

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

FACULDADE DE FARMÁCIA

BEATRIZ SILVA PEREIRA BERNUCCI

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
INCORPORADA EM FARINHA DE AVEIA

Belo Horizonte, MG

2017

BEATRIZ SILVA PEREIRA BERNUCCI

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
INCORPORADA EM FARINHA DE AVEIA

Tese apresentada ao Programa de Pós Graduação em Ciência de Alimentos da Faculdade de Farmácia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora em Ciência de Alimentos.

Área de Concentração: Ciência de Alimentos

Orientadora: Prof. Dra. Evelyn de Souza Oliveira
Lopes

Belo Horizonte, MG

2017

Bernucci, Beatriz Silva Pereira.

B531m Microencapsulação de *Bifidobacterium longum* 5^{1A}
incorporada em farinha de aveia / Beatriz Silva Pereira
Bernucci. – 2017.

137 f. : il.

Orientadora: Evelyn de Souza Oliveira Lopes.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Farmácia, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos.

1. Microscopia – Teses. 2. Microencapsulação – Teses.
3. Probióticos – Teses. 4. Viabilidade celular – Teses. 5.
Spray drying – Teses. 6. Citometria de fluxo – Teses. 7.
Hidrofobicidade – Teses. I. Lopes, Evelyn de Souza
Oliveira. II. Universidade Federal de Minas Gerais.
Faculdade de Farmácia. III. Título.

CDD: 664

Co-orientadores

- Prof.^a Dr.^a Inayara Cristina Lacerda, Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise, Departamento de Alimentos, Faculdade de Farmácia - UFMG
- Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Microorganismos, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Colaboradores

- Prof.^a Dr.^a Mônica Cristina de Oliveira, Laboratório de Farmacotécnica - Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia – UFMG
- Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino, do Laboratório de Hematologia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Farmácia – UFMG
- Dr. José Mario Carneiro Vilela, Laboratório de Nanoscopia - Centro de Inovação e Tecnologia SENAI / FIEMG - Campus Cetec

Dedico

à Clarice Bernucci

AGRADECIMENTOS

À Deus por me fortalecer diante dos obstáculos e ser providência constante em minha vida.

Ao meu esposo Vinícius Bernucci, que discreto, mas decisivamente, me apoiou e incentivou neste longo caminho.

Aos meus pais (Carlito e Olinda) e toda minha família (Sara, Raquel, João Paulo, Kelly, Fernando e meus queridos sobrinhos), grandes responsáveis pelas minhas conquistas, pelo apoio e incentivo.

Às minhas orientadoras Profa. Dra. Evelyn de Souza Oliveira Lopes e Prof. Dra. Inayara Cristina Lacerda, que nos anos de convivência, muito me ensinaram, contribuindo para meu desenvolvimento científico e intelectual. Obrigada pela confiança depositada em mim durante esses seis anos (mestrado e doutorado), pela compreensão, pela disponibilidade e amizade.

Ao meu co-orientador, Prof. Dr. Jacques Robert Nicoli, pelo profissionalismo, disponibilidade e atenção.

À Profa. Dra. Mônica Cristina de Oliveira e à Dra. Sália C. de Araújo Lopes do Laboratório de Farmacotécnica - Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia - UFMG pela colaboração fundamental, pelo envolvimento com este trabalho e pela constante disponibilidade e auxílio.

A FAPEMIG (Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de Minas Gerais) pelo apoio financeiro ao projeto e a CAPES (Coordenação do Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pela bolsa concedida.

Ao Wendel e Viviane da Empresa de Desenvolvimento Tecnológico Ltda. (EDETTEC) - BH/MG, por disponibilizarem o *spray dryer* para execução deste trabalho.

Ao Dr. José Mario Carneiro Vilela do Laboratório de Nanoscopia - Centro de Inovação e Tecnologia SENAI / FIEMG - Campus Cetec por disponibilizar o Microscópio de Força Atômica e ao Guilherme Ramos pelo auxílio durante a obtenção das imagens.

Prof. Dr. Adriano de Paula Sabino do Laboratório de Hematologia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Farmácia – UFMG por disponibilizar o Citômetro de Fluxo e à aluna Cristina M. G. Loures pelo auxílio nas análises e obtenção dos dados de citometria.

A Profa. Dra. Patrícia Martinelli, a Janine Costa Ivo e Denilson, do Centro de Microscopia da UFMG, pelo auxílio nas análises e obtenção das imagens de Microscopia de Transmissão.

Aos professores e pesquisadores do Departamento de Alimentos pelo auxílio, colaboração e formação científica que me proporcionaram durante todos esses anos.

Aos colegas e funcionárias do Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (Ana Diolina, Carmen, Cosme, Denise, Elaine, Fernanda, Luciana, Muriele, Raimunda, Vanessa, Verônica). Obrigada pelo convívio, pelas alegrias, incentivos, pelo carinho e por todos os momentos compartilhados.

Aos alunos de Iniciação Científica e Trabalho de Conclusão de Curso (Laura Coelho, Thais Monteiro e Yameric Cardoso), que abraçaram comigo a temática deste trabalho, demonstrando respeito e compromisso com a pesquisa.

Nada te perturbe,
nada te amedronte.
Tudo passa.
Só Deus nunca muda.
A paciência tudo alcança;
A quem tem Deus, nada falta.
Só Deus basta.”

Teresa d'Ávila

RESUMO

Buscou-se neste estudo investigar o efeito dos processos de microencapsulação na viabilidade e funcionalidade de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A}. Foram produzidas, pela técnica de emulsificação, microcápsulas de alginato com amido resistente e alginato com quitosana e, pela técnica de *spray drying*, microcápsulas usando leite desnatado em pó reconstituído como matriz. As microcápsulas foram caracterizadas por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Transmissão e a viabilidade das células microencapsuladas foi determinada por contagem em meio sólido durante 8 tempos do armazenamento (-20 °C / 90 dias) e a funcionalidade determinada diante de condições simuladas do trato gastrointestinal. Foram também analisadas as injúrias celulares utilizando fluorescência de dois marcadores seguido de citometria de fluxo e avaliada a hidrofobicidade das células microencapsuladas por *spray drying*. E foi determinada a viabilidade das células livres e microencapsuladas por *spray drying* incorporadas em farinha de aveia durante 90 dias a 5 °C. Os resultados indicaram a variabilidade no tamanho das microcápsulas, porém todas foram menores que 200 µm de diâmetro, sendo que as de *spray drying* foram menores (aproximadamente 17 µm). Durante estocagem (90 dias / -20°C), *B. longum* 5^{1A} manteve-se acima de 7,51 ± 0,25 log UFC g⁻¹ em todas as microcápsulas avaliadas. No entanto, apenas as microcápsulas feitas por *spray drying* mantiveram alta taxa de sobrevivência das células diante das condições simuladas do trato gastrointestinal, além de garantir a recuperação do perfil de hidrofobicidade durante o armazenamento. A análise de microestrutura indicou que cápsulas obtidas por *spray drying* a superfície é mais uniforme e com raras células sem recobrimento pelo material da matriz. Além disso, a citometria de fluxo demonstrou que a microencapsulação por *spray drying* mantém a maior parte das células intactas e sem injúrias após a secagem e que o método de contagem em meio sólido apresenta limitações para determinar a viabilidade celular, indicando que células injuriadas apresentam crescimento em ágar. Concluiu-se que, as microcápsulas produzidas por *spray drying* são adequadas para serem adicionadas em farinha de aveia e que as células se mantem estáveis neste produto durante os 90 dias de armazenamento avaliados.

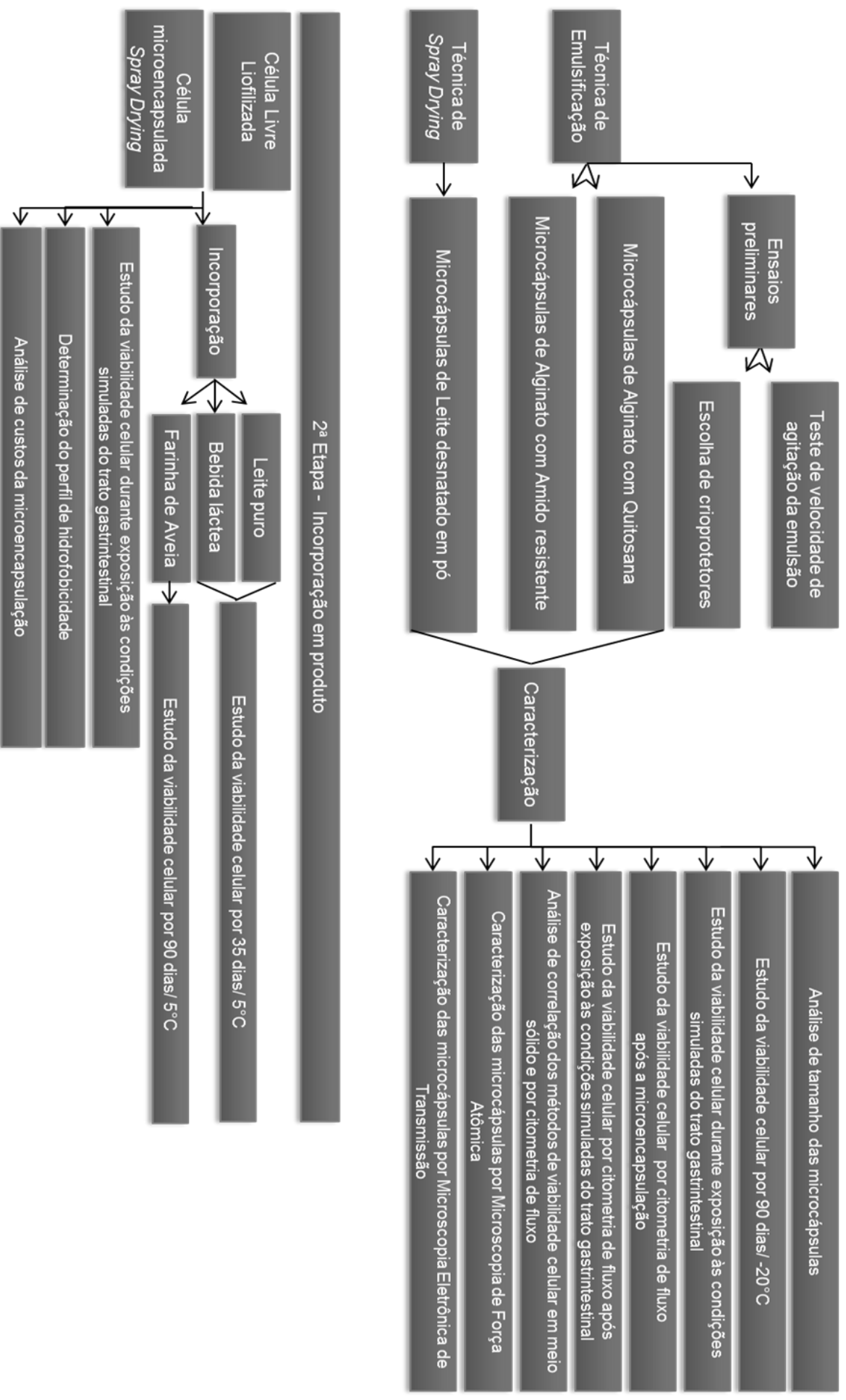
Palavras-chave: Microscopia; probiótico; viabilidade celular, *spray drying*; citometria de fluxo; hidrofobicidade.

