvidas, e olhe que não foram poucas.

Ao laboratório de Bromatologia, em especial ao Silvio que foi bem prestativo e sempre disposto a me ajudar.

Ao laboratório do LIKA, em especial ao Rafael pelos dados presentes na minha dissertação.

As amigas de laboratório Liany e Francielly que foram pessoas essenciais que de maneira direta ou indiretamente me ajudaram neste trabalho.

As amigas que fiz durante o mestrado Giselle e Edna que desde os grupos de estudos até as angústias do dia a dia estiveram sempre dispostas a me ajudar de forma significativa.

Ao amigo Tibério que desde o início da seleção do mestrado me ajudou e me deu o maior incentivo.

A todo o corpo docente do Programa de Pós Graduação em Química pelos conhecimentos que adquiri.

E em especial a minha Co-orientadora Prof^a Dr^a Christine Lamenha Luna Finkler, que me ajudou muito no desenvolvimento desse trabalho, com a sua paciência e serenidade me mostrou o melhor caminho a seguir. Uma profissional ímpar de grande conhecimento, competência, humildade e de um coração de ouro. Saibas que levarei para o resto da vida.

RESUMO

A encapsulação é uma técnica que pode ser empregada para a proteção de probióticos, conferindo-os resistência ao ambiente ácido do trato gastrintestinal, bem como viabilizando sua aplicação em produtos lácteos fermentados. O presente estudo teve como objetivo avaliar as melhores concentrações de encapsulamento de *L. rhamnosus* utilizando alginato de sódio, pectina e gelatina. Foram realizados dois planejamentos experimentais para cápsulas contendo alginato e gelatina e pectina e gelatina. As variáveis investigadas foram as concentrações dos polímeros e a variável resposta foi a concentração de células viáveis nas cápsulas. A maior concentração de células viáveis ($4,2 \times 10^9$ UFC/g) foi obtida para as concentrações de 1 % de alginato e 0,1 % de gelatina, sendo que a concentração de alginato foi a variável que influenciou de forma mais significativa a variável resposta, atingindo um efeito estimado negativo de -4,59. A avaliação estatística dos resultados das microcápsulas obtidas com pectina não foi satisfatória. Os resultados do Infravermelho mostraram que as três amostras analisadas continham o alginato, estas apresentaram picos muito próximos de 3400 cm^{-1} para 3454 cm^{-1} em relação ao grupo O-H. Nos espectros das microcápsulas observamos um pico com intensidade entre 1637 cm^{-1} e 1639 cm^{-1} comprovando a presença do grupo funcional $-\text{CONH}_2$ que está presente na gelatina, visto que o alginato puro não apresentou esse pico. A análise térmica do material indicou uma temperatura de transição vítrea (T_g) acima da temperatura de armazenamento das microcápsulas, o que garante a cristalização das microcápsulas. Após 120 dias de armazenamento sob refrigeração as cápsulas atingiram a concentração de 10^5 UFC/ml, sendo ainda adequadas para a sua incorporação em alimentos. Com relação a incorporação das microcapsulas e das células livres no fermentado de leite, as células livres obtido pela adição de de *L. rhamnosus* ATCC 7469, apresentou a contagem mínima necessária para um produto ser considerado probiótico. As microcápsulas produzidas através da técnica de extrusão com alginato como agente encapsulante foram adequadas para a microencapsulação destes probióticos, enquanto que as microcápsulas obtidas com pectina não foram satisfatórias.

Palavra Chave: encapsulação; alginato, lactobacilos.

ABSTRACT

Encapsulation is a technique that can be used for the protection of probiotics, conferring resistance to the acidic environment of the gastrointestinal tract allowing its use in fermented milk products. The present study had as objective evaluates the best encapsulation concentrations of *L. rhamnosus* using alginate of sodium, pectin and gelatin. Two experimental designs were conducted to capsules containing alginate and gelatin and pectin and gelatin. The variables investigated were concentrations of polymer and the dependent variable was the concentration of viable cells in the capsules. The highest concentration of viable cells (4.2×10^9 CFU/g) was achieved for concentrations of 1 % alginate and 0.1 % gelatin, whereas the concentration of alginate was variable that affected the response variable most significantly, reaching a negative estimated effect of -4.59. Statistical evaluation of the results obtained with microcapsules of pectin was not satisfactory. Results of IR spectra show that the three samples that were analyzed contain the alginate. The spectra shows peaks due to O-H group in the region of $3400\text{--}3454\text{ cm}^{-1}$. The spectra of Microcapsules shows a peak between 1637 cm^{-1} and 1639 cm^{-1} confirming the presence of the functional group -CONH_2 that is present in the gelatin, whereas pure alginate does not show this peak. Thermal analysis of the material indicates a glass transition temperature (T_g) above the storage temperature of the microcapsules, which ensures the crystallization of the microcapsules. After 120 days of storage under refrigeration capsules have reached the concentration of 10^5 UFC/mL, still being suitable for incorporation in food. Regarding the incorporation of the microcapsules and the free cells in the fermented milk, the free cells obtained by addition of *L. rhamnosus* ATCC 7469, presented the minimum score needed for a product to be considered probiotic. The microcapsules produced by the extrusion technique with alginate as encapsulating agents were suitable for microencapsulation of these probiotics, while microcapsules obtained were not satisfactory with pectin.

Key Word: Encapsulation, alginate, lactobacillus.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – As bactérias patogênicas e não patogênicas competindo por nutrientes.	20
Figura 2 - Mecanismos de ação dos probióticos	21
Figura 3 - Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B).	27
Figura 4 – Esquema da técnica de <i>spray drying</i>	28
Figura 5 – Esquema de processo geral para a preparação de microcápsulas por coacervação. (1) de água; (2) material do núcleo; (3) de polímero; (4) revestimento de deposição do polímero em cima do núcleo material; (5) microcápsulas.....	29
Figura 6 – Representação esquemática do procedimento de emulsificação.....	30
Figura 7 – Diagrama esquemático de frascos carregados em uma câmara de um secador de gelo.	30
Figura 8 – Técnica de extrusão. Agulha simples gotejando por ar conduzido (a); Dispositivo de disco fixado (b).	31
Figura 9 – Estrutura química do alginato de sódio	35
Figura 10 – Estrutura química das regiões de blocos MM, GG e MG. Os blocos homopoliméricos M- e G- e os blocos heteropoliméricos MG- constituem a molécula de alginato. Em (A) tem-se uma sequência M—M; em (B) uma sequência G—G e em (C) uma sequência M—G—M.	35
Figura 11 – Interação dos blocos G na presença de íons Ca^{+2} modelo “Egg-box” .	37
Figura 12 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.	39
Figura 13 – Estrutura química parcial da gelatina	40
Figura 14 - Estrutura química parcial da pectina.	42
Figura 15 – Pectina de alto e baixo teor de metoxilação	43
Figura 16 – Estrutura da pectina	44
Figura 17 – Mecanismo de gelificação da pectina.....	45
Figura 18 – Sistema de extrusão para a obtenção das cápsulas de alginato de sódio	50
Figura 19 – Microcápsulas em repouso em solução de $CaCl_2$	51
Figura 20 – Grânulos de alginato de cálcio.	51

Figura 21 – Microcápsulas armazenadas para estudo de viabilidade.	54
Figura 22 – Curva de crescimento celular de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> em meio caldo MRS	56
Figura 23 – Superfície de resposta para a concentração de células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.	58
Figura 24 – Curva de contorno para a concentração de células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.	58
Figura 25 – Gráfico de Pareto para a concentração de células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.	59
Figura 26 – Cápsulas úmidas de 1% alginato e 0,1% de gelatina	60
Figura 27 – Aspecto visual das microcápsulas após secagem	62
Figura 28 - Espectro infravermelho do alginato de sódio em KBr.	64
Figura 29 - Espectro infravermelho da cápsula úmida contendo alginato-gelatina em KBr.....	64
Figura 30 - Espectro infravermelho da cápsula desidratada contendo alginato-gelatina em KBr.	65
Figura 31 - Sobreposição das curvas DTA das microcápsulas úmida (1) e seca (2) .	67
Figura 32 - Sobreposição das curvas TGA das microcápsulas úmida (1) e seca (2), na razão de aquecimento de 10 °C.min ⁻¹	68
Figura 33 - Metalização das cápsulas	69
Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de alginato recobertas com gelatina (A) e (B). Aspecto externo da microcápsula (C). Aspecto interno da microcápsula (D).....	70
Figura 35 - MEV tamanho da microcápsulasde alginato	71
Figura 36 - MEV tamanho da microcápsulasde alginato	71
Figura 37 - Concentração de células viáveis de <i>Lactobacillus rhamnosus</i> durante o cultivo em leite inoculados com células livres e encapsuladas em alginato	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Planejamento fatorial completo empregado nos ensaios de encapsulação de <i>L. rhamnosus</i> em cápsulas de alginato e gelatina (2 variáveis e triplicata no ponto central).	49
Tabela 2 – Planejamento fatorial completo empregado nos ensaios de encapsulação de <i>L. rhamnosus</i> em cápsulas de pectina e gelatina (2 variáveis e triplicata no ponto central).	49
Tabela 3 - Concentração de células viáveis de <i>L. rhamnosus</i> em cápsulas de alginato revestidas com gelatina durante 120 dias de armazenamento a 8 °C.....	73

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	17
2.1	ALIMENTOS COM ALEGAÇÕES DE PROPRIEDADES FUNCIONAIS	17
2.2	PROBIÓTICOS.....	18
2.2.1	Bactérias Probióticas.....	22
2.2.2	O gênero <i>Lactobacillus</i>	24
2.3	ENCAPSULAÇÃO	26
2.4	POLÍMEROS COMO AGENTES ENCAPSULANTES	32
2.5	ALGINATO DE SÓDIO	34
2.6	GELATINA.....	38
2.7	PECTINA.....	42
3	OBJETIVOS	46
3.1	GERAL	46
3.2	ESPECÍFICOS	46
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
4.1	MATERIAIS	47
4.2	EQUIPAMENTOS	47
4.3	MICROORGANISMO	47
4.4	MANUTENÇÃO DA CULTURA.....	48
4.5	CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	48
4.6	ENSAIOS DE ENCAPSULAÇÃO	48
4.7	REVESTIMENTO DOS GRÂNULOS COM GELATINA.....	51
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	52
4.9	CARACTERIZAÇÃO DAS CÁPSULAS	52
4.9.1	Tamanho das cápsulas.....	52
4.9.2	Contagem de células viáveis	52
4.9.3	Atividade de água.....	53
4.9.4	Teor de umidade.....	53
4.9.5	Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR	53
4.9.6	Análise térmica.....	53
4.9.7	Avaliação da viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem.....	54

4.9.8	Microscopia eletrônica de varredura.....	54
4.9.9	Incorporação do probiótico no leite.....	55
4.9.10	Caracterização físico-química do leite probiótico	55
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	56
5.1	CURVA DE CRESCIMENTO CELULAR.....	56
5.2	ENSAIOS DE ENCAPSULAÇÃO	57
5.2.1	Microcápsulas de alginato e gelatina.....	57
5.2.2	Microcápsulas de pectina e gelatina.....	60
5.2.3	Atividade de água.....	61
5.2.4	Teor de umidade.....	62
5.2.5	Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR	63
5.2.6	Análise Térmica.....	66
5.2.7	Microscopia eletrônica de varredura.....	68
5.2.8	Avaliação da viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem.....	72
5.2.9	Incorporação do probiótico no leite.....	73
6	CONCLUSÃO	76
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	77

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, é crescente a busca dos consumidores por uma alimentação mais saudável, tanto para o seu bem estar como para a prevenção de determinadas doenças. Com esta tendência tem aumentado o interesse na pesquisa de alimentos com alegações com propriedades funcionais ao longo dos anos (SIMEONI et al., 2014).

São considerados funcionais os alimentos que além de fornecerem uma nutrição básica, tem a capacidade de promover a saúde. Salieta-se que esse efeito restringe-se à promoção da saúde e não à cura da doença (PRAVST, 2011). Entre os diversos tipos de alimentos funcionais temos as vitaminas, os minerais, o suplemento, as ervas, os fitoquímicos (polifenóis e carotenóides) e os probióticos (JACKSON, PALIYATH, 2011).

Com busca de satisfazer o novo mercado, as bactérias probióticas estão sendo empregadas em uma grande variedade de alimentos e bebidas que compõem uma dieta normal, como iogurtes, queijos, sorvetes, sucos, chocolates, cereais e produtos cárneos (SIMEONI et al., 2014).

O termo probiótico é de origem grega e significa “para a vida”. São alimentos funcionais contendo microrganismos vivos que quando consumidos regularmente, produzem efeitos benéficos à saúde e ao bem estar, além de beneficiarem o hospedeiro no equilíbrio da microbiota intestinal (QUIGLEY, 2011; TAKEDA, 2014; ZHU ZENG et al., 2016).

Entre os microrganismos mais utilizados na preparação dos probióticos estão as bactérias lactoacidófilas dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e a levedura *Saccharomyces boulardii* (MEILE et al., 2008). O gênero *Lactobacillus* está sendo vastamente utilizado com propriedades benéficas ao hospedeiro humano, sendo utilizado com segurança na obtenção de produtos lácteos probióticos (JIMÉNEZ-PRANTEDA et al., 2012).

A encapsulação é uma técnica que pode ser empregada para a proteção de probióticos, conferindo-os resistência ao ambiente ácido do trato gastrointestinal, bem como viabilizando sua aplicação em produtos lácteos fermentados ou sucos de fruta. Entre os vários procedimentos de encapsulamento temos a microencapsulação, podendo ser empregadas diversas matrizes para a proteção de células microbianas do meio externo (ETCHEPARE et al., 2016).

A microencapsulação é um método em que pequenas partículas ou gotículas são rodeadas por um revestimento para produzir cápsulas de tamanhos na faixa de micrômetros ou milímetros, sendo denominadas de microcápsulas. Estas caracterizam-se por separar o seu principal ingrediente funcional, que nesse caso é o probiótico, do seu ambiente externo por meio de uma proteção de revestimento, fazendo com que ocorra esta separação de ingredientes a partir do núcleo (JYOTHI et al., 2012).

A microencapsulação pode ser aplicada em alimentos para a elaboração de produtos funcionais, sendo que as microcápsulas ou microesferas não devem interferir na textura original ou no sabor do alimento (VOS et al., 2010).

Os polímeros têm sido usados com bastante frequência na constituição da matriz, e podem ser degradados por microrganismos na microbiota intestinal, facilitando o direcionamento dos probióticos para o intestino humano. Uma série de polissacarídeos tem sido empregados para o encapsulamento de bioativos, sendo que o mais utilizado é o alginato, pois fornece as matrizes não-tóxicas com cloreto de cálcio, adequado para bactérias sensíveis (JIMÉNEZ-PRANTEDA et al., 2012).

O alginato de sódio é um biopolímero aniônico composto por cadeias lineares de ácido α -L-glucurônico e β -D-manurônico, as quais em presença de íons tais como Ca^{++} formam hidrogéis, filmes, esferas, micro e nanopartículas, com capacidade para encapsulamento de várias substâncias (PAULA et al., 2010). Trata-se de um dos polímeros mais aplicados como material encapsulante, sendo capaz de formar uma matriz altamente versátil, biocompatível e não tóxica para a proteção de componentes ativos, células e principalmente microrganismos probióticos sensíveis ao calor, pH, oxigênio, entre outros fatores em que os alimentos são expostos durante seu processamento e armazenamento (PASIN et al., 2012).

Os lactobacilos são bactérias Gram-positivas e anaeróbicas facultativas que atuam no intestino delgado. Algumas das espécies mais empregadas como probióticos são *Lactobacillus casei*, *L. rhamnosus* e *L. acidophilus*. Os lactobacilos impedem a proliferação de microrganismos não benéficos pela competição com locais de ligação e nutrientes e produzem ácidos orgânicos, que reduzem o pH intestinal, retardando o crescimento de bactérias patogênicas (FLESCH et al., 2014).

O principal desafio com relação à incorporação de microrganismos probióticos em alimentos é quanto à sua sobrevivência após o processamento e armazenamento (GAGGIA et al., 2011). A manutenção da vida de prateleira do

produto e a garantia da viabilidade dos microrganismos probióticos dependem das condições de armazenamento (temperatura variável e estresse oxidativo) e do ambiente do produto (alto teor de água, pH baixo, estresse osmótico), podendo resultar numa rápida redução de contagem de células viáveis (WÜRTH et. al., 2015).

A federação internacional de lácteos aconselha que a concentração mínima de células probióticas deve ser de 10^6 - 10^7 UFC / mL no final da vida de prateleira do produto (DING ; SHAH, 2009; TRIPATHI; GIRI, 2014). No Brasil, uma resolução da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), o REGULAMENTO TÉCNICO DE SUBSTÂNCIAS BIOATIVAS E PROBIÓTICOS ISOLADOS COM ALEGAÇÃO DE PROPRIEDADE FUNCIONAL/ E OU SAÚDE, diz que ‘A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante’ (BRASIL, 2008).

Muitos estudos descreveram que vários produtos comerciais, contendo leites fermentados, iogurtes, pós granulados e comprimidos continham menos do que a concentração de células indicada no rótulo (NUALKAEKUL et al. , 2013).

Neste contexto, o presente estudo tem como objetivo desenvolver e caracterizar cápsulas probióticas contendo *Lactobacillus rhamnosus* visando sua incorporação em alimentos.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 Alimentos com alegações de propriedades funcionais

Devido às mudanças impulsionadas pela sociedade moderna, tanto no seu estilo como na sua qualidade de vida, atualmente os consumidores estão dando preferência a produtos alimentares que tragam algum benefício a saúde (NUNES et al., 2016).

O comércio de alimentos com alegações de propriedades funcionais está crescendo pelo mundo por ser uma área atraente de estudo e inovação na indústria de alimentos. Entre as diversas vantagens apresentadas pela população, temos as propriedades medicinais que vão desde os valores nutricionais, sensoriais e fisiológicos no organismo (KONG et al., 2014).

A dieta-saúde representa um novo paradigma no estudo dos alimentos. Neste contexto, surge a compreensão de que a alimentação adequada exerce um papel além do que fornecer energia e nutrientes essenciais, ressaltando também a importância dos constituintes não nutrientes, que em associação, são identificados pela promoção de efeitos fisiológicos benéficos, podendo prevenir ou retardar doenças cardiovasculares, câncer, infecções intestinais, obesidade, dentre outras (FREITAS et al., 2012).

Os alimentos funcionais são aqueles que proporcionam benefícios para a saúde, incluindo a prevenção e o tratamento de doenças. Esses produtos podem ser nutrientes isolados, produtos de biotecnologia, suplementos dietéticos, alimentos geneticamente construídos, bem como alimentos processados e derivados de plantas (ASSMANN et al., 2014).

Portanto, o alimento funcional é aquele parecido em aspecto ao alimento convencional, consumido como parte de uma alimentação normal, capaz de produzir efeitos metabólicos ou fisiológicos desejáveis na manutenção da saúde. Há em sua composição uma ou mais substâncias capazes de agir no sentido de modular os processos metabólicos, melhorando as condições de saúde, promovendo o bem-estar das pessoas e prevenindo o aparecimento precoce de doenças degenerativas, que levam a uma diminuição da longevidade (CANDIDO; CAMPOS, 2005; PANG et al., 2012).

Esses alimentos fazem parte de uma nova percepção de alimento difundida pelo Japão na década de 80 através de um programa de governo que tinha como finalidade desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e apresentava uma grande expectativa de vida. Pelos mesmos motivos, a população brasileira vem buscando por esse tipo de dieta (MILLONE et al., 2011).

Vale ressaltar que as substâncias fisiologicamente ativas devem estar presentes nos alimentos funcionais em quantidades adequadas para produzir o efeito fisiológico desejado. Ou seja, não é suficiente que um determinado alimento contenha determinadas substâncias com propriedades funcionais fisiológicas para que ele seja imediatamente classificado como funcional (PACHECO; SGARBIERI; 2013).

Os alimentos que contém microrganismos probióticos são considerados alimentos com alegação de propriedade funcional. A aplicação de probióticos em alimentos aumentou como uma forma de agregar valores nutricionais e terapêuticos, e atualmente várias cepas estão sendo estudadas e exploradas comercialmente (ETCHEPARE et al., 2016).

A indústria de laticínios vem aumentando a disponibilidade de produtos funcionais, principalmente iogurtes, bebidas à base de soro de leite e outros leites fermentados, em que sua função é desempenhada devido à utilização de culturas probióticas e/ou adição de substâncias prebióticas, tendo como exemplo o oligossacarídeo. Mas deve-se ter um cuidado especial em relação à cultura probiótica utilizada, podendo ocasionar sabores estranhos ou *off-flavors* nos produtos finais (PANG et al., 2012; PROSAPIO et al., 2016).

2.2 Probióticos

Após os ensinamentos microbiológicos do revolucionário Louis Pasteur, Elie Metchnikoff sugeriu que além de agentes causadores de doenças, algumas bactérias produtoras de ácido láctico presente no leite fermentado poderiam ter efeitos benéficos na saúde humana. *Lactobacillus bulgaricus* foi o primeiro microrganismo utilizado com essa finalidade, sendo descoberto em 1905 por este microbiólogo russo (RUTAVA; WALKER; 2009; COMAN et al., 2013).

Em 1965, Lilly & Stillwell utilizaram pela primeira vez a palavra probiótico, que eram substâncias produzidas por protozoários que estimulavam o crescimento de outros microrganismos. Depois disso, vários trabalhos foram desenvolvidos para verificar a ação dos probióticos. Já em 1989, Fuller determinou que os probióticos como suplementos eram compostos de microrganismos vivos que beneficiavam a saúde do hospedeiro por meio do equilíbrio da microbiota intestinal.

Por volta de 1992, Havenaar et al. concluíram a definição de Fuller (1989), e estabeleceram que os probióticos se baseavam em uma ou várias misturas de culturas de microrganismos vivos que quando ingeridos por animais ou por seres humanos afetavam benéficamente o hospedeiro, aprimorando as propriedades da microbiota endógena.

O efeito benéfico dos probióticos na microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, provocando um aumento de resistência contra patógenos. Deste modo, a utilização de culturas bacterianas probióticas aumenta a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento à proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (CRUZ et al.,2012).

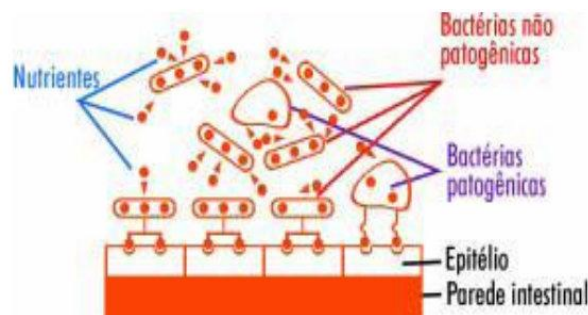
Os probióticos possuem vários benefícios nutricionais e à saúde, entre eles temos a promoção do sistema digestivo, a prevenção da infecção do trato urinário, a prevenção do cancro e a promoção da resposta imune. Além disso, exercem efeitos em indivíduos com intolerância a lactose, alergia a proteína do leite, doença de Crohn, diarreia, colesterol alto, retocolite ulcerativa e modulação ao sistema imune (BHAT et al., 2015).

Portanto, a segurança, especificidade, resistência e compatibilidade dos probióticos são fatores essenciais para seu uso como suplementos dietéticos ou preparados farmacológicos, em quantidade intraespecífica e variedade interespecífica, dessa forma aumentando o índice de colonização intestinal (MATOS, 2010).

O mecanismo de ação dos probióticos não está ainda bem esclarecido, sendo este um dos problemas enfrentados pela Autoridade Europeia de Segurança Alimentar (EFSA), pois vários processos podem atuar independentemente ou associados. Com isso, são diversos os mecanismos que levam ao equilíbrio da microbiota intestinal e que proporcionam os demais efeitos desejáveis (BUTEL, 2014).

Um dos mecanismos de ação mais aceitos é o da exclusão competitiva (Figura 1). De acordo com esse mecanismo, as bactérias probióticas ocupam sítios de ligação na mucosa intestinal, formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Deste modo, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço. Essa interação simbiótica impede uma produção excessiva de nutrientes, a qual desfavorece o estabelecimento dos competidores microbianos com potencial patogênico ao hospedeiro. Portanto, os probióticos impedem a multiplicação de seus competidores por meio de compostos antimicrobianos, principalmente bacteriocinas (PANDE et al., 2012).

Figura 1 – As bactérias patogênicas e não patogênicas competindo por nutrientes.

