



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE TECNOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
CURSO DE GRADUAÇÃO EM ENGENHARIA DE ALIMENTOS

ISABELLA ARAÚJO PORTELA

AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* La-05
MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM LEITES E EXTRATOS
HIDROSSOLÚVEIS DURANTE DIGESTÃO SIMULADA

João Pessoa

2019

ISABELLA ARAÚJO PORTELA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* La-05
MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM LEITES E EXTRATOS
HIDROSSOLÚVEIS DURANTE DIGESTÃO SIMULADA**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado à Coordenação do Curso Engenharia de Alimentos, do Centro de Tecnologia da Universidade Federal da Paraíba (UFPB) – *Campus I*, em cumprimento aos requisitos para obtenção do título de Engenheira de Alimentos.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª Marciane Magnani

Co-orientadora: MSc. Laênia Angélica Andrade Lopes

João Pessoa

2019

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

P843a Portela, Isabella Araujo.

Avaliação da sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em leites e extratos hidrossolúveis durante digestão simulada / Isabella Araujo Portela. - João Pessoa, 2019.

43 f. : il.

Orientação: Marciane Magnani.

Coorientação: Laênia Angélica Andrade Lopes.

Monografia (Graduação) - UFPB/CT.

1. probióticos. 2. gelificação iônica externa. 3. viabilidade. 4. matrizes lácteas. 5. matrizes não-lácteas. I. Magnani, Marciane. II. Lopes, Laênia Angélica Andrade. III. Título.

UFPB/BC

ISABELLA ARAÚJO PORTELA

**AVALIAÇÃO DA SOBREVIVÊNCIA DE *Lactobacillus acidophilus* La-05
MICROENCAPSULADO INCORPORADO EM LEITES E EXTRATOS
HIDROSSOLÚVEIS DURANTE DIGESTÃO SIMULADA**

Aprovado em: ____/____/_____.

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a Marciane Magnani

DEA / CT / UFPB

Orientadora

MSc. Laênia Angélica Andrade Lopes

PPGCN / UFPE

Co-orientadora

Prof^a. Dr^a. Janeeyre Ferreira Maciel

DEA / CT / UFPB

Examinador Interno

Prof^a. Dr^a. Whyara Karoline Almeida da Costa

Departamento de Nutrição, Centro Universitário Maurício de Nassau

Examinador Externo

João Pessoa

2019

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu força para nunca desistir dos meus objetivos, paz nos momentos que precisei e coragem para encarar todos os obstáculos que foram colocados no meu caminho. Eu devo minha vida a ti, Senhor!

Aos meus pais, João Wharles e Nina Araújo, por toda a paciência que tiveram comigo e por sempre me incentivarem a ser uma pessoa estudiosa, além de serem meu porto seguro e pessoas que eu sei que estarão comigo quando eu precisar. Amo vocês!

Aos meus irmãos, Arthur e Maria Clara, por terem feito silêncio quando eu pedi, quando precisei de concentração para estudar, e me suportarem (mesmo com todo o meu estresse).

À minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Marciane Magnani, por ter aceitado fazer parte desta importante etapa na minha vida e ter me dado a oportunidade de trabalhar no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, que, em muitos momentos, foi o que me incentivou a continuar batalhando pela minha formação acadêmica.

À MSc. Laênia Lopes, minha co-orientadora e grande amiga, que me deu orientação e muito incentivo. Uma pessoa iluminada e cativante, que me fez rir em momentos que eu estava totalmente desmotivada e me escutou sempre que precisei. Torço pelo teu sucesso e pela tua felicidade!

A Nicollas, por ter sido compreensivo e me entendido nos momentos que precisei do seu apoio. Obrigada por tudo!

Às minhas amigas, por terem me escutado e me apoiado durante todo este tempo, por serem verdadeiras irmãs para mim. Eu não sei o que seria de mim sem vocês! Aos meus poucos amigos também, por sempre estarem disponíveis para me ouvir.

Às lindas e lindo do LPMA, que me ajudaram em diversos momentos e são exemplos de determinação e força de vontade. Vocês me inspiram!

A todas as pessoas que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho e torceram tanto para que eu conseguisse realizar este sonho.

Muito obrigada!

RESUMO

Os probióticos são definidos pela Organização Mundial da Saúde como microrganismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde de quem os ingere. Contudo, para que estes microrganismos possam fornecer benefícios, necessitam suportar certas condições, como o armazenamento e a exposição ao trato gastrointestinal. Dessa forma, a microencapsulação de cepas probióticas vem sendo estudada com o intuito de proteger esses microrganismos das condições adversas às quais eles são expostos, mantendo a contagem de células viáveis até o intestino. Dentre os microrganismos probióticos mais estudados e aplicados em alimentos estão os do gênero *Lactobacillus*, particularmente a espécie *L. acidophilus*. Diante disso, o presente estudo avaliou a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-05 microencapsulado incorporado em distintas matrizes alimentares durante digestão simulada. *L. acidophilus* La-05 foi microencapsulado através da técnica de gelificação iônica externa, com alginato de sódio e quitosana, formando micropartículas de alginato de cálcio (MA) e alginato de cálcio com revestimento de quitosana (MAQ). As MA e MAQ liofilizadas foram referidas como MAL e MAQL. Os resultados revelaram compatibilidade entre o alginato e a quitosana com a cepa probiótica, apresentando uma eficiência de encapsulação de 99,27% para MA, 99,33% para MAQ (0,5%), 92,68% para MAL e 91,87% para MAQL. A MAQ (0,7%) exibiu uma eficiência de 64,82%, demonstrando que a concentração do agente microencapsulante influencia na viabilidade da cepa. Ao final do processo de digestão simulada, *L. acidophilus* La-05, em sua forma livre, apresentou um decréscimo na contagem de 3,39 log UFC/mL no extrato hidrossolúvel de arroz, 3,16 log UFC/mL no extrato hidrossolúvel de soja, 2,82 log UFC/mL no leite caprino, 2,61 log UFC/mL no leite bovino. Já as MAL e MAQL obtiveram reduções de, respectivamente, 1,31 e 1,29 log UFC/mL no extrato de arroz, 1,23 e 1,43 log UFC/mL no extrato de soja, 0,96 e 1,17 log UFC/mL no leite caprino, 1,09 e 1,29 UFC/mL no leite bovino. A cepa nas MAL e MAQL apresentou melhores resultados que em sua forma livre, com um decréscimo de menos de 2 log UFC/mL em todas as matrizes avaliadas. Os resultados obtidos revelaram que tanto o leite caprino quanto o leite bovino foram bons carreadores de probióticos. Ainda, a viabilidade de *L. acidophilus* La-05 também foi mantida quando adicionada nas matrizes vegetais, apresentando assim uma alternativa para incorporação de probióticos em produtos não lácteos.

Palavras-chave: probióticos, gelificação iônica externa, viabilidade, matrizes lácteas, matrizes não-lácteas.

ABSTRACT

Probiotics are defined by the World Health Organization as living microorganisms that, when consumed in adequate quantities, confer benefits to the health of those who ingest them. However, in order for these microorganisms to provide benefits, they must tolerate certain conditions, such as storage and exposure to the gastrointestinal tract. Thus, the microencapsulation of probiotic strains has been studied in order to protect these microorganisms from the adverse conditions to which they are exposed, keeping the cell count viable up to the intestine. Among the probiotic microorganisms most studied and applied in foods are those of the genus *Lactobacillus*, particularly *L. acidophilus*. Therefore, the present study evaluated the survival of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* La-05 incorporated in different food matrices during simulated digestion. *L. acidophilus* La-05 was microencapsulated through the external ionic gelation technique with sodium alginate and chitosan, forming calcium alginate (MA) microparticles and chitosan-coated calcium alginate (MAQ). Lyophilized MA and MAQ were referred to as MAL and MAQL. The results revealed compatibility between alginate and chitosan with the probiotic strain, presenting an encapsulation efficiency of 99.27% for MA, 99.33% for MAQ (0.5%), 92.68% for MAL and 91, 87% for MAQL. MAQ (0.7%) showed an efficiency of 64.82%, demonstrating that the concentration of the microencapsulating agent influences the viability of the strain. At the end of the simulated digestion process, *L. acidophilus* La-05, in its free form, presented a decrease of 3.39 log CFU / mL in the water-soluble rice extract, 3.16 log CFU / mL in the water-soluble soybean extract, 2.82 log CFU / mL in goat milk, 2.61 log CFU / mL in bovine milk. On the other hand, the MAL and MAQL obtained reductions of 1.31 and 1.29 log CFU / mL in rice extract, 1.23 and 1.43 log CFU / mL, respectively, in soybean extract, 0.96 and 1.17 log UFC / mL in goat milk, 1.09 and 1.29 UFC / mL in bovine milk. The strain in the MAL and MAQL presented better results than in its free form, with a decrease of less than 2 log CFU / mL in all matrices evaluated. The results showed that both goat milk and bovine milk were good carriers of probiotics. Furthermore, the viability of *L. acidophilus* La-05 was also maintained when added to the vegetable matrices, thus presenting an alternative for the incorporation of probiotics into non-dairy products.