ABSTRACT

The aim of this study was to investigate the effect of microencapsulation on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A}. For this purpose, microcapsules of alginate with resistant starch and alginate with chitosan were prepared by emulsification technique and, by spray drying technique, microcapsules were prepared using powdered skim milk reconstituted as matrix. The microcapsules were characterized by Atomic Force Microscopy and Transmission Electron Microscopy and the viability of microencapsulated cells was determined by plate count during 8 times of storage (-20 ° C / 90 days) and under simulated conditions of the gastrointestinal tract. Cellular injuries were also analyzed using fluorescence of two probes followed by flow cytometry and the hydrophobicity of microencapsulated cells by spray drying was evaluated. And, finally, the viability of the free and encapsulated cells in oatmeal was determined for 90 days at 4° C. The results indicated the size variability of the microcapsules, all were less than 200 µm, and the spray dried ones were the smallest, with approximately 17 µm. During storage (90 days/ -20°C), *B. longum* 5^{1A} remained above $7,51 \pm 0,25 \log \text{CFU g}^{-1}$ in all microcapsules evaluated. However, only the microcapsules made by spray drying ensured viability under simulated gastrointestinal conditions and also ensured the recovery of hydrophobicity during storage. Furthermore, the microstructure analysis indicated that in these capsules the surface is homogeneous and with rare cells without coating by the matrix material. In addition, flow cytometry has demonstrated that spray drying microencapsulation keeps most cells intact and uninjured after drying and showed the limitation of plate count method to assess cell viability, indicating that even when injured the bacterial cells grow in culture medium. It was finally obtained that the microcapsules produced by spray drying are suitable to be added in oatmeal and that the cells remain stable in this product during the evaluated 90 days of storage.

Keywords: Microscopy; probiotic; cell viability, spray drying; flow cytometry; hydrophobicity.

Fluxograma Geral - Metodologia



LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Representação esquemática dos tipos de microcápsulas	29
Figura 2 Representação esquemática da produção de microcápsulas pela técnica de emulsificação.....	36
Figura 3 Representação esquemática das principais etapas envolvidas no processo de microencapsulação por spray drying.....	39
Figura 4 Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica.	41
Figura 5 Diagrama esquemático dos principais componentes do microscópio eletrônico de transmissão.	43
Figura 6 Representação esquemática do funcionamento de um citômetro de fluxo.	45
Figura 7 Metodologia de microencapsulação de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por emulsificação usando matriz de alginato de cálcio com revestimento de quitosana.	52
Figura 8 Metodologia de microencapsulação de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por emulsificação usando matriz de alginato cálcio e amido resistente	52
Figura 9 Tamanho médio (μm) das microcápsulas de alginato antes da liofilização, produzidas em diferentes velocidades de agitação da emulsão, e a 700 rpm liofilizada.....	63
Figura 10 Porcentagem de sobrevivência (42 dias/ -20°C) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} em microcápsulas de Quitosana e Amido resistente, liofilizadas com diferentes crioprotetores: Sacarose, Glicose Trealose, Manitol e Glicose + Leite.....	64
Figura 11 Tamanho (μm) das microcápsulas de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} : quitosana sem liofilizar, quitosana liofilizada, alginato liofilizada, amido resistente liofilizada, amido resistente sem liofilizar e <i>spray drying</i>	66
Figura 12 Tamanho (μm) e desvios médios das microcápsulas liofilizadas feitas por emulsificação a 700rpm.	68
Figura 13 Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} microencapsulada por <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.....	71
Figura 14 Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre (fresca) e microencapsulada em microcápsulas de <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.....	73
Figura 15 Gráfico de pontos das células de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} : (A) SSC (Side-scattered) x FSC (Forward-scattered), (B) células vivas sem marcação, (C) mix de células vivas e mortas marcadas com CFDA-SE, (D) mix de células vivas e mortas marcadas com PI e (E)) mix de células vivas e mortas marcadas com CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) e PI (iodeto de propídio).	77
Figura 16 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A)	

Quitosana, (B) Amido resistente e (C) <i>Spray drying</i> . Q1: células mortas, Q2: células injuriadas, Q3: células vivas e Q4: células sem marcação.....	79
Figura 17 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A) Quitosana e (B) Amido resistente congeladas. Q1: células mortas, Q2: células injuriadas, Q3: células vivas e Q4: células sem marcação.....	80
Figura 18 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A) Quitosana, (B) Amido resistente e (C) <i>Spray drying</i> e submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	82
Figura 19 Relação entre a porcentagem de células vivas coradas (Q3) obtida por citometria de fluxo e a viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} (log ₁₀ UFC mL ⁻¹) obtida por enumeração em meio sólido ..	85
Figura 20 Relação entre a porcentagem de células vivas coradas + células injuriadas (Q2+ Q3) obtida por citometria de fluxo e a viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} (log ₁₀ UFC.mL ⁻¹) obtida por enumeração em meio sólido ..	85
Figura 21 Morfologia das células livres de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por Microscopia de Força Atômica em cultura fresca (1 e 2) ou liofilizada (3 e 4) ..	87
Figura 22 Morfologia das microcápsulas de alginato liofilizadas (1 e 2) e das microcápsulas brancas liofilizadas (3 e 4) obtidas por Microscopia de Força Atômica.....	89
Figura 23 Morfologia das microcápsulas de alginato revestido com quitosana antes (1, 2 e 3) e após (4, 5 e 6) a liofilização e das microcápsulas brancas antes (7) e após (8) a liofilização obtidas por Microscopia de Força Atômica ..	90
Figura 24 Morfologia das microcápsulas de alginato com amido resistente antes (1 e 2) e após (3 e 4) a liofilização e das microcápsulas brancas antes (6) e após (7) a liofilização obtidas por Microscopia de Força Atômica ..	92
Figura 25 Morfologia das microcápsulas obtidas por <i>spray drying</i> contendo as células (1, 2 e 3) e das microcápsulas brancas (4) obtidas por Microscopia de Força Atômica.....	93
Figura 26 Morfologia das microcápsulas produzidas por <i>spray drying</i> , congeladas sob alta pressão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	95
Figura 27 Morfologia das microcápsulas de quitosana (1 e 2) e amido resistente (3) , congeladas sob alta pressão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão ..	96
Figura 28 Morfologia das microcápsulas produzidas por <i>spray drying</i> , congeladas por imersão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão.....	97
Figura 29 Sobrevivência (log ₁₀ UFC g ⁻¹) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre e liofilizada na bebida láctea, no leite puro e microencapsulada por <i>spray drying</i> adicionada na bebida láctea e no leite puro	99
Figura 30 Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre fresca, livre liofilizada e microencapsulada em microcápsulas de <i>spray drying</i> , submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	104

Figura 31 Percentual de hidrofobicidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por spray drying no tempo 0 de armazenamento, *spray drying* após 30 dias de armazenamento (-20°C), *B. longum* 5^{1A} livre fresca, *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada no tempo 0 de armazenamento e *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada após 30 dias de armazenamento (-20°C)..... 106

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Concentração média de células (\log_{10} UFC g^{-1}) durante a produção das microcápsulas.	69
Tabela 2	Viabilidade (\log_{10} UFC g^{-1}) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} microencapsulada por <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.	72
Tabela 3	Contagem (\log_{10} UFC ml^{-1}) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre e microencapsulada em microcápsulas de <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	74
Tabela 4	Viabilidade (\log_{10} UFC g^{-1}) de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} incorporada em farinha de aveia nas formas microencapsulada por <i>spray drying</i> ou livre liofilizada, armazenadas a 5 °C por 90 dias.	101
Tabela 5	Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} incorporada em Farinha de Aveia nas formas microencapsulada por <i>spray drying</i> ou livre liofilizada, ambas armazenadas a 5°C por 90 dias.	102
Tabela 6	Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} (\log_{10} UFC mL^{-1}) livre fresca, livre liofilizada e microencapsulada em microcápsulas de <i>spray drying</i> , submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	104
Tabela 7	Concentração de células em \log UFC g^{-1} de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} em microcápsulas de quitosana e amido resistente liofilizadas com diferentes crioprotetores.	133
Tabela 8	Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} microencapsulada por <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.	133
Tabela 9	Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre e microencapsulada por <i>spray drying</i> , quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	133
Tabela 10	Porcentagem de sobrevivência de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre fresca, livre e liofilizada e microencapsulada por <i>spray drying</i> , submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.	134

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

FAO	<i>Food and Agriculture Organization</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
UFC	Unidades Formadoras de Colônias
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
UHT	<i>Ultra High Temperature</i>
MFA	Microscopia de Força Atômica
ICB	Instituto de Ciências Biológicas
MVS	Microscopia de Varredura por Sonda
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
CF	Citometria de Fluxo
SSC	<i>Side Scatter</i>
FSC	<i>Foward Scatter</i>
CFDA	Carboxifluoresceína diacetato
CFDA-SE	Carboxifluoresceína diacetado succinimidil ester
EDETEC	Empresa de Desenvolvimento Tecnológico
PI	Iodeto de propídio
SGS	Solução gástrica simulada
SIS	Solução intestinal simulada
TGI	Trato gastrintestinal
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
MRS	de Man, Rogosa & Sharpe
DBO	Demanda Bioquímica de Oxigênio
ANOVA	Análise de Variância

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1	Probióticos	20
2.2	Gênero <i>Bifidobacterium</i>	22
2.3	Produtos probióticos	24
2.3.1	Farinha de Aveia	25
2.4	Seleção <i>in vitro</i>	26
2.5	Microencapsulação	27
2.5.1	Estrutura das microcápsulas	29
2.5.2	Técnicas de microencapsulação	35
2.6	Microscopia de Força Atômica	41
2.7	Microscopia Eletrônica de Transmissão	42
2.8	Citometria de fluxo	44
3	OBJETIVOS	48
3.1	Objetivo Geral	48
3.2	Objetivos específicos	48
4	MATERIAL E MÉTODOS	49
4.1	Materiais	49
4.2	Micro-organismo e preparo da cultura estoque	49
4.3	Preparo da cultura de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} para microencapsulação	50
4.4	Microencapsulação	50
4.4.1	Testes de velocidade de agitação da emulsão	50
4.4.2	Preparo das cápsulas pela técnica de emulsificação	51
4.4.3	Metodologia para escolha do crioprotetor para técnica de microencapsulação por emulsificação	53
4.4.4	Técnica de <i>spray drying</i>	53
4.5	Análise de tamanho das microcápsulas	54
4.6	Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} após microencapsulação e durante armazenamento (-20°C / 90 dias)	54
4.7	Avaliação <i>in vitro</i> da viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre e microencapsulada em condições simuladas do trato gastrintestinal	55
4.8	Citometria de Fluxo	55
4.9	Análise de microestrutura das microcápsulas contendo <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por Microscopia de Força Atômica	56

4.10 Análise de microestrutura das microcápsulas contendo <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por Microscopia Eletrônica de Transmissão	57
4.11 Determinação do perfil de hidrofobicidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre ou microencapsulada	58
4.12 Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} , nas formas livre e microencapsulada, incorporada em bebida láctea fermentada ou em leite puro durante armazenamento refrigerado.	59
4.13 Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} , nas formas livre e microencapsulada, incorporada em farinha de aveia durante armazenamento refrigerado.	60
4.14 Delineamento experimental	60
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	62
5.1 Ensaio preliminares para desenvolvimento das microcápsulas	62
5.1.1 Escolha da velocidade de agitação para técnica de microencapsulação por emulsificação	62
5.1.2 Escolha do crioprotetor para técnica de microencapsulação por emulsificação	63
5.2 Análise de tamanho das microcápsulas	65
5.3 Estabilidade das microcápsulas feitas pela técnica de emulsificação e <i>spray drying</i> durante armazenamento -20°C	68
5.4 Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} , livre e microencapsulada, diante de condições simuladas do trato gastrointestinal.	73
5.5 Determinação por citometria de fluxo da viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} microencapsulada e armazenada a -20 °C	76
5.6 Análises de microestrutura das microcápsulas contendo <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por microscopia de força atômica	87
5.7 Análises da microestrutura das microcápsulas contendo <i>B. longum</i> 5 ^{1A} por microscopia de eletrônica de transmissão (MET)	95
5.8 Avaliação da viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} incorporada em bebida láctea e leite puro nas formas livre liofilizada ou microencapsulada, durante o armazenamento refrigerado	98
5.9 Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} , incorporada em farinha de aveia nas formas livre liofilizada ou microencapsulada, durante o armazenamento refrigerado	100
5.10 Viabilidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre liofilizada diante de condições simuladas do trato gastrointestinal	103
5.11 Perfil de hidrofobicidade de <i>B. longum</i> 5 ^{1A} livre e microencapsulada por <i>spray drying</i>	105
5.12 Custos da microencapsulação	108
CONCLUSÕES	110
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	111
APÊNDICE A	133

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). No entanto, o sucesso na sobrevivência dessas bactérias no intestino humano através da alimentação adequada é um desafio, devido ao ambiente desfavorável encontrado pelos probióticos durante o processamento, armazenamento e trânsito gastrointestinal, causando perda na viabilidade celular.