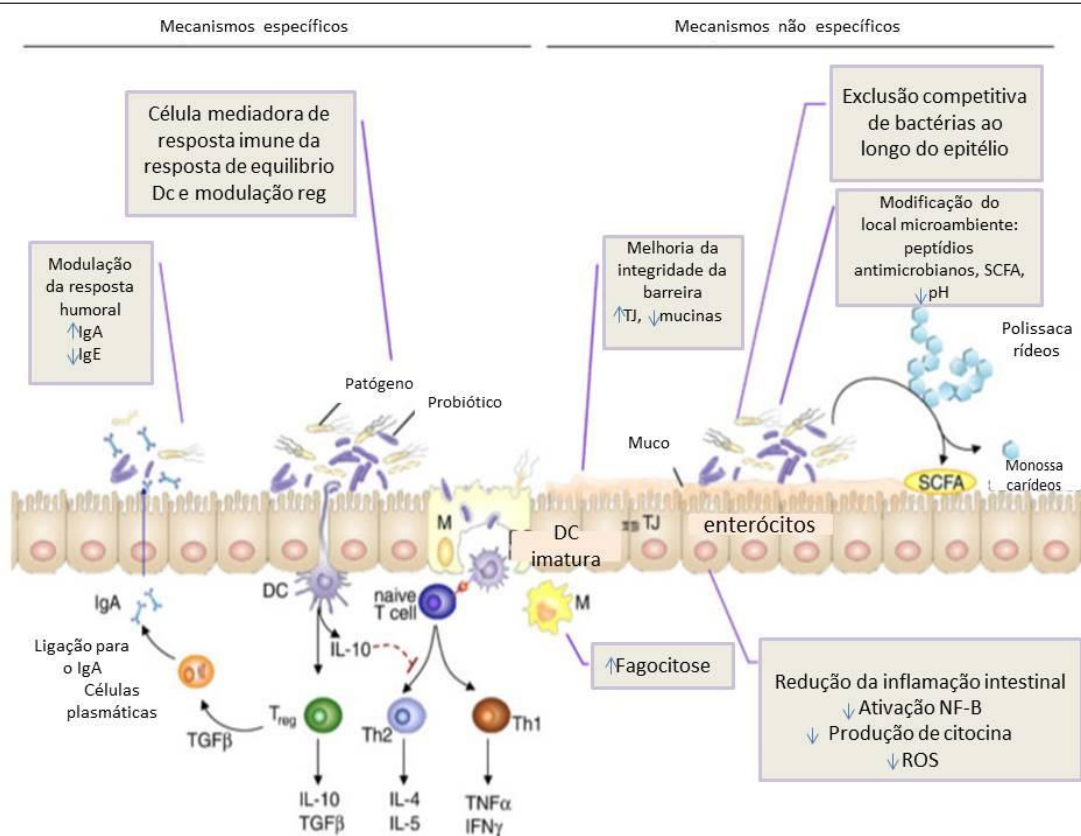


Fonte: FOX, 1988

Outro possível mecanismo de ação dos probióticos é a supressão do número de bactérias patogênicas através da produção de compostos com atividade antimicrobiana e enzimas. Em adição, a produção de ácido láctico diminui o pH e cria um ambiente químico desfavorável a determinadas bactérias patogênicas. Os patógenos são ainda afetados pelos probióticos por meio de ácidos orgânicos voláteis, peróxido de hidrogênio e pelo metabolismo celular, reduzindo a concentração de amônia no organismo e liberando enzimas como a lactase (IANNITTI; PALMIERI, 2010). O estímulo da imunidade do hospedeiro também pode ser citado como possível mecanismo de ação dos probióticos (FULLER, 1989). Os microrganismos probióticos estimulam tanto a resposta imunológica humoral específica, que promove a função do intestino como barreira intestinal, quanto à inespecífica, ajudando nos mecanismos imunológicos. Estimulam ainda que os macrófagos provoquem efeitos como aumento nos níveis de citocinas e aumento da atividade das células natural Killers ou dos níveis de imunoglobulinas (PATEL et al.,

2015). A Figura 2 mostra um resumo dos mecanismos de ação citados anteriormente.

Figura 2 - Mecanismos de ação dos probióticos



Legenda: Mecanismos específicos: envolvimento de probióticos em respostas imunes mediadas por células e humoral. Mecanismos inespecíficos: reforço da função de barreira epitelial, exclusão competitiva de bactérias ao longo do epitélio, a modificação do microambiente local e redução da inflamação intestinal. Th, célula T auxiliar; Ig, imunoglobulina; Treg, células T regulatórias; IL, interleucina; TGF, fator de transformação de crescimento; FNT, fator de necrose tumoral; IFN, interferon; M, M célula; DC, células dendríticas; TJ, junção apertado; MO, macrófagos; AGCC, ácidos graxos de cadeia curta; NF-κB, fator nuclear κB; ROS, espécies reativas de oxigênio.

Fonte: adaptado de LACONO et al. (2011)

Nas últimas décadas, os estudos com probióticos aumentaram consideravelmente. Por volta de 5.000 publicações descrevem seus benefícios à saúde, assim como a capacidade de obter células viáveis no momento de entrega no seu órgão alvo (GOVENDER et al., 2014). Devido a isto, o mercado mundial de probióticos em 2011 tinha um valor estimado de 27,9 bilhões e deverá chegar a 44,9 bilhões em 2018 (SYBESMA et al., 2015).

Embora os probióticos sejam comercializados a nível mundial, os mercados mais desenvolvidos para estes produtos estão localizados em países europeus, isto por terem um histórico em consumir produtos fermentados. No entanto, devido à crise europeia nos últimos anos, os probióticos estão ganhando credibilidade na América do Norte por ser este um dos maiores mercados do mundo (FRANZ et al., 2014).

Mesmo existindo várias evidências na literatura sobre os benefícios dos probióticos, ainda há certa dúvida em relação aos seus efeitos. Esta incerteza é ocasionada pela falta de reprodutibilidade dos dados, bem como de dúvidas a respeito de como esses microrganismos atingem o intestino. Isto principalmente porque os seus benefícios dependem da sua sobrevivência, colonização e multiplicação no hospedeiro (CHOTIKO; SATHIVEL, 2016).

Normalmente as quantidades de células viáveis variam de 10^9 a 10^{10} UFC / dose; no entanto, dependendo da estirpe bacteriana, alguns produtos tem se mostrado eficazes a níveis inferiores, enquanto que outros exigem maiores doses (MACIEL et al., 2014).

2.2.1 Bactérias Probióticas

As principais bactérias probióticas são aquelas pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*, além de outras bactérias como *Escherichia*, *Enterococcus* e *Bacillus*. São empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que têm sido isoladas de todas as porções do trato gastrointestinal do humano saudável (BUTEL, 2014). Essas bactérias, além de conferirem *flavor* aos produtos alimentícios aos quais forem adicionadas, fazem parte dos microrganismos capazes de exercer efeitos benéficos no hospedeiro (ROLIM et al., 2015).

Tanto o íleo terminal como o cólon parecem ser os locais de preferência para colonização intestinal dos lactobacilos e bifidobactérias (CHEOW et al., 2014). No entanto, deve-se salientar que o efeito de uma bactéria é específico para cada cepa, não podendo ser extrapolado para outras cepas da mesma espécie (GUARNER E MALAGELADA, 2003).

A escolha de bactérias probióticas tem como base os seguintes critérios: devem ser de origem humana; devem ser estáveis frente ao ácido e à bile; devem ser capazes de aderir à mucosa intestinal e de colonizar, ao menos temporariamente, o trato gastrointestinal humano; devem ter a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e de serem metabolicamente ativas no nível do intestino. Além disso, devem ter histórico de não patogenicidade e não devem estar associadas a outras doenças, tais como endocardite, além da ausência de genes determinantes da resistência aos antibióticos (SEMYONOV et al., 2011).

As bactérias lácticas são Gram-positivas, normalmente catalase negativas, não formam esporos e acumulam ácido lático no ambiente em que crescem como produto do metabolismo primário. Com isso, todos os componentes do grupo láctico são fastidiosos e estão presentes em ambientes nutricionalmente ricos, como vegetais, leite, carne e trato intestinal. São anaeróbios, anaeróbios facultativos ou microaerófilos (BARBOSA et al., 2016).

Estirpes de *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. produzem ácido lático, acético e propiônico, o que reduz localmente o pH e inibe o crescimento de uma grande variedade de patógenos Gram-negativos. Há um estudo que relata a sinergia de mecanismos: a diminuição do pH do meio pelo ácido lático permeabiliza a membrana das bactérias Gram-negativas, permitindo assim a ação de outras substâncias antimicrobianas (RUTAVA e WALKER, 2009).

Existe uma dificuldade em relação à classificação taxonômica das espécies, sendo que vários autores discutem este assunto. O gênero *Lactobacillus* engloba muitas espécies, sendo que algumas delas possuem genes diferentes umas das outras (CHÁVEZ-TAPIA et al., 2015).

O gênero *Lactobacillus* conta hoje com 56 espécies reconhecidas, das quais 5 contêm subespécies (*delbrueckii*, *aviarius*, *salivarius*, *coryniformis* e *paracasei*). Dezoito delas, presentes na microbiota intestinal de humanos, são consideradas de interesse como probióticos. Dentre as bactérias lácticas deste gênero, destacam-se *Lb. acidophilus*, *Lb. helveticus*, *Lb. casei* subsp. *paracasei* e subsp. *tolerans*, *Lb.*

paracasei, *Lb. fermentum*, *Lb. reuteri*, *Lb. johnsonii*, *Lb. plantarum*, *Lb. rhamnosus* e *Lb. salivarius* (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Dentre as bactérias pertencentes ao gênero *Bifidobacterium* destacam-se *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis*, *B. animalis*, *B. longum* e *B. thermophilum* (SANDERS e KLAENHAMMER, 2001). Somente cinco espécies de *Bifidobacterium* de origem humana (*B. longum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis* e *B. adolescentis*) têm atraído a atenção da indústria para a produção de produtos lácteos fermentados com fins terapêuticos (TURRONI et al., 2011).

As bacteriocinas, pequenos peptídeos antimicrobianos produzidos por *Lactobacillus* spp., têm um estreito espectro de ação e são sobretudo tóxicas para as bactérias Gram-positivas, ao criar poros na sua membrana plasmática ou intervir nas vias enzimáticas de algumas espécies. Algumas estirpes de *Bifidobacterium* spp. são produtoras de uma bacteriocina semelhante, capaz de atuar quer nas bactérias Gram-positivas, quer nas Gram-negativas (BARBOSA et al., 2015; LIU² et al., 2015).

Portanto, as bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, e seus benefícios tem sido cada vez mais explorados pela sua incorporação em diferentes tipos de alimentos (CHÁVARRI et al., 2010).

2.2.2 O gênero *Lactobacillus*

A procura pela presença dos lactobacilos na dieta humana cresceu desde o início do século XX (ALONSO e ISAY., 2007). Os *lactobacillus* são bactérias amplamente distribuídas no meio ambiente, principalmente em alimentos vegetais, no trato gastrintestinal e genital (ANTUNES et. al., 2007).

O gênero *Lactobacillus*, da família *Lactobacillaceae*, é dito como um grupo heterogêneo de bastonetes regulares que normalmente são largos e finos, que na maioria das vezes formam cadeias nas suas espécies, além de serem Gram-positivos, não esporulados e não flagelados. São estritamente fermentativos, armazenando ácido láctico no meio como produto do metabolismo, e dificilmente apresentam patogenicidade (ANTUNES et al., 2007). Com o avanço das análises filogenéticas nos anos de 1980, existiram muitas mudanças nesse gênero. Logo, o

gênero *Lactobacillus* contém várias espécies reconhecidas (ALONSO e ISAY, 2007; JAY, 1994.)

Esse gênero bacteriano possui o maior número de espécies tolerantes a meio ácido e normalmente associadas às fermentações de frutas, hortaliças, laticínios, carnes, etc. As bactérias lácticas (BLs) transformam o açúcar em lactato, sendo este um dos processos fermentativos mais importantes aplicados na tecnologia dos alimentos. Ainda que alguns conceitos sobre estes microrganismos venham sofrendo alterações, algumas características relativas à sua morfologia, que se apresenta na forma de cocos ou bastonetes, além da produção de ácido láctico como principal produto metabólico, permanecem inalteradas (COSTA et al., 2008).

O crescimento pertencente a este gênero pode ocorrer em temperaturas de 2 °C a 53 °C, com valores ótimos de 30 °C a 40 °C. Já com relação ao pH, o seu crescimento ocorre em valores iguais ou menores que 5, sendo considerados acidúricos, com diminuição da sua taxa de crescimento em meios neutros ou básicos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os *Lactobacillus* são microaerófilos ou anaeróbicos facultativos e, quando cultivados em meios sólidos, normalmente o seu crescimento é melhor em anaerobiose ou pressão de oxigênio reduzida e 5 a 10 % de CO₂. Nos seus meios usados para o crescimento, os lactobacilos dificilmente produzem pigmentos que, quando presentes, são amarelados, laranja-ferrugem ou vermelho-tijolo (BOTELHO, 2005; BADARÓ et al., 2008).

As espécies *Lactobacillus casei*, *Lb. paracasei*, *Lb. zae* e *Lb. rhamnosus*, que constituem o grupo taxonômico *Lactobacillus casei*, expõem comportamento fisiológico e necessidades nutricionais muito parecidas, multiplicando-se em condições ambientais bastante semelhantes. Seus efeitos benéficos são conferidos especialmente por meio da modulação da população e atividade da microbiota intestinal. As espécies *Lb. casei/paracasei* e *Lb. rhamnosus* compõem uma fração substancial da microbiota formada por *Lactobacillus* spp. na mucosa intestinal humana (ALONSO B. e ISAY S., 2007;).

Portanto, o grupo *Lactobacillus casei* tem grande importância comercial por causa da ampla diversidade de alimentos que podem ser obtidos, além de conferir aroma, sabor, textura e auxiliar na bioconservação dos alimentos pelo processo de acidificação (LIMA et al., 2014).

Lactobacillus rhamnosus GG é uma das bactérias probióticas mais estudadas

e tem sido empregada no tratamento de infecções gastrointestinais. Estudos demonstram que tem efeitos benéficos sobre a imunidade intestinal e, por consequência, é também eficaz na prevenção do início de doença atópica em crianças, em mães no período da gestação/lactação e/ou para os lactentes nos primeiros meses (VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015; CHEN et al, 2016).

Entre as características desejadas podem ser citadas a capacidade de sobreviver à passagem do trato gastrointestinal e a capacidade de adesão e posterior colonização. A ingestão de *L. rhamnosus* GG promove a diminuição do risco de diarreia relacionada ao rotavírus nosocomial em recém-nascidos, reduz a duração da diarreia aguda, diminui as infecções do trato respiratório superior entre as crianças em creches, diminui o risco de desenvolver eczema atópico, além de aliviar os sintomas de eczema e diminui o risco de cáries dentárias em crianças (LAAKSON et. al., 2011).

2.3 Encapsulação

A encapsulação é um processo no qual um material, denominado de núcleo ou recheio, é revestido por uma cobertura ou uma parede chamada encapsulante, que pode estar na forma de um filme fino ou de uma camada polimérica. Dessa forma, a cobertura ou material de parede são usados para envolver sólidos, líquidos ou gases, protegendo o núcleo do ambiente externo e evitando a sua exposição inadequada contra condições adversas do ambiente, como a luz, a umidade e o oxigênio (FERREIRA et al., 2009; PORTE et al., 2011).

Pode ser empregada para encapsular diversos materiais na indústria farmacêutica, como vitaminas, minerais e ácidos graxos. Outras aplicações incluem seu emprego em liberação de pesticidas em agroquímica, cosméticos, eletrônicos, biomedicina e processamento de materiais especiais (OLIVEIRA et al., 2009; FERNANDES et al., 2014).

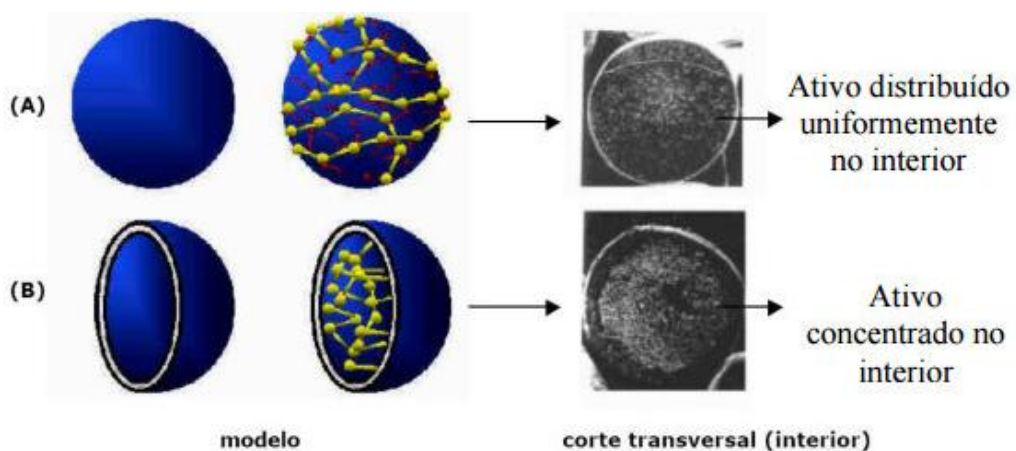
Na indústria alimentícia a encapsulação é utilizada para melhorar a estabilidade dos alimentos, aumentando o tempo de armazenamento e mantendo o seu valor nutritivo, assim como na encapsulação de microrganismos probióticos, melhorando a viabilidade das células e prevenindo a interação indesejável de substâncias alimentares em que o bioativo é incorporado (DIANAWATI et al., 2013).

A encapsulação de probióticos também é justificada com o intuito de melhorar a sobrevivência dos microrganismos sob as condições adversas como também a sua passagem pelo trato gastro intestinal (TGI), a fim de chegar ao intestino em um estado viável (ZOU et al., 2012).

A encapsulação controla a liberação de probióticos sob condições específicas, fazendo com que se prolongue a vida útil dos produtos por meio do aumento da viabilidade dos probióticos, que é afetada pela acidez, concentrações de ácido láctico e acético, temperatura de armazenamento, teor de oxigênio dissolvido e de peróxido de hidrogênio e pelo tipo e o conteúdo de agentes de encapsulação (KAMALIAN et al., 2014).

O processo de encapsulação origina partículas que podem ser divididas em três categorias de acordo com o seu tamanho: macro- ($> 5000 \mu\text{m}$), micro- ($0,2\text{-}5000 \mu\text{m}$) e nanocápsulas ($< 0,2\mu\text{m}$). Quanto à sua estrutura, podem ser formadas por um núcleo localizado na região central e circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, sendo denominadas de cápsulas, ou possuem uma geometria interna irregular, onde pequenas partículas de ingredientes ativos estão misturadas em uma matriz do agente encapsulante (esferas) (AZEREDO, 2005; SOHAIL et. al., 2011). A Figura 3 mostra a diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B).

Figura 3 - Diferença estrutural entre microesferas (A) e microcápsulas (B).

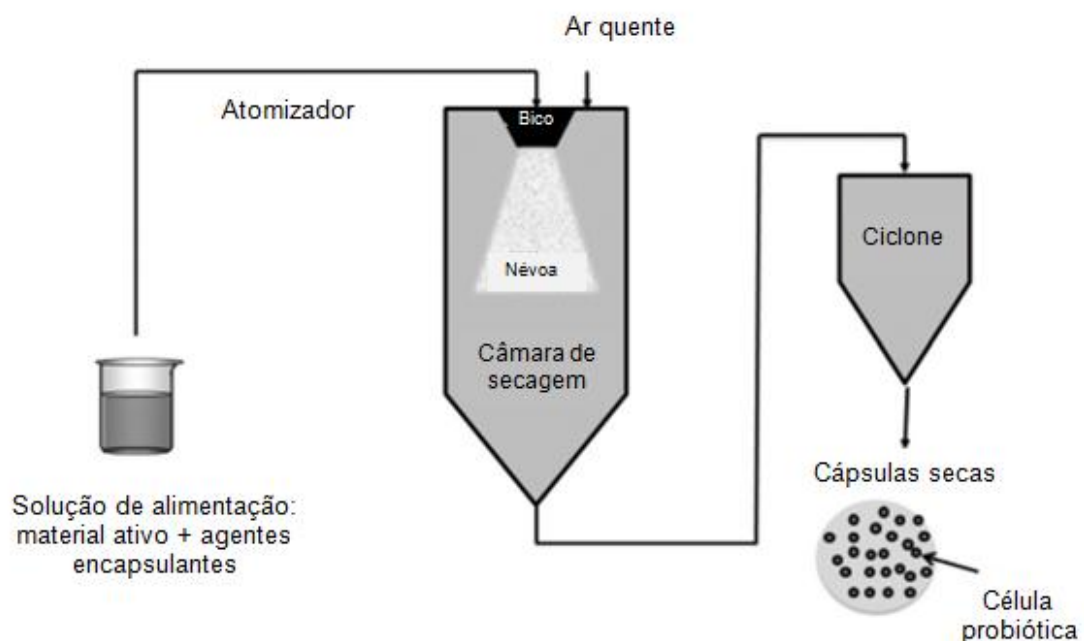


Fonte: BAZZO (2009)

Dentre os métodos de encapsulação podem ser citados o método de *spray drying*, coervação, emulsificação, liofilização e o método de extrusão (PRIANO et al., 2011; HE et al.,2015). A escolha da técnica de encapsulação irá depender do tipo do material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação almejado para a sua ação. Portanto, o que vai diferenciar entre as técnicas existentes é o tipo de envolvimento e o aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, sendo que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química (ASSUNÇÃO et al., 2014; ONWULATA , 2012).

A secagem por aspersão ou *spray drying* é umas das técnicas mais antigas empregadas para o encapsulamento de produtos alimentares Consiste em três etapas: a primeira fase é a pulverização de uma solução ou suspensão líquida em pequenas gotículas, em seguida ocorre a secagem por uma corrente de ar quente para produzir pequenas partículas sólidas e por fim a evaporação do solvente e a formação do produto sólido. Entretanto, tanto a viabilidade quanto a atividade do produto seco por aspersão possui um efeito negativo quando o contato das células com a corrente de ar quente ocorre em altas temperaturas, comprometendo a viabilidade celular (ALVIM et al., 2016) (Figura 4).

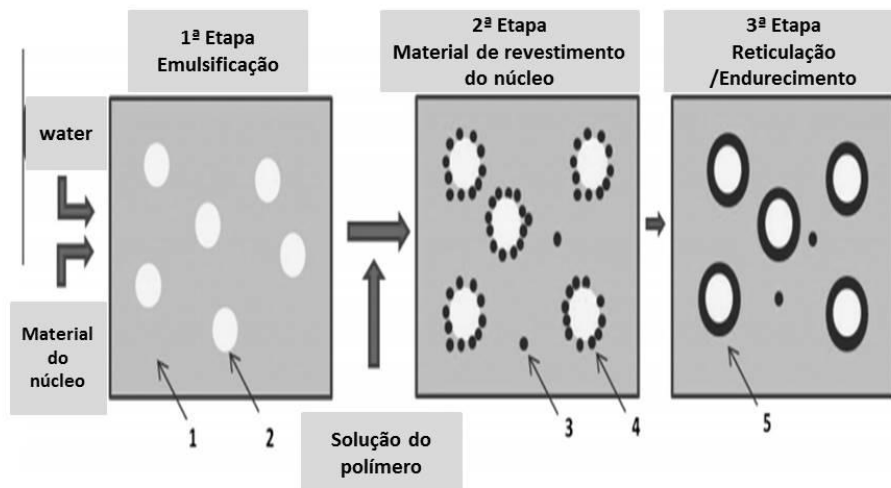
Figura 4 – Esquema da técnica de *spray drying*



Fonte: Adaptado de BURGAIN^A et. al. (2011)

A coacervação ou a separação de fases é um dos métodos mais antigos e mais simples de encapsular princípios ativos devido às condições de preparações simples usando solvente não-tóxico e de baixa agitação. É uma técnica que requer a mistura de dois polímeros com cargas opostas e com ajustes de pH, os quais são conduzidos à separação de fases e à formação de partículas sólidas ou gotículas de líquido fechadas (SARAVANAN; RAO, 2010) (Figura 5).

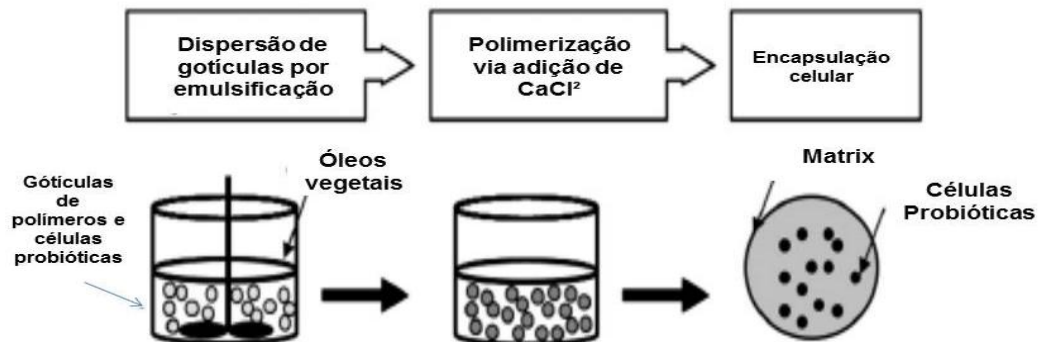
Figura 5 – Esquema de processo geral para a preparação de microcápsulas por coacervação. (1) de água; (2) material do núcleo; (3) de polímero; (4) revestimento de deposição do polímero em cima do núcleo material; (5) microcápsulas



Fonte: Adaptado de MARTINS et al., 2014.

A emulsificação é uma técnica química usada para encapsular células probióticas por meio do preparo de uma emulsão baseada na relação entre a fase descontínua (célula-polímero) e a fase contínua (óleo), dando origem a microcápsulas compostas por uma emulsão de água em óleo. O tamanho e a forma das cápsulas geradas são influenciados pelas variações da velocidade de agitação e a proporção óleo/água (ZHANG et al.², 2016) (Figura 6).