Key words: probiotics, external ionic gelation, viability, dairy matrices, non-dairy matrices.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Diferença entre microcápsulas e microesferas.....	16
Figura 2. Produção de micropartículas de alginato de cálcio através do encapsulador B-395 Pro pela técnica de gelificação iônica externa.....	21
Figura 3. Liofilização das micropartículas contendo <i>L.acidophilus</i>	22
Figura 4. Esquema da digestão <i>in vitro</i> de <i>Lactobacillus acidophilus</i> La-05.....	25
Figura 5. Processo de digestão <i>in vitro</i> de micropartículas.....	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Condições da simulação do trato gastrointestinal.....	25
Tabela 2. Contagem de células viáveis antes e após a microencapsulação de <i>L. acidophilus</i> La-05 e a eficiência de encapsulação.....	28
Tabela 3. Contagem (log UFC/mL) de <i>L. acidophilus</i> La-05 livres e em micropartículas liofilizadas adicionadas em extratos solúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino, expostos ao trato gastrointestinal simulado.....	31

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	Food and Agriculture Organization of the United Nations
WHO	World Health Organization
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
LPMA	Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos
UFPB	Universidade Federal da Paraíba
MA	Micropartículas de alginato de cálcio
MAQ	Micropartículas de alginato de cálcio revestidas com quitosana
MAL	Micropartículas de alginato de cálcio liofilizadas
MAQL	Micropartículas de alginato de cálcio revestidas com quitosana e liofilizadas
EE	Eficiência de encapsulação
RIISPOA	Regulamento de Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal
TGI	Trato gastrointestinal

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	11
2 OBJETIVOS.....	13
2.1 OBJETIVO GERAL.....	13
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
3 REVISÃO DE LITERATURA.....	15
3.1 PROBIÓTICOS.....	15
3.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS.....	15
3.3 MATRIZES LÁCTEAS E NÃO-LÁCTEAS.....	17
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO.....	20
4.2 CULTURA TESTE E OBTENÇÃO DO INÓCULO.....	20
4.3 PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO <i>L. acidophilus</i> La-05 PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA.....	21
4.4 REVESTIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM QUITOSANA.....	22
4.5 LIOFILIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE <i>L. acidophilus</i> La-05.....	23
4.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE <i>Lactobacillus acidophilus</i> La- 05.....	24
4.7 VIABILIDADE DE <i>L. acidophilus</i> La-05 EM MICROPARTÍCULAS EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS E LEITES DURANTE DIGESTÃO <i>in</i> <i>vitro</i>	24
4.7.1 Leites e obtenção de extratos hidrossolúveis vegetais.....	24
4.7.2 Simulação do trato gastrointestinal.....	26
4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	27
6 CONCLUSÃO.....	32
REFERÊNCIAS.....	33

1 INTRODUÇÃO

Os probióticos são definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002; HILL et al., 2014). Os benefícios decorrentes da ingestão de probióticos incluem a modulação da microbiota intestinal e a prevenção de doenças gastrointestinais (LUIS-VILLASEÑOR et al., 2015). Ainda, probióticos podem auxiliar no tratamento da diabetes *mellitus* e da obesidade (BAGAROLLI et al., 2017) além de modular positivamente o metabolismo lipídico (DAS et al., 2016).

O gênero *Lactobacillus* inclui as espécies de probióticos mais estudadas para a incorporação em alimentos (MARTINS et al., 2013). Particularmente, a espécie *L. acidophilus* que tem sido incorporada em distintas matrizes alimentares, tais como queijo (MEIRA et al., 2015), leite fermentado (ABDOLLAHZADEH et al., 2018), iogurte (MACHADO et al., 2017), bebidas à base de frutas como *smoothies* (LUCIANO et al., 2018), néctares e sucos (OZCAN et al., 2015; VALERO-CASES; FRUTOS, 2017).

Entretanto, as culturas probióticas podem perder a viabilidade celular durante o processamento e armazenamento de alimentos e quando expostas às condições desfavoráveis na passagem pelo trato gastrointestinal (TGI), como ambiente aeróbico, pH ácido e enzimas digestivas, o que pode comprometer sua funcionalidade (RATHORE et al., 2013). O uso de probióticos microencapsulados tem sido citado como uma forma de proteger estas células de condições de estresse (OLIVEIRA et al., 2014).

Na microencapsulação de probióticos deve haver uma escolha adequada da técnica e dos materiais microencapsulantes usados. As matrizes de microencapsulação têm que apresentar estabilidade durante sua passagem no TGI. Por outro lado, devem ser digeríveis para garantir a liberação dos probióticos microencapsulados no sítio de ação correspondente, para que estes possam exercer a função desejada (HEIDEBACH et al., 2012). Dentre as matrizes de encapsulação aceitas para consumo humano estão os biopolímeros, como o alginato e a quitosana (LIU et al., 2016; YONEKURA et al., 2014).

O alginato é um polissacarídeo que apresenta baixo custo, é biocompatível e não-tóxico. Contudo, as micropartículas produzidas a partir deste polissacarídeo podem se dissolver em meio com pH baixo e formar poros na superfície, sendo susceptíveis à

entrada e saída de água ou outros fluidos através da membrana (SOHAIL et al., 2011). Com o intuito de solucionar a porosidade e tornar a partícula mais estável, outros biopolímeros, como a quitosana, têm sido usados como material de revestimento (ETCHEPARE et al., 2016).

A quitosana é um polímero catiônico obtido a partir da quitina, geralmente extraída do exoesqueleto de crustáceos aquáticos, embora possa também ser obtida a partir da parede celular de alguns fungos. Este polissacarídeo é bastante empregado no revestimento de micropartículas por apresentar hipoalergenicidade, biocompatibilidade e propriedades mucoadesivas (KANMANI et al., 2011).

Micropartículas contendo probióticos têm sido comumente adicionadas em produtos lácteos, como leites fermentados (PATRIGNANI et al., 2017), queijos (NINGTYAS et al., 2019) e chocolate (KEMSAWASD; CHAIKHAM; RATTANASENA, 2016). No entanto, devido ao custo de obtenção reduzido, aumento do vegetarianismo, de intolerantes à lactose e indivíduos alérgicos à proteína do leite, as matrizes vegetais apresentam-se como alternativa para a adição de probióticos (PANGHAL et al., 2018). Estudos relataram a incorporação de probióticos microencapsulados em sucos (CALABUIG-JIMÉNEZ et al., 2019; DIAS et al., 2018), chá (LACEY et al., 2014) e néctar (ANTUNES et al., 2013).

Considerando estes aspectos, este estudo avaliou a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-05 microencapsulados em alginato com e sem revestimento de quitosana expostos às condições simuladas do trato gastrointestinal quando incorporados em leites bovino e caprino e extratos vegetais hidrossolúveis de soja e de arroz.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* La-05 microencapsulado em alginato com e sem revestimento de quitosana em leites e extratos vegetais hidrossolúveis durante a exposição às condições gastrointestinais simuladas.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir micropartículas de alginato de cálcio, com e sem revestimento de quitosana, contendo *L. acidophilus* La-05 pela técnica de gelificação iônica externa;
- Liofilizar as micropartículas de alginato de cálcio com e sem revestimento de quitosana contendo *L. acidophilus* La-05;
- Determinar a eficiência de encapsulação de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas de alginato de cálcio, com e sem revestimento de quitosana;
- Avaliar a sobrevivência de *L. acidophilus* La-05 em micropartículas de alginato de cálcio, com e sem revestimento de quitosana, liofilizadas e adicionadas em leites caprino e bovino e em extratos hidrossolúveis vegetais de soja e arroz quando expostos às condições simuladas do trato gastrointestinal.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PROBIÓTICOS

Probióticos são microrganismos vivos capazes de auxiliar no equilíbrio da microbiota intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo (ANVISA, 2018; FAO/WHO, 2002). Dentre os efeitos associados à ingestão de probióticos estão o estímulo do sistema imunológico (GLEESON et al., 2012), a prevenção contra inflamações (COLEMAN; CERVIN, 2018) e distúrbios gastrointestinais (FLOCH, 2018), a redução do colesterol sérico (DAMODHARAN et al., 2016), e ação em diversas doenças, como câncer (HEYDARI; RAHAIE; ALIZADEH, 2019), fibrose cística (WEST et al., 2011) e diabetes mellitus (BAGAROLLI et al., 2017).

Para que um microrganismo seja classificado como probiótico, deve sobreviver a ácidos gástricos, enzimas digestivas e sais de bile, e às condições adversas de armazenamento, como pH, luz, oxigênio, dentre outras. Os benefícios associados a um probiótico necessitam de comprovação e evidências de eficácia em seres humanos, que devem ser obtidas por meio de estudos (ANVISA, 2018). Para a alegação de efeitos de saúde específicos, a dose mínima do microrganismo proposta vai de acordo com a cepa e a matriz onde esta será inserida, devendo manter sua viabilidade até o prazo de validade final para promover efeitos esperados (HILL et al., 2014).

Além disso, a seleção de determinado probiótico ainda considera critérios que envolvem segurança para uso humano, como: histórico de não causar ou estar associado a doenças; ser capaz de aderir à mucosa intestinal; ausência de genes que codificam resistência aos antibióticos e ser susceptível a, pelo menos, dois antibióticos; produzir compostos antimicrobianos e ser metabolicamente ativo no sítio de ação (MATSUBARA, 2016).

Os probióticos de maior importância na produção, processamento e preservação de alimentos são as bactérias ácido lácticas (BAL), principalmente por inibir o crescimento de microrganismos deteriorantes, proporcionando maior estabilidade aos produtos alimentícios (BURGAIN et al., 2011). BAL constituem um grupo de bactérias Gram-positivas, não formadoras de esporos, utilizadas como cultura inicial no processo de fermentação de carboidratos, resultando em ácido láctico como o principal produto final (EDALATI et al., 2018). Dentre as BAL, as cepas do gênero *Lactobacillus* são as mais comumente estudadas e aplicadas em alimentos, devido à sua capacidade de

adesão ao epitélio intestinal, bem como a regulação do trato gastrointestinal (TGI) (CHAMPAGNE et al., 2011; DAHROUD et al., 2016).

Morfológicamente, *Lactobacillus* spp. possuem forma de bacilos e são desprovidos de flagelos, apresentam temperatura ideal de crescimento de 35 a 40 °C e, em sua maioria, são considerados neutrófilos, com pH ótimo de 5,5 a 6,0. Dependendo da espécie, podem exibir características distintas, podendo ser consideradas bactérias anaeróbias ou aerotolerantes, homofermentativas ou heterofermentativas (DU TOIT et al., 2011; GOMES; MALCATA, 1999). Este gênero representa o maior grupo dentro da família Lactobacillaceae, com mais de 100 espécies e subespécies reconhecidas. Dentre estas, presente no trato gastrointestinal humano e considerada de interesse probiótico, destaca-se *L. acidophilus* (STURMER et al., 2012; ETCHEPARE, 2017).