A sobrevivência em concentrações suficientes durante a estocagem e a passagem pelo trato gastrointestinal são os maiores desafios para a manutenção da viabilidade dessas bactérias (ANNAN *et al.*, 2008). Neste contexto, a microencapsulação tem sido frequentemente estudada com objetivo de proteger os micro-organismos probióticos contra a degradação fisiológica (meio ácido e sais biliares) e do meio ambiente (presença de oxigênio) (TRIPATHI & GIRI, 2014), manutenção da viabilidade da bactéria durante toda a vida útil do produto e liberar de forma controlada no sítio de ação do micro-organismo (FAVARO-TRINDADE; HEINEMANN & PEDROSO, 2011).

A técnica de microencapsulação é, de modo geral, definida como o processo de revestimento de partículas muito pequenas possibilitando a utilização destas em ampla variedade de formas e produtos. Na área de alimentos tem sido uma alternativa viável para resolver os problemas de instabilidade e inviabilidade de probióticos (SULTANA *et al.*, 2000; FÁVARO-TRINDADE & GROSSO, 2002). No entanto, a microencapsulação pode afetar a viabilidade das células (RATHORE *et al.*, 2013) e um número limitado de estudos tem monitorado possíveis injúrias ao probiótico induzidas pelo estresse dos processos de microencapsulação, havendo necessidade de mais trabalhos nesta área. Assim, o controle da viabilidade celular deve ser complementado pelo estudo da funcionalidade para avaliar a preservação dos efeitos benéficos dos probióticos (VINDEROLA *et al.*, 2011; IACONELLI *et al.*, 2015). Além disso, a citometria de fluxo pode colaborar na discriminação de estados fisiológicos celulares adicionais, como a injúria celular, e no estudo da funcionalidade da linhagem (TRACY, GAIDA & PAPOUTSAKIS, 2010), além de ser uma técnica sensível e rápida para análises de rotina.

Desta forma, este trabalho objetivou avaliar a influência de diferentes matrizes e técnicas de microencapsulação de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A} em dois parâmetros de viabilidade (enumeração em meio sólido e injúria celular avaliada por citometria de

fluxo) e dois parâmetros de funcionalidade (tolerância às condições simuladas do gastrintestinal (TGI) e hidrofobicidade da superfície celular de *B. longum* 5^{1A}), de modo a tornar o micro-organismo estável para ser incorporado em um produto final, que neste estudo foram avaliados a bebida láctea fermentada, o leite puro e a farinha de aveia.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Não se conhecem probióticos capazes de se multiplicar e colonizar o trato digestivo do adulto, mesmo após sua ingestão prolongada, uma vez que a microbiota residente ainda que desequilibrada, impede essa colonização (NICOLI & VIEIRA, 2004). Portanto, a ingestão diária de probiótico em quantidade adequada é indispensável para manter níveis adequados do micro-organismo no ecossistema digestivo, permitindo que ele desenvolva o efeito benéfico desejado (MARTIN *et al.*, 2005).

É necessária uma contagem mínima de probióticos viáveis até ao momento do consumo para conferir benefícios para a saúde. Em geral, a indústria de alimentos adota o nível mínimo de 10^6 UFC g^{-1} ou mL^{-1} , no produto, recomendado na literatura para exercer seus efeitos benéficos (TRIPATHI & GIRI, 2014). Ou, de acordo com a ANVISA (2008), em que a quantidade mínima viável deve estar entre 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Já para Vinderola *et al.*, (2000) o consumo de 10^8 - 10^{11} UFC/dia é o recomendável para alcançar os benefícios propostos pelos micro-organismos probióticos.

Apesar de algumas definições de probióticos focarem a importância de sua viabilidade, alguns trabalhos sugerem que micro-organismos não viáveis ou seus componentes podem exercer também algum efeito benéfico (PENNER *et al.*, 2005; KATARIA *et al.*, 2009, SOUZA *et al.*, 2012). Kataria (2011) afirma que os benefícios à saúde pelo consumo de micro-organismos probióticos podem ser alcançados sem estar associado ao consumo do micro-organismo vivo. Tal fato foi observado por Souza *et al.* (2012) ao avaliar a viabilidade de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A} em leites fermentados com diferentes culturas iniciadoras, e a capacidade da linhagem em proteger camundongos contra infecção por *Salmonella enterica* ssp. *enterica* sorovar Typhimurium. A linhagem probiótica perdeu a viabilidade ($< 5 \log$ UFC mL^{-1}) durante armazenamento refrigerado (5 °C / 28 dias), porém os leites fermentados contendo *B. longum* 5^{1A} foram efetivos contra infecção por *Salmonella*. Também no trabalho de Vieira *et al.* (2016) foi observado que o tratamento de camundongos com *B. longum* 5^{1A} inativada (células na

fase log de crescimento foram mantidas em banho maria a 70°C por 20 minutos) reduziu o número de células inflamatórias 72 horas após a infecção por *Klebsiella pneumoniae*.

Culturas comerciais empregadas como probióticos incluem principalmente linhagens de *Lactobacillus* ssp. e *Bifidobacterium* ssp. (VASILJEVIC & SHAH, 2008). Uma condição essencial para selecionar uma linhagem com potencial probiótico é sua habilidade de sobreviver ao trânsito no estômago e no intestino delgado e de tolerar a acidez e sais biliares ali presentes (CHATERIS *et al.*, 1998).

Outra condição essencial para probióticos é que tenham capacidade de aderir à mucosa intestinal. A adesão às células epiteliais é o primeiro passo da colonização (mesmo que temporária) de um micro-organismo, pois modula o sistema imune intestinal devido ao contato do probiótico com o tecido linfóide associado ao intestino e pode impedir a adesão de patógenos (LIONG, 2007; VASILEVIC & SHAH, 2008; GUGLIELMETTI *et al.*, 2009). Envolve um processo complexo, incluindo interações entre receptores não específicos e específicos (GARCÍA-CAYUELA *et al.*, 2014) e geralmente está relacionada às características da superfície celular (BIBILONI *et al.* 2001; CANZI *et al.*, 2005). Fatores, tais como as proteínas, glicoproteínas e ácidos teicoico e lipoteicoico presentes na superfície da parede celular das bactérias estão envolvidos na capacidade de adesão (RAMIAH *et al.*, 2008). Sabe-se que danos celulares devido ao calor e estresse osmótico durante o *spray drying* podem ocorrer (BOZA, BARBIN, & SCAMPARINI, 2004), e que a desidratação celular pode ter consequências graves para os fosfolipídios da membrana, como a fusão e transformação de cristal líquido de ácidos graxos em uma fase de gel (CROWE *et al.*, 1987).

A capacidade de aderir ao cólon é considerada um pré-requisito indispensável às linhagens probióticas para que estas exerçam seus efeitos benéficos à saúde (PEDERSEN & TANNOCK 1989). Porém, os processos de secagem, o *stress* osmótico durante a desidratação, podem causar danos celulares (BOZA, BARBIN, & SCAMPARINI, 2004) e afetar a funcionalidade do micro-organismo, alterando sua capacidade de aderir à parede intestinal.

Contudo, estudos *in vivo* para avaliar a adesão bacteriana não são fáceis de realizar, enquanto que estudos *in vitro*, com base principalmente na utilização de enterócitos do tipo células Caco-2 humanas (FOGH *et al.*, 1977), são caros e demorados. Porém, vários autores descreveram uma boa correlação entre a capacidade de adesão e a

hidrofobicidade da superfície celular (DEL RE *et al.*, 2000). E essa hidrofobicidade da superfície celular pode ser medida com precisão através da determinação da adesão de bactérias a hidrocarbonetos (hexadecano, octano e xileno) (PAN *et al.*, 2006; RAHMAN *et al.*, 2008).

2.2 Gênero *Bifidobacterium*

O gênero pertence ao Filo Actinobacteria, Classe Actinobacteria, Ordem Bifidobacteriales e Família Bifidobacteriaceae. A maioria das espécies foi isolada principalmente do trato digestivo de mamíferos (LEAHY *et al.*, 2005). São conhecidas aproximadamente 30 espécies pertencentes ao gênero *Bifidobacterium*, sendo pelo menos 11 destas de origem humana: *B. adolescentis*, *B. angulatum*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. catenulatum*, *B. dentium*, *B. gallicum*, *B. infantis*, *B. longum*, *B. pseudocatenulatum*, e *B. scardovii* (MEILE *et al.*, 2008).

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* são bastonetes Gram-positivos, anaeróbios obrigatórios, não formadores de esporos e imóveis (GOMES & MALCATA, 1999). Sua morfologia celular é variável, podendo se apresentar no formato de V e Y, e o tamanho das células é de aproximadamente 5 µm de comprimento. Fermentam diversos açúcares (glicose, galactose, lactose e frutose) produzindo ácido acético e láctico sem a geração de gás carbônico, com pH ótimo de crescimento entre 6 e 7 e a temperatura ótima entre 37 e 41 °C (GOMES & MALCATA, 1999). Teoricamente, a proporção de ácido acético e ácido láctico produzidos por bifidobactéria é de 3:2. Porém, durante crescimento de *B. longum* BL04 após 24 horas de fermentação em extrato hidrossolúvel de soja, Bernal (2004) detectou por cromatografia maior produção de ácido láctico do que ácido acético, dando uma taxa de ácido láctico/ácido acético >1. As bifidobactérias produzem a enzima frutose-6-fosfato fosfoquetolase, que quebra frutose-6-fosfato em acetil-1-fosfato e eritrose-4-fosfato. Esta enzima é utilizada como uma ferramenta na identificação do gênero, apesar de não permitir a distinção no nível de espécie (VASILJEVIC & SHAH, 2008).

Bactérias desse gênero são mais frequentemente empregadas como suplementos probióticos para alimentos, uma vez que elas têm sido isoladas do trato gastrointestinal do humano saudável. Pode-se afirmar que, uma linhagem probiótica irá desempenhar melhor seu efeito benéfico quando estiver em ambiente similar ao qual foi isolado, visto que é geralmente hospedeiro-específica (SAARELA *et al.*, 2000).