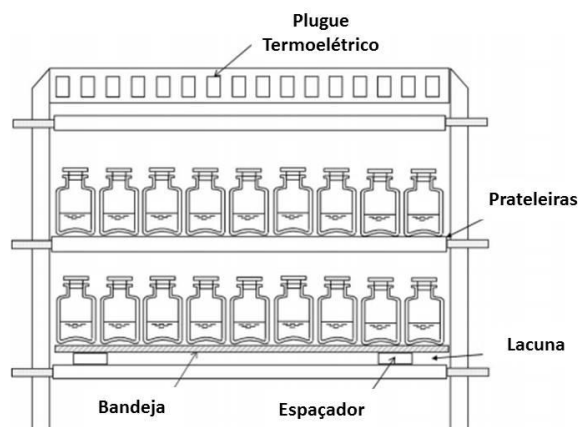
Figura 6 – Representação esquemática do procedimento de emulsificação



Fonte: Adaptado de BURGAIN^A et al. (2011)

Freeze-drying ou liofilização é a técnica mais utilizada para a proteção de moléculas termossensíveis e instáveis. Antes do processo de secagem, o material é dissolvido em água e congelado. Após isso, a água congelada passa pelo processo de sublimação. Dessa forma, baseia-se em um método de desidratação a baixas temperaturas (MUNIN; LÉVY, 2011) (Figura 7).

Figura 7 – Diagrama esquemático de frascos carregados em uma câmara de um secador de gelo.



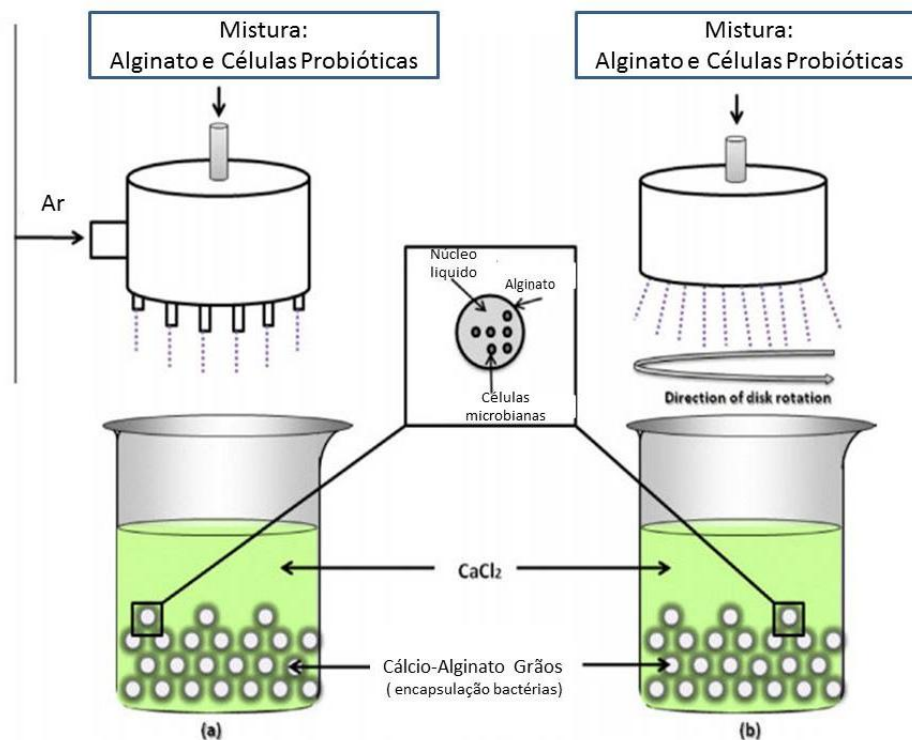
Fonte: Adaptado de KUU et al., (2013)

O método de extrusão é empregado na encapsulação de células probióticas usando hidrocolóides como material de encapsulamento. A mistura contendo uma

solução de hidrocolóide (alginato) com o microrganismo é forçada, por meio de uma máquina de pulverização ou um bico de agulha de seringa, em direção a um líquido desidratante (ex: cloreto de cálcio), que endurece a cobertura. Dessa forma, o material entra em contato com o líquido desidratante e a parede se endurece, e com isso qualquer porção oleosa é removida da superfície (VALERO-CASES; FRUTOS, 2015).

Trata-se de uma técnica simples, barata e de operação suave, que não causa danos às células probióticas, além de minimizar a perda de viabilidade das células. Esta tecnologia não envolve o emprego de solventes prejudiciais e pode ser feita sob condições aeróbicas e anaeróbicas. Uma das desvantagens desta técnica é que é difícil de ser aplicada em larga escala devido à lenta formação das microesferas (BURGAIN^A et. al., 2011). A Figura 8 ilustra a técnica de extrusão.

Figura 8 – Técnica de extrusão. Agulha simples gotejando por ar conduzido (a); Dispositivo de disco fixado (b).



Fonte: Adaptado de BURGAIN^A et al. (2011).

O tamanho das partículas obtidas a partir do método de extrusão usando alginato como agente encapsulante é diretamente proporcional à concentração e a

viscosidade da solução de polímero utilizada. Por exemplo, uma diminuição na concentração de alginato reduz o tamanho das partículas e, por consequência, diminui a resistência mecânica e a estabilidade das micropartículas em condições gastrointestinais (SACCHETIN et al., 2010).

Os materiais encapsulantes consistem em um grande número de polímeros formadores de filmes como a goma, a celulose, os carboidratos, os lipídios, as proteínas e os materiais inorgânicos, fazendo com que a escolha destes polímeros dependa das características do núcleo (PORTE et al., 2011). O agente encapsulante origina uma cápsula que se rompe através de um estímulo específico, permitindo que as substâncias ativas atuem no local ideal (SOUZA et al., 2015; SILVA et al., 2014).

2.4 Polímeros como agentes encapsulantes

Nas últimas quatro décadas, houve pequenos avanços na química de polímeros que foram relatados. Entre esses métodos destacam-se a polimerização controlada (transferência de átomo de polimerização por radicais, reversível de polimerização de adição-fragmentação, a polimerização metátese de abertura de anel, etc.), polímeros de várias estruturas (linear, ramificado, hiper, dendrítica, etc.), e estratégias de auto-montagem para preparar polímeros moleculares (ligação de hidrogênio, ligantes de metal, interações iônicas). Mesmo assim, o consumo por esses polímeros aumenta a cada ano (GRINSTAFF; ZHANG, 2014).

Uma ampla variedade de biopolímeros naturais ou sintéticos pode ser aplicada como agentes encapsulantes de compostos bioativos (FERNANDES et al., 2014). Entre os polímeros naturais se destacam os polissacarídeos, os peptídeos e as proteínas. Os polissacarídeos são polímeros naturais formados pela condensação de um alto número de moléculas monossacarídicas (oses), podendo ser do mesmo ou de diversos tipos, pois sua classificação vai depender do número de átomos de carbono presente nas moléculas (SEVERINO et al., 2011).

Com a expansão dos biomateriais ao longo dos anos, os polímeros biodegradáveis vêm sendo bastante utilizados para o transporte e liberação de drogas devido à sua biocompatibilidade e biodegradabilidade. Dessa forma, houve um aumento na utilização desses polímeros naturais, seja na forma isolada ou

combinada. Entre eles podem ser citados o alginato, agarose, colágeno, gelatina, fibrina e ácido hialurônico (PRAJAPAT et al., 2013; DALHEIM et al., 2016).

Os polissacarídeos podem ser classificados quanto a sua estrutura, composição química, solubilidade, fontes e aplicações. Em relação à sua composição, os polissacarídeos podem ser classificados em dois tipos: homopolissacarídeo, composto por um único tipo de monossacarídeo, e heteropolissacarídeo, composto por mais de um tipo de monossacarídeo (LIU¹ et al., 2015). Como exemplos, podemos citar a celulose, o alginato e a goma arábica, que são homo-, co- e hetero- polissacarídeos, respectivamente (TONELI et al., 2005; CUNHA et al., 2009; MONTEIRO et al., 2012).

Os polissacarídeos que são aplicados nas indústrias são extraídos de plantas, de algas, de animais, de fungos ou são obtidos por via microbiológica. Já quando são originados de plantas superiores podem ser de exsudatos, sementes, frutos e tubérculos. A matéria-prima das algas marinhas é empregada tanto na indústria alimentícia, na busca por agentes gelificantes, como na farmacêutica, com o objetivo de serem obtidas atividades antivirais, antitrombóticas, anticoagulantes e antitumorais (CUNHA et al., 2009).

A estrutura química dos polímeros, quando em solução, tem a capacidade de formar géis (TONELI et al., 2005) que podem ser aplicados em uma grande variedade de alimentos. Quando usados como agentes espessantes, esses compostos têm a capacidade de aumentar a viscosidade de um líquido, originando suspensões com características organolépticas e texturas desejáveis em alimentos (MONTEIRO et al., 2012; TONELI et al., 2005).

Os biopolímeros são compostos biocompatíveis, biodegradáveis e abundantes, e oferecem várias aplicações comerciais por causa da sua vasta variedade de propriedades funcionais, sendo eficazes em níveis muito baixos de concentração. Do mesmo modo, a presença de vários grupos funcionais reativos ao longo da cadeia polimérica favorece interações com outras espécies moleculares, podendo ocorrer ligação, quelação, complexação, microencapsulação, emulsificação, floculação, estabilização ou suspensão (GÖNEN et al., 2016).

Os polímeros naturais estão cada vez mais sendo utilizados nas indústrias. Além de serem abundantes, apresentam baixa ou nenhuma toxicidade, são de baixo custo, susceptíveis a uma grande variedade de modificações químicas e potencialmente degradáveis (SOUZA et al., 2015). Os materiais à base de polímeros

naturais representam matrizes promissoras de entrega sistema de liberação controlada, devido às suas características de biodegradabilidade, biocompatibilidade, bioadesividade, condições brandas de gelificação, sensibilidade, distintas condições de pH e ampla disponibilidade (SACCHETIN et al., 2010; DOHERTY et al., 2011; BELHABIB et al., 2016).

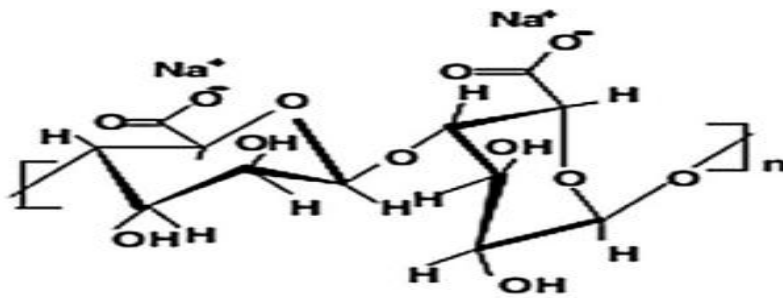
Portanto, diversos sistemas à base de biopolímeros estão sendo empregados como matrizes para a liberação prolongada de fármacos, princípios ativos e inseticidas. Um exemplo desses sistemas são as microesferas, que vem sendo empregadas em áreas de pesquisa (PAULA et al., 2010). Esses polímeros naturais são ainda usados em técnicas de encapsulação de microrganismos, fazendo com que ocorra um aumento da resistência das células à ação dos fatores ambientais (LIMA et. al., 2014).

2.5 Alginato de sódio

Os alginatos são polímeros extraídos de algas marrons pertencentes à classe denominada de Phaeophyceae. Dentre as principais algas marinhas para a comercialização do alginato destacam-se *Macrocystis pyrifera*, *Laminaria hyperborea*, *Laminaria digitata* e *Ascophyllum nodosum* (PEREIRA et. al., 2014).

O alginato de sódio é um polissacarídeo formado por unidades de sais de ácidos β -D-manurônico(M) e α -L-gulurônico(G) ligadas em 1-4, unidas por ligações glicosídicas e difundidas em diferentes proporções ao longo da cadeia (Figura 9). Uma vez que o alginato é um sal de ácido algínico, é também um polímero aniônico solúvel em água. Isso acontece quando o pH é reduzido abaixo dos valores de pKa dos ácidos D-manurônico e L-gulurônico, fazendo com que ocorra a conversão em ácido algínico (ANNAN et al., 2008; TAGLIARI et al., 2012; SONG et al., 2013; SATHYABAMA et al., 2014).

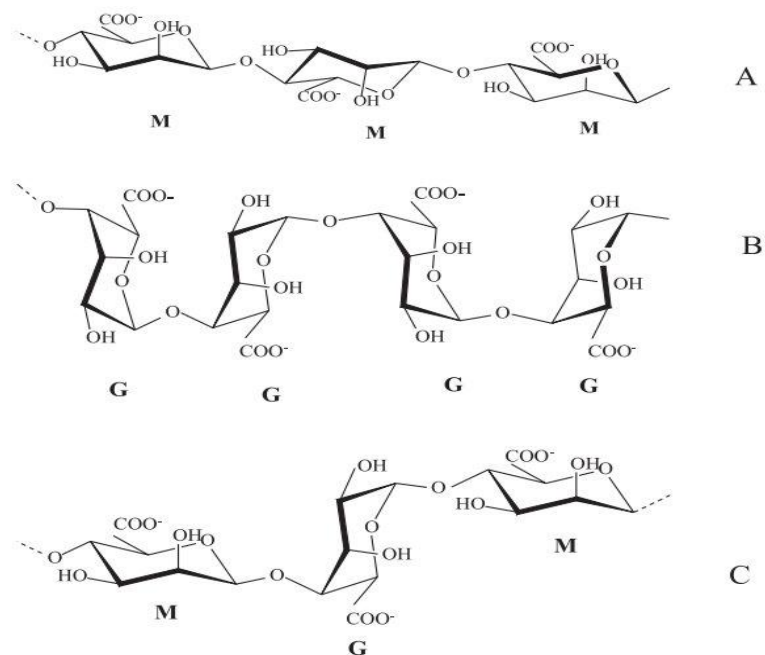
Figura 9 – Estrutura química do alginato de sódio



Fonte: SHAARI; KAMARUDIN (2015).

Dessa forma, o ácido alginico consiste de cadeias lineares de resíduos arranjados na forma de blocos de ácidos manurônico (M) ou gulurônico (G), ligados de forma que a continuação destes resíduos na molécula seja alternada. Os polímeros são constituídos por blocos de homopolímeros (M- e G-) e por blocos de heteropolímeros (MG) (Figura 10) (FALKEBORG et al., 2015).

Figura 10 – Estrutura química das regiões de blocos MM, GG e MG. Os blocos homopoliméricos M- e G- e os blocos heteropoliméricos MG- constituem a molécula de alginato. Em (A) tem-se uma sequência M—M; em (B) uma sequência G—G e em (C) uma sequência M—G—M.



Fonte: GARCIA-CRUZ et al., 2008

O alginato é um polissacarídeo com cadeias lineares muito solúveis em água, e conseqüentemente forma soluções viscosas que irão diminuindo a viscosidade com o aumento da temperatura, originando um gel (LODEIRO et. al., 2016).

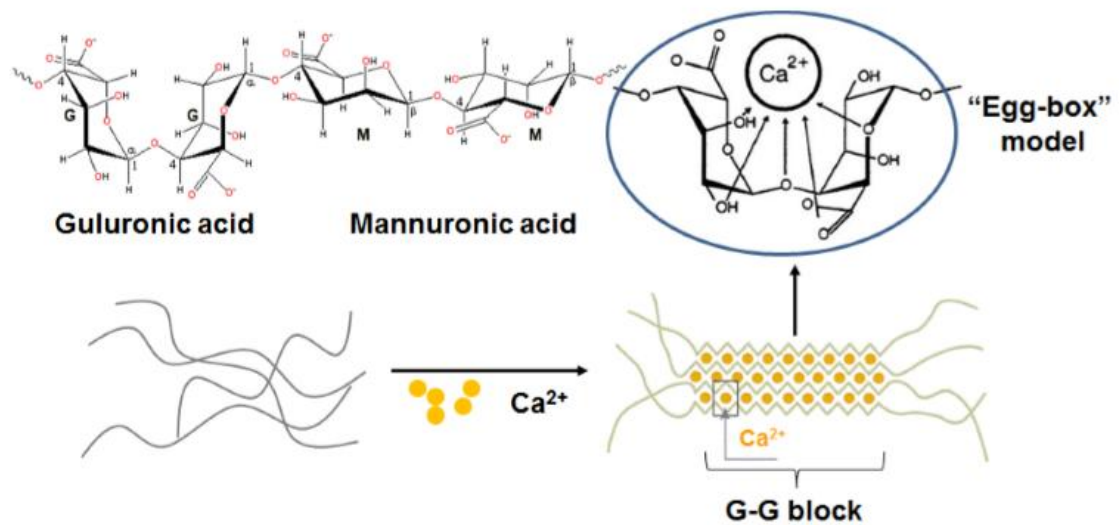
Dentre os diversos materiais de encapsulação, o alginato tem recebido uma atenção especial devido à sua simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade, custo baixo e compatibilidade em relação a outros materiais. Sua capacidade de rápida absorção de água auxilia na formação do gel (LU-E. SHI et. al., 2013; ALBADRAN et al., 2015). Esse polímero vem sendo empregado em alimentos, cosméticos e medicamentos bem como na aplicação da indústria têxtil e de papel (AKIN; ISIKLAN, 2016).

Técnicas inovadoras de encapsulação na área médica e farmacêutica estão sendo aplicadas hoje em dia. Entre suas várias funções temos a espessante, estabilizante de emulsões e de espuma, agente de encapsulação, agente de gelificação, agente de formação de filmes e de fibras sintéticas, entre outras possibilidades (MÜLLE et al., 2011). Porém, o uso em determinados produtos alimentares ácidos pode ser potencialmente problemático por causa da sua estabilidade relativamente moderada na presença de agentes quelantes em condições de pH baixo (NUALKAEKUL et al., 2013).

O alginato de sódio, em presença do cálcio e outros íons divalentes, pode trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, ocorrendo a gelificação-ionotrópica. Isso ocorre devido à interação intermolecular ionotrópica entre cátions e grupos carboxílicos das cadeias do alginato, promovendo uma estrutura tridimensional gelatinosa que permite a inclusão de algumas moléculas bioativas em sua matriz polimérica por meio de interações eletrostáticas e de Van Der Waals, devido à perda de água (NAYAK et al., 2013).

A gelificação do alginato de sódio ocorre através da troca do Na^+ dos blocos G com os cátions divalentes (Ca^{+2}). Estas ligações entre os cátions bivalentes com as cadeias dos blocos G se acomodam em cavidades eletronegativas de maneira tridimensional para formar uma estrutura no formato de “caixa de ovo” ou “egg-box”. (NAYAK; PAL, 2011; JIAO et al., 2016), conforme ilustra a Figura 11.

Figura 11 – Interação dos blocos G na presença de íons Ca^{2+} , modelo “Egg-box”.



Fonte: PRIETO et al. (2007); RUVINOV et al.(2012)

A formação da estrutura de “caixa de ovo” é mais afetada pelos blocos G devido à compatibilidade que os resíduos dessa estrutura têm com os cátions bivalentes (Ca^{+}), aumentando dessa maneira a força do gel. Com isso, os blocos M e M-G são menos sensíveis a cátions e são menos resistentes aos géis comparados ao bloco G (NAKAUMA et al., 2016).

Os géis de alginato são estáveis em soluções com pH baixo, porém dilatam em soluções fracamente básicas. Dessa forma, cápsulas de alginato podem ser utilizadas para proteger drogas da acidez do suco gástrico, fazendo com que permita a liberação subsequente no ambiente básico dos fluidos intestinais (ANNAN et al., 2008; CHÁVARRI et al., 2010; LIMA et al., 2014).

A capacidade do alginato de reagir com cátions polivalentes, principalmente íons cálcio, para produzir géis fortes ou polímeros insolúveis depende do grau de reticulação do polímero. A reticulação polimérica é um processo que ocorre quando cadeias poliméricas lineares ou ramificadas são interligadas por ligações covalentes, produzindo polímeros tridimensionais com alta massa molar. Quanto maior o grau de reticulação a estrutura se torna mais rígida. Isso resulta numa liberação lenta do agente incorporado, fazendo com que os sistemas sejam usados na liberação controlada de substâncias (TURBIANI et al., 2011).

Portanto, a matriz mais usada para microencapsulação de probióticos é o

alginato devido à sua propriedade de gelificação inotrópica. Vale salientar que o que vai permitir que o gel seja solúvel ou insolúvel é o pH, pois quanto mais ácido for o gel ele fica mais insolúvel e quanto mais neutro ou básico for o gel fica mais solúvel (ZOU et. al.,2012).

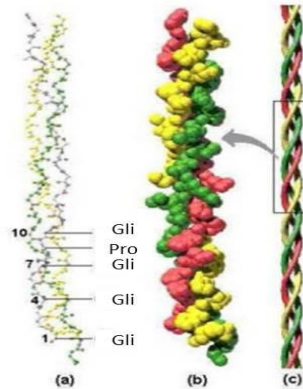
Estudos descrevem que baixas concentrações de alginato quando empregado como único polímero não melhora a viabilidade celular em contato com o estômago por causa do pH baixo. Já quando o alginato é revestido por um polímero hidrofóbico, resiste à acidez gástrica prologando a sua degradação. Com isso, a utilização de um polímero hidrófobo seria a melhor escolha para retardar a degradação das microcápsulas de alginato (LAELORSPOEN et al. ,2014).

2.6 Gelatina

O colágeno possui uma molécula de 280 nm de comprimento, com massa molecular de 300.000 Da, sendo estável por ligações de hidrogênio (Figura 12). Sua sequência de aminoácidos é, geralmente, uma unidade tripeptídica, glicina-X-prolina ou glicina-X-hidroxi-prolina, onde o X pode ser qualquer um dos 20 aminoácidos-padrão. Cada molécula de colágeno pode ter até três cadeias diferentes, que se unem na formação do procolágeno (SILVA e PENNA, 2012).

O colágeno pode ser obtido a partir dos tecidos conjuntivos dos animais, cuja maior concentração está nas cartilagens e nos ligamentos das juntas ósseas. É uma proteína de origem animal que resulta da degradação hidrolítica, seja ela ácida ou básica, resultando a gelatina, completamente desnaturada, que não contém glúten, colesterol, gordura ou carboidratos em sua composição. Tanto o colágeno desnaturado (gelatina) quanto o não desnaturado tem excelente bicompatibilidade, biodegradabilidade e fraca antigenicidade. (ZHANG¹ et. al., 2016).

Figura 12 – Estrutura do colágeno: (a) forma de triplete presente nas matrizes colagênicas; (b) tropocolágeno; (c) hélice tripla.



Fonte: SIONKOWSKA (2006).

A gelatina é originada a partir da desnaturação parcial da tripla hélice do colágeno ou do colágeno hidrolisado. Por ser uma proteína solúvel em água, ela tem grande importância nas propriedades de gelificação, estabilização, texturização, emulsificação, adesividade, sedimentação e de capacidade de encapsulamento (CEBI et al., 2016).

Tem uma vasta aplicação tanto na indústria alimentícia como na de cosméticos e fármacos. Na indústria farmacêutica, são amplamente usadas para o tratamento de feridas, revestimento de comprimidos e produção de *soft* e cápsulas. Na indústria alimentícia, a gelatina pode ser aplicada em confeitarias, em geleias, produtos de panificação, produtos de carne, textura, capacidade de ligação de água, emulsificação e de estabilização de espuma. Como também pode ser hidrolisada enzimaticamente para preparar peptídeos bioativos, os quais são tidos como uma fonte importante de aditivo alimentar (YU et al., 2016).

Na maioria das vezes, a gelatina é obtida a partir de mamíferos, especialmente de (do tecido epitelial e ósseo) e porco, peles de vaca e ossos. Em consequência disso, fontes diversas, particularmente subprodutos de processamento de peixe incluindo a pele, osso, etc. ganharam atenção para produção de gelatina por causa da sua disponibilidade e a necessidade de aumentar o seu valor agregado (SAE-LEAW et al., 2016).

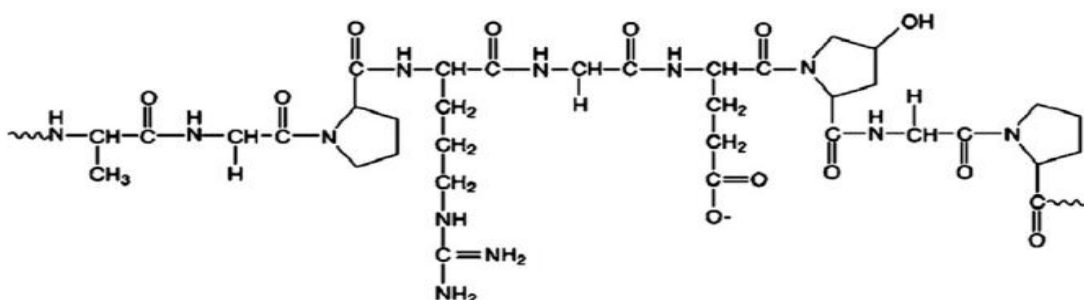
Por ser de fonte natural, a gelatina possui matrizes tridimensionais que são usadas para a cultura de células de mamíferos e aplicações de liberação controlada de drogas. Trata-se de um polímero reversível, que em solução dissolve em água morna com temperaturas próximas de 35 °C formando um hidrogel (sol-gel). Isto acontece devido às interações intermoleculares da gelatina formando uma rede tridimensional entre as moléculas. Já em temperaturas acima de 35 °C ocorre uma interrupção destas interações e a conversão do hidrogel em solução (BISWAL et al., 2016).