Lactobacillus acidophilus é uma espécie tolerante ao pH ácido e à salinidade do meio e também se destaca por ser microaerófilo, ou seja, apresenta crescimento em ambientes com pouca oxigenação, resultando em uma maior facilidade de aplicação durante o processamento e armazenamento de produtos alimentícios quando comparada com outras culturas probióticas (GOMES; MALCATA, 1999). É uma das principais espécies do gênero aplicada em alimentos, como iogurte (GONÇALVES et al., 2018), mousse (SANTOS et al., 2019) e cerveja (SOHRABVANDI et al., 2010).

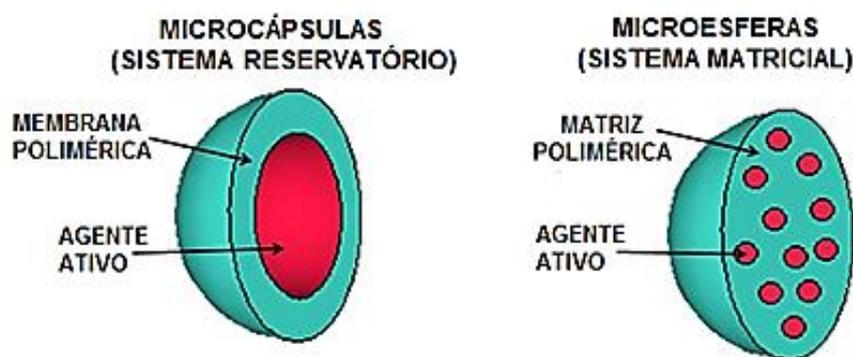
Na última década, tem aumentado a demanda dos consumidores por produtos que, além de fornecer nutrientes essenciais, promovam efeitos desejáveis para o organismo humano, conhecidos como alimentos funcionais. Os produtos adicionados de probióticos representam um forte nicho entre estes alimentos, por influenciar na manutenção da microflora intestinal e promover uma boa digestão (BIMBO et al., 2017; RATHER et al., 2017). Como o mercado de alimentos probióticos é composto majoritariamente de matrizes lácteas, é pertinente e interessante o desenvolvimento de pesquisas com a proposta de incorporar estes microrganismos em matrizes alimentares não-lácteas (NUALKAELKUL; CHARALAMPOPOULOS, 2011; PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2015b).

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS

A microencapsulação consiste no aprisionamento de uma substância dentro de outra substância com membranas impermeáveis ou semipermeáveis, globulares, delgadas e firmes com diâmetros que variam de nanômetro (nm) a micrômetro (μm), no

formato de partículas. O material microencapsulado é nomeado de material do núcleo, agente ativo, enchimento, fase interna ou fase de carga útil (MOKHTARI et al., 2017). As micropartículas podem ser classificadas em microesferas ou microcápsulas (Figura 1). As microcápsulas possuem um sistema de reservatório, onde o agente ativo é envolvido por uma membrana polimérica, ou seja, o núcleo fica concentrado somente na região central. Já as microesferas possuem um sistema matricial onde o agente ativo é dispersado de forma heterogênea em uma matriz de encapsulação (RIBEIRO; ESTEVINHO; ROCHA, 2019).

Figura 1. Diferença estrutural entre microcápsulas e microesferas.



Fonte: Paulo e Santos (2017).

O processo de microencapsulação tem sido tema de diversas pesquisas e utilizado principalmente pela indústria alimentícia para microencapsular compostos bioativos e microrganismos probióticos (CASANOVA; ESTEVINHO; SANTOS, 2016; KAVOOSI, 2018; SUN; CAMERON; BAI, 2019). A microencapsulação de probióticos tem como objetivo principal proteger as células de condições adversas, garantindo a sua estabilidade ao longo do processamento e armazenamento (TURKMEN; AKAL; OZER, 2019) e durante a passagem pelo TGI (IRAVANI et al., 2015).

A eficiência de microencapsulação e a estabilidade da micropartícula estão diretamente relacionadas à escolha da técnica e do material microencapsulante (MOKHTARI et al., 2017; YING et al., 2016). A escolha do método de microencapsulação depende da substância a ser microencapsulada, suas propriedades físico-químicas e sua aplicação. Entre os métodos utilizados estão *spray drying*, *spray cooling*, *spray chilling*; recobrimento em leito fluidizado e a gelificação iônica (SUN; CAMERON; BAI, 2019).

A técnica de gelificação iônica externa consiste na gelificação de biopolímeros, onde o composto ativo a ser microencapsulado é dispersado na solução polimérica, seguida de extrusão desta por meio de uma seringa ou bico, sendo gotejada em uma solução iônica (comumente o cloreto de cálcio) formando micropartículas de gel esféricas (CHEN et al., 2018; YAMADA; SEKI, 2018). Além de não necessitar de equipamento especializado, alta temperatura ou solvente orgânico, esta técnica tem custo reduzido e é caracterizada por sua simples e fácil execução, podendo ser utilizada na microencapsulação de probióticos (MARTIN et al., 2015).

A seleção do material microencapsulante envolve a aplicação pretendida, custo, estabilidade no armazenamento, restrições legais e propriedades físicas e químicas do agente ativo, além do próprio método utilizado para microencapsulação (PARAMERA; KONTELES; KARATHANOS, 2011). Uma ampla variedade de polissacarídeos pode ser empregada na produção de micropartículas para aplicação em alimentos, com destaque para o alginato e a quitosana, que podem ser utilizados sozinhos ou combinados. Uma matriz microencapsulante formada por múltiplos polímeros pode promover uma melhora nas propriedades físicas das micropartículas, aumentando assim a eficiência de encapsulação (SUN; CAMERON; BAI, 2019).

O alginato é um polissacarídeo de origem natural, extraído de algas marrons, e considerado um dos principais materiais microencapsulantes para probióticos, devido ao seu custo reduzido, não-toxicidade e biocompatibilidade com os íons de cálcio (CHÁVARRI et al., 2010; ETCHEPARE, 2014). Contudo, este polissacarídeo quando reticulado com cálcio apresenta uma natureza porosa e, por meio da ação do suco gástrico, pode perder sua propriedade de barreira. Com o intuito de solucionar a porosidade e tornar a partícula mais estável, outros biopolímeros têm sido utilizados para revestimento do alginato, como a quitosana (ETCHEPARE et al., 2016; RATHER et al., 2017).

A quitosana é um polímero linear, obtido a partir da desacetilação da quitina, considerada como o segundo polissacarídeo mais abundante na natureza, depois da celulose, e está presente no exoesqueleto de crustáceos ou, ainda, na parede celular de alguns fungos (BARRETO et al., 2015). A quitosana, além de apresentar biocompatibilidade, biodegradabilidade e não ser tóxica, tem sido utilizada como agente de revestimento das micropartículas de alginato por proporcionar estabilidade adequada a este material microencapsulante (JANTARATHIN; BOROMPICHAICHARTKULB; SANGUANDEEKULB, 2017).

3.3 MATRIZES LÁCTEAS E NÃO-LÁCTEAS

Conforme o Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA), o leite é definido, sem outra especificação, como o produto oriundo da ordenha completa, em condições adequadas de higiene e sem interrupções, de vacas sadias, bem alimentadas e descansadas. O leite de outros animais deve ser denominado de acordo com a espécie de que proceda. Dentre os mais estudados, estão os leites de origem bovina e origem caprina (LIAO et al., 2019; GREENWOOD; HONAN, 2019; PAZZOLA et al., 2019; SIDDIQUE; PARK, 2019).

O leite é composto de água, lactose, gorduras, sais e proteínas. As proteínas do leite podem ser divididas em dois grandes grupos: as caseínas, que possuem alta estabilidade térmica e tornam possível o tratamento do leite a elevadas temperaturas, e as proteínas do soro, comumente aplicada em suplementos alimentícios devido ao seu eminente perfil de aminoácidos (BRASIL et al., 2015). O leite é considerado o mais nobre produto de origem animal, notadamente pelo elevado teor nutricional para as diversas faixas etárias, bem como seus derivados, além de ser fonte de renda para os diferentes segmentos da cadeia produtiva de lácteos (MELO et al., 2016).

A diferença entre leite bovino e caprino, além da composição de seus ácidos graxos, é a disposição estrutural e o tamanho dos lipídeos encontrados na composição de ambos, o que faz com que o leite caprino apresente maior digestibilidade para o organismo humano (BRASIL et al., 2015; PAZZOLA et al., 2019).

O leite de origem caprina, assim como o de origem bovina, possui um alto valor nutritivo, apresenta um baixo poder alergênico, se destacando por suas características físico-químicas e sensoriais (QUEIROGA et al., 2013; ZHU; WHANG; WHANG, 2018) e é utilizado na fabricação de uma ampla gama de produtos alimentícios, como queijos, iogurtes, sorvetes e bebidas lácteas (GOMES et al., 2013; FENG et al., 2018; SILVA; GUIMARÃES; OLIVEIRA, 2015; SANT'ANA et al., 2018). O Nordeste é considerado o maior produtor de leite caprino do Brasil, concentrando 60,9% da produção, com ênfase para o estado da Paraíba que detém a maior produtividade da Região, com 22,2% do volume de leite ordenhado (IBGE, 2017).

O custo do leite e de derivados lácteos, como também a intolerância à lactose e o aumento no número de indivíduos adeptos ao vegetarianismo, tem estimulado o consumo de alimentos não-lácteos (KANDYLIS et al., 2016). Os extratos hidrossolúveis vegetais são uma alternativa para evitar o consumo de leite. Além da

qualidade proteica, os produtos obtidos de grãos são excelentes fontes de minerais e fibras, podendo complementar a recomendação necessária de nutrientes que devem ser ingeridos diariamente pelos indivíduos (BOÊNO, 2014).