A linhagem do presente estudo (*Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A}) foi isolada de fezes de crianças saudáveis e identificada por testes morfológicos, respiratórios e bioquímicos, seguidos de PCR-Multiplex e faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismo do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Diversos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, indicando seu potencial probiótico. Guerra *et al.* (2011), utilizando um iogurte probiótico com leite de cabra suplementado com *B. longum* 5^{1A}, desenvolvido por MAZOCHI (2009), observaram a sua efetividade no tratamento da constipação funcional em crianças, num ensaio clínico duplo-cego, randomizado e controlado com fórmula. Souza *et al.* (2012) por sua vez, ao tentarem aumentar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} em leites fermentados variaram a cultura iniciadora, o teor de sólidos e a temperatura de fermentação. Estes autores obtiveram melhor viabilidade nos leites fermentados com maior teor de sólidos (14%) e nas temperaturas de fermentação próximas de 37 °C, indicando que estes fatores juntos podem ser variáveis tecnológicas a serem trabalhadas a fim de otimizar a sobrevivência de bifidobactéria. No entanto, o tempo de viabilidade de *B. longum* 5^{1A} foi inferior a sete dias em todas as formulações testadas com diferentes culturas iniciadoras e a maior acidificação foi observada nos leites fermentados com a cultura iniciadora comercial YF-L812 e 903 (Christian Hansen, Dinamarca), compostas de *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*.

Também reduziu a resposta inflamatória num modelo experimental murino de gota, sugerindo que pode ser útil como tratamento adjuvante em pacientes com gota, sendo capaz de modular a resposta inflamatória mesmo para além do intestino (VIEIRA *et al.*, 2015). Além disso, esta linhagem bacteriana reduziu a carga parasitária em animais infectados com *Giardia lamblia*, sugerindo um aumento na produção de muco como um dos mecanismos utilizados pelo probiótico para reduzir a carga parasitária (FONSECA, 2015). *B. longum* 5^{1A} também demonstrou proteção contra infecção pulmonar em camundongos infectados por *Klebsiella pneumoniae*, através da ativação da imunidade inata dos camundongos, facilitando assim a depuração bacteriana do patógeno (VIEIRA *et al.*, 2016).

Diante das evidências científicas que comprovam o potencial probiótico de *B. longum* 5^{1A} torna-se desejável o desenvolvimento de um produto contendo o micro-organismo, de forma a disponibilizá-lo para o consumo. Porém, produtos à base de micro-organismos benéficos podem perder algumas propriedades probióticas após o processamento,

tornando-se necessário o controle da viabilidade celular no produto, complementado pelo estudo da funcionalidade para avaliar a preservação dos efeitos benéficos dos probióticos (IACONELLI *et al.*, 2015).

2.3 Produtos probióticos

Entre os alimentos probióticos disponíveis no mercado, os produtos lácteos fermentados e não fermentados são ainda os mais consumidos, sendo que as linhagens probióticas mais comuns adicionadas aos alimentos são pertencentes a várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

No entanto, diversos fatores durante a produção, processamento e armazenamento de alimentos contendo probióticos podem influenciar sua viabilidade. Os fatores identificados incluem parâmetros do alimento (pH, acidez, oxigênio, atividade da água, presença de sal, açúcar e produtos químicos como peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, aromatizantes artificiais e corantes); do processamento (tratamento térmico, temperatura de incubação, taxa de aquecimento do produto, material de embalagem, métodos de armazenamento e escala de produção); e parâmetros microbiológicos (linhagens de probióticos, taxa e proporção de inoculação) (TRIPATHY & GIRI, 2014).

Nos produtos lácteos probióticos, a formação de ácido lático em produtos fermentados é desejável, pois este é um conservante natural, o que torna o produto biologicamente seguro, além de favorecer a digestibilidade dos componentes do leite (OLIVEIRA, 2006). A acidez exerce grande influência sobre os atributos de qualidade dos produtos lácteos fermentados e é um dos fatores que limita sua aceitação (THAMER & PENA, 2006). No entanto, o pH interfere na viabilidade da microbiota probiótica em leites fermentados. Com o decréscimo deste, ocorre uma redução nas contagens de células viáveis de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* durante a estocagem refrigerada de iogurtes (VINDEROLA, 2000).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2008) estabelece que para um produto probiótico apresentar a alegação de que promove a saúde, a quantidade mínima viável da cultura deve estar situada na faixa de $10^8 - 10^9$ UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Diversos trabalhos podem ser encontrados sobre a aplicação a sobrevivência destes micro-organismos em

matrizes alimentares não lácteas (SAAD, 2011; HUI, 2012; MONDRAGON-BERBAL *et al.*, 2012). Porém, os alimentos não lácteos ainda representam apenas uma pequena parcela no mercado de produtos probióticos (DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

2.3.1 Farinha de Aveia

Produtos probióticos não lácteos são um campo em crescimento, com especial demanda de pessoas alérgicas ao leite. Além disso, os alimentos probióticos não convencionais podem representar uma forma atraente de consumo de micro-organismos benéficos, disponibilizando um amplo e diverso número de alimentos probióticos capazes de enriquecer ainda mais a dieta dos consumidores (DE PRISCO & MAURIELLO, 2016).

Prebiótico foi inicialmente definido por Gibson e Roberfroid (1995) como ingrediente alimentar não digerível pelas enzimas do intestino delgado que beneficia o organismo por estimular seletivamente o crescimento e/ou atividade de determinadas bactérias no cólon, promovendo a saúde do hospedeiro. Em 2015, Bindels *et al.* estimulou a expansão do conceito prebiótico para incluir “um composto não digerível que, através de sua metabolização por micro-organismos no intestino, modula a composição e / ou atividade da microbiota intestinal, conferindo assim um efeito fisiológico benéfico sobre o hospedeiro’.

Segundo Saarela *et al.* (2006), as fibras podem agir tecnologicamente protegendo culturas probióticas em condições de *stress* como a liofilização, desidratação e armazenamento. Os principais componentes da fibra solúvel da aveia são as β -glucanas, que são polissacarídeos lineares não ramificados, compostos por unidades de glicose β -D-glicopiranosil unidas por ligações $\beta(1\rightarrow3)$ e $\beta(1\rightarrow4)$ e são consideradas prebióticas (DONG *et al.*, 2016).

A aveia pode ser considerada um produto adequado para adição de probióticos para o consumo, como foi demonstrado no trabalho de Guergoletto (2009). Os autores observaram melhora na estabilidade de *Lactobacillus casei* durante o armazenamento e durante a exposição às condições simuladas do trato gastrointestinal quando este micro-organismo foi liofilizado e armazenado em farelo de aveia.

Apesar de bifidobactérias não serem capazes de utilizar β -glucanas com substrato para crescimento, β -glucanas podem aderir à parede celular de bactérias probióticas para

formar estruturas protetoras que podem reduzir o impacto negativo do *stress* ambiental, tal como o associado a condições gastrointestinais (ARENA *et al.*, 2016).

Além disso, o armazenamento de probióticos em produtos com baixa atividade de água durante a estocagem influencia consideravelmente na manutenção da viabilidade do micro-organismo (DIANAWATI & SHAH, 2011). Embora a água seja um componente essencial da vida, a manutenção da viabilidade dos probióticos é reforçada nesta condição (MENG *et al.*, 2008). No entanto, pouco se conhece sobre o efeito da microencapsulação na sobrevivência de micro-organismos probióticos em produtos alimentares secos (WEINBRECK *et al.*, 2010).

2.4 Seleção *in vitro*

Para os probióticos exercerem os efeitos esperados, alguns aspectos devem ser considerados como, por exemplo, serem capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (CHATERIS *et al.*, 1998). A tolerância dos probióticos as condições do pH ácido, presença de sais biliares e oxigênio varia entre as espécies. Sendo que os efeitos adversos do baixo pH na fisiologia das bactérias ainda não foram completamente entendidos, mas condições ácidas têm um impacto negativo sobre as bactérias, reduzindo o pH do citoplasma, o que pode resultar em perda de atividade das enzimas glicolíticas relativamente sensíveis a ácidos e a danos estruturais da membrana celular e das macromoléculas, como as proteínas e o DNA. Já os sais biliares representam moléculas anfipáticas com atividade antimicrobiana, agindo como detergentes, rompendo a estrutura da bicamada lipídica das membranas celulares e causando danos oxidativos para as células (LEEBER *et al.*, 2008).

Segundo Ross *et al.* (2005) condições extremamente ácidas como as encontradas no estômago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegam ao intestino. Para tentar solucionar este problema técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas.

Quando probióticos são encapsulados, é essencial avaliar duas condições. Primeiro, garantir que a microcápsula seja protetora em meios que simulam a secreção gástrica e, em seguida, assegurar que os probióticos encapsulados serão liberados no meio simulado do fluido intestinal. Existem na literatura, diversos modelos experimentais para

simular o trato gastrointestinal. Estes modelos avaliam a tolerância do micro-organismo probiótico ao meio ácido, aos sais biliares e enzimas (GBASSI & VANDAMME, 2012).

Diversos trabalhos têm sugerido a utilização de solução salina como meio para simular as condições do estômago (HANSEN *et al.*, 2002; KRASAEKOOPT *et al.*, 2004; ANNAN *et al.*, 2008). Cloreto de sódio fornece um meio isotônico que mantém a integridade e a viabilidade das células (GBASSI & VANDAMME, 2012). Quanto ao pH, testes que contemplem uma variação de pH entre 1,5 e 3,5 cobrem os valores geralmente encontrados no estômago humano (VANDAMME *et al.*, 2002). Qualquer fluido gástrico artificial deve incluir pepsina em sua composição (GBASSI & VANDAMME, 2012).

Sais de sódio, por sua vez são usados em várias concentrações para simular o fluido intestinal, como por exemplo a solução salina tamponada com fosfato de sódio. Quanto às condições para simulação do suco intestinal, sais biliares e enzimas pancreáticas (pancreatina e tripsina) estão geralmente presentes (GBASSI & VANDAMME, 2012). Com relação ao pH, testes que contemplem uma variação de pH entre 5,5 e 7,0, refletem o encontrado no intestino (VANDAMME *et al.*, 2002). No entanto, não existem estudos conclusivos que permitam especificar a concentração de sais biliares e enzimas encontradas no intestino (GBASSI & VANDAMME, 2012).

2.5 Microencapsulação

Microencapsulação é definida como uma tecnologia de empacotamento de ingredientes sensíveis (sólidos, líquidos ou gasosos) dentro da matriz, sendo que os ingredientes estão aprisionados ou completamente rodeados pela matriz protetora formando pequenas partículas (DE PRISCO & MAURIELLO, 2016). É uma tecnologia inovadora que tem sido utilizada tanto na indústria de alimentos quando na farmacêutica e de cosméticos (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

A microencapsulação vem sendo utilizada para manter a estabilidade de micro-organismos probióticos durante o processamento e estocagem dos alimentos (SAAD, CRUZ & FARIA, 2011). A matriz do alimento e as condições de processamento são fatores que determinam a necessidade de microencapsulação dos micro-organismos (DEVOS *et al.*, 2010). A sua utilização também pode aumentar a resistência das bactérias no decorrer do trato digestivo, visto que esse meio possui elevada acidez, além da presença de enzimas e da bile, possibilitando que as bactérias cheguem ao intestino com condições

de sobrevivência e de atuação (CHAMPAGNE & FUSTIER, 2007; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). Portanto, o objetivo da microencapsulação de probióticos não é apenas proteger as células contra as condições adversas dos produtos, mas também permitir que cheguem em estado viável e metabolicamente ativo no intestino (PICOT & LACROIX, 2004).

Entretanto, alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados, tais como a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado, as características do polímero encapsulador, o processo de microencapsulação e as características do produto a ser obtido (DE PRISCO & MAURIELLO, 2016). A microcápsula obtida deve ser insolúvel em água, para manter sua integridade na matriz alimentar e na parte superior do trato gastrintestinal e, finalmente, as propriedades da partícula devem permitir liberação progressiva das células no intestino (PICOT & LACROIX, 2004).