Em virtude dessas características, a sua produção é realizada em grande escala e seus preços são relativamente baixos, explicando, portanto, o grande interesse em seu uso devido às suas propriedades multifuncionais, como também na capacidade de formar géis estáveis (GONÇALVES et al., 2015).

É um polímero considerado seguro pela FDA além de ser acessível, biocompatível e biodegradável. É um biopolímero de combinação de proteínas de alto peso molecular solúveis em água. A sequência peptídica His-Gly-Pro-Leu-Gli-Pro-Leu (797 Da) é relatada como um captador de radicais que são capazes de impedir a peroxidação lipídica (OLIVEIRA² et al., 2016).

A gelatina é uma substância anfótera que possui uma parte catiônica (gelatina tipo A, obtida por uma hidrólise ácida do tecido epitelial de porco) e outra aniônica (gelatina tipo B, obtida por uma hidrólise alcalina do colágeno bovino) ao longo dos grupos hidrofóbicos presentes na cadeia. A molécula da gelatina possui aproximadamente 13 % de cargas positivas (lisina e arginina), 12 % de carga negativa (ácido glutâmico e aspartico), 11 % de cadeias hidrofóbicas (leucina, interleucina, valina e metionina) e o final da cadeia é composto de glicina e hidroxiprolina (ELZOGHBY, 2013). A Figura 13 representa a composição da gelatina.

Figura 13 – Estrutura química parcial da gelatina



Fonte: ELZOGHBY, 2013.

As propriedades funcionais da gelatina estão interligadas com a composição dos aminoácidos e distribuição do peso molecular. Os aminoácidos (prolina e hidroxiprolina) são conhecidos em desempenhar um papel importante na reestruturação da gelatina durante a gelificação, pois são responsáveis pela estrutura tripla hélice da gelatina. A gelatina com maior teor de aminoácidos apresenta melhor propriedade viscoelástica, já que apresenta maior capacidade de formação do gel. A gelatina de peixe tem menor teor de aminoácidos, com isso o seu poder gelificante também é menor do que a gelatina mamífera (CHEN² et al., 2015).

As propriedades físico-químicas das gelatinas são normalmente influenciadas por diversos fatores, tais como o método de preparação e as propriedades intrínsecas, incluindo a composição química, a sequência de aminoácidos, bem como o comprimento dos componentes da cadeia da proteína. Além do mais, as propriedades funcionais e o comprimento dos polipeptídios de gelatina podem ser influenciados pelas substâncias químicas utilizadas para o pré-tratamento, por exemplo, a temperatura e o tempo durante a extração. A prolina e a hidroxiprolina afetam as propriedades gelificantes, térmicas e funcionais da gelatina (JONGJAREONRAK et al., 2010).

A gelatina é um material capaz de formar películas para a formação de invólucros de cápsulas que se dissolvem rapidamente em fluidos biológicos à temperatura do corpo, por causa de seu material hidroscópico que é altamente sensível. Ela também possui característica que a torna adequada para o processo de fabricação de cápsulas, géis, formação de películas e propriedades ativas de superfícies (BARHAM et al., 2015).

As coberturas das cápsulas a partir de proteínas (caseína, gelatina, soja, zeína, glúten e albumina de ovo) e os biofilmes são boas barreiras ao O₂ e CO₂, sendo os materiais mais empregados em ambientes com baixa umidade relativa. Em alta umidade essas proteínas são muito susceptíveis à absorção de umidade e dissolução. Além disso, a alta permeabilidade ao vapor de água em função do caráter hidrofílico dos filmes à base de proteínas limita sua aplicação na formação de embalagens (OLIVEIRA et al., 2012).

Diversos materiais de parede podem ser utilizados na microencapsulação, entre eles temos a gelatina que está sendo vastamente estudada e utilizada em combinação com outros polímeros para o encapsulamento, devido às suas propriedades muco-adesivas, que são de grande importância para as células alvo

(ROHRER et. al., 2015).

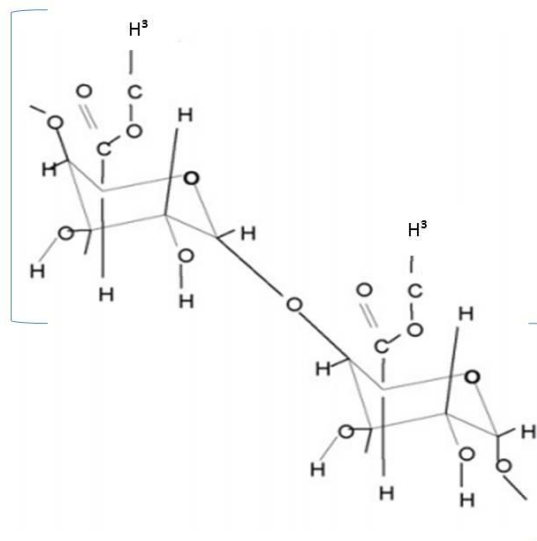
Dessa forma, a sua principal função é diminuir a desidratação dos alimentos e das microcápsulas bem como estender a vida de prateleira desses produtos, fornecendo barreiras contra riscos de contaminação (OUSSALAH, 2004).

2.7 Pectina

A pectina é um polímero de origem vegetal constituído de polissacarídeos heterogêneos, e caracteriza-se por ser um polissacarídeo aniônico, linear, natural e não tóxico. Localiza-se em paredes de células de plantas superiores e contribui para a rigidez e a integridade do tecido. Logo, é a macromolécula mais complexa da natureza (GUO et al., 2016).

É um polissacarídeo parcialmente esterificado com grupos carboxílicos esterificados com metanol, unidos por ligações glicosídicas α - 1,4 ácidos galacturônicos em uma longa cadeia molecular, apresentando uma estrutura química complexa (BAYON et al., 2016). Pode ser composta de 17 monossacarídeos diferentes a partir de 20 distintas linhagens (Figura 14).

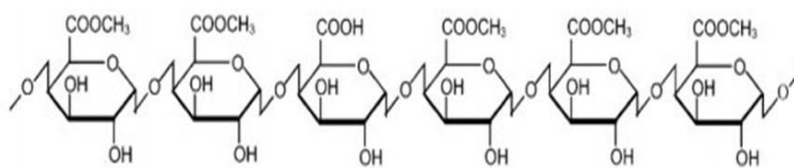
Figura 14 - Estrutura química parcial da pectina.



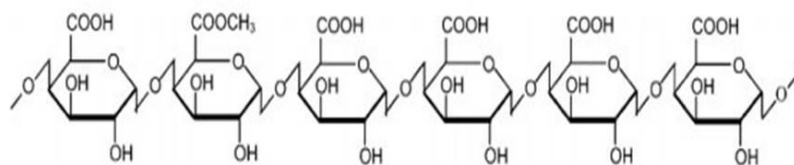
Fonte: YADAV et. al. (2009).

Devido à ampla variedade de matérias-primas, existem diferenças no poder gelificante de preparações de pectina. A pectina comercializada pode ser classificada com um alto peso molecular (acima de 50 %) ou um baixo peso molecular (abaixo de 50 %), dependendo do grau de substituição dos grupos carboxilas por grupos metoxila (-OCH₃), presentes nos monômeros de ácido D-galacturônico (SAHA et al.,2016) (Figura 15).

Figura 15 – Pectina de alto e baixo teor de metoxilação



(A) Alto teor de metoxilação

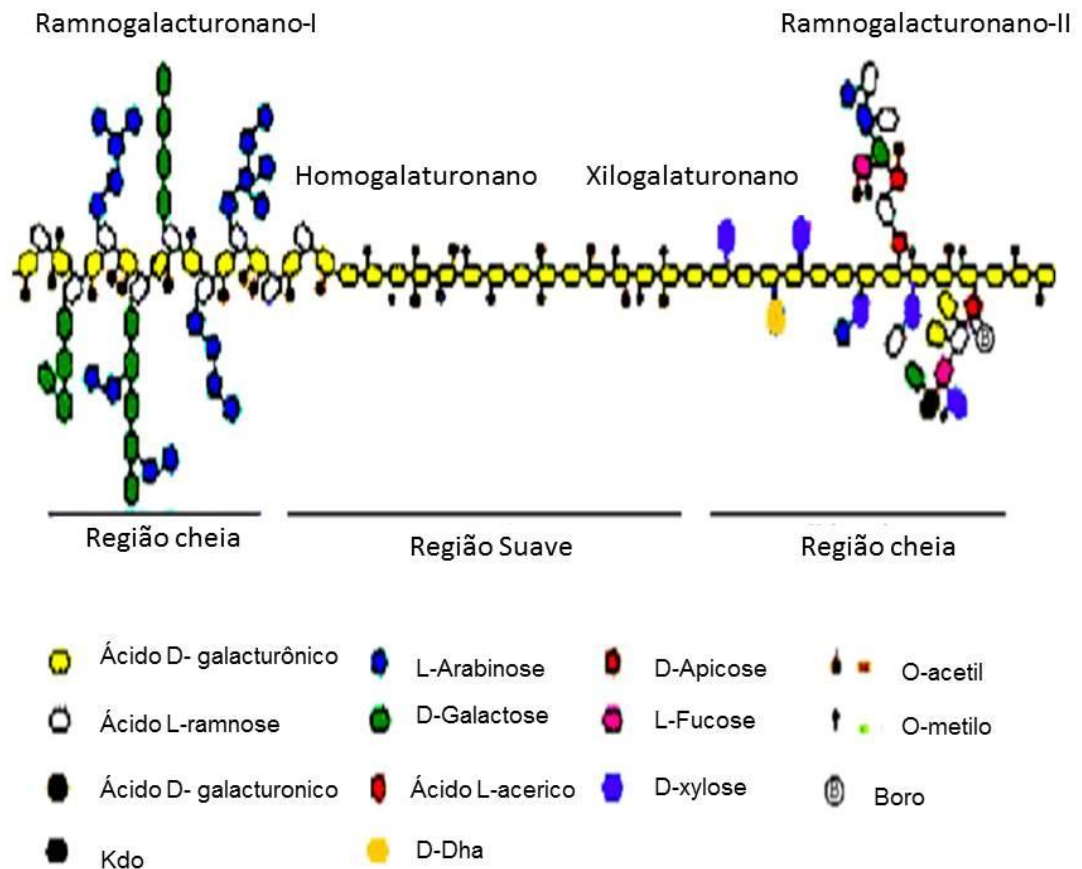


(B) Baixo teor de metoxilação

Fonte: Adaptado de THARANATHAN (2003).

A pectina é composta principalmente dos seguintes polímeros estruturais: homogalacturonano (HG), que representa a cadeia principal da pectina, ramnogalacturonano-I(RG-I), que está localizada em uma área altamente ramificada, e ramnogalacturonano-II(RG-II), que foi isolado das paredes celulares primárias. Estes polissacarídeos são ligados covalentemente uns aos outros, porém possuem ligações não-covalentes, como Ca²⁺, ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas (KYOMUGASHO et. al., 2015; GÓMEZ et. al., 2016; LIN et. al., 2016). (Figura 16).

Figura 16 – Estrutura da pectina



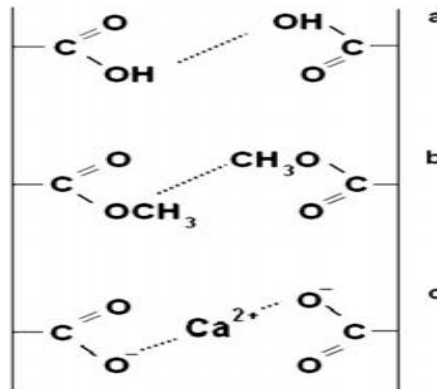
Fonte: YADAV et al. (2009)

A pectina com alto grau de esterificação na presença de açúcares forma géis em meio ácido. Já a pectina com baixo grau de esterificação possui um maior número de grupos livres de ácido carboxílico, que quando em contato com íons bivalentes, como por exemplo o Ca^{+2} , resulta na formação de uma rede contínua formando um “egg-box” (FRAEYE et al., 2010; MIERCZYNSKA et al., 2015).

O mecanismo de gelificação acontece da seguinte forma: em altas temperaturas e com pH baixo a pectina de alta-metoxilação (HMP) favorece as interações hidrofóbicas (Figura 17.b), e em baixas temperaturas ocorrem as ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos sem a dissociação (Figura 17.a). Já as pectinas de baixa-metoxilação (LMP) é favorecida em pH elevado na presença de Ca^{+2} , se ligando por interações iônicas formando a “caixa de ovo” (Figura 17.c). Dessa forma, a formação da gelificação da pectina de baixa-metoxilação é favorecida por um pH mais elevado do que a de alta-metoxilação devido as interações eletrostáticas do íon Ca^{+2} requererem um certo número de grupos

carboxílicos dissociados. (KASTNER et. al., 2012). O mecanismo de gelificação da pectina é mostrado na Figura 17.

Figura 17 – Mecanismo de gelificação da pectina



Fonte: KASTNER et al. (2012).

Nota: a: As ligações de hidrogênio entre os grupos carboxílicos, sem dissociar. b: Interações hidrofóbicas. c: interações iônicas aleatórias (ligações cruzadas) entre grupos carboxílicos dissociados. Os grupos carboxílicos fazem pontes com Ca^{2+} formando um “egg-box”.

Entre os produtos de extração mais importantes da pectina temos a polpa de maçã e a casca de frutas cítricas, as quais dão origem a pectinas de alto grau de metoxilação que são amplamente utilizadas na indústria alimentícia como espessantes e gelificantes ou como excipientes devido à sua não toxicidade na indústria farmacêutica. Além do girassol, que é fonte de pectina de baixo teor de metoxilação (LIU¹ et al., 2015).

A extração e o isolamento de pectina podem ser realizados por diversas maneiras, utilizando métodos químicos, enzimáticos ou tratamentos físicos. A extração química é um método bastante utilizado na produção de pectina (YULIARTI et al., 2015).

Com relação as suas propriedades estruturais, destaca-se a capacidade de gelificação, biocompatibilidade, não toxicidade, espessante, biodegradabilidade, solubilidade em água, além de apresentar uma grande importância na indústria de alimentos e medicamentos (OLIVEIRA et. al., 2016).

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

- Desenvolver microcápsulas probióticas utilizando alginato de sódio, pectina e gelatina e sua aplicação.

3.2 Específicos

- Avaliar as melhores concentrações de encapsulamento utilizando alginato de sódio, pectina e gelatina;
- Caracterizar as microcápsulas quanto aos aspectos físico-químicos, morfológicos.
- Avaliar a viabilidade celular ao longo do tempo.
- Caracterizar por infravermelho e análise térmica das microcápsulas úmidas e desidratadas.
- Determinar os parâmetros físico-químicos das microcápsulas e das células livres no leite.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Materiais

Foram utilizados no experimento alginato de sódio (GRINDSTED[®]/média viscosidade); Pectina (Genu[®] pectin tipo B-rapid LM); Gelatina em pó (Vetec); Citrato de sódio 2H₂O P.A. (Química Moderna 14560); Cultura probiótica *Lactobacillus rhamnosus* (UFPEDA); Caldo MRS (Merck); Cloreto de cálcio P.A. (Química Moderna); Cloreto de sódio P.A. (Química Moderna); Cloreto de Potássio P.A. (Química Moderna); Fosfato de sódio dibásico P.A. (Vetec); Fosfato de potássio monobásico P.A. (Vetec); Glicose (Nuclear); Ágar-ágar (Ágar brasileiro). Agulha 22G (25 x 0,7 mm; Descarpack); seringa de 5 mL.

4.2 Equipamentos

Foram utilizados o equipamento centrífuga (Excelsa[™] II Centrifuge Mod. 206 BL), Incubadora BOD (MB155/3), Thermal analyzer TA-60 WS (Shimadzu), Agitador de tubos (Phoenix AP56), Bomba peristáltica (Gilson, minipuls 3), Banho termostático (TE 184 Tecnal), Agitador shaker (shaker Ma 563), Biorreator (Tec-Bio-V 4,5 litros- Tecnal), centrífuga (80-2B, Marconi), Peneiras de análise granulométrica (a bronzinox), Espectrofotômetro (modelo 640 – IR da Varian), Microscópio eletrônico de Varredura EVO LS15 (ZEISS), Metalizador de ouro Q150 TES (QUORUM).

4.3 Microrganismo

Foi utilizada uma cepa de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, proveniente da coleção de culturas do Departamento de Antibióticos da Universidade Federal de Pernambuco (UFPEDA).

4.4 Manutenção da cultura

Uma alçada da cultura mantida em tubo inclinado com meio MRS Ágar foi inoculada em frasco Erlenmeyer de 250 mL de capacidade contendo 50 mL de meio caldo MRS (Merck). Após crescimento celular por 24 h, as células foram centrifugadas (Excelsatm II Centrifuge Mod. 206 BL) a 3500 rpm por 10 minutos.

Foi preparado um meio para o processo de liofilização composto por 10 % de sacarose e 1 % de gelatina. Adicionou-se 3 mL da suspensão (células centrifugadas + meio de liofilização) em frascos de penicilina e estes foram colocados por 12 horas em freezer a - 80 °C. A suspensão foi liofilizada por 24 horas a - 50 °C, com vácuo a 1720 mT. Para a contagem de bactérias para determinação da viabilidade celular ao longo do tempo, o material liofilizado foi resuspendido com 3 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v).

4.5 Curva de crescimento celular

O crescimento celular de *L. rhamnosus* foi avaliado com o objetivo de identificar a fase de crescimento exponencial do microrganismo, de forma a serem obtidas células nesta etapa de cultivo para serem usadas nos ensaios de encapsulação. O cultivo foi realizado em frascos autoclaváveis de 500 mL contendo um volume de meio de 100 mL. Foi empregado o meio caldo MRS, sendo este inoculado com um volume de inóculo correspondente a 5 % (v/v). O inóculo foi preparado a partir de suspensões de 2 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v) por frasco liofilizado. O cultivo foi realizado a 37 °C por 24 h. Amostras foram retiradas ao longo do tempo para avaliar a concentração de células viáveis durante o crescimento celular. Os ensaios foram realizados em quintuplicata.

4.6 Ensaio de encapsulação

Foram realizados dois planejamentos experimentais para o preparo das cápsulas contendo alginato/gelatina e alginato/pectina. As variáveis investigadas foram as concentrações dos polímeros e a variável resposta foi a concentração de células viáveis nas cápsulas. Os planejamentos foram do tipo fatorial completo, com

duas variáveis e triplicata no ponto central, totalizando 7 experimentos. As Tabelas 1 e 2 mostram as condições experimentais testadas.

Tabela 1 – Planejamento fatorial completo empregado nos ensaios de encapsulação de *L. rhamnosus* em cápsulas de alginato e gelatina (2 variáveis e triplicata no ponto central).

Ensaio	Concentração de alginato (%) (m/v)	Concentração de gelatina (%) (m/v)
1	-1 (1)	-1 (0,1)
2	+1 (5)	-1 (0,1)
3	-1 (1)	+1 (0,5)
4	+1 (5)	+1 (0,5)
5	0 (3)	0 (0,3)
6	0 (3)	0 (0,3)
7	0 (3)	0 (0,3)

Tabela 2 – Planejamento fatorial completo empregado nos ensaios de encapsulação de *L. rhamnosus* em cápsulas de pectina e gelatina (2 variáveis e triplicata no ponto central).

Ensaio	Concentração de pectina (%) (m/v)	Concentração de gelatina (%) (m/v)
1	-1 (1)	-1 (0,1)
2	+1 (5)	-1 (0,1)
3	-1 (1)	+1 (0,5)
4	+1 (5)	+1 (0,5)
5	0 (3)	0 (0,3)
6	0 (3)	0 (0,3)
7	0 (3)	0 (0,3)

Inicialmente, as células foram cultivadas de acordo com a metodologia descrita no item 4.5 durante 14 h, tempo necessário para atingir a fase de crescimento exponencial. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3500 rpm por 10 minutos, os pellets foram lavados uma vez com solução estéril de tampão

salina-fosfato PBS a 0,1 M e ressuspensos em 5 mL do mesmo tampão de forma a ser obtida uma suspensão celular com aproximadamente 10^9 UFC/mL.

Os ensaios de encapsulação foram realizados de acordo com NUALKAEKUL et al. (2013), com uma modificação em relação às proporções volumétricas de suspensão celular e solução do polímero empregado no teste. Neste trabalho, um volume de 5 mL da suspensão celular foi misturado com 5 mL da solução do polímero a ser testado. As soluções poliméricas foram pasteurizadas previamente a $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 30 s em banho-maria e imediatamente resfriadas em banho de gelo. A pasteurização foi utilizada em substituição à esterilização a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ para minimizar a hidrólise dos polímeros.

As suspensões de células/alginato ou células/pectina foram bombeadas com o auxílio de uma bomba peristáltica (Gilson, minipuls 3) a uma vazão de 1,66 mL/min (Figura 18), sendo extrudadas por meio de uma agulha estéril de 22 G (25 x 0,7 mm 22G1) sobre uma solução de CaCl_2 0,15 M (20 mL). As microesferas foram deixadas em repouso por 30 min (Figura 19), sendo posteriormente coletadas por meio de uma peneira (Figura 20).

Figura 18 – Sistema de extrusão para a obtenção das cápsulas de alginato de sódio



Figura 19 – Microcápsulas em repouso em solução de CaCl_2

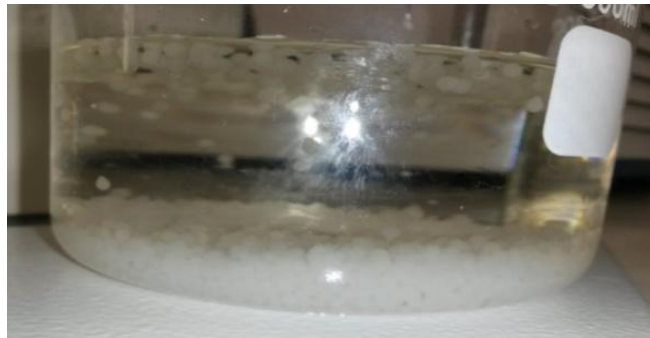


Figura 20 – Grânulos de alginato de cálcio.



4.7 Revestimento dos grânulos com gelatina

Após o preparo das cápsulas, estas foram recobertas com gelatina, sendo colocadas em tubos Falcon de 50 mL de capacidade contendo 30 mL de soluções aquosas de gelatina, previamente preparadas com as concentrações previstas no planejamento experimental e pasteurizadas conforme descrito anteriormente. As suspensões foram agitadas a 300 rpm por 10 min em agitador shaker para tubos (Ma 563), e em seguida as cápsulas foram recolhidas e lavadas com uma solução estéril de tampão salina-fosfato PBS a 0,1 M. Todas as cápsulas foram armazenadas sob refrigeração a 4 °C em frascos tipo penicilina contendo água estéril, para os testes posteriores de caracterização.

4.8 Análise estatística

Para a análise estatística dos resultados foi utilizado o programa Statistic® 8.0 (StatSoft. Inc. 1984-2007), sendo considerados estatisticamente significativos os resultados com $p < 0,05$.

4.9 Caracterização das cápsulas

4.9.1 Tamanho das cápsulas

Foram escolhidos de forma aleatória 12 grânulos de cada ensaio, e realizadas fotografias dos grânulos com o programa de processamento de imagens Fiji/ImageJ.

4.9.2 Contagem de células viáveis

As concentrações de células viáveis das amostras que passaram pelo processo de liofilização, das suspensões celulares obtidas a partir do ensaio de crescimento celular e das suspensões usadas para os ensaios de encapsulação foram determinadas a partir de diluições decimais seriadas das amostras em solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v). Para a contagem do material liofilizado, o material foi resuspendido em 3 mL de solução salina.

Para a contagem de células viáveis das microcápsulas, uma massa de 0,2 g de cápsulas úmidas foi colocada em tubo Falcon contendo 4,5 mL de solução de citrato de sódio 1,5 % (p/v) até a completa dissolução das partículas. Em seguida, a amostra foi submetida a diluições decimais seriadas em solução salina estéril (NaCl 0,85 % p/v).

Um volume de 200 μ L de amostras diluídas foi inoculado em placas de Petri contendo meio MRS Ágar suplementado com 2% (p/v) de glicose pelo método *pour plate*. As placas foram incubadas por 72 h a 37 °C e os resultados foram expressos em Unidades Formadoras de Colônias (UFC) por mL de suspensão ou por g de cápsula úmida.

4.9.3 Atividade de água

A atividade de água (A_w) foi determinada nas microcápsulas úmidas durante a avaliação do tempo de estocagem. Foi utilizado o equipamento PawKit Water Activity Meter® (Figura 6), de acordo com as instruções do fabricante. Os ensaios foram realizados em duplicata.

4.9.4 Teor de umidade

A umidade das cápsulas (X_p) foi determinada segundo a metodologia descrita de acordo com a Association of Official Analytical Chemists (AOAC, 1997). Uma massa de 5 g da amostra foi levada a estufa por 3 horas a temperatura de 105 °C. Após resfriamento em dessecador, a massa foi pesada e o procedimento repetido até obtenção de peso constante ($m_{pesocte}$). A umidade foi calculada por meio da Equação 1. Os ensaios foram realizados em triplicata.

$$X_p = \left[\frac{5}{m_{pesocte}} \right] - 1 \quad (1)$$

4.9.5 Espectroscopia de Infravermelho com Transformada de Fourier – FTIR

As análises FTIR foram realizadas no CENAPESQ (Centro de Apoio a Pesquisa) da UFRPE. Os espectros FTIR foram obtidos por espectrômetro modelo 640 – IR da Varian, utilizando a pastilha KBr. Foram obtidos em um intervalo de números de onda de 400 a 4000 cm^{-1} .