Extratos hidrossolúveis são bebidas de origem vegetal, que apresentam boas propriedades nutricionais, como consideráveis teores de minerais e ausência de gorduras animais (GAZOLA et al., 2016). Dentre os principais extratos hidrossolúveis, destacam-se o de soja e o de arroz, por serem de fácil obtenção e custo de produção relativamente baixo (SILVA, 2015).

O extrato hidrossolúvel de soja foi processado pela primeira vez na China, no século II a.C. Seus aspectos remetem ao leite de vaca, principalmente em relação à sua composição e aparência (ROSSI; ROSSI, 2010). Por ser menos calórico que o leite, o extrato hidrossolúvel de soja e seus derivados podem atender às necessidades dos indivíduos que buscam uma alimentação saudável (GAZOLA et al., 2016).

Uma das formas de obtenção do extrato hidrossolúvel de soja, assim como de arroz, ocorre a partir da emulsão aquosa resultante da hidratação dos grãos, devidamente limpos, seguida de processamento tecnológico indicado, com adição ou não de outros ingredientes permitidos, podendo ser submetido ao processo de desidratação total ou parcial (ZADINELLO et al., 2010).

O extrato hidrossolúvel de arroz também se apresenta como uma opção para ser empregado na elaboração de outros produtos alimentícios (ÁVILA et al., 2017; SILVA et al., 2015). Além de ser presente na dieta usual dos brasileiros, bebidas à base de extrato de arroz têm boa representatividade em alguns países orientais (JAEKEL; RODRIGUES; SILVA, 2010). Ainda, a proteína presente no extrato de arroz destaca-se pela digestibilidade e hipoalergenicidade (MELO; CAVALCANTI; SILVA, 2017; SILVA et al., 2015).

Diante das diversas propriedades e benefícios oferecidos pelos extratos hidrossolúveis de soja e de arroz, além da facilidade de consumo e a utilização para o desenvolvimento de produtos alimentícios, estas bebidas surgem como alternativa para incorporação de probióticos para consumo por indivíduos que não ingerem leite e derivados lácteos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010; ZADINELLO et al., 2010). Entretanto, ainda é insipiente o número de estudos envolvendo probióticos microencapsulados com alginato de cálcio revestidos ou não com quitosana nestas matrizes, ou mesmo em matrizes lácteas.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 LOCAL DO EXPERIMENTO

Os experimentos foram desenvolvidos no Laboratório de Processos Microbianos em Alimentos, Departamento de Engenharia de Alimentos (DEA), Centro de Tecnologia (CT), Universidade Federal da Paraíba (UFPB). As micropartículas de *L. acidophilus* La-05 foram produzidas no Laboratório de Imunopatologia Keizo-Asami (Departamento de Farmácia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Pernambuco) e a liofilização das micropartículas e células livres de *L. acidophilus* La-05 foram realizadas no Laboratório de Análise Química de Alimentos (DEA, CT, UFPB).

4.2 CULTURA TESTE E OBTENÇÃO DO INÓCULO

A cultura de *Lactobacillus acidophilus* La-05 foi obtida na forma liofilizada da Chr. Hansen A/S (Denmark). As culturas liofilizadas foram ativadas em 5 mL de caldo Man Rogosa Sharpe (MRS) (HiMedia, Mumbai, India) e incubadas a 37°C por 24 h sob condições anaeróbicas (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid Ltda., Wade Road, UK). Posteriormente as culturas foram colhidas por centrifugação (4500 x g, 15 min, 4 °C). O *pellet* obtido foi lavado duas vezes em solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e as células foram ressuspensas em 5 mL do mesmo diluente para obter uma suspensão celular padrão.

A leitura em densidade óptica (DO) a 660 nm da suspensão das células foi de 1,8 que forneceu uma contagem de células viáveis de aproximadamente 9 log UFC/mL. A suspensão celular foi submetida ao processo de microencapsulação em alginato com e sem revestimento de quitosana, ou usada diretamente nos ensaios.

4.3 PRODUÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO CONTENDO *L. acidophilus* La-05 PELA TÉCNICA DE GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA

A microencapsulação de *L. acidophilus* (La-05) foi realizada pela técnica de gelificação iônica externa previamente descrita por Prisco et al. (2015), com algumas

modificações. O Encapsulador B-395 Pro foi equipado com uma bomba de seringa e um bico de 300 mm (BÜCHI Labortechnik, Flawil, Suíça). A suspensão celular de *L. acidophilus* La-05 foi incorporada em 50 mL de uma solução estéril de alginato de sódio (30 g/L) (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) para obter uma concentração de 8 log UFC/mL.

A seringa utilizada no sistema de alimentação foi preenchida com 10 mL da suspensão celular em alginato de sódio e colocada no Encapsulador, como mostra a Figura 2., que foi ajustado para uma taxa de fluxo de 26 mL/min com turbo, uma frequência de vibração de 1740 Hz e uma tensão do eletrodo de 980 mV. As gotículas de alginato de sódio contendo as células bacterianas foram endurecidas em 500 mL de uma solução de 0,5 mol/L de cloreto de cálcio (CaCl_2) e cuidadosamente agitadas por 40 min, posteriormente as micropartículas permaneceram 30 min em repouso para sedimentar. Através deste processo, foram formadas micropartículas de alginato de cálcio contendo *L. acidophilus* La-05. Estas foram lavadas, filtradas e mantidas em água destilada estéril a 4 °C para os demais experimentos.

Figura 2 - Produção de micropartículas de alginato de cálcio através do encapsulador B-395 Pro pela técnica de gelificação iônica externa.



Fonte: Autor, 2019.

4.4 REVESTIMENTO DAS MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO DE CÁLCIO COM QUITOSANA

As micropartículas de alginato de cálcio (MA) foram revestidas com duas concentrações de quitosana (0,5 e 0,7%) de baixo peso molecular com grau de desacetilação de 75 – 85% (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA). A quitosana foi dissolvida em uma solução de ácido láctico (0,8%) sob agitação durante 20 min, e teve pH ajustado para 5,7 - 6,0. A solução de quitosana foi esterilizada em autoclave a 121 °C durante 15 min. As micropartículas foram adicionadas na proporção de 1 g para 10 mL de quitosana e suavemente agitadas durante 15 min em temperatura ambiente (20 a 23 °C). Posteriormente, as micropartículas de alginato de cálcio revestidas de quitosana (MAL) foram filtradas, lavadas com água destilada estéril e armazenadas a 4 °C.

4.5 LIOFILIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS DE *L. acidophilus* La-05

As MA e MAQ (1 g) e as células livres (1 mL) de *L. acidophilus* La-05 foram acondicionadas em criotubos contendo 10 mL de uma solução de *Skimmed Milk* estéril (Acumedia, EUA) na concentração de 10%. As amostras foram congeladas no mesmo dia a -80 °C por 24 h. Os criotubos foram submetidos ao processo de liofilização, sob pressão e temperatura de 0.250 mBar e -58 °C, respectivamente, em liofilizador de laboratório (modelo L-101, Liotop, São Carlos, Brazil), apresentado na Figura 3, durante 48 h. As MA e MAQ (0,5%) liofilizadas foram referidas como MAL e MAQL, respectivamente. As amostras de MAL e MAQL foram armazenadas/seladas a vácuo a 4 °C para experimentos posteriores.

Figura 3 – Liofilização das micropartículas contendo *L.acidophilus*.



Fonte: Autor, 2019.

4.6 EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* La-05

A avaliação da Eficiência de Encapsulação (EE) foi realizada conforme a metodologia proposta por Chávarri et al. (2010), onde 0,1 g de MA, MAQ (0,5%), MAQ (0,7%), MAL e MAQL, separadamente, foram ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% p/v) e agitadas com solução de citrato de sódio (1%) em vortex por 10 min para quebra das micropartículas. As amostras foram então submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril e posteriormente 20 μ L de cada diluição foram plaqueados em triplicata sobre ágar MRS pela técnica da microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em jarra de anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e submetidas à contagem do número de colônias formadas. Os resultados foram expressos como log de UFC/mL.

A eficiência de Encapsulação (EE) foi calculada como na equação (CHÁVARRI et al., 2010) apresentada a seguir:

$$EE = (N/N_0) \times 100,$$

Onde N é o número de células viáveis aprisionadas e libertadas das micropartículas, e N_0 é o número de células livres adicionadas à mistura do biopolímero durante a produção das micropartículas. A concentração de quitosana que apresentou a maior EE foi usada nos demais experimentos de viabilidade.

4.7 VIABILIDADE DE *L. acidophilus* La-05 EM MICROPARTÍCULAS EM EXTRATOS HIDROSSOLÚVEIS VEGETAIS E LEITES DURANTE DIGESTÃO *in vitro*.

4.7.1 Leite e obtenção de extratos hidrossolúveis vegetais

O leite caprino foi obtido da Fazenda Pendências Carminha na cidade de Juazeirinho/PB e o leite bovino adquirido da Fazenda Paulo Diniz localizada em João Pessoa/PB. Os leites caprino e bovino, *in natura*, foram armazenados sob refrigeração por, no máximo, 1 dia, e submetidos ao processo de pasteurização a 65 °C por 30 min. Após resfriamento, foram expostos à simulação do trato gastrointestinal (TGI).

Os grãos de soja e de arroz foram adquiridos em comércio local da cidade de João Pessoa. O extrato hidrossolúvel de soja e arroz foram produzidos conforme metodologia de He, Guo e Zhu (2019), com algumas modificações. Uma amostra de 100 g de grãos foi deixada imersa em 200 mL de água por 12 h à temperatura ambiente (20 a 23° C). A água do molho foi descartada e, posteriormente os grãos juntamente com 600 mL de água foram triturados em liquidificador doméstico e aquecidos à 90 °C por 25 min. Em seguida, o extrato hidrossolúvel foi filtrado com uma peneira de plástico e esterilizado em filtro estéril de membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA).