Existem inúmeras técnicas para promover a microencapsulação, porém nem todas se adequam para probióticos, pois algumas fazem uso de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos para estes micro-organismos (AZEREDO, 2005).

Burgain *et al.* (2011) demonstram, de uma maneira geral, os passos para produção das microcápsulas. A primeira fase consiste em, incorporar o componente bioativo em uma matriz líquida ou sólida. Na segunda etapa, se a matriz for líquida esta será dispersa em ar ou em líquido, enquanto para uma matriz sólida uma solução será pulverizada sobre a mesma. A última etapa consiste na estabilização por um processo químico (polimerização), físico-químico (geleificação) ou físico (evaporação, solidificação, coalescência).

É importante ressaltar aqui que imobilização e microencapsulação são dois termos frequentemente usados como sinônimos, porém erroneamente, pois, imobilização refere-se à introdução do material do núcleo dentro ou por toda matriz (**Figura 1**) enquanto microencapsulação produz um revestimento em volta do núcleo da partícula de forma que fique completamente revestido do material da parede (KAILASAPATHY, 2002). Porém, microesferas sem revestimento podem ser consideradas cápsulas em um sentido mais amplo, porém o revestimento protege o núcleo ativo das condições adversas do meio (ROKKA & RANTAMÄKI, 2010).

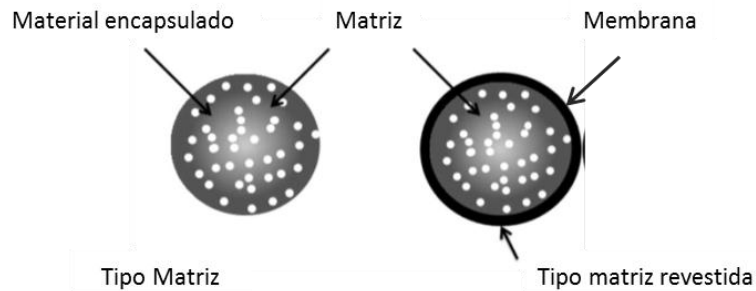


Figura 1 Representação esquemática dos tipos de microcápsulas
Adaptado de Burgain *et al.* (2011)

2.5.1 Estrutura das microcápsulas

O tamanho das microcápsulas pode variar de alguns nanômetros até vários micrômetros e a forma também é bastante variável em função do método e do agente encapsulante utilizado para prepará-las (FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008). Diferentes tecnologias podem ser aplicadas para microencapsulação de probióticos e cada uma fornece microcápsulas com diferentes características. Dois principais tipos de microcápsulas podem ser distinguidos, o tipo reservatório, que possui uma membrana em volta do agente ativo, e o tipo matriz, no qual o agente ativo está disperso por todo material carreador, estando presente até mesmo na superfície, a menos que tenha um revestimento adicional (matriz revestida) (ZUIDAM & SHIMONI, 2009). Cápsulas do tipo matriz podem ser produzidas por *spray drying*, extrusão e emulsificação, já as microcápsulas do tipo reservatório podem ser produzidas pelas técnicas de *spray-coating* ou pelos outros métodos citados, desde que tenha um revestimento adicional (BURGAIN *et al.*, 2011).

As propriedades funcionais tecnológicas dos ingredientes alimentares que os tornam úteis como materiais de matriz na microencapsulação são suas propriedades emulsificantes e sua habilidade de aumentar a viscosidade para formar redes de gel (AUGUSTIN & HEMAR, 2009). Como material de encapsulação de micro-organismos probióticos, normalmente empregam-se polissacarídeos de diferentes origens como algas marinhas (alginato e k-carragena), plantas (amido e seus derivados, goma arábica), animais (quitosana) ou bactérias (goma xantana, gelana) e proteínas animais (caseína, gelatina) (de VOS *et al.*, 2010).

Empregam-se, principalmente, polissacarídeos na microencapsulação de probióticos, pois estes constituem uma matriz cuja degradação é favorecida por micro-organismos da

microbiota intestinal. Além disso, oferecerem proteção ao nível do trato gastrointestinal superior, permitindo obter uma liberação dos micro-organismos no órgão alvo (de VOS *et al.*, 2010). Segundo Rodrigues *et al.* (2011b) a biocompatibilidade entre os polímeros de encapsulação e os micro-organismos é linhagem dependente.

Para a quantificação dos micro-organismos probióticos nas microcápsulas a liberação é um passo importante, uma vez que uma desintegração incompleta pode subestimar o número real de células (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003). Em geral, as microcápsulas de alginato se desintegram mediante a agitação em tampão fosfato (ANNAN *et al.*, 2008; LORENZ *et al.*, 2009).

Hansen *et al.* (2002) compararam três métodos para liberação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* microcápsulas de alginato produzidas por emulsificação. Os autores utilizaram 4,9 mL das seguintes soluções com pH 7: salina peptonada, salina peptonada + CaCl₂ (0,05M) ou tampão fosfato, com agitação a 37 °C por 30 minutos. Dessas, salina peptonada foi identificada como melhor solução para liberação das células das microcápsulas de alginato, apesar do tampão fosfato também ter dissolvido completamente todas as microesferas, porém com menor porcentagem de recuperação de células.

2.5.1.1 Alginato

Alginato é um polímero linear composto por duas unidades monoméricas de β-D-manurônico e α-L-gulurônico ligados entre si por ligações glicosídicas entre seus carbonos 1 e 4. É extraído de algas marrons, sendo que a principal função é de fortalecer e dar flexibilidade para os tecidos das algas, podendo ser utilizado industrialmente devido a sua capacidade de reter água e por suas propriedades de gelificação, espessante e estabilizante (RAYMENT *et al.*, 2009).

Alginato é um polissacarídeo aniônico, com tendência a neutralidade em valores abaixo do pK_a (~3,5), mas se torna negativo quando pH está acima do pK_a. Em presença de cálcio e outros íons divalentes, o alginato de sódio pode, por um processo de ligação cruzada, trocar o íon sódio de sua estrutura por um íon divalente, gelificando no meio em que se encontra. Os cátions monovalentes e o íon Mg²⁺ não induzem a essa gelificação. Íons como Pb²⁺, Cu²⁺, Cd²⁺, Co²⁺, Ni²⁺, Zn²⁺ e Mn²⁺ possuem um uso limitado por apresentarem certa toxicidade. Na maioria das vezes, essa reticulação é feita ao se trocar

o íon Na^+ dos ácidos gulurônico com cátions divalentes formando uma rede tridimensional (GOMBOTZ & WEE, 1998). De acordo com Krasaekoopt (2003), uma maior viscosidade e maior concentração da solução de alginato de sódio, o tamanho das microcápsulas diminui.

As microcápsulas de alginato de cálcio são estáveis em baixo pH, mas são frágeis em soluções básicas podendo desintegrar-se (GROSSO & FAVARO-TRINDADE, 2004). Dependendo da concentração dos íons cálcio, os géis podem ser termorreversíveis (baixas concentrações) ou não (concentrações elevadas) (BELITZ; GROSCH & SCHIEBERLI, 2009).

Apesar de sua adequação como material encapsulante, o alginato apresenta baixa estabilidade na presença de agentes quelantes como fosfatos, lactatos e citratos, que possuem afinidade pelo cálcio e desestabilizam o gel formado. Tratamentos especiais, como cobrir as microcápsulas com um filme de quitosana, podem ser usados para aumentar a estabilidade química e mecânica, de forma a prevenir a liberação das células (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003). Porém, esta instabilidade do alginato de cálcio diante de fosfato e citrato torna-se vantajosa para liberação e enumeração de células das microcápsulas, uma vez que apresentam alta afinidade por Ca^{2+} , sequestram os íons das ligações cruzadas e conseqüentemente, desestabilizam o gel e liberam as células (SMIDSROD & SKJAK-BREAK, 1990).

A técnica de microencapsulação com alginato de sódio tem grande potencial para aplicação em culturas probióticas, uma vez que aumenta a viabilidade do probiótico em aproximadamente 80% (AMINE *et al.*, 2014). Rodrigues *et al.* (2011b) estudaram a viabilidade de bactérias probióticas em seis tipos de polímeros a fim de determinar a eficácia dos materiais para imobilização dos micro-organismos. Boas razões de sobrevivência foram observadas para *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 em alginato de sódio (2 - 4%).

Grosso e Favaro-Trindade (2004) avaliaram a estabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, imobilizada com alginato de cálcio. Em iogurte (pH 4,2) observaram gradual declínio da viabilidade da linhagem probiótica durante o armazenamento refrigerado. Os autores também estudaram a estabilidade de *B. lactis* em leite acidificado com ácido láctico (pH 6,4; 5,0; 4,4 e 3,8) e a concentração de células foi apenas levemente afetada durante o armazenamento, chegando em 28 dias com contagens superiores a $6,0 \log \text{UFC mL}^{-1}$

para todas as faixas de pH, indicando que a presença das culturas iniciadoras de iogurte pode ter afetado negativamente a sobrevivência de *B. lactis* imobilizada em alginato de cálcio, o que não aconteceu no leite acidificado.

2.5.1.2 Quitosana

É um polissacarídeo linear composto de unidades de glicosamina que podem polimerizar por formação de ligação cruzada na presença de ânions e poliânions (BURGAIN *et al.*, 2011). É um polissacarídeo catiônico, com tendência a ser neutro em valores de pH acima do pK_a (6.5) e positivo abaixo do pK_a (MATALANIS *et al.*, 2011). Dissolve-se facilmente em pH ácido, de modo que tem sido empregada, frequentemente, em combinação com outro polímero (geralmente o alginato) que suporte o pH ácido do estômago. Uma vez atingido o intestino delgado é degradada pela microbiota indígena (PRATEADA, 2010).

No caso de utilizar quitosana como matriz, as células aprisionadas podem ser liberadas excessivamente durante a fermentação (na presença de ácido láctico) e causar carga inicial baixa para a fermentação seguinte. Portanto, é preferencialmente utilizada como revestimento e não como microcápsulas. Grânulos revestidos não só vão prevenir liberação das células, mas também aumentam a sua estabilidade mecânica e química (KARSAEKOOPT *et al.*, 2003).

Revestimento de microcápsulas com quitosana promove proteção das células em soluções com sais biliares visto que, uma reação de troca iônica acontece quando as microcápsulas absorvem os sais biliares formando um complexo insolúvel entre ambos, o que impede a difusão de sais biliares para o interior, garantindo a proteção das células (KRASAEKOOPT *et al.*, 2004). A proteção oferecida pelo revestimento de quitosana também pode ser explicada pelas interações eletrostáticas entre quitosana e alginato. Por ser carregada positivamente, a quitosana forma uma membrana semipermeável em volta de um polímero carregado negativamente, como alginato, que não se dissolve na presença de Ca^{2+} e que restringe a difusão da secreção gástrica (ETCHEPARE *et al.*, 2016; COOK *et al.*, 2012). Complexos de poli-eletrólitos (formados com dois ou mais polieletrólitos com carga oposta, como alginato e quitosana, por exemplo) são, portanto, bons biomateriais a serem escolhidos para a preparação de microcápsulas contendo probióticos, pois reduzem a porosidade das microcápsulas de algiato e conseqüentemente reduzem a perda de micro-organismos (CHÁVARRI *et al.*, 2010; WU *et al.*, 2016).

Para escolha do material, deve-se, no entanto, atentar para o fato de que quitosana de baixo peso molecular se difunde mais facilmente na matriz de alginato, resultando em uma membrana densa, ao contrário de quitosana de alto peso molecular (MCKNIGHT *et al.* 1988 apud KRASAEKOOPT *et al.*, 2003).