4.9.6 Análise térmica

Inicialmente, o equipamento DTA 60 (SHIMADZU®) foi calibrado seguindo as normas do fabricante, a fim de obterem-se resultados mais precisos. As amostras foram mantidas em dessecador até sua pesagem e acondicionamento em micro-cadinhos. Os equipamentos foram dotados de cadinho de referência (vazio de mesmo material ao da amostra). Para obtenção das curvas foi utilizado o programa

TA 60 (SHIMADZU®). As análises foram realizadas no Laboratório de Física e Química de Materiais Poliméricos do Departamento de Física da UFRPE.

Os parâmetros utilizados foram cadinho de platina, gás de arraste de Nitrogênio, razão de aquecimento de 10°C/min e uma faixa de temperatura de 30 °C até 800 °C.

4.9.7 Avaliação da viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

A viabilidade dos microrganismos microencapsulados foi determinada por meio de contagens realizadas imediatamente após o preparo das microcápsulas e após 30, 60, 90 e 120 dias de estocagem à temperatura de 8 °C e imersas em água destilada estéril. A Figura 21 apresenta as microcápsulas armazenadas.

Figura 21 – Microcápsulas armazenadas para estudo de viabilidade.



4.9.8 Microscopia eletrônica de varredura

A Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) foi realizada no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami (LIKA) da UFPE. As microcápsulas foram fixadas em uma fita dupla face em *stubs* de alumínio e recobertas por uma fina camada de ouro. As imagens foram obtidas por um Microscópio eletrônico de varredura EVO LS15 em uma voltagem de 20.00 KV.

4.9.9 Incorporação do probiótico no leite

Foram utilizados frascos tipo Erlenmeyer de 500 mL de capacidade contendo 100 mL de volume de leite adicionado de microrganismo (células livres e encapsuladas). O volume de células livres adicionado foi de 10 μ L a partir da suspensão celular concentrada obtida como descrito no item 4.5 (10^9 UFC/mL), enquanto que a quantidade de cápsulas úmidas adicionada foi de 10 g (10^6 UFC/g de cápsulas úmidas), de forma a serem obtidas concentrações iniciais de células viáveis de 10^5 UFC/mL. As amostras foram mantidas a 37 °C por 36 h, sendo avaliadas as concentrações de células viáveis ao longo do tempo. As cápsulas utilizadas foram elaboradas de acordo com a metodologia descrita no item 4.6. Os experimentos foram realizados em duplicata.

4.9.10 Caracterização físico-química do leite probiótico

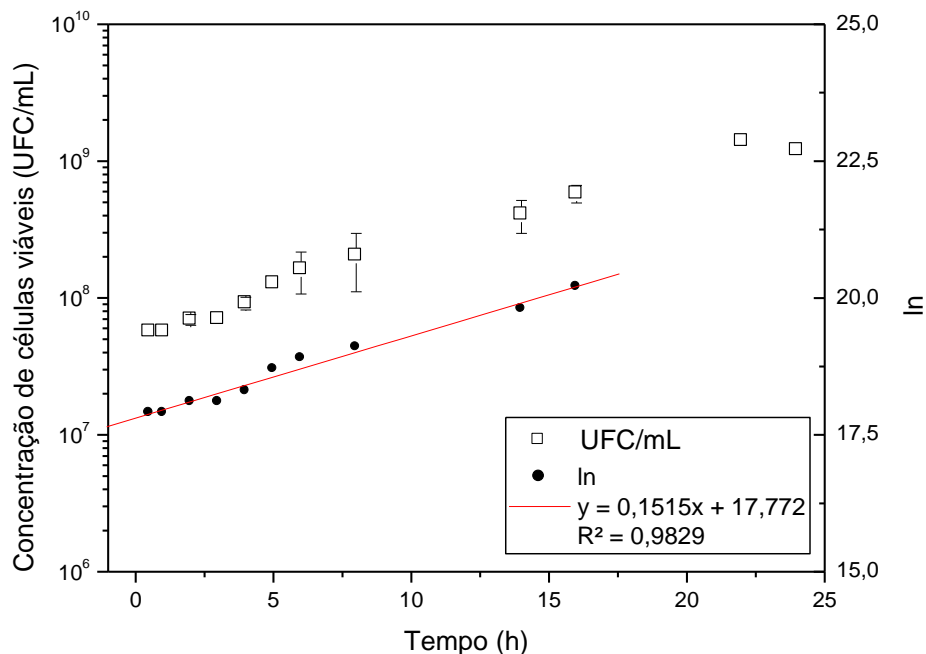
A caracterização físico-química das amostras fermentadas foi realizada por meio da determinação de umidade, cinzas e proteínas de acordo com os Métodos Analíticos Oficiais ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC,1997). Os ensaios foram realizados em triplicata. O pH foi determinado por potenciometria.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Curva de crescimento celular

A Figura 22 mostra a curva de crescimento celular de *L. rhamnosus* em meio caldo MRS, podendo ser observado que nas condições experimentais empregadas a concentração de células no início do cultivo é de 5×10^7 UFC/mL. A concentração celular atinge 3×10^8 UFC/mL após 14 h de fermentação, sendo atingida uma velocidade específica de crescimento celular de $0,15 \text{ h}^{-1}$. A elevada concentração inicial de células é devido à alta concentração celular do material liofilizado (10^7 UFC/mL) que foi usado como inóculo. SOHAIL et al. (2012) obtiveram uma concentração de 10^8 UFC/mL de *Lactobacillus rhamnosus* cultivado em caldo MRS a 37°C mas apenas após 24 h de cultivo.

Figura 22 – Curva de crescimento celular de *Lactobacillus rhamnosus* em meio caldo MRS



VOO et al. (2011) investigaram a estabilidade de cápsulas de pectina e de alginato/pectina contendo uma cultura mista de *Lactobacillus reuteri*, *L. brevis*, *L. salivarius* e *L. gallinarum*. Os microrganismos foram cultivados em caldo MRS a 37 °C e as células foram recuperadas por centrifugação no início da fase estacionária de crescimento celular para posterior adição às soluções dos polímeros. Neste trabalho, foi selecionado o tempo de 14 h de cultivo para a obtenção das células a serem submetidas aos ensaios de encapsulação.

5.2 Ensaio de encapsulação

5.2.1 Microcápsulas de alginato e gelatina

As Figuras 23, 24 e 25 mostram a superfície de resposta, a curva de contorno e o gráfico de Pareto, respectivamente, para a variável concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina. A maior concentração de células viáveis ($4,2 \times 10^9$ UFC/g) foi obtida para as concentrações de 1 % de alginato e 0,1 % de gelatina. Os resultados indicam que a concentração de células viáveis diminui com o aumento das concentrações dos polímeros.

A análise de variância aplicada aos resultados da matriz do planejamento é mostrada no gráfico de Pareto (Figura 25). A magnitude dos efeitos é representada pelas colunas, enquanto que a linha transversa às colunas representa a magnitude dos efeitos com significado estatístico para $p= 0,05$, ou seja, valores estatísticos com 95 % de confiança.

Observa-se que a concentração de alginato foi a variável que influenciou de forma mais significativa a variável resposta, atingindo um efeito estimado negativo de -4,59, ou seja, menores concentrações de alginato induzem a um aumento da concentração de células viáveis. A variável concentração de gelatina e o fator de interação alginato/gelatina não influenciaram a variável resposta. Este resultado indica que o recobrimento das cápsulas com gelatina não exerce um efeito positivo sobre a viabilidade celular das microcápsulas.

Figura 23 – Superfície de resposta para a concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.

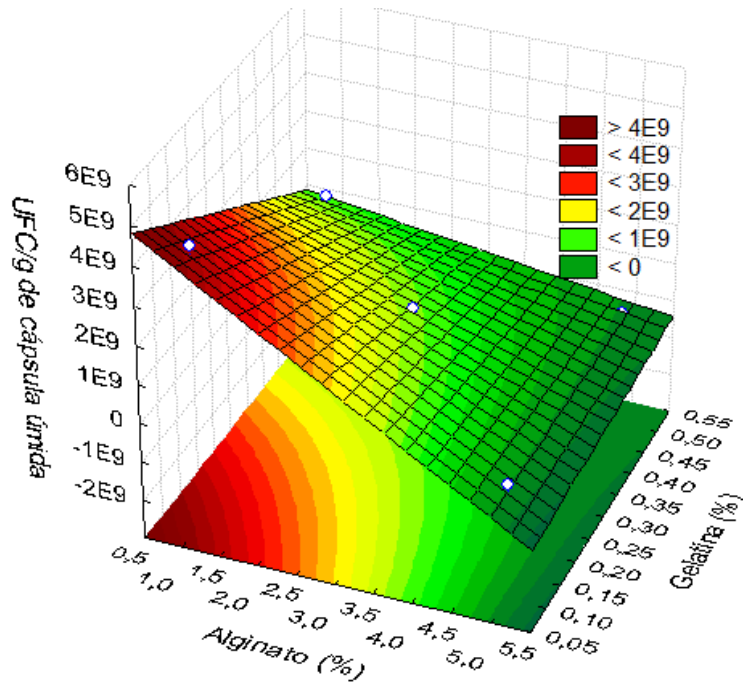


Figura 24 – Curva de contorno para a concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.

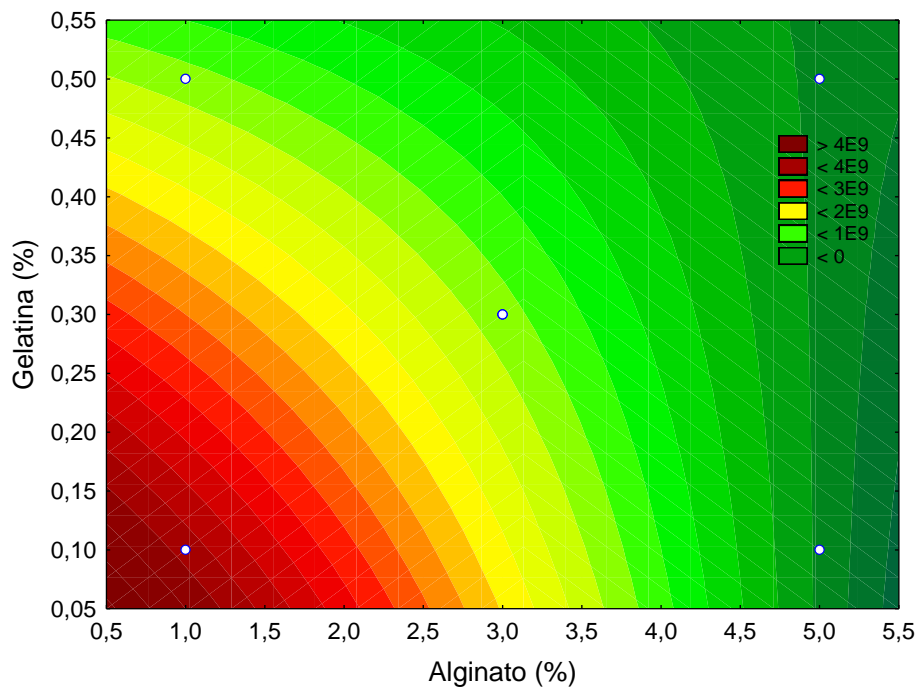
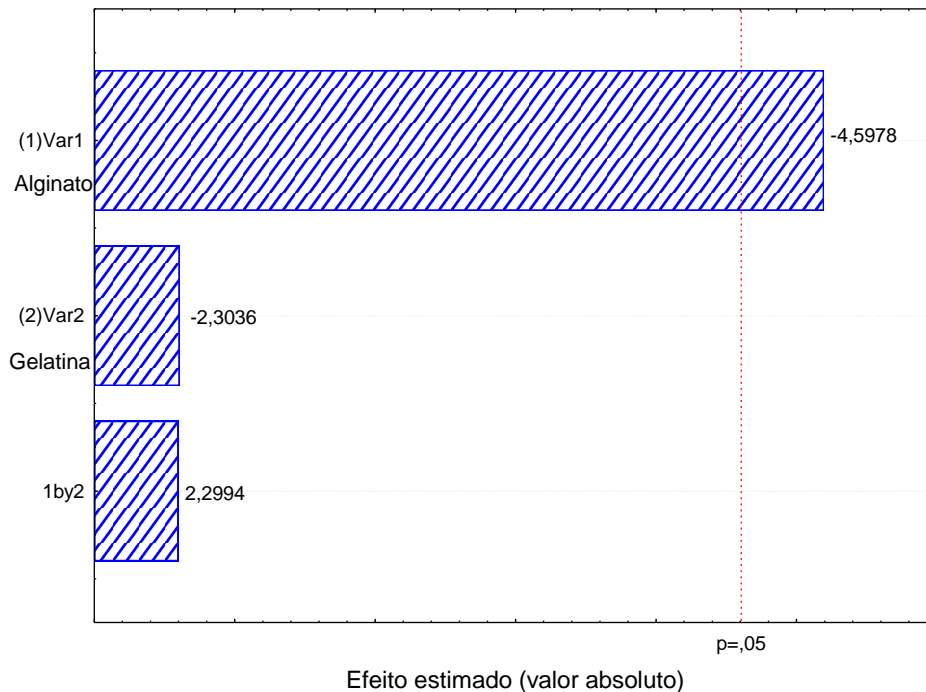


Figura 25 – Gráfico de Pareto para a concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em função da concentração de alginato e da concentração de gelatina.



KAMALIAN et al. (2014) investigaram as diferentes concentrações de alginato e alginato/quitosana e observaram um aumento da viabilidade celular de *Bifidobacterium* G4 com um aumento da concentração do alginato. Por outro lado, LÉONARD et al. (2014) relataram que maiores concentrações de alginato diminuíram significativamente a viabilidade celular de *Lactococcus lactis* quando comparado com alginato/caseína.

Resultados semelhantes foram relatados por LOTFIPOUR et al. (2012), quando mostraram que o aumento da concentração de alginato ocasionava uma diminuição da viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus*. Sugere-se que um aumento da concentração do polímero dê origem a uma estrutura rígida das cápsulas, o que pode dificultar a liberação das células bacterianas.

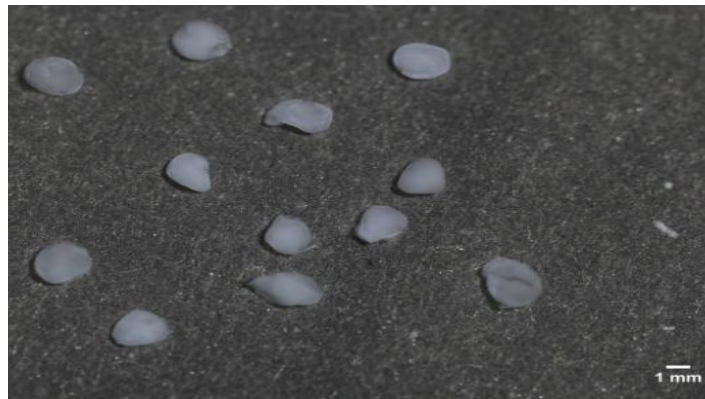
As microcápsulas de alginato/gelatina foram analisadas a olho nu, sendo observado que as mesmas eram aproximadamente esféricas e de cor opaca. Nas diferentes concentrações de alginato de sódio, percebeu-se também que a utilização de 1 % deste polímero resultou em microcápsulas menos homogêneas quando

comparadas com as demais concentrações (Figura 26). Já com as concentrações de 3 e 5 %, observou-se que os grânulos formados apresentaram-se mais uniformes, mais homogêneos e arredondados. Estas características também foram observadas por BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al. (2015).

Resultado idêntico foi observado por LUO et al. (2016), quando observaram que as microcápsulas de alginato possuíam características semi-translúcidas de cor branca, sendo a maioria esféricas.

Considerando os resultados mostrados acima, foi definida a condição de preparo de microcápsulas de alginato/gelatina contendo 1 % de alginato e 0,1 % de gelatina para os ensaios posteriores de caracterização das microcápsulas.

Figura 26 – Cápsulas úmidas de 1% alginato e 0,1% de gelatina



5.2.2 Microcápsulas de pectina e gelatina

A avaliação estatística dos resultados das microcápsulas obtidas com pectina não foi satisfatória, ou seja, as variáveis concentrações de pectina e concentração de gelatina não foram estatisticamente significativas. Em alguns experimentos, inclusive, não foi observada a formação das microcápsulas de 1% de pectina.

Observando as cápsulas a olho nu, estas se apresentaram de forma aproximadamente esférica e cor opaca. Já com relação ao preparo das microcápsulas nas diferentes concentrações, percebeu-se que a concentração de 1 % de pectina não favoreceu a formação das cápsulas. Entretanto, com as concentrações de 3 e 5 %, observou que os grânulos formados apresentaram-se uniformes e esféricos.

A gelificação da pectina de baixa-metoxilação é favorecida por um pH mais

elevado do que a de alta-metoxilação devido as interações eletrostáticas do íon Ca^{+2} , que requer um certo número de grupos carboxílicos dissociados.

Segundo ORMUS et al. (2015), a pectina de baixa metoxilação (LM) é um biopolímero carregado negativamente que é utilizado como espessante na ausência de íons cálcio ou como gelificante na sua presença. Algumas pectinas, dependendo da sua origem, possuem grupos hidroxílicos que podem estar acetilados nas posições dois e três, interferindo assim em sua capacidade de formar géis.

LOFGREN et al. (2007) confirmam esta teoria e afirmam que pectinas de baixa metoxilação na presença de íons cálcio são capazes de formar gel em valores elevados de pH. Considerando que neste trabalho o pH da solução de pectina foi de 4,5, não houve a formação de cápsulas de pectina devido à baixa concentração do polímero e do baixo valor do pH.

PREZOTTI et al. (2014) verificaram que a pectina de baixa metoxilação com concentrações superiores a 2 % permitiu a formação de partículas esféricas, enquanto que concentrações inferiores a 2 % (0,5 %, 1 % e 1,5 %) não foram suficientes para a formação da cápsula.

5.2.3 Atividade de água

A atividade de água é definida como água livre no produto, favorecendo dessa forma o crescimento de bactérias. Em geral, há uma variação na atividade de água dos alimentos; alimentos muitos secos apresentam uma atividade de água de 0,2, já alimentos úmidos apresentam uma atividade de 0,99. Atividade de água baixa é essencial para uma boa sobrevivência dos probióticos durante seu armazenamento, melhorando assim a estabilidade do produto. Com isso, é aconselhável uma atividade inferior a 0,25 durante seu armazenamento em longo prazo. (VESTERLUND et al., 2012).

Dessa forma, a atividade de água é um fator que afeta a viabilidade dos probióticos durante o processamento, o armazenamento e a passagem do trato gastrointestinal (ALBADRAN et al., 2015). As microcápsulas úmidas de *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram uma atividade de água de 0,95. De acordo com JIMÉNEZ et al.(2015) os resultados da atividade de água das microcápsulas úmidas de *Lactobacillus paracasei* variaram de 0,2 a 0,3. Já de acordo com CASTRO-

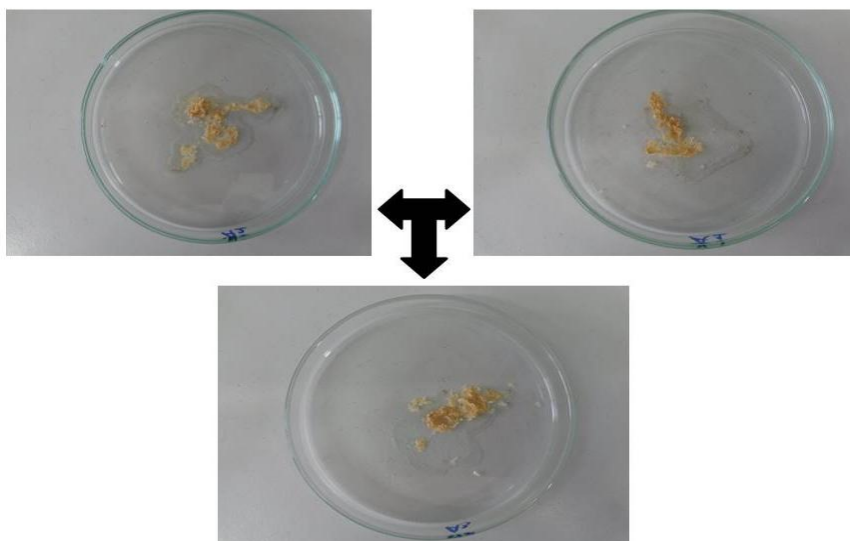
CISLAGHI et al.(2012) os resultados de atividade de água de microcápsulas contendo *Bifidobacterium* foram menores do que 0,3. Com isso, as microcápsulas deste trabalho não são adequadas para aplicação em alimentos com baixa atividade de água.

5.2.4 Teor de umidade

O teor de umidade é um fator importante na conservação e na viabilidade de microrganismos. As microcápsulas úmidas de alginato contendo *Lactobacillus rhamnosus* apresentaram teor de umidade de $97,68\% \pm 0,026$. Resultados semelhantes foram encontrados por LI et. al. (2011). Os autores justificam este alto valor de umidade como sendo característico de micropartículas produzidas com polissacarídeos formadores de géis, devido à sua capacidade de retenção de água. Resultado análogo foi observado por BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al. (2015), que obtiveram um teor de umidade de 95 %, devido ao poder de retenção de água que o polímero apresenta.

O alto teor de umidade encontrado nas amostras é devido ao fato das amostras terem sido armazenadas em água estéril, além de serem formadas por um polímero altamente higroscópico (CANO-CHAUCA et al., 2005). A Figura 27 mostra o aspecto visual das amostras após secagem.

Figura 27 – Aspecto visual das microcápsulas após secagem



5.2.5 Espectroscopia no infravermelho por transformada de Fourier – FTIR

Os espectros de absorção no infravermelho foram usados para identificar a composição das amostras a partir dos grupos funcionais presentes nos polímeros. As Figuras 28, 29 e 30 mostram os espectros do alginato puro, da cápsula úmida e da cápsula desidratada, respectivamente.

Na Figura 28 observa-se a banda 3430 cm^{-1} referente ao grupo funcional O-H que se estende em torno da banda. O pico presente em 2929 cm^{-1} é atribuído ao estiramento simétrico e assimétrico de C-H. O pico observado em 2150 cm^{-1} é atribuído ao grupo CO_2 . O aumento da intensidade do pico em 1611 cm^{-1} é referente ao estiramento simétrico do COO^- , o pico 1416 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico do COO^- , o pico 1304 cm^{-1} é referente ao grupo C-O, e os picos 1093 cm^{-1} e 1031 cm^{-1} estão associados ao estiramento referente ao grupo C-O. Os picos 946 cm^{-1} , 890 cm^{-1} e 818 cm^{-1} são devido ao grupo C-H do grupo piranose (anel do alginato) (FALKEBORG et al., 2015; HONG-YAN et al., 2015; BEKHIT et al., 2016).

Observamos na Figura 29 a banda 3443 cm^{-1} referente ao grupo funcional O-H devido à presença de grande quantidade de água. O pico observado em 2218 cm^{-1} é atribuído ao grupo CO_2 . O aumento da intensidade do pico em 1639 cm^{-1} do grupo $-\text{CONH}_2$ indica que o grupo negativo do alginato pode se associar com a carga positiva da gelatina. O pico 1420 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico do COO^- . Os picos 1090 cm^{-1} e 1036 cm^{-1} estão associados ao grupo C-O das unidades gulurônicas, o pico 943 cm^{-1} refere-se ao grupo C-H do anel piranose (DEVI et al., 2012 ;GHAFAR et al.,2012 ;XIAO et al.,2014).

Figura 28 - Espectro infravermelho do alginato de sódio em KBr.