4.7.2 Simulação do trato gastrointestinal

A contagem de células viáveis de *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre ou em micropartículas de alginato de cálcio com e sem revestimento de quitosana liofilizadas nos leites caprino e bovino e extratos hidrossolúveis vegetais de soja e arroz foi monitorada durante simulação do TGI, conforme Madureira et al. (2011). Para isso, 2,5 g das amostras de MAL e MAQL ou células livres liofilizadas de *L. acidophilus* La-05 foram adicionadas separadamente em frascos estéreis (50 mL) contendo 25 mL de água destilada, ou leites (caprino ou bovino) ou extratos hidrossolúveis vegetais (arroz ou soja). O experimento foi conduzido de forma contínua, simulando o processo de digestão no esôfago-estômago, duodeno e íleo. O volume inicial de 25 mL da amostra aumentou gradualmente a medida que as soluções correspondentes à cada etapa da digestão foram sendo colocadas no sistema. As condições da simulação do TGI (compostos e suas concentrações, período de exposição e velocidade de agitação) estão dispostas na Tabela 1.

As enzimas e os sais biliares (Sigma Aldrich, St. Louis, USA) foram esterilizados com filtro estéril de membrana de 0,22 µm (Millipore, Billerica, MA, EUA) no momento do experimento. Durante a realização da simulação, as enzimas e os sais biliares foram conservados em banho de gelo.

Na simulação da passagem pelo esôfago-estômago foi adicionada uma solução de pepsina (25 mg/mL diluído em HCl 0,1 M) a uma taxa de 0,05 mL/mL em 90 minutos. Nesta etapa, o pH foi reduzido gradualmente utilizando solução de HCl a 1M (MAINVILLE et al., 2005). O duodeno foi simulado adicionando pancreatina (1 g/L diluído em NaHCO₃ a 0,1 M) e sais biliares (6 g/L diluído em NaHCO₃ a 0,1 M) ao sistema em uma proporção de 0,25 mL/mL (LAURENT; BESANÇON; CAPORICCIO,

2007) e o pH foi ajustado para 5,0 com NaHCO_3 a 0,1 M. Na última etapa o íleo foi simulado com o ajuste do pH para 6,5 com solução de NaHCO_3 a 0,1 M. A agitação mecânica (simulação do peristaltismo intestinal) e a temperatura de 37° C (simulação da temperatura corporal) foram realizadas em uma incubadora (TE-424 TECNAL, Orbital Shaker Incubadora, São Paulo, SP, Brasil), como mostra a Figura 4.

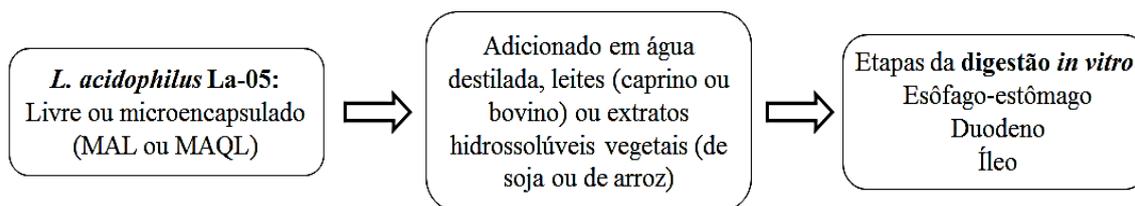
Após o término de cada etapa da simulação do TGI 0,1 mL das micropartículas MAL e MAQL contendo *L. acidophilus* La-05 ou de células livres foram retiradas do sistema e ressuspensas em 1 mL de solução salina estéril (NaCl 0,85% w/v). As micropartículas foram agitadas em vortex em solução de citrato de sódio (1%) por 10 min para quebra das partículas. As amostras foram submetidas à diluição seriada (10^{-1} a 10^{-8}) em solução salina estéril e posteriormente 20 μL de cada diluição foi plaqueado em triplicata sobre ágar MRS pela técnica da microgota (HERIGSTAD; HAMILTON; HEERSINK, 2001). As placas foram incubadas por 48 h a 37 °C em anaerobiose (Anaerobic System Anaerogen, Oxoid) e submetidas à contagem do número de colônias formadas. Os resultados foram expressos como log de UFC/mL.

Tabela 1. Condições da simulação do trato gastrointestinal.

Etapa	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH	Tempo de Exposição (min)
Antes da Simulação	-	-	-	-
Esôfago- Estômago	Pepsina	130	5,5	10
			4,6	10
			3,8	10
			2,8	20
			2,3	20
Duodeno	Pancreatina + sais de bile	45	2,0	20
			5,0	30
Íleo	-	45	6,5	60

Fonte: Autor, 2019.

Figura 4 – Esquema simples da digestão *in vitro* de *Lactobacillus acidophilus* La-05, em sua forma livre, em MAL ou MAQL.



Fonte: Autor, 2019.

Figura 5 – Processo de digestão *in vitro* de micropartículas. Fonte: Autor, 2019.



Fonte: Autor, 2019.

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise dos dados foi realizada utilizando o software Sigma Stat 3.5. (Jandel Scientific Software, San Jose, California). Os ensaios foram executados em triplicata, em dois experimentos independentes (repetições) e os resultados expressos como uma média dos ensaios. Os dados foram analisados para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) através da análise de variância (ANOVA) seguida do teste de Tukey.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

As micropartículas de *L. acidophilus* La-05 foram analisadas quanto à eficiência de encapsulação (EE) e contagem de células viáveis antes e depois do processo de microencapsulação (Tabela 2). De acordo com os dados apresentados, micropartículas de alginato de cálcio (MA), micropartículas de alginato de cálcio revestidas com quitosana (MAQ) com concentração de 0,5%, micropartículas de alginato de cálcio liofilizadas (MAL) e (MAQL) apresentaram alta EE, enquanto MAQ com concentração de 0,7% mostrou EE de 64,82%. Estes dados corroboram com os obtidos por Chávarri et al. (2010) e Prisco et al. (2015), que mostraram que o alginato e a quitosana são considerados polímeros apropriados para a microencapsulação de microrganismos por preservarem a viabilidade celular da cepa e proporcionarem boa eficiência de encapsulação.

O processo de microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 não reduziu a contagem celular nas MA e MAQ (0,5%). Ainda, a EE nas MAQ (0,5%) não foi superior ($p < 0,05$) que nas MA. Resultados semelhantes aos do presente estudo foram relatados por Darjani e colaboradores (2016) na microencapsulação do probiótico *Lactobacillus casei*. Os pesquisadores observaram que o revestimento de alginato com quitosana não afetou a viabilidade celular após o processo de microencapsulação.

Por outro lado, *L. acidophilus* La-05 em MAQ (0,7%) apresentou uma redução de 2,8 log UFC/mL quando comparado com a MAQ (0,5%). Em razão da baixa EE de *L. acidophilus* La-05 em MAQ a 0,7%, a MAQ a 0,5% foi selecionada para o teste de digestão simulada em diferentes matrizes alimentares.

L. acidophilus La-05 nas MAL e MAQL apresentaram redução de menos de 1 log UFC/mL na contagem de células viáveis após o processo de liofilização das micropartículas e não apresentaram diferença entre si ($p > 0,05$) em relação à EE. Prisco e colaboradores (2015) avaliaram a sobrevivência de micropartículas liofilizadas contendo *L. Reuteri* DSM 17938 e os resultados foram semelhantes aos obtidos neste estudo, onde a combinação dos processos de encapsulação e liofilização manteve a viabilidade celular da cepa probiótica, permitindo baixo decréscimo na contagem de células viáveis e alta EE. Em trabalho publicado por Jantarathin et al. (2017), após o processo de liofilização, a viabilidade de *L. acidophilus* TISTR 1338 apresentou uma redução de 1,17 log UFC/mL para as micropartículas de alginato sem revestimento e de 0,92 log UFC/mL para as de alginato com revestimento de quitosana, sugerindo que o

revestimento de quitosana pode proporcionar certa proteção às micropartículas durante o processo de secagem.

Tabela 2. Contagem de células viáveis antes e após a microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 e a eficiência de encapsulação.

Tipos de Micropartículas	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)		EE (%)
	Células iniciais	Células microencapsuladas	
MA	8,16 ± 0,03 ^a	8,09 ± 0,02 ^a	99,27 ± 0,59 ^a
MAQ (0,5%)	8,20 ± 0,04 ^a	8,10 ± 0,02 ^a	99,33 ± 0,15 ^a
MAQ (0,7%)	8,19 ± 0,10 ^a	5,31 ± 0,13 ^c	64,82 ± 0,83 ^c
MAL	8,23 ± 0,02 ^a	7,65 ± 0,08 ^b	92,68 ± 1,12 ^b
MAQL	8,24 ± 0,01 ^a	7,57 ± 0,06 ^b	91,87 ± 0,91 ^b

MA: micropartículas de alginato de cálcio; MAQ (0,5%): micropartículas de alginato de cálcio revestidas de quitosana com concentração de 0,5%; MAQ (0,7%): micropartículas de alginato de cálcio revestidas de quitosana com concentração de 0,7%; MAL: micropartículas de alginato de cálcio liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato de cálcio revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. Os valores expressos são médias de seis ensaios independentes ± desvio padrão. Médias com letras diferentes na mesma coluna são diferentes ($p < 0,05$) baseadas no teste de Tukey.