Chávarri *et al.* (2010), com o objetivo de melhorar a eficiência de alginato na proteção das células, revestiram as microcápsulas com quitosana e avaliaram a capacidade das mesmas em melhorar a sobrevivência de *Bifidobacterium bifidum* e *Lactobacillus gasseri*, durante o armazenamento refrigerado (28 dias a 4 °C) e na exposição a condições simuladas do trato gastrointestinal. Ambos os micro-organismos mantiveram-se estáveis e *B. bifidum* permaneceu com contagens superiores a 7,0 log UFC mL⁻¹ até o fim do armazenamento e mostrou-se resistente a exposição por 120 minutos a pH 2,0 e concentração de sais biliares de 3,0 g L⁻¹. As microcápsulas de alginato revestidas de quitosana foram produzidas por extrusão e desidratadas por liofilização.

Krasaekoopt *et al.* (2006) estudaram a viabilidade de *B. bifidum* ATTC 1994, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei*, encapsulados pela técnica de extrusão em alginato revestido com quitosana, durante o armazenamento (4 °C/ 4 semanas), em iogurte convencional (leite pasteurizado) e UHT. Em ambos os iogurtes, as células apresentaram maior viabilidade quando encapsuladas, com contagens de 1 ciclo logarítmico maior do que as células livres durante os dias de análise. Alginato revestido de quitosana foi capaz de manter o número de células viáveis, dentro do mínimo terapêutico recomendado, por duas semanas para *B. bifidum* e durante todo armazenamento para as demais culturas, em ambos os iogurtes.

2.5.1.3 Amido

O amido tem sido frequentemente utilizado como agente encapsulante de probióticos em combinação com o alginato (MARTIN, LARA-VILLOSLADA, RUIZ, & MORALES, 2013). É um polissacarídeo constituído de amilose e amilopectina. Amilose tem estrutura linear (α -1,4) e tem alta susceptibilidade a retrogradação. Amilopectina é uma molécula maior, é ramificada (ligações α -1,4 e α -1,6), tem baixa susceptibilidade a retrogradação e está presente em maior quantidade no grão de amido (SHARMA *et al.*, 2008).

Amido resistente é a soma de amido e produtos da degradação do amido não absorvidos no intestino delgado de seres humanos saudáveis. É considerado prebiótico por resistir à

digestão e ser fermentado no intestino grosso, principalmente por bifidobactérias. Muitos estudos demonstraram que amido resistente é uma molécula linear de α -1,4-D-glucano, essencialmente derivada da fracção de amilose retrogradada, e tem um peso molecular relativamente baixo ($1,2 \times 10^5$ Da) (FUENTES-ZARAGOZA *et al.*, 2010). Especificamente, é ideal para liberação das células no intestino, além de oferecer uma superfície ideal de aderência dos probióticos ao grânulo durante o processamento, armazenamento e ao longo do trato gastrintestinal, fornecendo resistência ao estresse ambiental (ANAL & SINGH, 2007).

Sultana *et al.* (2000) estudaram a viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus acidophilus* encapsulados em alginato de sódio + amido resistente, pelo método de emulsificação, assim como a resistência das mesmas em condições gástricas e intestinais simuladas e também durante o armazenamento em iogurte. A adição de amido melhorou a viabilidade das células no processo de encapsulação e a inclusão de glicerol na matriz de alginato + amido, antes da encapsulação, aumentou a sobrevivência das bactérias quando as microcápsulas foram armazenadas a -20 °C. Os micro-organismos encapsulados mantiveram-se estáveis em condições gastrintestinais simuladas, porém não diferiram das células livres quanto a estabilidade durante o armazenamento em iogurte, permanecendo com contagens próximas a $6,0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ até a oitava semana.

Kaisalapathy (2006) obteve melhora na sobrevivência de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *L. acidophilus* microencapsulados em alginato + amido pela técnica de emulsificação. Os micro-organismos permaneceram com contagens acima de $6,0 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ durante 7 semanas em iogurte armazenado a 4 °C, com aumento na sobrevivência acima de 1 log quando comparadas com o número de células livres. Vale ressaltar que o pH do produto, tanto com as células livres quanto encapsuladas, chegou a 4,2 ao final do armazenamento.

Jayalalitha *et al.* (2011) estudaram a viabilidade de *Bifidobacterium longum* BB46 e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 encapsuladas, adicionadas em iogurte durante 21 dias de armazenamento refrigerado. Os micro-organismos probióticos foram encapsulados em alginato + amido e alginato + amido + gelatina, utilizando diferentes técnicas (emulsificação ou extrusão). Porém, a mistura alginato + amido + gelatina, pela técnica de extrusão, mostrou-se mais efetiva em proteger as células de bifidobactérias durante o armazenamento, com contagens acima de $8,9 \log \text{ UFC mL}^{-1}$ e sem variação estatística ao longo dos 21 dias de análise.

Boscarioli (2010) avaliou a capacidade de microcápsulas de alginato de cálcio, produzidas por extrusão, adicionadas ou não de prebióticos (amido resistente ou goma acácia) em proteger *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* durante o armazenamento de sorvete (210 dias a -18 °C). O micro-organismo probiótico mostrou-se resistente a técnica de microencapsulação empregada, com concentrações acima de 10^9 UFC g⁻¹. No entanto, a adição dos prebióticos não influenciou a sobrevivência em sorvete durante o armazenamento.

A associação física com o amido também pode garantir a vantagem competitiva à bifidobactéria de utilizar o amido resistente como fonte de carbono e energia no cólon humano e esta característica pode ser usada para produção de microcápsulas simbióticas (CRITTENDEN *et al.*, 2001).

2.5.2 Técnicas de microencapsulação

Todas as técnicas apresentam variado grau de sucesso, dependendo do micro-organismo e do processamento tecnológico envolvido. Segundo Nissim (2008), as discrepâncias de dados na literatura quanto à viabilidade dos micro-organismos após os processos de microencapsulação se devem na maioria das vezes às diferenças de sensibilidade ao oxigênio entre as linhagens e aos variados níveis de oxigênio dissolvido no produto, devido a diferenças nos procedimentos experimentais. Este autor ressalta ainda que o processo protege mais as células da presença do oxigênio do que do ambiente ácido.

2.5.2.1 Emulsificação

Como na maioria dos casos, na emulsificação se empregam diversos polímeros como material de encapsulação. Esta metodologia, aplicada aos micro-organismos probióticos, se desenvolve (**Figura 2**) com a adição de pequeno volume da solução polimérica contendo as células microbianas em suspensão (fase descontínua) em um volume maior de óleo vegetal (fase contínua ou externa). A mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo (fase externa oleosa). Uma vez formada a emulsão, o polímero hidrossolúvel deve ser insolubilizado para formar o núcleo dentro da fase oleosa (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003). Para rompimento da emulsão e formação das microcápsulas, pode-se adicionar, por exemplo, cloreto de cálcio, cloreto de sódio, entre outros.

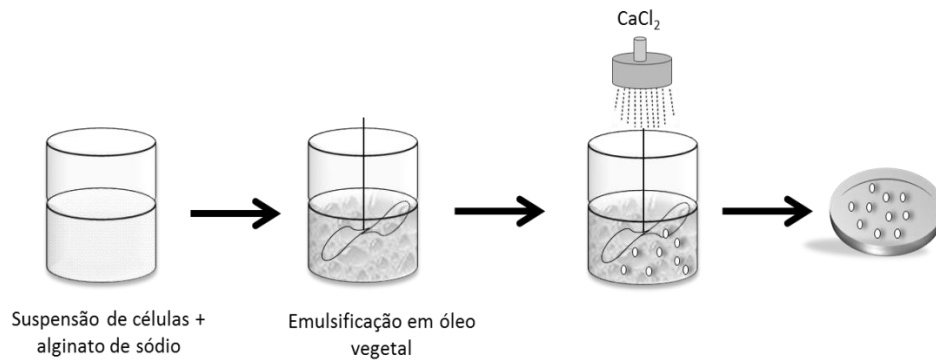


Figura 2 Representação esquemática da produção de microcápsulas pela técnica de emulsificação.

O tamanho das microcápsulas é controlado pela velocidade da agitação da emulsão e quanto menor o tamanho das partículas na fase interna da emulsão, menor será o tamanho final das micropartículas (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003).

Para encapsulamento com uma emulsão é necessário um agente tensoativo. São normalmente adicionados surfactantes, como Tween 80, que induz a encapsulação mediante a formação de micelas e vesículas ao redor do produto a ser encapsulado. Além disso, ele diminui a tensão superficial, refletindo diretamente no tamanho das esferas (cápsulas). O tamanho das cápsulas pode variar de 20 μm a 2 mm (PRATEADA, 2010; KRASAEKOOPT *et al.*, 2003).

No entanto, esta técnica apresenta alguns inconvenientes para ser aplicada na indústria de alimentos, pois o óleo residual nas microcápsulas pode prejudicar as características organolépticas do alimento. Além disso, o óleo residual, os emulsificantes e surfactantes utilizados podem ser tóxicos para determinadas células (KAILASAPATHY *et al.*, 2002). Outras dificuldades que a técnica apresenta é a instabilidade da emulsão, necessitando de vigorosa agitação, que pode ser prejudicial para as células devido a incorporação de ar e a incorporação aleatória das células nas microcápsulas, podendo existir células expostas na superfície da microcápsulas e, portanto sem a proteção contra as condições adversas do meio (VANDAMME *et al.*, 2002).

Hansen *et al.* (2002) testaram nove linhagens diferentes de *Bifidobacterium* spp. quanto a tolerância às condições simuladas gastrintestinais e observaram entre as linhagens apresentaram variações de resistência ao fluido gástrico (pH 2,0 e 3,0) e sais biliares (5,0 e 10 g L⁻¹). Entre estas linhagens, apenas *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 mostrou-se resistente a baixo pH e sais biliares. Os autores também encapsularam algumas linhagens em microcápsulas de alginato (média viscosidade), por emulsificação

em óleo vegetal, para avaliar suas propriedades de resistência ao fluido gástrico e aos sais biliares. Eles obtiveram micropartículas densamente carregadas de bactérias probióticas, porém muito porosas. As microcápsulas mantiveram-se estáveis durante o armazenamento, a 4 °C no leite (2% p/v) e iogurte, durante 16 dias e em fluido gástrico (pH 2,0) durante 1 h, a 37 °C.

Com o objetivo de aumentar a sobrevivência dos micro-organismos, pode-se realizar o recobrimento das microcápsulas com outros materiais. O recobrimento das microcápsulas com uma camada adicional, previne a exposição dos micro-organismos ao oxigênio durante o armazenamento, assim como melhora sua estabilidade ao pH ácido (ROKKA & RANTAMAKI, 2010).

Mokarram *et al.* (2009) estudaram a capacidade de microcápsulas de alginato de cálcio produzidas por emulsificação, revestidas ou não com uma ou duas camadas de alginato de sódio, na proteção de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus* contra as condições adversas dos sucos gástrico e intestinal simulados. Os autores observaram maior viabilidade para células encapsuladas, sendo que esta aumentou com a adição de camadas de revestimento de alginato de sódio.

Possíveis materiais para revestimento incluem quitosana, alginato, amido, gelatina e poli-L-lisina (ROKKA & RANTAMAKI, 2010). O revestimento de microcápsulas de alginato com policátions como quitosana e poli-aminoácidos (poli-L-lisina) podem melhorar a estabilidade química e física do alginato, conseqüentemente, melhorando a eficiência da encapsulação (KASAEKOOPT *et al.*, 2004).