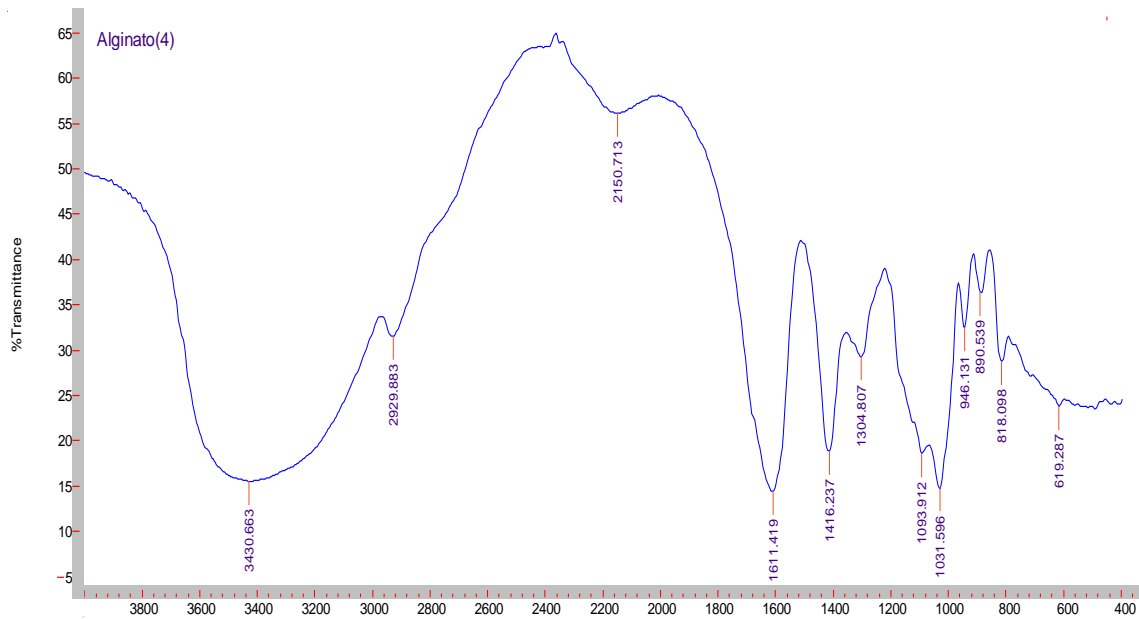
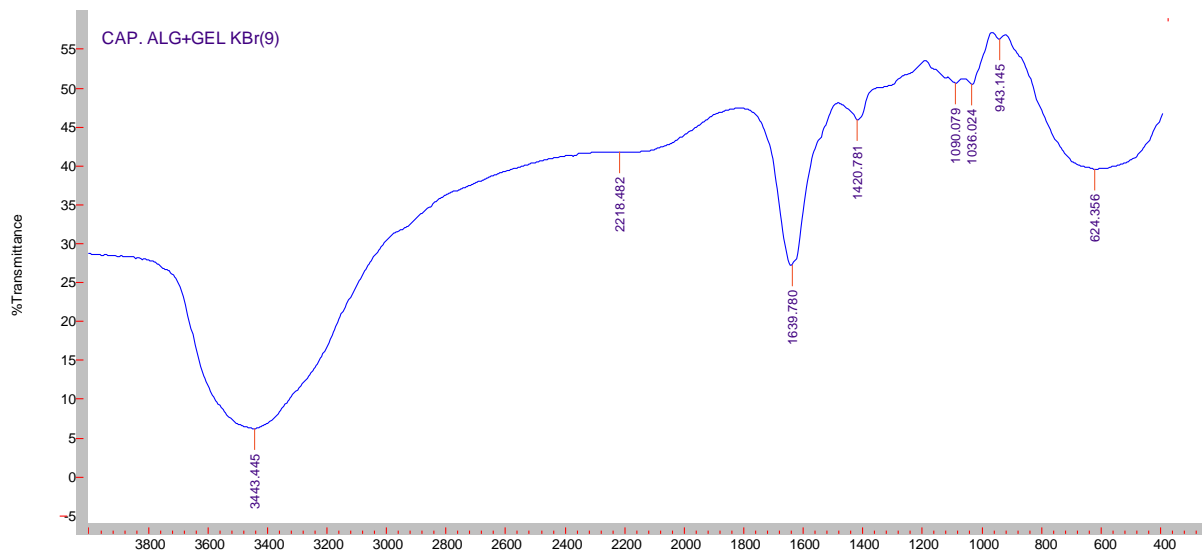


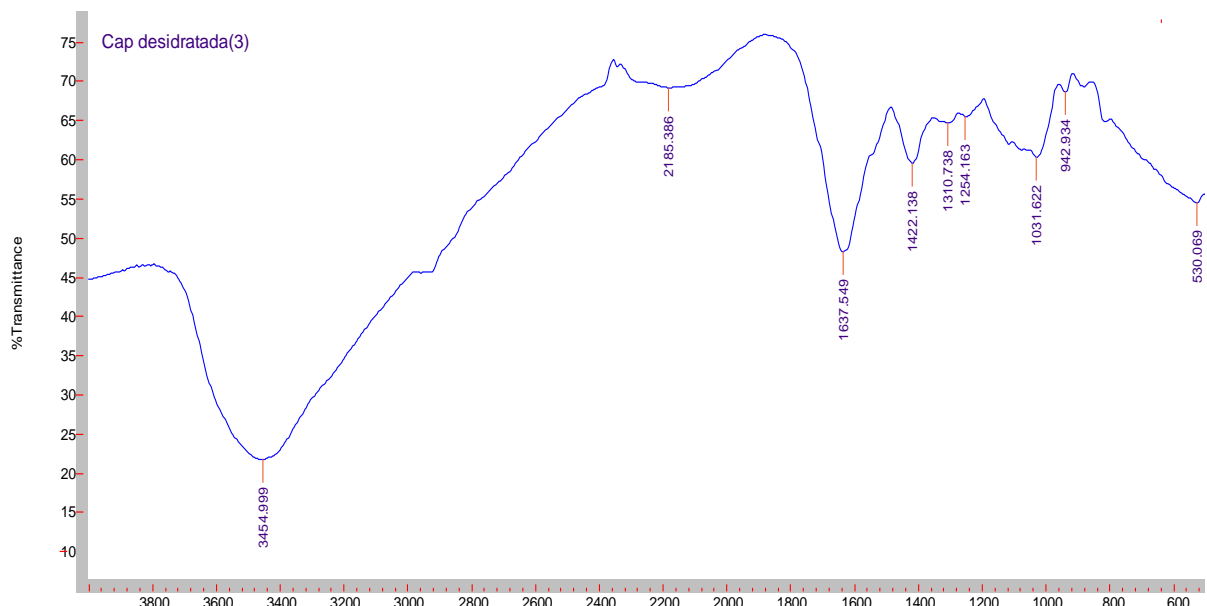
Figura 29 - Espectro infravermelho da cápsula úmida contendo alginato-gelatina em KBr.



Podemos observar na Figura 30 a banda 3454 cm^{-1} referente ao grupo funcional O-H ligado ao hidrogênio. O pico observado em 2185 cm^{-1} é atribuído ao grupo CO_2 . O aumento da intensidade do pico em 1637 cm^{-1} do grupo $-\text{CONH}_2$ ($\text{C}=\text{O}$) indica que o grupo negativo do alginato pode associar-se com a carga positiva da gelatina. O pico 1422 cm^{-1} é referente ao estiramento assimétrico do

COO⁻ ligado ao hidrogênio do alginato. O pico 1310 cm⁻¹ é referente ao grupo C-N da gelatina, o pico observado em 1254 cm⁻¹ refere-se ao grupamento C-O, o pico 1031 cm⁻¹ está associado ao grupo C-O, o pico 942 cm⁻¹ ao grupo C-H. Com a secagem das cápsulas, as moléculas de água foram afetadas e as bandas diminuíram (GÓMEZ-ORDÓÑEZ, RUPÉREZ, 2011; DEVI, KAKAT, 2013; SARKER et al., 2014).

Figura 30- Espectro infravermelho da cápsula desidratada contendo alginato-gelatina em KBr.



Os resultados obtidos são semelhantes aos observados por ISIKLAN, KÜÇÜKBALCI (2012) para os picos 3400 cm⁻¹ a 2500 cm⁻¹ dos grupos funcionais O-H e C-H. Os resultados de 1600 cm⁻¹ a 1400 cm⁻¹ se assemelham aos resultados obtidos por SANGEETHA et al. (2013) dos grupos funcionais COO⁻. O pico 1028 cm⁻¹ do grupo C-H relatado por TU et al. (2015) difere dos resultados do presente estudo. Já SAARAI et al. (2013) afirmam que o pico de 1030 cm⁻¹ é do grupo funcional C-O.

Nas Figuras 29 e 30 observamos um pico com intensidade entre 1637 cm⁻¹ e 1639 cm⁻¹ comprovando a presença do grupo funcional -CONH² que está presente na gelatina, visto que o alginato puro não apresentou esse pico (WEI et al., 2014)

5.2.6 Análise Térmica

A análise térmica é um grupo de técnicas por meio das quais uma propriedade física de uma substância e/ou de seus produtos de reação é medida em função da temperatura e/ou tempo, enquanto essa substância é submetida a um programa controlado de temperatura.

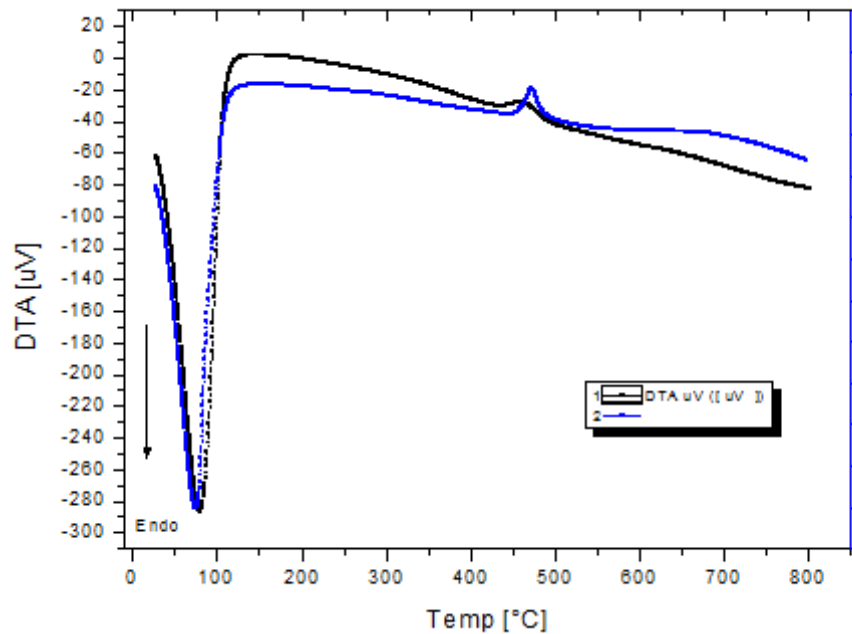
As técnicas termoanalíticas utilizadas foram DTA (Análise Térmica Diferencial) e TGA (Análise Termogravimétrica). DTA é uma técnica térmica de medição contínua das temperaturas da amostra e um material de referência termicamente inerte, que envolve uma mudança na energia durante o aquecimento ou arrefecimento de uma amostra em um forno. Este processo inclui reações endotérmicas que são devido à desidratação e a decomposição da amostra e reação exotérmicas que são por causa da combustão ou até mesmo da cristalização do material amorfo (GOOCH, 2011). TGA é uma técnica termoanalítica que acompanha a perda ou o ganho de massa da amostra em função da temperatura em uma atmosfera inerte. Ela consiste em um processo termoanalítico utilizado para analisar a decomposição térmica da amostra (GAŠPAROVIC[˘] et al., 2012). As curvas TGA permitem obter conclusões sobre a estabilidade térmica da amostra.

As Figuras 31 e 32 mostram os resultados das análises das microcápsulas úmidas e secas pelas duas técnicas citadas acima.

Notando a linha DTA da amostra das microcápsulas úmidas e secas (Figura 31), observa-se um evento térmico onde ocorreu a maior perda de massa de caráter endotérmico, porém neste caso a perda de água das microcápsulas úmidas e secas ocorreu em um processo muito parecido. Isso acontece porque as microcápsulas contém água, embora a amostra seca apresentasse menos água que a úmida. Segundo WU et. al. (2011), o pico endotérmico das microcápsulas de alginato é devido à evaporação de água. ANBINDER et al. (2011) analisaram as interações na encapsulação entre o alginato e a quitosana e observaram que o alginato sem a quitosana apresentou picos endotérmicos em torno de 132 °C

Observa-se a desidratação das microcápsulas úmidas e secas, com perda de massa polimérica e perda de massa secundária. A amostra possui dois estágios: o primeiro, que vai até 150 °C, e o segundo que ocorre por volta de 400 °C, onde ocorre a decomposição.

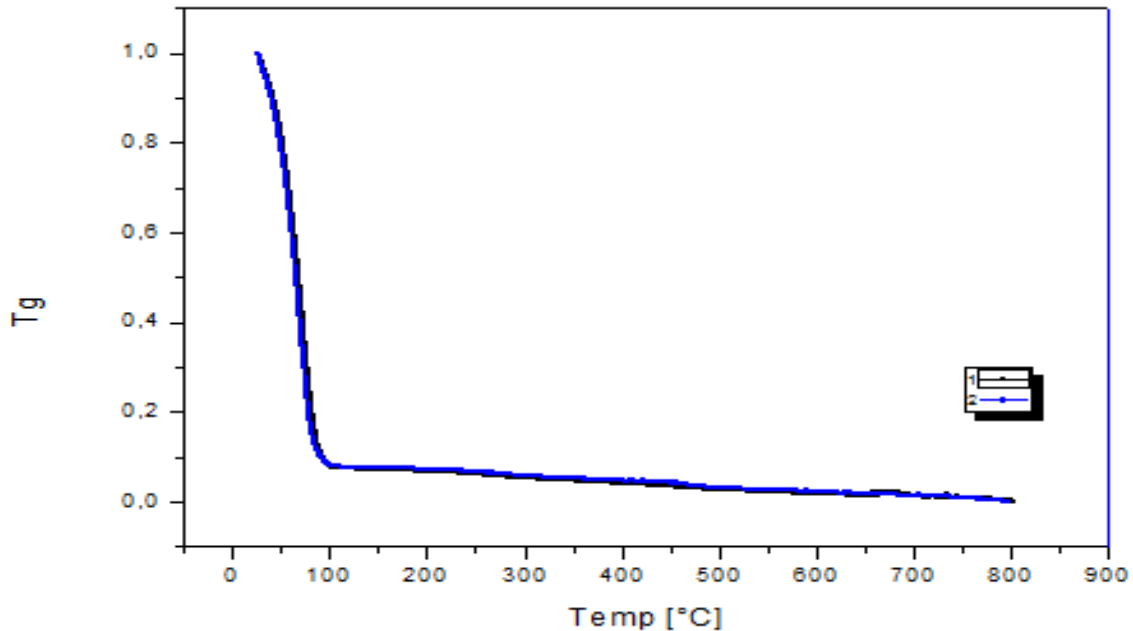
Figura 31- Sobreposição das curvas DTA das microcápsulas úmida (1) e seca (2)



A curva de TGA (Figura 32) para as microcápsulas úmidas e secas mostra uma curva típica de perda de massa. O resultado indica que até 100 °C a amostra continha um baixo teor relativo da matéria orgânica, sendo que a partir desta temperatura a amostra degradou-se rapidamente durante o aquecimento até 800 °C. A degradação oxidativa térmica dos polímeros pode fornecer informações importantes sobre a forma como materiais poliméricos se comportam sob diferentes condições atmosféricas (LIU et al., 2013).

Conforme STOJANOVIC et al. (2012), a decomposição térmica dos polímeros inclui três processos, que são a decomposição térmica, a remoção de água (que é a desidratação) e a despolimerização acompanhada pela ruptura de ligações C-O e C-C que dão origem a CO, CO₂ e H₂O. Os autores observaram que as curvas de TGA da encapsulação de *Thymus serpyllum* utilizando o alginato de sódio ocorreu entre 40-160 °C, mostrando que houve a liberação da água em diferentes temperaturas de acordo com a sua interação com o polímero.

Figura 32- Sobreposição das curvas TGA das microcápsulas úmida (1) e seca (2), na razão de aquecimento de $10\text{ }^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$.



A Temperatura de Transição Vítreia (T_g) observada foi de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo percebida no gráfico pela mudança na linha de base. Este resultado é favorável em se tratando da amostra do probiótico, já que esta teria sua atividade biológica preservada em temperaturas inferiores.

A curva de T_g das microcápsulas de alginato com revestimento de gelatina mostra comportamento térmico das microcápsulas úmida e seca, que obtiveram uma perda de massa similar entre os eventos térmicos onde ocorreu o maior percentual de perda de massa a partir da temperatura de $27\text{ }^{\circ}\text{C}$ e finaliza por volta de $100\text{ }^{\circ}\text{C}$. Já ANBINDER et al. (2011) apresentaram uma temperatura de transição de $50,8\text{ }^{\circ}\text{C}$ e finalização em $100\text{ }^{\circ}\text{C}$, sendo obtida uma estabilidade satisfatória do produto. As microcápsulas apresentaram uma perda de massa de 99,8%.

5.2.7 Microscopia eletrônica de varredura

A morfologia superficial das microcápsulas foi estudada por meio das micrografias obtidas por MEV (microscopia eletrônica de varredura). O processo de metalização (Figura 33) nessas amostras foi importante para observar a porosidade,

rugosidade e o revestimento das microcápsulas.

Figura 33 - Metalização das cápsulas



A morfologia das micropartículas secas por microscopia eletrônica de varredura mostrou uma alta aglomeração levando a uma perda da forma esférica (Figura 34 A) e de tamanhos variados (Figura 34 B). Entretanto, a observação em um aumento maior mostra que alguns fragmentos mantiveram o contorno esférico (Figura 34 D). Na Figura 34 C pode-se observar que a superfície das microcápsulas é formada por estruturas não homogêneas constituídas por partículas poliédricas. Isto também foi relatado por FINOTELLI et al. (2010), quando observaram partículas poliédricas nas microcápsulas de alginato e quitosana.

O tamanho médio das cápsulas variou de 1,532 mm (Figura 35) a 1,9 mm (Figura 36). As imagens apresentadas por SOHAIL et al.(2011) mostraram um resultado semelhante à Figura 36, com microcápsulas de alginato contendo *Lactobacillus rhamnosus* produzidas pelo método de extrusão apresentando um tamanho de 1,9 mm.

O processo de secagem das microcápsulas pode explicar essa variação de tamanho, além da ocorrência de rachaduras. Este aspecto de rachaduras foi observado no trabalho de SHEN et al. (2011), quando imobilizaram β -galactosidase em cápsulas de alginato/gelatina. RAJAM et al. (2012) investigaram microcápsulas de alginato contendo *Lactobacillus plantarum* e observaram que após a secagem das cápsulas as micropartículas apresentaram forma irregular e elevada porosidade.

CÓRDOBA et al. (2013) obtiveram esferas de alginato de cálcio com uma distribuição de tamanho homogênea e com valor médio de 3,7 μ m, sendo obtido um grau elevado de esfericidade quando comparado ao presente trabalho. Por outro lado, CHAN et al. (2011) obtiveram grânulos de alginato de cálcio com algumas

fissuras sobre a superfície.

Figura 34 – Microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas de alginato recobertas com gelatina (A) e (B). Aspecto externo da microcápsula (C). Aspecto interno da microcápsula (D)

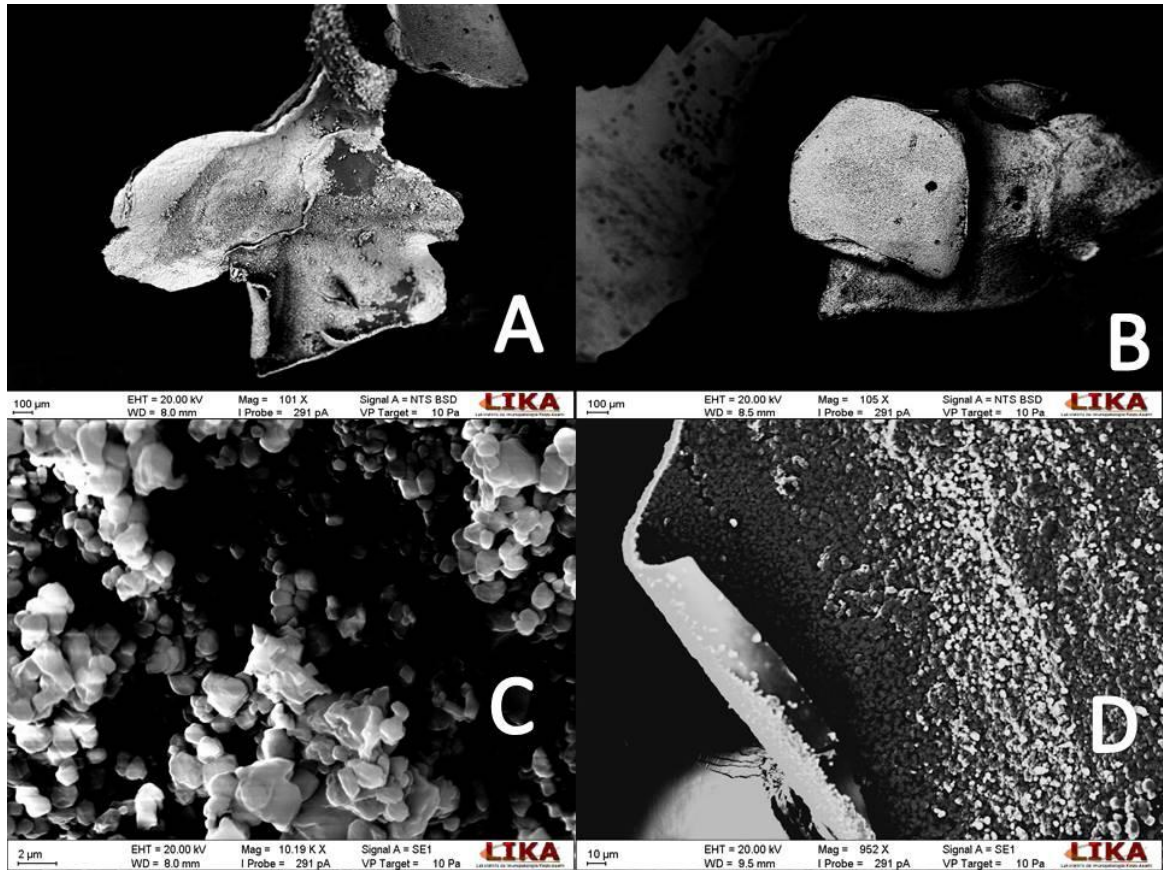


Figura 35 - MEV tamanho da microcápsulasde alginato

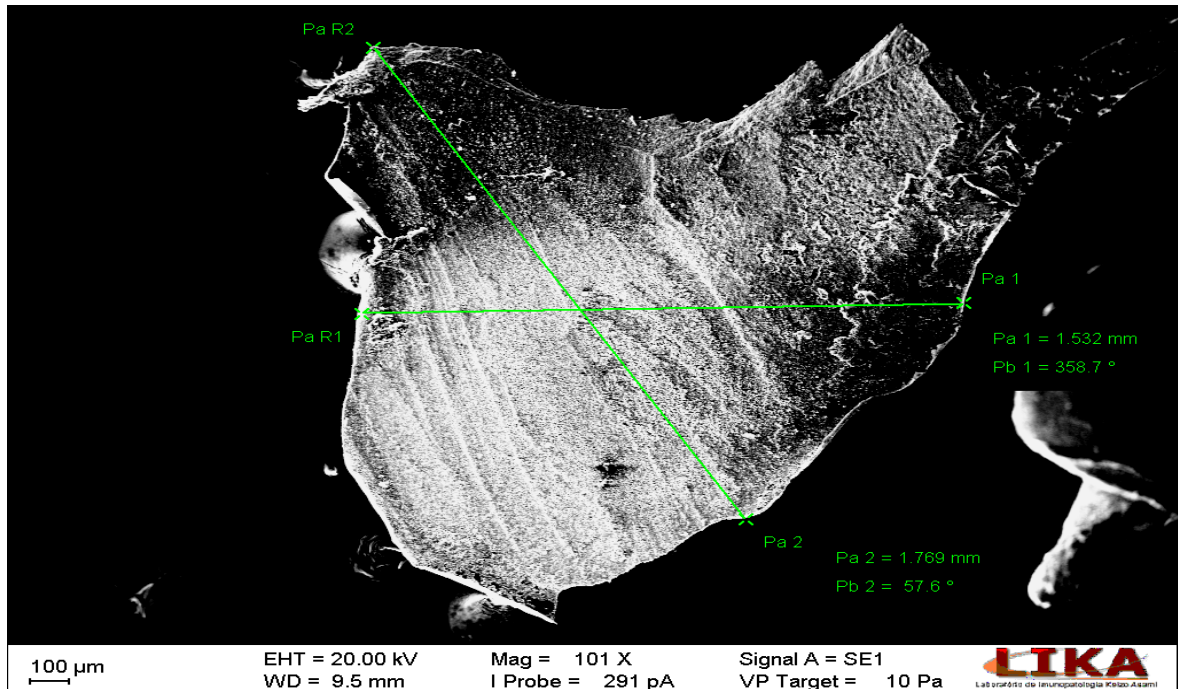
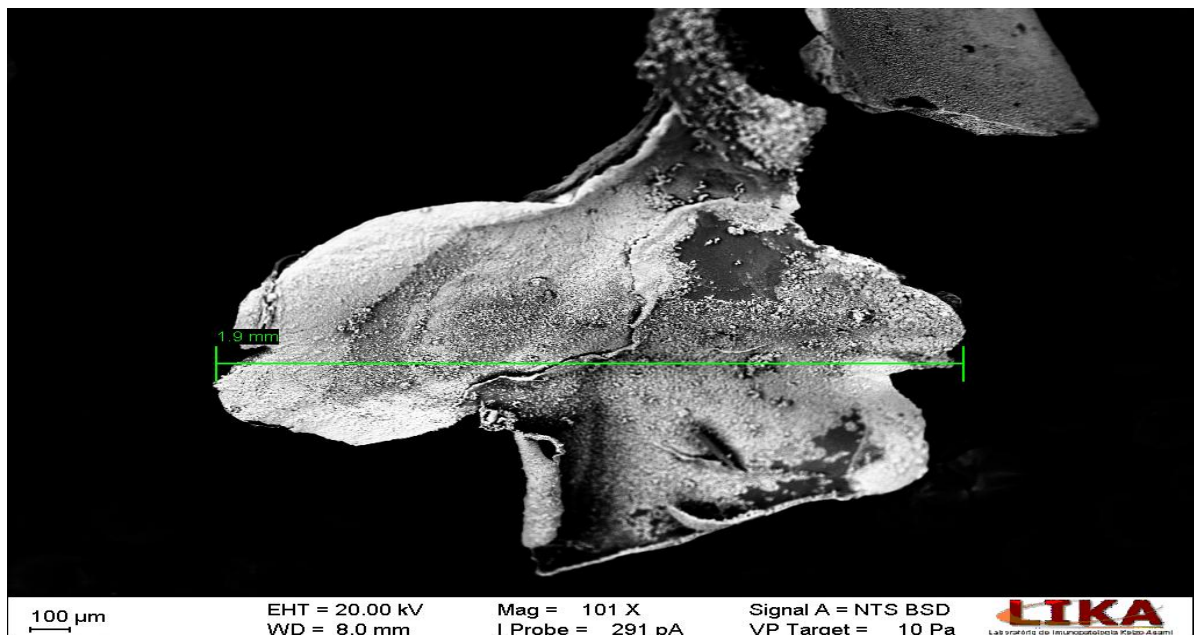


Figura 36 - MEV tamanho da microcápsulasde alginato



No estudo de ABBASZADEH et al. (2014) foi observado o efeito de diferentes concentrações de alginato e quitosana sobre o tamanho e o aspecto dos grânulos. Em relação ao tamanho, este variou entre 1,38 mm para concentrações maiores de alginato e quitosana e 1,64 mm para concentrações menores de alginato e quitosana. Embora a concentração de quitosana não tivesse nenhum efeito

significativo em relação ao tamanho do grânulo, o diâmetro do grânulo diminuiu significativamente ($p < 0,05$) com o aumento da concentração do alginato, por causa das ligações entre o COO^- do alginato com o íon Ca^{+2} resultando na diminuição do tamanho da cápsula.