Antes da simulação da digestão, foi obtida uma contagem de *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre de 7 log UFC/mL. A Tabela 3 mostra que a contagem de *L. acidophilus* La-05 livres e nas micropartículas MAL e MAQL diferiram ($p < 0,05$) quando expostas e não expostas à digestão simulada. *L. acidophilus* La-05 em sua forma livre apresentou menor viabilidade celular ao final do experimento que a cepa nas MAL e MAQL, com uma redução de 3,39 log UFC/mL no extrato hidrossolúvel de arroz, 3,16 log UFC/mL no extrato hidrossolúvel de soja, 2,82 log UFC/mL no leite caprino, 2,61 log UFC/mL no leite bovino e ausência de células viáveis na água destilada, quando comparados à contagem celular realizada antes da simulação. Uma redução menor na contagem de células viáveis livres ($p < 0,05$) foi observada nos leites em comparação aos extratos hidrossolúveis. De acordo com estudos já publicados, o leite tende a oferecer proteção aos microrganismos, devido à sua composição físico-química e capacidade de tamponamento (FAZILAH et al., 2018; MUÑOZ et al., 2018).

L. acidophilus La-05 nas MAL e MAQL mostraram a maior contagem (6 log UFC/mL) em todas as matrizes ao final do TGI. Esses dados estão de acordo com diversos estudos que mostraram que a microencapsulação mantém a viabilidade de bactérias probióticas ao longo da exposição ao trato gastrointestinal simulado (CHÁVARRI et al., 2010; FRITZEN-FREIRE et al., 2013; SATHYABAMA et al., 2014; PRISCO et al., 2015; DARJANI et al., 2016).

L. acidophilus La-05 nas MAL e MAQL adicionadas nos leites caprino e bovino apresentaram valores superiores ($p < 0,05$) que nas matrizes não-lácteas. Nas MAL, *L. acidophilus* La-05 apresentou uma redução de menos de 1 log UFC/mL no leite caprino e de 1,09 log UFC/mL no leite bovino. Ainda, nas MAQL, *L. acidophilus* La-05 mostrou um decréscimo de 1,16 log UFC/mL no leite caprino e de 1,29 log UFC/mL no leite bovino. Estes dados indicam que o leite caprino não difere do leite de vaca enquanto carreador da cepa probiótica testada nas MAL e MAQL.

As contagens de células viáveis de *L. acidophilus* La-05 nas MAL e MAQL adicionadas em água destilada e em extrato hidrossolúvel de arroz não diferiram ($p > 0,05$) ao final da digestão simulada, com reduções de 1,5 e 1,44 log UFC/mL para as MAL e MAQL em água destilada e 1,31 e 1,38 UFC/mL em extrato hidrossolúvel de arroz, respectivamente. No extrato hidrossolúvel de soja, a redução na contagem de *L. acidophilus* La-05 nas MAL foi de 1,23 log UFC/mL e nas MAQL foi de 1,43 log UFC/mL. As MAL e MAQL nos extratos hidrossolúveis vegetais também conseguiram manter a contagem celular de *L. acidophilus* La-05, sugerindo que extratos de origem vegetal podem ser uma alternativa aos produtos de origem animal para incorporação de microrganismos probióticos.

Ao final da simulação do trato gastrointestinal, a contagem de células viáveis de *L. acidophilus* La-05 na MAQL não foi superior ($p < 0,05$) que na MAL. Estes resultados diferem dos obtidos por Prisco et al. (2015), que observou que as micropartículas de alginato com o revestimento de quitosana conferiram maior proteção à cepa probiótica *L. reuteri* DSM 17938 que as micropartículas formadas apenas por alginato, durante o processo de digestão simulada. Segundo Darjani e colaboradores (2016), isto pode ser explicado pela formação de uma membrana na superfície da MAQL em razão das interações eletrostáticas promovidas a partir da ligação entre o alginato e a quitosana, conferindo maior proteção à micropartícula. Entretanto tais diferenças não foram observadas no presente estudo.

Os estudos de Etchepare et al. (2016) e Halim et al. (2017) apresentaram resultados semelhantes aos obtidos neste trabalho, reportando contagens similares de probióticos em micropartículas de alginato de cálcio com e sem o revestimento de quitosana. Conforme estes pesquisadores, fatores como a técnica de microencapsulação e a escolha do material microencapsulante podem influenciar na sobrevivência dos probióticos nas micropartículas. De acordo com Burgain et al. (2011), técnicas que envolvem altas temperaturas podem reduzir a contagem de células viáveis. Por outro

lado, a adição de amido, como material microencapsulante, pode aumentar a viabilidade da cepa probiótica durante o processo de secagem e ao longo do armazenamento.

Tabela 3. Contagem (log UFC/mL) de *L. acidophilus* La-05 livres e em micropartículas liofilizadas adicionadas em extratos solúveis de soja e arroz e em leites caprino e bovino, expostos ao trato gastrointestinal simulado

Etapa	Solução enzimática	Agitação (rpm)	pH	Tempo (min)	Contagem de células viáveis (log UFC/mL)																	
					Água destilada			Extrato solúvel de arroz			Leite caprino			Extrato solúvel de soja			Leite bovino					
					MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres	MAL	MAQL	Células livres			
Antes da simulação	-	-	-	-	7,70 ± 0,09 ^{abA}	7,66 ± 0,04 ^{bA}	7,58 ± 0,09 ^{bA}	7,63 ± 0,10 ^{bA}	7,61 ± 0,03 ^{bA}	7,59 ± 0,02 ^{bA}	7,73 ± 0,08 ^{abA}	7,71 ± 0,05 ^{abA}	7,63 ± 0,08 ^{bA}	7,79 ± 0,08 ^{abA}	7,75 ± 0,05 ^{abA}	7,54 ± 0,06 ^{bA}	7,81 ± 0,01 ^{aA}	7,80 ± 0,02 ^{aA}	7,68 ± 0,04 ^{abA}			
Esôfago- estômago	Pepsina	130	5,5	10	7,28 ± 0,01 ^{cdB}	7,20 ± 0,16 ^{cdB}	7,17 ± 0,17 ^{cdB}	7,41 ± 0,01 ^{bcB}	7,33 ± 0,17 ^{cb}	7,14 ± 0,08 ^{dB}	7,66 ± 0,13 ^{abAB}	7,65 ± 0,05 ^{abA}	7,51 ± 0,05 ^{bcB}	7,64 ± 0,03 ^{abB}	7,51 ± 0,02 ^{bcB}	7,26 ± 0,13 ^{cdB}	7,77 ± 0,15 ^{aA}	7,61 ± 0,07 ^{abB}	7,58 ± 0,04 ^{bB}			
					4,6	10	7,12 ± 0,01 ^{dc}	6,99 ± 0,05 ^{dc}	6,39 ± 0,21 ^{fc}	7,37 ± 0,04 ^{cb}	7,13 ± 0,05 ^{dc}	6,70 ± 0,11 ^{ec}	7,56 ± 0,03 ^{bcBC}	7,60 ± 0,07 ^{bA}	7,47 ± 0,09 ^{cb}	7,58 ± 0,02 ^{bcB}	7,54 ± 0,06 ^{bcB}	7,40 ± 0,04 ^{cAB}	7,74 ± 0,02 ^{aA}	7,58 ± 0,01 ^{bcB}	7,51 ± 0,06 ^{bcC}	
			3,8	10	7,07 ± 0,10 ^{ec}	6,70 ± 0,05 ^{dd}	5,76 ± 0,04 ^{hd}	7,12 ± 0,01 ^{ec}	6,64 ± 0,15 ^{dd}	6,13 ± 0,04 ^{gd}	7,52 ± 0,08 ^{abCD}	7,37 ± 0,05 ^{bb}	6,27 ± 0,07 ^{fc}	7,37 ± 0,07 ^{bc}	7,31 ± 0,01 ^{bc}	6,12 ± 0,09 ^{gc}	7,62 ± 0,06 ^{ab}	7,42 ± 0,05 ^{bc}	6,40 ± 0,02 ^{ed}			
					2,8	20	6,95 ± 0,02 ^{fd}	6,65 ± 0,02 ^{ghD}	5,24 ± 0,05 ^{ie}	7,06 ± 0,02 ^{ec}	6,60 ± 0,05 ^{hd}	5,72 ± 0,01 ^{ie}	7,40 ± 0,02 ^{bd}	7,27 ± 0,03 ^{cb}	5,62 ± 0,04 ^{kd}	7,18 ± 0,06 ^{ad}	6,70 ± 0,03 ^{ed}	5,61 ± 0,07 ^{kd}	7,63 ± 0,02 ^{ab}	7,35 ± 0,01 ^{bd}	6,07 ± 0,02 ^{ie}	
			2,3	20	6,66 ± 0,06 ^{ee}	6,48 ± 0,07 ^{ie}	5,02 ± 0,03 ^{if}	6,77 ± 0,05 ^{ed}	6,40 ± 0,02 ^{ie}	5,56 ± 0,08 ^{gf}	7,42 ± 0,12 ^{bd}	7,29 ± 0,17 ^{bcB}	5,48 ± 0,08 ^{hgE}	6,94 ± 0,04 ^{de}	6,67 ± 0,01 ^{ed}	5,58 ± 0,08 ^{ghD}	7,61 ± 0,03 ^{ab}	7,15 ± 0,04 ^{ce}	5,68 ± 0,01 ^{gf}			
					2,0	20	6,50 ± 0,05 ^{cdF}	6,30 ± 0,11 ^{ef}	4,37 ± 0,02 ^{hg}	6,51 ± 0,06 ^{cdE}	6,41 ± 0,02 ^{de}	4,45 ± 0,02 ^{hg}	7,20 ± 0,05 ^{ae}	6,93 ± 0,04 ^{bc}	5,08 ± 0,04 ^{gf}	6,81 ± 0,08 ^{bf}	6,52 ± 0,02 ^{ce}	5,03 ± 0,02 ^{ge}	7,21 ± 0,01 ^{ac}	6,91 ± 0,01 ^{bf}	5,29 ± 0,01 ^{fg}	
			Duodeno	Pancreatina + Sais biliares	45	5,0	30	6,37 ± 0,02 ^{cdG}	6,27 ± 0,13 ^{df}	4,02 ± 0,01 ^{ih}	6,45 ± 0,02 ^{ce}	6,31 ± 0,07 ^{de}	4,36 ± 0,04 ^{hg}	7,02 ± 0,01 ^{af}	6,80 ± 0,13 ^{bc}	4,90 ± 0,01 ^{fg}	6,72 ± 0,02 ^{bg}	6,41 ± 0,09 ^{cdF}	4,63 ± 0,03 ^{gf}	7,07 ± 0,03 ^{ad}	6,75 ± 0,04 ^{bg}	5,12 ± 0,02 ^{eh}
								Íleo	-	45	6,5	60	6,20 ± 0,04 ^{ch}	6,22 ± 0,02 ^{cf}	ND	6,32 ± 0,08 ^{cf}	6,23 ± 0,09 ^{cf}	4,20 ± 0,10 ^{gh}	6,77 ± 0,01 ^{ag}	6,54 ± 0,01 ^{bd}	4,81 ± 0,04 ^{cg}	6,56 ± 0,02 ^{bh}

MAL: micropartículas de alginato de cálcio liofilizadas; MAQL: micropartículas de alginato de cálcio revestidas de quitosana com concentração de 0,5% liofilizadas. ND: não detectado. Os valores expressos são médias de três ensaios independentes ± desvio padrão. Médias com letras maiúsculas diferentes na mesma coluna são diferentes (p<0,05) baseadas no teste de Tukey. Médias com letras diferentes na mesma linha são diferentes (p<0,05) baseadas no teste de Tukey.