Uma vez preparadas as microcápsulas pela técnica de emulsificação, torna-se desejável isolá-las como um pó seco, para facilitar a manipulação e armazenamento. Embora a água seja um componente essencial para a vida, a retenção da viabilidade durante o armazenamento é frequentemente melhorada sob baixa atividade de água (MENG *et al.*, 2008). Para este fim, inúmeros processos de secagem são utilizados, dentre eles, liofilização e *spray drying* (COOK *et al.*, 2012).

Liofilização é a secagem de uma amostra congelada pela sublimação do gelo sob vácuo. Tem a vantagem de ser um processo no qual as bactérias podem sobreviver bem com a adição de agentes crioprotetores (SAARELA *et al.*, 2005). Porém, liofilização além de ser

um processo demorado, não reduz o tamanho das partículas como nos outros métodos de secagem, devido a retenção da estrutura hidratada (COOK *et al.*, 2012).

Segundo Augustin & Hemar (2009), a liofilização geralmente é utilizada em ingredientes sensíveis ao calor e é um processo no qual as bactérias podem sobreviver bem com a adição de agentes crioprotetores (SAARELA *et al.*, 2005). Porém, a remoção de água é mais demorada e o pó apresenta estrutura mais porosa, quando comparado ao *spray drying*, o que pode aumentar os custos com armazenamento e transporte.

Agentes protetores podem ser adicionados antes do congelamento ou desidratação. O tipo de crioprotetor depende do micro-organismo, no entanto, existem alguns que parecem funcionar bem para muitas espécies. Estes incluem os sólidos não gordurosos do leite, soro, glicerol, trealose, betaína, adonitol, sacarose, glicose, lactose e polímeros tais como dextrano e polietilenoglicol (MORGAN *et al.*, 2006).

2.5.2.2 *Spray drying*

A produção de microcápsulas pelo método de *spray drying* consiste na atomização de um líquido, que contem o material a ser encapsulado e o polímero encapsulador, no interior de uma câmara de secagem, na qual também é inserida uma corrente de ar aquecido (**Figura 3**). Esta operação se divide em etapas distintas: atomização do líquido, mistura do *spray* formado com o ar aquecido, secagem do material e por fim a separação do produto seco (DE VOS *et al.*, 2010). A temperatura de secagem, em combinação com o tempo de secagem são os fatores chave que influenciam na viabilidade final do probiótico, sendo que, quanto maior a temperatura de saída no equipamento, maior é a viabilidade do micro-organismos após a desidratação (HUANG *et al.* 2017).

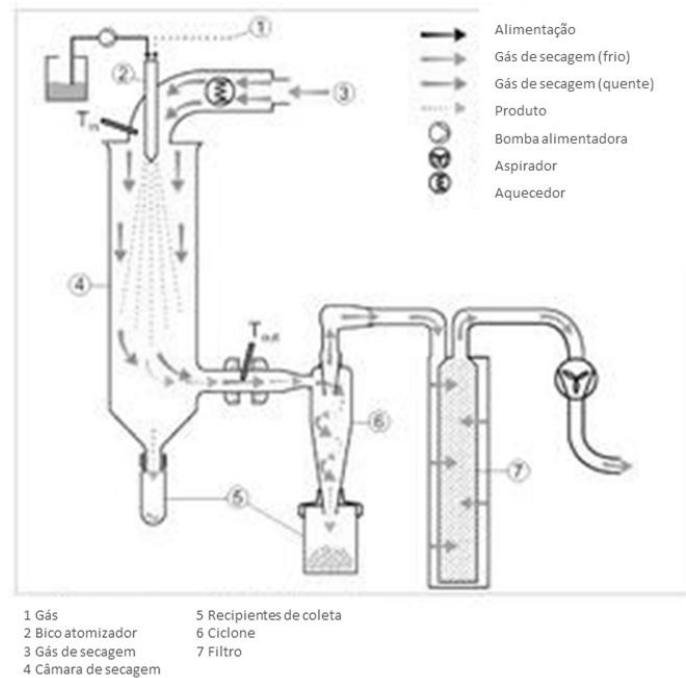


Figura 3 Representação esquemática das principais etapas envolvidas no processo de microencapsulação por spray drying. (Adaptado de *In Vitro Technologies*)

Apenas dispersões a base de água são aplicadas na secagem por *spray drying*. Sendo assim, a matriz deve ter elevada solubilidade em água. Porém, tanto moléculas hidrofílicas quanto hidrofóbicas podem ser usadas, desde que as hidrofóbicas sejam primeiramente dissolvidas em uma fase de óleo, após a qual uma emulsão água-óleo é formada antes da secagem (DE VOS *et al.*, 2010). Segundo Huang *et al.* (2017), formulações nas quais a base da matriz de encapsulação são carboidratos com baixo peso molecular e alta temperatura de transição vítrea produzem alto grau de proteção aos micro-organismos durante a secagem por *spray drying*. Além disso, outros materiais são possíveis para serem utilizados como agentes encapsulantes pela técnica de *spray drying*, como: concentrado proteico de soro, gelatina, goma arábica, dentre outros. Por outro lado, leite desnatado em pó reconstituído tem se apresentado como outro meio favorável para manutenção da viabilidade de culturas probióticas durante a secagem por *spray drying*.

Leite desnatado em pó contém abundante Ca^{2+} , o que pode proteger as células contra o estresse térmico a partir de dois aspectos: estabiliza estruturas celulares sob estresse térmico, possivelmente a membrana citoplasmática combina-se com as proteínas do leite para formar aglomerados com as células, o que amortece tensões causadas pela rápida desidratação e elevação da temperatura (HUANG & CHEN, 2013).

Estudos iniciais tendiam a atribuir a proteção de leite em pó desnatado a presença de lactose, um dissacarídeo, que foi considerado protetor da membrana citoplasmática durante a desidratação com mecanismo similar aos dissacarídeos não-redutores, tais como trealose e sacarose (ANANTA, VOLKERT & KNORR, 2005). No entanto, em estudos recentes, a proteção a partir de componentes de proteína de leite tem atraído muita atenção. Quando leite desnatado foi desnaturado por calor, as proteínas desnaturadas foram consideradas responsáveis por melhorar a resistência de linhagens de bactérias ácido-lácticas contra o estresse térmico (HUANG *et al.*, 2014).

Uma possível desvantagem do processo de *spray drying* é o fato de ser uma tecnologia de imobilização ao invés de encapsulação, o que implica que algum componente bioativo pode ficar exposto. Outra limitação é a alta temperatura necessária, que pode não ser compatível com alguns tipos de probióticos (DE VOS *et al.*, 2010; BURGAIN *et al.*, 2011). Embora algumas espécies bacterianas possam refletir resistência aparente, a robustez das bactérias probióticas durante a secagem por *spray drying* parece ser mais dependente da linhagem (HUANG, *et al.*, 2017).

Uma redução no número de células viáveis dos micro-organismos é de certa forma esperada, em virtude da aplicação de elevadas pressões e temperaturas, que provocam perda de água intracelular, como também inativação de proteínas essenciais para a manutenção do equilíbrio celular (OLIVEIRA, 2006). Segundo Huang *et al.* (2017), fatores como o tamanho do equipamento e o tempo de permanência do micro-organismo na câmara de secagem têm grande influência na manutenção da viabilidade do micro-organismo.

Colisão de partículas durante a secagem no *spray dryer* pode ser dividida nos fenômenos de colisão partícula-partícula e partícula com parede do equipamento. Colisão de partícula-partícula pode levar a coalescência ou aglomeração das partículas. Isto vai determinar a morfologia definitiva do produto e influenciar a sua reconstituição e propriedades mecânicas. Colisões de partículas com parede do equipamento pode levar, em vez disso, a deposição de pó na parede, reduzindo o rendimento do processo e qualidade do produto (BOONYAI *et al.*, 2004). Bicudo (2014) observou essa aglomeração de microcápsulas durante a secagem por *spray drying*, com tendência de formação de agregados de microcápsulas menores em torno das de maior diâmetro. Esta aglomeração geralmente é maior quando se utiliza maiores concentrações do polímero que constituirá a matriz da microcápsula (CARRARO, 2013).

2.6 Microscopia de Força Atômica

A microscopia de força atômica (MFA) constitui uma classe de instrumentos pertencentes ao grupo de microscopias chamadas Microscopia de Varredura por Sonda (MVS). MVS não utiliza lentes para obtenção de imagens e não necessitam de uma fonte de luz, nem de feixe de elétrons. Esta técnica utiliza sondas de dimensões muito reduzidas a distâncias muito pequenas, proporcionando uma alta resolução espacial na visualização de superfícies em nível atômico de diferentes naturezas (metais, películas orgânicas, polímeros, amostras biológicas em sistemas condutores e isolantes) e em diversos meios (vácuo, pressão atmosférica, meios líquidos) (THORNTOM *et al.*, 2000).

O funcionamento da MFA baseia-se na varredura da superfície da amostra por uma sonda de ponta piramidal de alguns micrômetros de comprimento (100 a 200 μm) e geralmente com menos de vinte nanômetros de diâmetro, integrada em um cantilever flexível. A força entre a ponta e a superfície da amostra faz com que o cantilever se aproxime ou se afaste e essa deflexão é proporcional à força de interação. Na parte superior da haste há um espelho que reflete a luz de um feixe de laser. Após a reflexão, o feixe de laser passa por uma lente e incide sobre um fotodetector (fotodiodo) que mede as variações de posição e de intensidade da luz produzidas pelas deflexões do cantilever (**Figura 4**). A medida que a ponta varre a amostra ou a amostra é deslocada sob a ponta, os diferentes tipos de topografia encontrados na superfície fazem com que a interação mude. Essas diferenças, captadas no detector, são armazenadas e processadas por um computador, que as transformam em imagens topográficas da superfície bi e tridimensionais (HOWLAND & BENATAR, 2000).

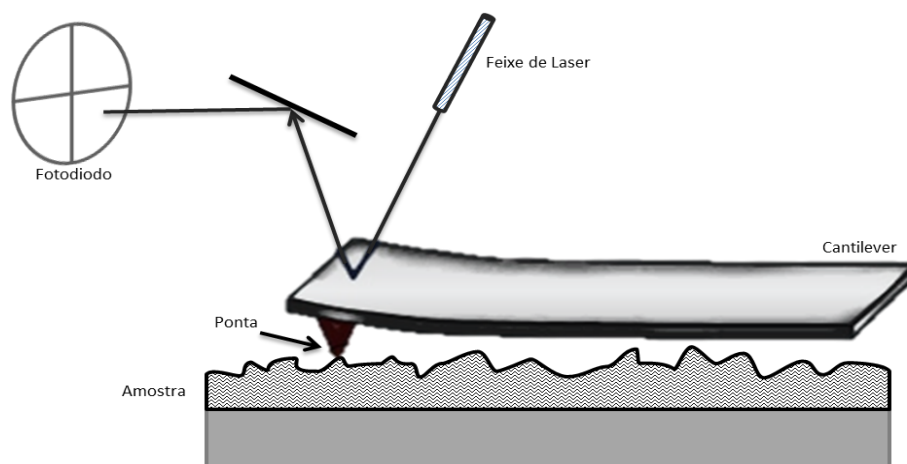


Figura 4 Diagrama esquemático do sistema de microscopia de força atômica. Adaptado de Ferreira e Yamanaka (2006).

MFA oferece uma série de características únicas, a mais vantajosa é o alto poder de ampliação com alta resolução e a preparação mínima da amostra (as amostras podem manter o seu estado nativo ou quase nativo). Além disso, na análise por MFA o material precisa ser depositado e fixado em um substrato rígido (MORRIS *et al.*, 1999) e a adsorção de amostra é um aspecto importante a ter em consideração para evitar a destruição da estrutura nativa ou alterar as interações macromoleculares (OLIVARES, 2010).