Segundo TOTOSAUS et al. (2013) microcápsulas de alginato de sódio contendo bactérias lácticas apresentaram uma superfície enrugada, ondulada, macia e de formato irregular. Isso acontece devido aos géis ionotrópicos formados por íons de cálcio possuírem uma maior concentração do polímero na superfície, resultando numa superfície irregular.

5.2.8 Avaliação da viabilidade dos microrganismos encapsulados durante a estocagem

Durante o processamento e/ou armazenamento dos microrganismos pode ocorrer o dano celular e a perda de atividade. Deste modo, a microencapsulação apropriada assegura que os microrganismos sobrevivam ao processamento e que permaneçam viáveis ao longo do armazenamento (THOMAS et al., 2014).

A gelatina, por ser um polímero anfótero, com pH abaixo do seu ponto isoelétrico, pode formar complexos com polissacarídeos aniônicos, tais como o alginato, através de interações eletrostáticas, a fim de melhorar a biodisponibilidade de *Lactobacillus rhamnosus* no decorrer do encapsulamento (SARAVANAN & RAO, 2010).

A Tabela 3 mostra a concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em cápsulas de alginato revestidas com gelatina durante 120 dias de armazenamento a 8 °C, sendo observada uma diminuição da concentração celular de 10^{10} para 10^5 UFC/g após 120 dias.

Tabela 3 - Concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em cápsulas de alginato revestidas com gelatina durante 120 dias de armazenamento a 8 °C

Tempo (dia)	UFC/g
1	$3,6 \times 10^{10}$
10	$2,3 \times 10^{10}$
20	$1,4 \times 10^7$
30	$3,5 \times 10^7$
40	$1,9 \times 10^7$
50	$1,1 \times 10^6$
60	$1,3 \times 10^7$
70	$1,9 \times 10^7$
80	$1,6 \times 10^6$
90	$1,3 \times 10^6$
100	$2,7 \times 10^5$
110	$1,2 \times 10^6$
120	$1,4 \times 10^5$

Contrário a esse resultado, TRABELSI et al. (2014) observaram que *Lactobacillus plantarum* não sobreviveram em microcápsulas de alginato revestidas com gelatina. Já CHÁVARRI et al. (2010) microencapsularam *Lactobacillus gasseri* em cápsulas de alginato-quitosana e observaram que após 28 dias de armazenamento a viabilidade celular diminuiu de 10^9 para 10^7 UFC/mL.

BRINQUES, AYUB (2011) avaliaram a eficiência das microcápsulas refrigeradas a 4 °C com o intuito de reduzir as perdas da viabilidade celular com menos de 38 dias de incubação. Os resultados mostraram que tanto as células imobilizadas com pectina quanto as com alginato-quitosana tiveram a menor perda de viabilidade.

5.2.9 Incorporação do probiótico no leite

Os resultados obtidos para a concentração de células livres de *Lactobacillus rhamnosus* durante o cultivo em leite inoculado com células livres e encapsuladas em alginato são mostrados na Figura 37. Observa-se que a concentração celular

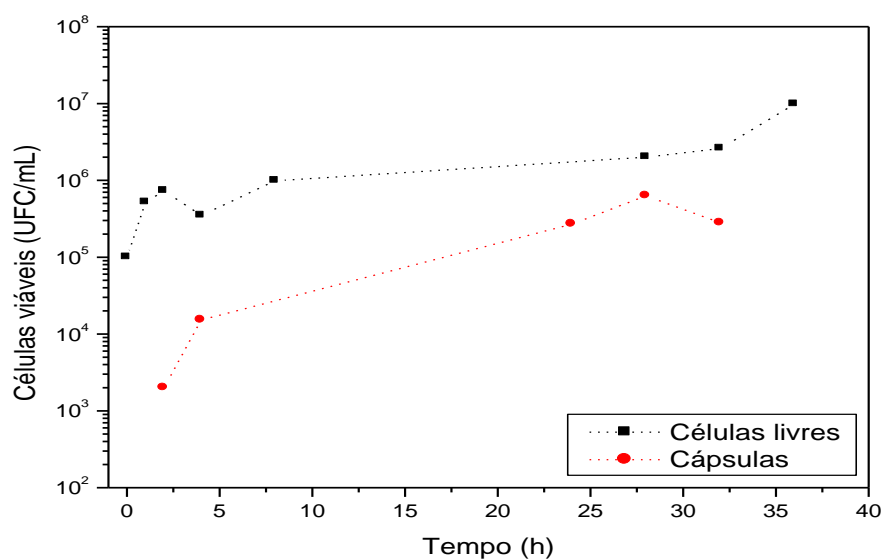
aumenta ao longo do tempo para ambos os experimentos, sendo que para as células encapsuladas observou-se uma liberação gradual das células, atingindo $2,8 \times 10^5$ UFC/mL após 32 h, enquanto que para as células livres foi atingida uma concentração de células viáveis de 10^7 UFC/mL após 36 h de cultivo. Segundo DIMITRELLOU et al. (2016) e KRASAEKOOPT e WATCHARAPOK (2014) eles observaram que *Lactobacillus casei* atingiu uma concentração de 10^7 UFC/mL no leite incorporado com células livres e encapsuladas.

De acordo com PETROV et al. (2006), *L. rhamnosus* ATCC 7469 apresenta genes localizados no cromossomo que codificam a utilização de lactose, resultando em taxas de conversão de lactose em lactato acima de 90 % em cultivos com células livres. Esses mesmos autores avaliaram o processo de obtenção de ácido láctico a partir de lactose por *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em células livres e imobilizadas em gel de poliacrilamida. Os autores avaliaram concentrações iniciais de lactose de 5 a 30 g/L e observaram que para concentrações deste açúcar abaixo de 11 g/L não foi observada inibição do crescimento pelo substrato no cultivo com células livres. No presente trabalho, a concentração de carboidrato (lactose) é de 45 g/L. Dessa forma, sugere-se que concentrações celulares maiores que 10^7 UFC/mL podem ser obtidas com menores concentrações de lactose no meio.

Ainda segundo PETROV et al. (2006), o cultivo com as células imobilizadas em gel de poliacrilamida a uma concentração de lactose de 11 g/L apresentou uma fase lag mais longa. Os autores concluem que este polímero pode ser usado para preservar o microrganismo sob condições de estocagem a baixas temperaturas quando comparado com as células livres.

Uma alternativa eficiente e econômica para o cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 é o emprego de soro de leite. De acordo com FITZSIMONS et al. (2007), o soro de leite contém, em média, 93% de água, 5% de lactose, 0,9 a 0,7% de proteínas, 0,5 a 0,3% de gordura, 0,2% de ácido láctico e pequenas quantidades de vitaminas. BOVO et al. (2014) avaliaram o crescimento de *L. rhamnosus* HOWARU® LYO 40 DCU em meio caldo MRS e em meio à base de soro de leite (MMW) a 37 °C por 24 h. Os autores observaram uma maior concentração celular no meio MMW (9,84 log UFC/mL) do que no meio MRS (9,63 log UFC/mL).

Figura 37 - Concentração de células viáveis de *Lactobacillus rhamnosus* durante o cultivo em leite inoculados com células livres e encapsuladas em alginato



LIEW et al. (2005) realizaram um estudo de otimização das condições de cultivo de *L. rhamnosus* ATCC 7469 e observaram que a concentração de células viáveis atingia o valor máximo (9,35 log UFC/mL) a pH 6,9, solução de vitaminas 1,28 % (v/v) e concentrações de glicose e de extrato de levedura de 5 % (v/v) e 6 % (v/v), respectivamente. Estas diferenças de crescimento celular para a mesma cepa é explicada pela influência das condições de cultivo, tais como pH, temperatura, formulação do meio, concentração de inóculo, tempo de incubação, entre outros, sobre o crescimento celular de lactobacilos.

Os resultados das análises físico-químicas para o leite com células livres e encapsuladas de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 são mostrados na Tabela 4. Pode-se verificar que os resultados obtidos indicam que o teor de proteínas para ambas as amostras de leite é superior ao teor proteico normalmente encontrado em leites fermentados comerciais (2 %), resultados próximos foi observado por THOMAZ et al.(2012).

Tabela 4 - Análises físico-químicas para o leite inoculados com células livres e encapsuladas de *L. rhamnosus* ATCC 7469

AMOSTRA	Proteínas (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Leite – células livres	2,97 ± 0,06	16,1 ± 0,7	88,0 ± 0,1
Leite – células encapsuladas	2,55 ± 0,34	17,3 ± 0,6	89,6 ± 0,1

6 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que a fase exponencial de cultivo de *Lactobacillus rhamnosus* em meio caldo MRS foi atingida com 14 h de cultivo, sendo selecionada esta condição para a obtenção de células para os ensaios de encapsulamento.

As microcápsulas produzidas por meio da técnica de extrusão com alginato como agente encapsulante foram adequadas para a microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus*, enquanto que as microcápsulas obtidas com pectina não foram satisfatórias. A partir desses resultados, foi selecionada a condição de 1 % de alginato e 0,1 % de gelatina para a obtenção das microcápsulas probióticas.

Encontram-se várias publicações de trabalho falando sobre a microencapsulação de probióticos. No entanto, na literatura não publicaram microcápsulas de alginato contendo *Lactobacillus rhamnosus* recobertas por gelatina utilizando a técnica de extrusão, tornando este trabalho inovador.

A análise térmica do material indicou uma temperatura de transição vítrea (T_g) acima da temperatura de armazenamento das microcápsulas, o que garante a cristalização das microcápsulas.

A concentração de células viáveis de *L. rhamnosus* em cápsulas de alginato revestidas com gelatina durante 120 dias de armazenamento a 8 °C diminuiu em 5 ciclos logarítmicos, atingindo 10⁵ UFC/g.

A incorporação de cápsulas de alginato revestidas com gelatina contendo *L. rhamnosus* em leite resulta no aumento gradual da concentração celular ao longo do tempo, atingindo 2,8 x 10⁵ UFC/mL após 32 h, enquanto que para as células livres foi atingida uma concentração de células viáveis de 10⁷ UFC/mL após 36 h de cultivo, concentração mínima terapêutica recomendada para probióticos na estocagem do produto.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBASZADEH et al. The effect of alginate and chitosan concentrations on some properties of chitosan-coated alginate beads and survivability of encapsulated *Lactobacillus rhamnosus* in simulated gastrointestinal conditions and during heat processing. *Journal of Science and Food Agriculture*. 94, 2210–2216, 2014.

AKIN A.; ISIKLAN N. Microwave assisted synthesis and characterization of sodium alginate-graft-poly(N,N -dimethylacrylamide). ***International Journal of Biological Macromolecules*** 82,530–540, 2016.

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

ALONSO e ISAY . Bactérias do grupo *Lactobacillus casei*: caracterização, viabilidade como probióticos em alimentos e sua importância para a saúde humana. ***Archivos latinoamericanos de nutrición***. Vol. 57 N° 4, 2007.

ALVIM et al. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. ***LWT - Food Science and Technology***. 65,689-694, 2016.

ANBINDER et al. Yerba Mate Extract Encapsulation with Alginate and Chitosan Systems: Interactions between Active Compound Encapsulation Polymers. ***Journal of Encapsulation and Adsorption Sciences***, 1, 80-87, 2011.

ANNAN et al. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions.***Food Research International***. 41, 184–193,2008.

ANTUNES, A. E. C. et. al. ; SILVA, E. R. A.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; LERAYER, A. L. S. Probióticos: agentes promotores de saúde. *Nutrire: rev.*

Sociedade Brasileira. Alimentação. Nutrição. São Paulo, SP, v. 32, n. 3, p. 103-122, dez. 2007.

ASSMANN et al. Functional foods and cardiometabolic diseases. **Nutrition, Metabolism & Cardiovascular Diseases.** V. 24, p.1272-1300, 2014.

ASSOCIATION OF OFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS (AOAC). **Official methods of analysis.** 16th ed.Washington D.C.: AOAC, 1997. v.2

ASSUNÇÃO et al., ESTUDO PROSPECTIVO SOBRE ENCAPSULAMENTO DE COMPOSTOS BIOATIVOS. **Revista GEINTEC.**ISSN: 2237-0722. São Cristóvão/SE. Vol. 4/n. 4/ p.1382-1391. 2014.

AZEREDO. Encapsulação: aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimento Nutricional.** Araraquara v. 16, n. 1, p. 89-97, jan./mar. 2005.

BADARÓ. Alimentos probióticos: aplicações como promotores da saúde humana. Nutrir gerais – **Revista Digital de Nutrição** – Ipatinga: Unileste-MG, V. 2 – N. 3 – Ago./Dez. 2008.

BARBOSA et al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate **Food Microbiology.** 46,254-262, 2015.

BARBOSA et al. Characterization of a two-peptide plantaricin produced by *Lactobacillus plantarum* MBSa4 isolated from Brazilian salami. **Food Control.** 60, 103-112, 2016.

BAZZO. Poly (3 hydroxybutyrate)/ chitosan/ ketoprofen or piroxicam composite microparticles: Preparation and controlled drug release evaluation. *Carbohydrate Polymers.*v. 77, pp. 839–844,. BILLMEYER Jr., F. W. **Textbook of polymer science.** 3rd. ed. New York. 2009.

BARHAM et al. Moisture diffusion and permeability characteristics of

hydroxypropylmethylcellulose and hard gelatin capsules. **International Journal of Pharmaceutics**. 478 796–803, 2015.

BARBOSA et. al. Improving safety of salami by application of bacteriocins produced by an autochthonous *Lactobacillus curvatus* isolate. **Food Microbiology**. 46,254-262, 2015.

BAYARRI et al. Properties of lysozyme/low methoxyl (LM) pectin complexes for antimicrobial edible food packaging **Journal of Food Engineering**. 131,18–25, 2014.

BAYON et al. Development of antimicrobial hybrid mesoporous silver phosphatepectin microspheres for control release of levofloxacin. **Microporous and Mesoporous Materials**. 226,71-78, 2016.

BEKHIT et al. Design of microcapsules containing *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* in alginate shell and xanthan gum with nutrients core. **LWT - Food Science and Technology**. 68, 446-453, 2016.

BELHABIB et al. Microstructural design of biopolymer blends and related elasticity with imperfect interfacial bonding. **Carbohydrate Polymers**. 138, 309–316, 2016.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al. Improving the controlled delivery formulations of caffeine in alginate hydrogel beads combined with pectin, carrageenan, chitosan and psyllium. **Food Chemistry**. 167, 378–386, 2015.

BELŠČAK-CVITANOVIĆ et al. Encapsulation of polyphenolic antioxidants from medicinal plant extracts in alginate–chitosan system enhanced with ascorbic acid by electrostatic extrusion. **Food Research International**. 44, 1094–1101, 2011.

BHAT et al. Improving survival of probiotic bacteria using bacterial poly- γ -glutamic acid. **International Journal of Food Microbiology**. 196, 24–31, 2015.

BISWAL et al. Effect of mechanical and electrical behavior of gelatin hydrogels on

drug release and cell proliferation. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 53, 174–186, 2016.

BOVO et al. Ability of a *Lactobacillus rhamnosus* strain cultured in milk whey based medium to bind aflatoxin B1. **Food Science and Technology**. 34, 566-570, 2014.

BOTELHO, L. Isolamento e identificação de lactobacilos e bifidobacterias em alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro, Campinas. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição). Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos. 2005.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **ANVISA**, Resolução nº 18. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, abril de 1999. ANVISA. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. IX-Lista de Alegações de Propriedade Funcional Aprovadas. Diário Oficial [da] República Federativa do Brasil, Brasília, julho de 2008.

BRINQUES G.B., AYUB M. A. Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**. 103, 123–128, 2011.

BURGAIN^A J. et. al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. / **Journal of Food Engineering**. 104,467–483, 2011.

BURGAIN^B J. et. al. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG in microparticles: Influence of casein to whey protein ratio on bacterial survival during digestion. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**. 19 233–242.(2013).

BURGAIN et al. Significance of bacterial surface molecules interactions with milk proteins to enhance microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Food Hydrocolloids**. 41,60-70, 2014.

BUTEL M. J. Probiotics, gut microbiota and health. **Médecine et maladies infectieuses**. 1–8, 2014.

CANDIDO L. M. B.; CAMPOS, A. M. Alimentos funcionais. Uma revisão. **Boletim da SBCTA**, v. 29, n. 2, p. 193-203, 2005.

CASTRO-CISLAGHI et al. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**. 113,186–193, 2012.

CEBI et al. An evaluation of Fourier transforms infrared spectroscopy method for the classification and discrimination of bovine, porcine and fish gelatins. **Food Chemistry**. 190, 1109–1115, 2016.

CHAN et al.). Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium-alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, 83, 225–232, 2011.

CHÁVARRI et al., Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**. 142 185–189.2010.

CHÁVEZ-TAPIA et al., Current evidence on the use of probiotics in liver diseases. **Journal of Functional Foods**. 17 137–151, 2015.

CHEN et al.² Separation and characterization of alpha-chain subunits from tilapia (*Tilapia zillii*) skin gelatin using ultrafiltration. **Food Chemistry**. 188, 350–356, 2015.

CHEN et al. Lactobacillus rhamnosus GG supernatant promotes intestinal barrier function, balances Treg and TH17 cells and ameliorates hepatic injury in a mouse model of chronic-binge alcohol feeding. **Toxicology Letters**. 241, 103–110, 2016.

CHEOW et al.¹ Controlled release of Lactobacillus rhamnosus biofilm probiotics from alginate-locust bean gum microcapsules. **Carbohydrate Polymers**. 103, 587–595, 2014.

CHERYL-LOW et al. Alginate-derived solid acid catalyst for esterification of low-cost palm fatty acid distillate. **Energy Conversion and Management**. 106, 932–940, 2015.

CHOTIKO A., SATHIVEL S. Development of a combined low-methoxyl-pectin and rice-branextract delivery system to improve the viability of *Lactobacillus plantarum* under acid and bile conditions. **LWT - Food Science and Technology**. 66, 420-427, 2016.

COMAN et al. Effect of buckwheat flour and oat bran on growth and cell viability of the probiotic strains *Lactobacillus rhamnosus* IMC 501®, *Lactobacillus paracasei* IMC 502® and their combination SYN BIO®, in synbiotic fermented milk **International Journal of Food Microbiology**. 167 261–268,2013.

CÓRDOBA et al. Effect of starch filler on calcium-alginate hydrogels loaded with yerba mate antioxidants. **Carbohydrate Polymers**. 95, 315–323, 2013.

COSTA et al. Produções de ácido acético, etanol e dos isômeros óticos do 503 ácido láctico por linhagens de *Lactobacillus* isoladas de fermentações alcoólicas industriais. **Ciência agrotécnica**., Lavras, v. 32, n. 2, p. 503-509, mar./abr., 2008

CRUZ et al. Use of Probiotics in Aquaculture. **ISRN Microbiology**. ID 916845, 13, 2012.

CUNHA et. al. Polissacarídeos da biodiversidade brasileira: uma oportunidade de transformar conhecimento em valor econômico. **Química Nova**, Vol. 32, No. 3, 649-660, 2009.

DALHEIM et al. Efficient functionalization of alginate biomaterials. **Biomaterials**. 80, 146-156,2016.

DEVI et al. Study of Complex Coacervation of Gelatin A and Sodium Alginate for Microencapsulation of Olive Oil. **Journal of Macromolecular Science**. 49, 936–945, 2012.

DEVI N., KAKAT D.K. Smart porous microparticles based on gelatin/sodium alginate polyelectrolyte complex. **Journal of Food Engineering**. 117, 193–204,2013.

DIANAWATI et al. Survival of Bifidobacterium longum 1941 microencapsulated with proteins and sugars after freezing and freeze drying. **Food Research International**. 51 503–509,2013.

DIAS, J.F., SIMBRAS, B.D., CABRAL, L.M.C., SANTOS, K.M.O.S., MIGUEL, M.A.L. Efeito do pH e da concentração de glicose de uma bebida a base de fruta na sobrevivência de Lactobacillus casei subsp. rhamnosus ATCC 7469. XXI ALAM – Congresso Latinoamericano de Microbiologia, 2012, Santos, SP.

DIMITRELLOU et al. Survival of spray dried microencapsulated Lactobacillus casei ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT - Food Science and Technology**. 71,169-174, 2016.

DING; SHAH. Effect of various encapsulating materials on the stability of probiotic bacteria. **Journal Food Science**. Mar;74(2):M100-7,2009.

DOHERTY et al. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection. **Food Hydrocolloids**. 25, 1604-1617, 2011.

ELZOGHBY A. O. Gelatin-based nanoparticles as drug and gene delivery systems: Reviewing three decades of research. **Journal of Controlled Release**. 172, 1075–1091, 2013.

ETCHEPARE et al. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of Lactobacillus acidophilus microencapsulated with sodium alginate. **Journal of Functional Food**. 21, 321–329,2016.

FALKEBORG et al. Dodecenyly succinylated alginate as a novel material for encapsulation and hyperactivation of lipases. **Carbohydrate Polymers**. 133,194–

202,2015.

FERNANDES et al., Nanopartículas de poli-hidroxibutirato-co-valerato como suporte para a imobilização da lipase de *Candida antarctica* fração b. **Quimica Nova**, Vol. 37, No. 2, 331-336, 2014.

FERREIRA et al. Encapsulation of Blackberry Anthocyanins by Thermal Gelation of Curdlan. **Journal Brazil Chemical. Soc.**, Vol. 20, No. 10, 1908-1915, 2009.

FINOTELLI et al. Microcapsules of alginate/chitosan containing magnetic nanoparticles for controlled release of insulin. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. 81, 206–211, 2010.

FITZSIMONS, S. M., MULVIHILL, D. M., MORRIS, E.R. Denaturation and aggregation processes in thermal gelation of whey proteins resolved by differential scanning calorimetry. **Food Hydrocolloids**, v.21, n.4, p.638-639, 2007.

FLESCH Aline. Gamarra. Taborda., Aline Kirjner POZIOMYCK, Daniel De Carvalho DAMIN. O USO TERAPÊUTICO DOS SIMBIÓTICOS. **ABCD Arq Bras Cir Dig**, 27(3):206-209, 2014.

FOX. Probiotics intestinal inoculants for production animals. **Veterinary Medicine**, v.83, p. 806-830, 1988.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. *Journal of Applied Bacteriology*, v.66, p.365-378, 1989. Disponível em: <[http:// onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x/pdf](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1365-2672.1989.tb05105.x/pdf)>. Acesso em: 30.01 2015. doi: 10.1111/ j.1365-2672.

FRAEYE, et. al. Influence of pectin structure on texture of pectin–calcium gels. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 11, p. 401-409, 2010.

FRANZ et al. African fermented foods and probiotics. **International Journal of Food Microbiology**. 190, 84–96, 2014.

FREITAS et al. Marine biotechnology advances towards applications in new functional foods. **Biotechnology Advances**. 30, 1506–1515, 2012.

GAGGIA et al., The role of protective and probiotic cultures in food and feed and their impact in food safety. **Trends in Food Science & Technology**. 22, S58-S66, 2011.

GARCIA-CRUZ et al. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quimica Nova**, Vol. 31, No. 7, 1800-1806, 2008.

Gašparović L, Labovsky J, Markoš J. Calculation of kinetic parameters of the 549 thermal decomposition of wood by distributed activation energy model 550 (DAEM). **Chemical and Biochemical Engineering**. 26:45–53, 2012.

GBASSI et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**. 129,103–105, 2009.

GHAFFAR et al. pH-sensitive sodium alginate hydrogels for riboflavin controlled release. **Carbohydrate Polymers**. 89, 667–675, 2012.