6 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo mostraram que a microencapsulação do probiótico *L. acidophilus* La-05 em MAQL foi eficiente e permitiu a manutenção da viabilidade da cepa teste. Além disso, foi possível verificar que MAL e MAQL protegeram a cepa probiótica *L. acidophilus* La-05 durante exposição ao trato gastrointestinal, permitindo a manutenção de contagens de células viáveis superiores à da cepa na sua forma livre. Contudo, as contagens de *Lactobacillus acidophilus* La-05 nas MAQL não foi superior àquelas observadas nas MAL durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, nas diferentes matrizes alimentares. Os resultados também mostraram que a cepa probiótica nas MAL e MAQL sobreviveram com contagem superior a 6 log UFC/mL à passagem pelo trato gastrointestinal nas matrizes lácteas e não-lácteas testadas. Tanto os leites caprino e bovino, como os extratos hidrossolúveis de soja e arroz se mostraram veículos adequados para a incorporação das micropartículas de *L. acidophilus* La-05.

REFERÊNCIAS

ABDOLLAHZADEH, S. M. et al. Development of *Lactobacillus acidophilus*-fermented milk fortified with date extract. **LWT - Food Science and Technology**. 2018.

AGÊNCIA NACIONAL DE VIGILÂNCIA SANITÁRIA (ANVISA). Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Dispõe sobre os requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Ministério da Saúde. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/3898888/RDC_243_2018_.pdf>. Acesso em: 12 de março de 2019.

ANADÓN, A. et al. Bioactive Foods in Promoting Health: Probiotics and Prebiotics. **Probiotics, Prebiotics, and Symbiotics**, p. 3–23, 2016.

ANTUNES, A. E. C. et al. Acerola nectar with added microencapsulated probiotic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 125–131, 2013.

ÁVILA, B.P. et al. Avaliação sensorial de bebida sem lactose à base de arroz, butiá e pitanga vermelha. **Revista da Jornada da Pós-graduação e Pesquisa**, 2017.

BAGAROLLI, R. A. et al. Probiotics modulate gut microbiota and improve insulin sensitivity in DIO mice. **Journal of Nutritional Biochemistry**, v. 50, p. 16-25, 2017.

BARRETO, R. et al. Materiais de revestimento utilizados na microencapsulação de probióticos. **Ciência e Natura**, v. 37, 2015.

BIMBO, F. et al. Consumers' acceptance and preferences for nutrition-modified and functional dairy products: A systematic review. **Appetite**, v. 113, p. 141–154, 2017.

BOÊNO, J.A. **Bebidas lácteas fermentadas formuladas com leite, soro de leite e extrato de arroz vermelho: aspectos físicos, químicos, microbiológicos e sensorial**. 115 p. Tese (Doutorado em Ciência Animal) – Escola de Veterinária e Zootecnia - Universidade Federal de Goiás, Goiânia, 2014.

BRASIL, 2017. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Regulamento da Inspeção Industrial e Sanitária de Produtos de Origem Animal (RIISPOA). Disponível em: <http://www.agais.com/normas/riispoa/riispoa_titulo8a.pdf>. Acesso em 12 de março de 2019.

BRASIL, R. B. et al. Estrutura e estabilidade das micelas de caseína do leite bovino. **Ciência Animal**, v. 25, p. 71-80, 2015.

BRASIL. Resolução RDC nº 243, de 26 de julho de 2018. Regulamento técnico sobre requisitos sanitários dos suplementos alimentares. Órgão emissor: ANVISA - Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Disponível em: <www.anvisa.gov.br>. Acesso em: 12 de março de 2019.

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: from laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

CALABUIG-JIMÉNEZ, L. et al. High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and in vitro digestion. **Journal of Food Engineering**, v. 240, p. 43–48, 2019.

CASANOVA, F.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Preliminary studies of rosmarinic acid microencapsulation with chitosan and modified chitosan for topical delivery. **Powder Technology**, v. 297, p. 44–49, 2016.

CHAMPAGNE, C. P. et al. Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 185-193, 2011.

CHÁVARRI, M. et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p. 185-189, 2010.

CHEN, L. et al. Production and fermentation characteristics of angiotensin-I-converting enzyme inhibitory peptides of goat milk fermented by a novel wild *Lactobacillus plantarum* 69. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 532-540, 2018.

COLEMAN, A.; CERVIN, A. Probiotics in the treatment of otitis media. The past, the present and the future. **International Journal of Pediatric Otorhinolaryngology**, v. 116, p. 135-140, 2018.

DAHROUD, B. D. et al. Low intensity ultrasound increases the fermentation efficiency of *Lactobacillus casei* subsp. *casei* ATTC 39392. **International Journal Biological Macromolecules**. v. 86, p. 462–467, 2016.

DAMODHARAN, K. et al. Functional probiotic characterization and in vivo cholesterol-lowering activity of *Lactobacillus helveticus* isolated from fermented cow milk. **Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 26, p. 1675–1686, 2016.

DARJANI, P. et al. Influence of prebiotic and coating materials on morphology and survival of a probiotic strain of *Lactobacillus casei* exposed to simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 162-167, 2016.

DAS, P.; KHOWALA, S.; BISWAS, S. In vitro probiotic characterization of *Lactobacillus casei* isolated from marine samples. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 383–390, 2016.

DIAS, C. O. et al. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, v. 24, p. 26–36, 2018.

DU TOIT, M. et al. *Lactobacillus*: the Next Generation of Malolactic Fermentation Starter Cultures-an Overview. **Food and Bioprocess Technology**, v. 4, p. 876-906, 2011.

EDALATI, E. et al. Isolation of probiotic bacteria from raw camel milk and their antagonistic effects on two bacteria causing food poisoning. **New Microbes and New Infections**, v. 27, p. 64-68, 2018.

ETCHEPARE, M. A. et al. Microencapsulation of probiotics using sodium alginate. **Ciência Rural**, v. 45, 2014.

ETCHEPARE, M. A. et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511-517, 2016.

ETCHEPARE, M. A. **Desenvolvimento, caracterização e estudo da viabilidade de micropartículas contendo *Lactobacillus acidophilus* La-14 obtidas por gelificação iônica externa associadas à interação eletrostática**. 121 p. Tese (Doutorado em Ciência e Tecnologia dos Alimentos) - Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul, 2017.

FAO - FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED

NATIONS; WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food**. Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. 2002. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf >. Acesso em: 15 de fevereiro de 2019.

FAZILAH, N. F. et al. Influence of probiotics, prebiotics, symbiotics and bioactive phytochemicals on the formulation of functional yogurt. **Journal of Functional Foods**, v. 48, p. 387-399, 2018.

FLOCH, M. H. The Role of Prebiotics and Probiotics in Gastrointestinal Disease. **Gastroenterology Clinics of North America**, v. 47, p. 179-191, 2018.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Effect of microencapsulation on survival of Bifidobacterium BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 39-44, 2013.

GAZOLA, M. B. et al. Elaboração e caracterização de bebidas à base de extrato hidrossolúvel de soja com polpa de pitanga, amora e mirtilo. **Boletim do Centro de Pesquisa de Processamento de Alimentos**, v. 34, p. 1-14, 2016.

GLEESON, M. et al. Effects of a *Lactobacillus salivarius* probiotic intervention on infection, cold symptom duration and severity, and mucosal immunity in endurance athletes. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 22, p. 235–242, 2012.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium spp. and Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science & Technology**, v. 10, p. 139-157, 1999.

GOMES, J. J. L. et al. Physicochemical and sensory properties of fermented dairy beverages made with goat's milk, cow's milk and a mixture of the two milks. **LWT - Food Science and Technology**, v. 54, p. 18–24, 2013.

GONÇALVES, N. M. et al. Iogurte com geleia de cajá (*Spondias mombin l.*) adicionado de probióticos: avaliação microbiológica e aceitação sensorial. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 12, p. 54, 2018.

GREENWOOD, S. L.; HONAN, M. C. Symposium review: Characterization of the bovine milk protein profile using proteomic techniques. **Journal of Dairy Science**, v.

102, p. 1-11, 2019.

HALIM, M. et al. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, 2017.

HE, L.-D.; GUO, X.-N.; ZHU, K.-X. Effect of soybean milk addition on the quality of frozen-cooked noodles. **Food Hydrocolloids**, v. 87, p. 187-193, 2019.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291–311, 2012.

HERIGSTAD, B.; HAMILTON, M.; HEERSINK, J. How to optimize the drop plate method for enumerating bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 44, p. 121–129, 2001.

HEYDARI, Z.; RAHAIE, M.; ALIZADEH, A. M. Different anti-inflammatory effects of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in hepatocellular carcinoma cancer mouse through impact on microRNAs and their target genes. **Journal of Nutrition & Intermediary Metabolism**, v. 16, 2019.