GÓMEZ et al. Prebiotic potential of pectins and pectic oligosaccharides derived from lemon peel wastes and sugar beet pulp: A comparative evaluation. **Journal of Functional Foods**. 20, 108–121, 2016.

GÓMEZ-ORDÓÑEZ E., RUPÉREZ P. FTIR-ATR spectroscopy as a tool for polysaccharide identification in edible brown and red seaweeds. **Food Hydrocolloids**. 25, 1514-1520, 2011.

GONÇALVES et al., Benefícios da ingestão de colágeno para o organismo humano. **REB** Volume 8 (2): 190-207, 2015.

GÖNEN et. al. Evaluation of the factors influencing the resultant diameter of the electrospun gelatin/sodium alginate nanofibers via Box–Behnken design. **Materials Science and Engineering C** 58, 709–723, 2016.

GOOCH J. W. Encyclopedic Dictionary of Polymers. **Springer-Verlag**. pp 246-247 , 978-1-4419-6247-8, 2011.

GOVENDER et al. A Review of the Advancements in Probiotic Delivery: Conventional vs. Non-conventional Formulations for Intestinal Flora Supplementation **AAPS PharmSciTech- American Association of Pharmaceutical Scientists**. 15(1): 29–43,2014.

GUARNER, F.; MALAGELADA, J.R. Gut flora in health and disease. **Lancet**, London, v. 360,p. 512 – 518, 2003.

GUO et al. Stepwise ethanolic precipitation of sugar beet pectins from the acidic extract. **Carbohydrate Polymers**. 136, 316–321, 2016.

GRINSTAFF M. W.; ZHANG H. Recent Advances in Glycerol Polymers: Chemistry and Biomedical Applications. **Macromolecular Rapid Communications**. 35, 1906–1924, 2014.

HAVENAAR, R. et al. Selection of strains for probiotic use. In: FULLER, R. **Probiotics, the scientific basis**. London: Chapman & Hall. p.209-224, 1992.

HE et al. Encapsulation and characterization of slow-release microbial fertilizer from the composites of bentonite and alginate. **Applied Clay Science**. 109–110, 68–75, 2015.

HO, K.L.G., POMETTO III, A.L., HINZ, P.N., DICKSON, J.S., DEMIRCI, A. Ingredient selection for plastic composite supports for L(+)-lactic acid biofilm fermentation by *Lactobacillus casei* subsp. *rhamnosus*. **Applied Environment. Microbiology**., v. 63, p. 2516–2523, 1997.

HONG-YAN et. al. Characterization of pumpkin polysaccharides and protective effects on streptozotocin-damaged islet cells. **Chinese Journal of Natural Medicines**. 13(3): 0199–0207, 2015.

IANNITTI T.; PALMIERI B. Therapeutical use of probiotic formulations in clinical practice. **Clinical Nutrition** 29,701-725,2010.

ISIKLAN N., KÜÇÜKBALCI G. Microwave-induced synthesis of alginate-graft-poly(N-isopropylacrylamide) and drug release properties of dual pH- and temperature-responsive beads. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**. 82, 316–331, 2012.

JACKSON, C. J. C., PALIYATH, G. (2011). Functional foods and nutraceuticals. In G. Paliyath, M. Bakovic, & K. Shetty (Eds.), **Functional foods, nutraceuticals, and degenerative disease prevention** 1st Ed. (pp. 11-43). John Wiley & Sons, Inc. 2011.

JAY, M. J. **Microbiología moderna de los alimentos**. 3. ed. Traduzido por Manuel Ramis Vergés. Zaragoza: Editorial Acribia, 1994.

JIAO et al. Sodium alginate/graphene oxide aerogel with enhanced strength-toughness and its heavy metal adsorption study. **International Journal of Biological Macromolecules**, 83,133–141,2016.

JIMÉNEZ-PRANTEDA et. al., Stability of lactobacilli encapsulated in various microbial polymers. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. vol. 113 No. 2, 179–184, 2012.

JIMÉNEZ et al. Effect of water activity on the stability of *Lactobacillus paracasei* capsules. **LWT - Food Science and Technology**. 60, 346-351, 2015.

JONGJAREONRAK et al. Chemical compositions and characterisation of skin gelatin from farmed giant catfish (*Pangasianodon gigas*). **LWT - Food Science and Technology**. 43, 161–165, 2010.

JYOTHI et. al., Microencapsulation: a review. **International Journal of Pharma and Bio Sciences**. 0975-6299, Vol 3, 2012.

KAMALIAN et al. Effect of alginate and chitosan on viability and release behavior of *Bifidobacterium pseudocatenulatum* G4 in simulated gastrointestinal fluid. **Carbohydrate Polymers**. 111 700–706, 2014.

KASTNER et al. Structure formation in sugar containing pectin gels e Influence of Ca²⁺ on the gelation of low-methoxylated pectin at acidic pH. **Food Hydrocolloids**. 27, 42-49, 2012.

KLAENHAMMER, T. R.; KULLEN, M. J. Selection and design of probiotics. **Int. J. Food Microbiology**. v. 50, p. 45-57, 1999.

KRASAEKOOPT et al. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal** 13, 3-13, 2003.

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 Technology**. v. 57, p. 761-766, 2014.

KONG et al., Occurrence of toxigenic fungi and determination of mycotoxins by HPLC-FLD in functional foods and spices in China markets. **Food Chemistry** 146, 320–326, 2014.

KUMAR A., KUMAR D. Characterization of *Lactobacillus* isolated from dairy samples for probiotic properties. **Anaerobe**. 33, 117-123, 2015.

KUU et al. Gap-Freezing Approach for Shortening the Lyophilization Cycle Time of Pharmaceutical Formulations—Demonstration of the Concept. **Journal of Pharmaceutical Sciences**. 102, 2572–2588, 2013.

KYOMUGASHO et al. Microscopic evidence for Ca²⁺ mediated pectin–pectin interactions in carrot-based suspensions. **Food Chemistry**. 188, 126–136, 2015.

LAAKSON et. al. Growth phase-associated changes in the proteome and transcriptome of *Lactobacillus rhamnosus* GG in industrial-type whey medium. **Microbial Biotechnology**. 4(6): 746–766, 2011.

LACONO et al. Probiotics as na emerging therapeutics strategy to treat NAFLD: focus on molecular and biochemical mechanisms. **Journal of Nutritional Biochemistry** 22, 699-711, 2011.

LAELORSPOEN et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in zein–alginate core–shell microcapsules via electrospraying. **Journal of Functional Foods**. 7, 342 – 349, 2014.

LIEW, S.L., ARIFF, A.B., RAHAA, A.R., HO, Y.W., Optimization of medium composition for the production of a probiotic microorganism, *Lactobacillus rhamnosus*, using response surface methodology. **International Journal Food Microbiology**. v. 102, p. 137-142, 2005.

LILLY, D.M.; STILLWELL, R.H. Probiotics. Growth promoting factors produced by micro-organisms. **Science**, v.147, p.747-748, 1965. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/content/147/3659/747.short>>. Acesso em: 07 fev. 2012. doi:10.1126/science.147.3659.747.

LIMA et. al. Incorporação de *Lactobacillus casei* microencapsulado em queijo tipo coalho . **Revista Ciência & Saúde**, Porto Alegre, v. 7, n. 1, p. 27-34, jan./abr. 2014.

LIN et al. Intermolecular binding of blueberry pectin-rich fractions and anthocyanin. **Food Chemistry**. 194, 986–993, 2016.

LIU¹ et. al. A review of bioactive plant polysaccharides: Biological activities, functionalization, and biomedical applications. **Bioactive Carbohydrates and Dietary Fibre**. 5, 31–61,2015.

LIU² et. al. Purification and characteristics of bifidocin A, a novel bacteriocin produced by *Bifidobacterium* animals BB04 from centenarians' intestine. **Food Control**. 50,

889-895,2015.

LIU et al., Thermal degradation and stability of starch under different processing conditions. **Starch/Stärke** 65, 48–60, 2013.

LODEIRO et al. Silver nanoparticles coated with natural polysaccharides as models to study AgNP aggregation kinetics using UV-Visible spectrophotometry upon discharge in complex environments. **Science of the Total Environment**,539,7–16,2016.

LOTFIPOUR et al. Evaluation of the effect of CaCl₂ and alginate concentrations and hardening time on the characteristics of Lactobacillus acidophilus loaded alginate beads using response surface analysis. **Advanced Pharmaceutical Bulletin.**, 2, 71-78, 2012.

LU-E. SHI et. al. Encapsulation of probiotic Lactobacillus bulgaricus in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering** 117, 99–104,2013.

LUO et al. Emulsifying ability and cross-linking of silk fibroin microcapsules containing phase change materials. **Solar Energy Materials & Solar Cells.** 147, 144–149, 2016.

MACIEL et al. Microencapsulation of Lactobacillus acidophilus La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science.** Vol. 97 No. 4, 2014.

MANDAL et al. Detection of intestinal colonization of probiotic Lactobacillus rhamnosus by stool culture in modified selective media. **Asian Pacific Journal of Tropical Disease.** 205-210, 2012.

MARTINS et al. Microencapsulation of essential oils with biodegradable polymeric carriers for cosmetic applications. **Chemical Engineering Journal.** 245,191–200, 2014.

MATOS, P.M.S. Probióticos.2010. 19 folhas. Dissertação de mestrado integrado em medicina. **Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar**- Universidade de Porto. Largo Prof. Abel Salazar, 2. 4099-003 Porto, 2010.

MEILE, et. al. Safety assessment of dairy micro-organism: Propionibacterium and Bifidobacterium. **International Journal of Food Microbiology**. v.126, p.316-320, 2008.

MIERCZYNSKA et al. Effect of Ca²⁺, Fe²⁺ and Mg²⁺ on rheological properties of new food matrix made of modified cell wall polysaccharides from apple. **Carbohydrate Polymers**,133,547–555,2015.

MILLONE et al. Alimentos funcionales: análisis de la recomendación en la práctica diaria. **Diaeta** (B.Aires), v.29(134), p.7-15,2011.

MONTEIRO et al. Caracterização química dos géis produzidos pelas bactérias diazotróficas *Rhizobium tropici* e *Mesorhizobium* sp. **Química Nova**, Vol. 35, No. 4, 705-708, 2012.

MÜLLER et al. Renata Lopes dos Santos; Riveli Vieira Brigido. Produção de Alginato por Microrganismos. **Polímeros**, vol. 21, nº 4, p. 305-310, 2011.

MUNIN A.; LÉVY F. E. Encapsulation of Natural Polyphenolic Compounds; a Review. **Journal Pharmaceutics**. (4): 793–829, 2011.

NAKAUMA et al. Calcium binding and calcium-induced gelation of sodium alginate modified by low molecular-weight polyuronate. **Food Hydrocolloids** 55, 65-76,2016.

NAYAK A. K.; PAL D., Development of pH-sensitive tamarind seed polysaccharide–alginate composite beads for controlled diclofenac sodium delivery using response surface methodology. **International Journal of Biological Macromolecules**, 49,784–793, 2011.

NAYAK et al. Plantago ovata F. Mucilage-Alginate Mucoadhesive Beads for Controlled Release of Glibenclamide: Development, Optimization, and In Vitro-In Vivo Evaluation. **Journal of Pharmaceutics**, ID 151035, 2013.

NUALKAEKUL et al. Influence of encapsulation and coating materials on the survival of Lactobacillus plantarum and Bifidobacterium longum in fruit juices. **Food Research International** 53, 304–311, 2013.

NUNES et al., How functional foods endure throughout the shelf storage? Effects of packing materials and formulation on the quality parameters and bioactivity of smoothies. **LWT - Food Science and Technology** 65, 70-78, 2016.

OLIVEIRA et al. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Quimica Nova**, Vol. 32, No. 5, 1195-1201, 2009.

OLIVEIRA, T. A. et al. Biofilmes de gelatina: Efeito da adição de surfactante e ácidos graxos de óleo de coco na permeabilidade ao vapor de água. **Revista Verde** (Mossoró – RN), v. 7, n. 4, p. 76-80, out-dez, 2012.

OLIVEIRA et al. Imobilização da lacase em micropartículas de quitosana obtidas por spray drying e usadas na construção de biossensores. **Quimica Nova**, Vol. 32, No. 5, 1195-1201, 2009.

OLIVEIRA et al.¹ Impact of pectin or chitosan on bulk, interfacial and antioxidant properties of (p)-catechin and b-lactoglobulin ternary mixtures. **Food Hydrocolloids**. 55, 119-127, 2016.

OLIVEIRA C.A. et al.² Cutaneous biocompatible rutin-loaded gelatin-based nanoparticles increase the SPF of the association of UVA and UVB filters. **Pharmaceutical Sciences**. 81, 1–9, 2016.

ONWULATA CHARLES I. Microencapsulation and functional bioactive foods. **Journal of Food Processing and Preservation**. ISSN 1745-4549, 2012.

ORMUS et al. Effect of low methoxyl (LM) pectin complexation on the thermal and proteolytic inactivation of lysozyme: A kinetic study. **Food Hydrocolloids**. 43, 812-818, 2015.

OUSSALAH et al. Antimicrobial and antioxidante effects of milk protein-based film containing essential oils for the preservation of whole beef muscle. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, Easton, v.52, p.5598-5605, 2004.

PACHECO M. T. B.; SGARBIERI V. C.; **Alimentos funcionais**.2013. Disponível em : <http://escoladaluz.com.br/livros/20131013_233356_6.pdf> . Acesso em : 30.01.2015.

PANDE et al. Prospectus of probiotics in modern age diseases. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**. S1963-S1974,2012.

PANG et al. How functional foods play critical roles in human health. **Food Science and Human Wellness** 1, 26–60, 2012.

PASIN, B. L.; AZÓN, C. G.; GARRIGA, A. M. Microencapsulación com alginato en alimentos. Técnicas y aplicaciones. **Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos**, v. 3, n. 1, p. 130-151, 2012.

PATEL et al. Probiotics in valorization of innate immunity across various animal models. **Journal of Functional Foods**. 14, 549–561,2015.

PAULA et al., Esferas (Beads) de Alginato como Agente Encapsulante de Óleo de Croton Zehntneri Pax et Hoffm. **Polímeros**, vol. 20, nº 2, p. 112-120, 2010.

PEREIRA et al. Bionanocompósitos preparados por incorporação de nanocristais de celulose em polímeros biodegradáveis por meio de evaporação de solvente, automontagem ou eletrofiação. **Química Nova**, Vol. 37, No. 7, 1209-1219, 2014.

PETROV, K.K., YANKOV, D.S., BESCHKOV, V.N. Lactic acid fermentation by cells of

Lactobacillus rhamnosus immobilized in polyacrylamide gel. **World Journal Microbiology Biotechnology**. v. 22, p. 337-345, 2006.

PORTE et al.. Avaliação da porosidade de microcápsulas contendo proteína bioativa por porosimetria de mercúrio e adsorção de nitrogênio. **Química Nova**, Vol. 34, No. 9, 1582-1587, 2011.

PRAJAPAT et al. Development of modified release gliclazide biological macromolecules using natural biodegradable polymers. **International Journal of Biological Macromolecules**. 55, 6–14, 2013.

PRAVST. Risking public health by approving some health claims? – The case of phosphorus. **Food Policy** 36, 725–727, 2011.

Prezotti et al. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**. 113, 286–295, 2014.

PRIANO. **Encapsulamento de β -caroteno em PHBV com dióxido de carbono e avaliação da liberação in vitro**. Tese (Doutorado em Engenharia de Alimentos), Programa de Pós-Graduação em Engenharia de Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC – Brasil. 2011.

PRIETO et al. Síntesis de arsenoalginato de calcio para eliminación de iones arseniatos en aguas contaminadas. **Dyna**, 153, 167-179, 2007.

PROSAPIO et al. Production of lysozyme microparticles to be used in functional foods, using an expanded liquid antisolvent process. **The Journal of Supercritical Fluids**. 107,106–113,2016.

QUIGLEY. The enteric microbiota in the pathogenesis and management of constipation. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. 25,119–126,2011.

RAJAM et al. Effect of whey protein – alginate wall systems on survival of

microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions. **Journal Of Functional Foods** 4, 891 – 898, 2012.

ROLIM et al. Survival of *Lactobacillus rhamnosus* EM1107 in simulated gastrointestinal conditions and its inhibitory effect against pathogenic bacteria in semi-hard goat cheese. **LWT - Food Science and Technology**. 63,807-813, 2015.

ROHRER et. al. Synthesis and in vitro characterisation of preactivated thiolated gelatina. **European Polymer Journal**. 73, 268–277, 2015.

RUVINOV et al. Cardiac Tissue Engineering: Principles, Materials, and Applications, Morgan & Claypool. **Synthesis Lectures on Tissue Engineering**. 2012.

RUTAVA; WALKER. Probiotics. In: Nutrition and Health: **Probiotics in Pediatric Medicine** (Michail S and Sherman PM, ed), pp41-52. Humana Press 2009.

SAARAI et al. On the development and characterisation of crosslinked sodium alginate/gelatine hydrogels. **Journal of the mechanical behavior of biomedical materials**. 18, 152–166, 2013.

SACCHETIN et al. Produção de micropartículas de alginato contendo *flavobacterium columnare* inativada pelo método de emulsão para vacinação de peixes por via oral. **Quimica Nova**, Vol. 33, No. 2, 263-268, 2010.

SAE-LEAW et al. Effects of defatting and tannic acid incorporation during extraction on properties and fishy odour of gelatin from seabass skin. **LWT - Food Science and Technology** 65, 661-667, 2016.

SAHA et al. Studies on methylcellulose/pectin/montmorillonite nanocomposite films and their application possibilities. **Carbohydrate Polymers**. 136, 1218–1227, 2016.

SARKER et al. Fabrication of alginate–gelatin crosslinked hydrogel microcapsules and evaluation of the microstructure and physico-chemical properties. **Journal of Materials Chemistry B**. 2, 1470–1482, 2014.

SANDERS; KLAENHAMMER. Invited review: the scientific basis of *Lactobacillus acidophilus* NCFM functionality as a probiotic. **Journal Dairy Science**. 84:319-331, 2001.

SANGEETHA et al. Effect of gelatin on the in situ formation of Alginate/Hydroxyapatite nanocomposite. **Materials Letters**. 91, 27–30, 2013.

SARAVANAN M.; RAO K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**. 80,808–816, 2010.

SATHYABAMA et al. Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment. **LWT - Food Science and Technology**. 57, 419-425, 2014.

SEMYONOV et al. Using ultrasonic vacuum spray dryer to produce highly viable dry probiotics. **LWT - Food Science and Technology**. 44,1844-1852,2011.

SEVERINO et al., Polímeros Usados como Sistemas de Transporte de Princípios Ativos. **Polímeros**, vol. 21, nº 5, p. 361-368, 2011.

SHAARI N., KAMARUDIN S.K., Chitosan and alginate types of bio-membrane in fuel cell application: An overview. **Journal of Power Sources**. 289,71-80,2015.

SHEN et al. Gelatin-templated biomimetic calcification for β -galactosidase immobilization. **Process Biochemistry**. 46,1565–1571, 2011.

SHORI A. M. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria: A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience** 13, 1–8, 2016.

SIMEONI et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos. - **Revista Eletrônica em Gestão, Educação e Tecnologia Ambiental-REGET**, v. 18. Ed. Especial Mai., p. 66-75,2014.

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**, Santa Maria, online. ISSN 0103-8478, 2014.

SILVA TF, PENNA ALB. Colágeno: Características químicas e propriedades funcionais. **Revista Instituto Adolfo Lutz**. São Paulo; 71(3):530-9, 2012.

SIONKOWSKA, A. The influence of UV light on collagen/poly (ethylene glycol) blends. **Polymer Degradation and Stability**, vol. 91, no.2, p.: 305- 312, 2006.

SOHAIL et al. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**. 145,162–168, 2011.

SOHAIL et al. Evaluation of Lactobacillus rhamnosus GG and Lactobacillus acidophilus NCFM encapsulated using a novel impinging aerosol method in fruit food products. **International Journal of Food Microbiology**. 157, 162–166, 2012.

SONG et al. Microencapsulated probiotics using emulsification technique coupled with internal or external gelation process. **Carbohydrate Polymers**. 96, 181–189, 2013.

SOUZA, C. A. et al. Encapsulação do ácido l-ascórbico no biopolímero natural galactomanana por spray drying: preparação, caracterização e atividade antioxidante. **Química Nova**, Vol. 38, No. 7, 877-883, 2015.

STOJANOVIC et al. Encapsulation of thyme (*Thymus serpyllum* L.) aqueous extract in calcium alginate beads. **Journal of the Science of Food Agriculture**. 92, 685–696, 2012.

SYBESMA et al. Locally sourced probiotics, the next opportunity for developing countries? **Trends in Biotechnology** Vol. 33, No. 4, 2015.

TAGLIARI et al. Desenvolvimento e validação de métodos analíticos para determinação de ácido glicirrízico, ácido salicílico e cafeína em nanopartículas de quitosana e alginato. **Quimica Nova**, Vol. 35, No. 6, 1228-1232, 2012.

TAKEDA et al. Antiallergic activity of probiotics from Mongolian dairy products on type I allergy in mice and mode of antiallergic action. **Journal of Functional Foods** 9 60–69, 2014.

THARANATHAN. Biodegradable films and composite coatings: past, present and future. **Trends in Food Science & Technology**. v.14, n.3, p.71-78, 2003.

THOMAS et al. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**. 136, 1–8, 2014.

THOMAZ et al. Comparison between homologous human milk supplements and a commercial supplement for very low birth weight infants. **Jornal de Pediatria** - Vol. 88, No. 2, 2012.

TONELI et al. Estudo da reologia de polissacarídeos utilizados na indústria de alimentos. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, Campina Grande, v.7, n.2, p.181-204, 2005.

TOTOSAUS et al. Lactic acid bacteria microencapsulation in sodium alginate and other gelling hydrocolloids mixtures. **Journal of Food and Nutrition Research**. 52, 107–120, 2013.

TU et al. Preparation and characterization of alginate–gelatin microencapsulated *Bacillus subtilis* SL-13 by emulsification/internal gelation. **Journal of Biomaterials Science**. 26, No. 12, 735–749, 2015.

TURBIANI et al. Liberação de Benzoato de Cálcio de Filmes de Alginato de Sódio Reticulados com Íons Cálcio. **Polímeros**, vol. 21, nº 3, p. 175-181, 2011.

TURRONI et al. Genomics and ecological overview of the genus *Bifidobacterium* **International Journal of Food Microbiology**. 149, 37–44, 2011.

TRABELSI et al. Effects of *Lactobacillus plantarum* immobilization in alginate coated with chitosan and gelatin on antibacterial activity. **International Journal of Biological Macromolecules**. 64, 84–89, 2014.

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

TRIPATHI et al. Deciphering the nanometer-scale organization and assembly of *Lactobacillus rhamnosus* GG pili using atomic force microscopy. **Langmuir**, 28, 2211-2216, 2012.

VANDENPLAS; HUYS; DAUBE. Probiotics: an update. **Jornal Pediatria**. 91(1):6-21, 2015.

VALERO-CASES E. ; FRUTOS M.J. Effect of different types of encapsulation on the survival of *Lactobacillus plantarum* during storage with inulin and in vitro digestion. **LWT - Food Science and Technology**. 64,824-828,2015.

VESTERLUND et al. 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**. 157, 319–321, 2012.

VOO et al. Comparison of alginate and pectin based beads for production of poultry probiotic cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. 111, 294–299, 2011.

VOS et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v.20, n.4, p.292-302,2010.

XIAO et al. Drying process of sodium alginate films studied by two-dimensional correlation ATR-FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**. 164, 179–184, 2014.

WEI et al. Hydroxyapatite–gelatin nanocomposite as a novel adsorbent for nitrobenzene removal from aqueous solution. **Applied Surface Science**. 292, 1020–1029, 2014.

WU et al. Adsorption and Selective Separation of Neodymium with Magnetic Alginate Microcapsules Containing the Extractant 2-Ethylhexyl Phosphonic Acid Mono-2-ethylhexyl Ester. **Journal of Chemical & Engineering Data**. 56, 2280–2289, 2011.

WÜRTH et al., Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. **Journal of functional foods**. 15, 116–125, 2015.

YADAV et al. Pectin lyase: A review. **Process Biochemistry**. 44, 1–10, 2009.

YU et. al. Effect of ultrasonic pretreatment on kinetics of gelatin hydrolysis by collagenase and its mechanism. **Ultrasonics Sonochemistry**. 29,495–501, 2016.

YULIARTI et al. Extraction and characterisation of pomace pectin from gold kiwifruit (*Actinidia chinensis*). **Food Chemistry**. 187, 290–296, 2015.

ZHANG et. al.¹ Comparison of collagen and gelatin extracted from the skins of Nile tilapia (*Oreochromis niloticus*) and channel catfish (*Ictalurus punctatus*). **Food Bioscience**. 13, 41–48, 2016.

ZHANG et al.² S/O/W emulsions prepared with sugar beet pectin to enhance the viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514. **Food Hydrocolloids**. 52 804-810,2016.

ZHU ZENG et. al. Screening for potential novel probiotic *Lactobacillus* strains based on high dipeptidyl peptidase IV and α -glucosidase inhibitory activity. **Journal of Functional Foods** 20 486–495,2016.

ZOU et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in Whey Protein-

Based Microcapsules by Transglutaminase-Induced Gelation. **Journal of Food Science**. Vol. 77, Nr. 5, 2012.