HILL, C. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, v. 11, p. 506-514, 2014.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2006. Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. Resultados Preliminares. Disponível em: <<https://censos.ibge.gov.br/agro/2017/>>. Acesso em: 22 de março de 2019.

IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; MIRMOHAMMADIM S.V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, p. 4679-4696, 2015.

JAEKEL, L. Z.; RODRIGUES, R. S.; SILVA, A. P. Avaliação físico-química e sensorial de bebidas com diferentes proporções de extratos de soja e de arroz. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 30, p. 342-348, 2010.

JANTARATHIN, S.; BOROMPICHAICHARTKUL, C.; SANGUANDEEKUL, R. Microencapsulation of probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules and its

effect on viability under heat process in shrimp feeding. **Materials Today: Proceedings**, v. 4, p. 6166-6172, 2017.

KANDYLIS, P. et al. Dairy and non-dairy probiotic beverages. **Food Science**, v. 7, p. 58-63, 2016.

KANMANI, P. et al. Effect of cryopreservation and microencapsulation of lactic acid bacterium *Enterococcus faecium* MC13 for long-term storage. **Biochemical Engineering Journal**, v. 58-59, p. 140-147, 2011.

KAVOOSI, G. et al. Microencapsulation of zataria essential oil in agar, alginate and carrageenan. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 45, p. 418-425, 2018.

KEMSAWASD, V.; CHAIKHAM, P.; RATTANASENA, P. Survival of immobilized probiotics in chocolate during storage and with an in vitro gastrointestinal model. **Food Bioscience**, v. 16, p. 37-43, 2016.

LACEY, A. M. L. et al. Survival and metabolic activity of probiotic bacteria in green tea. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, p. 314-322, 2014.

LAURENT, C.; BESANCON, P.; CAPORICCIO, B. Flavonoids from a grape seed extract interact with digestive secretions and intestinal cells as assessed in an in vitro digestion/caco-2 cell culture model. **Food Chemistry**, v. 100, p. 1704-1712, 2007.

LIAO, H. et al. Effect of high pressure carbon dioxide on alkaline phosphatase activity and quality characteristics of raw bovine milk. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 52, p. 457-462, 2019.

LIU, Y. et al. In vitro and in vivo study of sodium polyacrylate grafted alginate as microcapsule matrix for live probiotic delivery. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 429-437, 2016.

LUCIANO, W. A. et al. Effects of *Lactobacillus acidophilus* LA-3 on physicochemical and sensory parameters of açai and mango based smoothies and its survival following simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 114, p. 159-168, 2018.

LUIS-VILLASEÑOR, I.E. et al. Probiotic modulation of the gut bacterial community of juvenile *Litopenaeus vannamei* challenged with *Vibrio parahaemolyticus* CAIM 170.

Latin American Journal of Aquatic Research, v. 43, p. 766-775, 2015.

MADUREIRA, A. R. et al. Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 44, p. 465–470, 2011.

MACHADO, T. A. D. G. et al. Impact of honey on quality characteristics of goat yogurt containing probiotic *Lactobacillus acidophilus*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 221–229. 2017.

MAINVILLE, I.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E. R. A dynamic model that simulates the human upper gastrointestinal tract for the study of probiotics. **International Journal of Food Microbiology**, v. 99, p. 287–296, 2005.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, p. 764-770, 2013.

MATSUBARA, V.H. **Efeito de bactérias probióticas sobre *Candida albicans*: ensaios em cultura de macrófagos e de biofilme**. 145 p. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Odontologia - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2016.

MEIRA, Q. G. S. et al. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828–838, 2015.

MELO, A. F. et al. Efeitos do estresse térmico na produção de vacas leiteiras: Revisão. **Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia**, v. 10, p. 721-730, 2016.

MELO, J.R. de L.; CAVALCANTI, M.T.; SILVA, J. N. Prospecção tecnológica como ferramenta de estudo para elaboração de extratos hidrossolúveis do arroz vermelho. **Cadernos de Prospecção**, Salvador, v. 10, p.237-247, 2017.

MOKHTARI, S. et al. The cell wall compound of *Saccharomyces cerevisiae* as a novel

wall material for encapsulation of probiotics. **Food Research International**, v. 96, p. 19-26, 2017.

MUÑOZ, I. DE B. et al. The use of soft fresh cheese manufactured from freeze concentrated milk as a novelty protective matrix on *Bifidobacterium* BB-12 survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 725–729, 2018.

NINGTYAS, D.W. et al. The viability of probiotic *Lactobacillus rhamnosus* (non-encapsulated and encapsulated) in functional reduced-fat cream cheese and its textural properties during storage, **Food Control**, v.100, p. 8-16, 2019.

NUALKAELKUL, S.; CHARALAMPOPOULOS, D. Survival of *Lactobacillus plantarum* in model solutions and fruit juices. **International Journal of Food Microbiology**, v. 146, p. 111-117, 2011.

OLIVEIRA, M. E. G. et al. Addition of probiotic bacteria in a semi-hard goat cheese (coalho): Survival to simulated gastrointestinal conditions and inhibitory effect against pathogenic bacteria. **Food Research International**, v. 64, p. 241–247, 2014.

OZCAN, T. et al. Survival of *Lactobacillus spp.* in Fruit Based Fermented Dairy Beverages. **International Journal of Food Engineering**, v. 1, p. 44-49, 2015.

PANGHAL, A. et al. Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, 2018.

PARAMERA, E. I.; KONTELES, S. J.; KARATHANOS, V. T. Microencapsulation of curcumin in cells of *Saccharomyces cerevisiae*. **Food Chemistry**, v. 125, p. 892-902, 2011.

PATRIGNANI, F. et al. Microencapsulation of functional strains by high pressure homogenization for a potential use in fermented milk. **Food Research International**, v. 97, p. 250-257, 2017.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**, v. 77, p. 1327-1340, 2017.

PAZZOLA, M. et al. Effect of goat milk composition on cheesemaking traits and daily cheese production. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1-9, 2019.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 838-846, 2015b.

PRISCO, A. et al. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462, 2015.

QUEIROGA, R. D. C. R. D. E. et al. Nutritional, textural and sensory properties of Coelho cheese made of goats', cows' milk and their mixture. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 538-544, 2013.

RANADHEERA, R. D. C. S.; BAINES, S. K.; ADAMS, M. C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RATHER, S. A. et al. Effect of double alginate microencapsulation on in vitro digestibility and thermal tolerance of *Lactobacillus plantarum* NCDC201 and *L. casei* NCDC297. **LWT — Food Science and Technology**, v. 83, p. 50-58, 2017.

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.

RIBEIRO, A. M.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. Microencapsulation of polyphenols - the specific case of the microencapsulation of *Sambucus Nigra L.* extracts - A review. **Trends in Food Science & Technology**, 2019.

ROSSI, E. A; ROSSI, P. R. Bebidas funcionais à base de soja. In: VENTURINI FILHO, Waldemar G. **Bebidas não alcoólicas: ciência e tecnologia**. 1º ed. São Paulo: Blucher, p. 57-79, 2010.

SANT'ANA, A. M. S. et al. Fatty acid, volatile and sensory profiles of milk and cheese from goats raised on native semiarid pasture or in confinement. **International Dairy Journal**, 2018.

SIDDIQUE, A.; PARK, Y. W. Effect of iron fortification on microstructural, textural, and sensory characteristics of caprine milk Cheddar cheeses under different storage treatments. **Journal of Dairy Science**, v. 102, p. 1-13, 2019.

SILVA, P. D. L. et al. Potentially probiotic ice cream from goat's milk:

Characterization and cell viability during processing, storage and simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 62, p. 452–457, 2015.

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

SOHRABVANDI, S. et al. Viability of probiotic bacteria in low alcohol- and non-alcoholic beer during refrigerated storage. **Philippine Agricultural Scientist**, v. 93, p. 24-28, 2010.

STURMER, E.S. et al. A importância dos probióticos na microbiota intestinal humana. **Revista Brasileira de Nutrição Clínica**. v. 27, p. 264-272, 2012.

SUN, X.; CAMERON, R. G.; BAI, J. Microencapsulation and antimicrobial activity of carvacrol in a pectin-alginate matrix. **Food Hydrocolloids**, v. 92, p. 69-73, 2019.

TURKMEN, N.; AKAL, C.; ÖZER, B. Probiotic dairy-based beverages: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 53, p. 62-75, 2019.

VALERO-CASES, E.; FRUTOS, M. J. Development of prebiotic nectars and juices as potential substrates for *Lactobacillus acidophilus*: Special reference to physicochemical characterization and consumer acceptability during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 136-143, 2017.

WEST, N. P. et al. *Lactobacillus fermentum* (PCC(®)) supplementation and gastrointestinal and respiratory-tract illness symptoms: A randomised control trial in athletes. **Nutrition Journal**, v. 10, 2011.

XAVIER-SANTOS, D. et al. *L. acidophilus* La-5, fructo-oligosaccharides and inulin may improve sensory acceptance and texture profile of a synbiotic diet mousse. **LWT – Food Science and Technology**, 2019.

YAMADA, M.; SEKI, M. Multiphase microfluidic processes to produce alginate-based microparticles and fibers. **Journal of Chemical Engineering of Japan**, v. 51, p. 318–330, 2018.

YING, D. et al. Effect of encapsulant matrix on stability of microencapsulated probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 25, p. 447–458, 2016.

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

ZADINELLO, R. E. et al. Métodos de extração, formulação e avaliação sensorial de produto à base de extrato hidrossolúvel de soja. **Revista Varia Scientia Agrárias**, v. 1, p. 111-120, 2010.

ZHU, Y.; WANG, J.; WANG, C. Research on the preparation, uniformity and stability of mixed standard substance for rapid detection of goat milk composition. **Animal Science Journal**, v. 89, p. 794-801, 2018.