Quando bactérias estão presentes em matrizes alimentares, é provável que sua superfície interaja com outros constituintes (LY *et al.*, 2006). Existem, porém, poucos estudos por microscopia de força atômica indicando a interação entre o micro-organismo e a matriz de encapsulação ou a matriz alimentar. Burgain *et al.* (2013) avaliaram por MFA a força de interação de linhagens de *L. rhamnosus* com proteínas do leite. Os autores relataram uma interação não específica das linhagens com as micelas de caseína (interações hidrofóbicas, eletrostática de Van der Waals).

Doherty *et al.* (2011) também demonstraram por MFA forte interação entre *L. rhamnosus* e proteínas de soro de leite em microcápsulas feitas por extrusão, com proteção e aprisionamento das células dentro da matriz proteica.

2.7 Microscopia Eletrônica de Transmissão

Várias técnicas de microscopia podem ser utilizadas para descrição microestrutural completa das microcápsulas, sendo que a estrutura interna do sistema pode ser estudada fraturando as microcápsulas e observando-as usando Microscópio Eletrônico de Varredura (MEV) que opere em baixas temperaturas (Cryo-MEV) ou pela incorporação das microcápsulas em resina, com corte fino e observação de seções usando Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) (WOJTAS, HANSEN & PAULSON, 2008). Neste trabalho, optou-se pelo uso do MET em virtude da indisponibilidade de um MEV com tal tecnologia de operação.

O MET usa um feixe de elétrons sob alta tensão emitido por uma coluna de elétrons (**Figura 5**). Lentes eletromagnéticas são utilizadas para focalizar este feixe de elétrons, que ao passar através da amostra, produz diferentes tipos de radiação. Em geral, apenas os elétrons transmitidos são analisados pelo detector. A coluna do microscópio é onde o feixe de elétrons é gerado e dirigido para atravessar a amostra e onde a imagem será

ampliada para realização da análise e registro digital. Na figura abaixo está a representação esquemática dos principais componentes do microscópio eletrônico de transmissão (KESTENBACH & BOTTA FILHO, 1989).

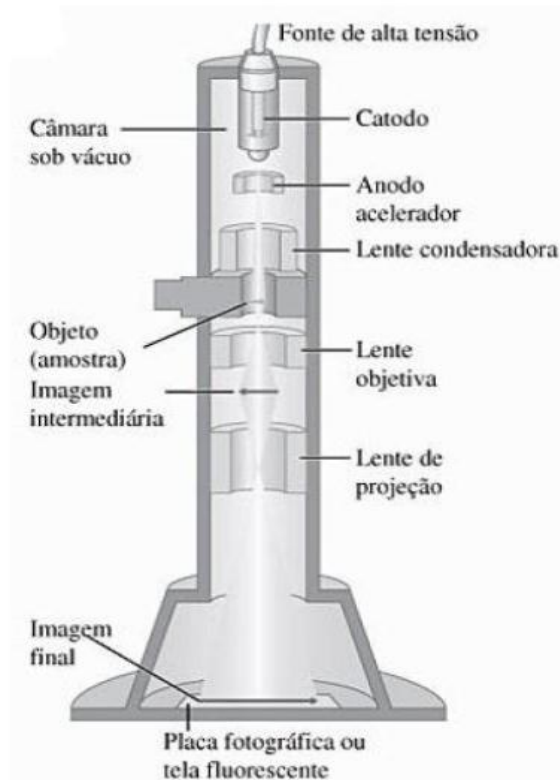


Figura 5 Diagrama esquemático dos principais componentes do microscópio eletrônico de transmissão (YOUNG & FREEDMAN, 2009, p. 228).

Materiais biológicos precisam ser tratados antes das análises de microscopia eletrônica para resistir ao alto vácuo e ao feixe de elétrons. No protocolo padrão de preparo de amostras para análise em microscopia eletrônica de transmissão, as amostras são quimicamente preservadas (fixadas), depois desidratadas e infiltradas com resina líquida, que é subsequentemente solidificada. Estas amostras sólidas podem ser cortadas em fatias finas, utilizando um ultramicrotomo e as seções montadas numa grelha de metal para observação no MET. Para microscopia eletrônica de transmissão, as amostras precisam ser seccionadas em fatias finas para permitir a passagem de elétrons. No entanto, toda essa manipulação pode induzir artefatos e a mudanças estruturais grosseiras (RENSING, 2016).

Por outro lado, os métodos de criopreparação podem evitar muitos problemas relacionados a presença de artefatos nas imagens. A criomicroscopia é uma técnica de microscopia eletrônica de transmissão que permitiu imagens melhoradas, uma vez que o congelamento rápido e a criopreparação introduziram menos artefatos durante o preparo

das amostras (CHEVILLE & STASKO, 2013). Um avanço da criomicroscopia foi a vitrificação da água congelando rapidamente a amostra em camadas finas de gelo, preservando assim a estrutura em um ambiente nativo para imagens (RUSSO & PASSMORE, 2016). Além disso, com a criofatura, que consiste em fraturar a amostra a baixas temperaturas (-100 °C ou menos), é possível examinar a ultraestrutura interna das amostras após a deposição a vácuo de platina-carbono sobre o plano da fratura e a construção da réplica para análise no microscópio de transmissão (CHEVILLE & STASKO, 2013).

Uma vez que as amostras biológicas não são normalmente condutoras, nem muito densas em elétron, um revestimento de metal e carbono é aplicado em muitos casos para aumentar a condutividade e a densidade de elétrons e para facilitar a formação de imagens (SCHADLER, BURKHARDT & KAPPLER, 2008). As réplicas de platina / carbono são estáveis ao longo do tempo e sob observação no microscópio de transmissão, podem ser armazenadas para posterior re-investigação e quando obtidas sob condições ótimas de preparação da amostra, as réplicas criofaturadas refletem o estado original, nativo da amostra (KUNTSCHE, HORST & BUNJES, 2011).

2.8 Citometria de fluxo

O prefixo “cito” significa célula, junto com o sufixo “metria”, que significa contar, mensurar, mais a palavra “fluxo” que vem de fluídos ou canalização, forma-se então Citometria de Fluxo (CF) que nada mais é que uma técnica que carrega um fluxo de células através de um contador (DELUDE, 2005). CF é um método com alta sensibilidade, uma vez que avalia vários parâmetros celulares, tal como a estrutura da membrana, estrutura intracelular e proteínas de sinalização ou até mesmo o ciclo celular (JAHAN-TIGH *et al.*, 2012).

O princípio da CF se baseia na captação da suspensão contendo as células (**Figura 6**), as quais serão canalizadas até que fiquem enfileiradas, de modo que passe uma a uma no laser. Após passar pelo laser, dois fenômenos importantes acontecem: primeiro, as células irão espalhar a luz incidida, e isso irá determinar o tamanho e a granulosidade da célula. O outro acontecimento é a pesquisa das atividades bioquímicas, biofísicas e moleculares das células através de um marcador que irá liberar uma fluorescência. A dispersão dessa luz e a fluorescência serão captadas por várias lentes que transferem

para tubos fotomultiplicadores (PMTs) e assim convertem a luminosidade em sinais elétricos (BERTHO, 2011).

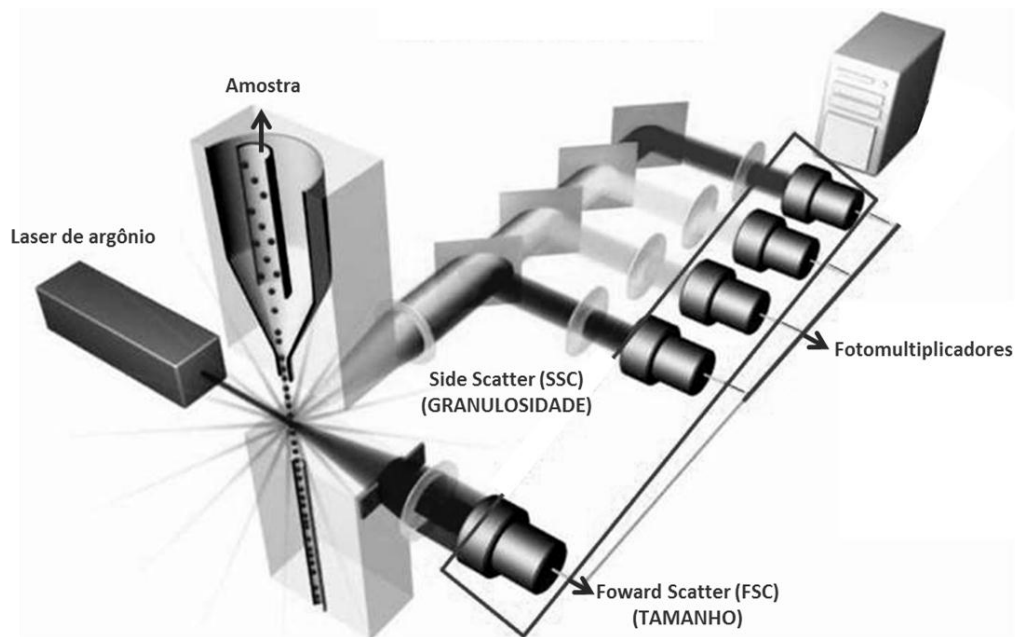


Figura 6 Representação esquemática do funcionamento de um citômetro de fluxo. (Adaptado de Medical University of South Carolina)

Para selecionar apenas os raios de comprimento de onda desejados, filtros óticos são usados. Os sinais elétricos gerados pelo PMTs são amplificados e transferidos digitalmente para um computador. *Softwares* fazem a leitura e análises desses dados e oferecem seis parâmetros que incluem: tamanho celular ou *Foward Scatter* (FS), granulosidade *Side Scatter* (SS), além de cinco tipos de fluorescências (verde (FL1), amarela (FL2), laranja (FL3), vermelha (FL4) e roxa (FL5)) (BERTHO, 2011).

Usar a Citometria de Fluxo convencional sem marcadores, não é uma tarefa fácil, uma vez que, sem eles, não é possível distinguir os micro-organismos de interesse de outros micro-organismos ou *debris*. Esses marcadores emitem fluorescências que permitem a diferenciação entre micro-organismo. Podem ser eles, anticorpos, lectinas, ácido nucleicos ou corantes fluorescentes (VEAL *et al.*, 2000).

Carboxifluoresceína diacetato (CFDA) em si é um derivado de fluoresceína, não-fluorescente, que passa através da membrana celular e é usado para avaliar atividade de esterases em bactérias. As células com metabolismo ativo produzem esterase intracelular e esta enzima hidrolisa o grupo diacetato do CFDA e gera um produto altamente fluorescente, fluoresceína, que pode ser detectado (SALAR-BEHZADI *et al.*, 2013). O composto Carboxifluoresceína diacetado succinimidil ester (CFDA-SE) é similar ao CFDA,

diferindo pela presença do grupo succinimidil ester (SE) que se liga covalentemente a grupos amino nas moléculas intracelulares ajudando na fixação do corante. CFDA-SE não é tóxico para célula, não modifica a viabilidade da célula corada e sua ligação com a mesma é estável (WANG *et al.*, 2005).

Iodeto de propídio (PI) forma complexos com a dupla fita de DNA por intercalação entre os pares de bases e esta ligação num ambiente hidrofóbico resulta num aumento da sua eficiência de fluorescência. É um marcador de DNA que normalmente não entra em células intactas, mas sim em células injuriadas ou mortas com danos na membrana (SHAPIRO, 2003). Apenas células mortas ou comprometidas são permeáveis ao PI (DOHERTY, 2010). Dupla coloração com CFDA-SE e PI é comumente usada para distinguir mais facilmente entre bactérias ativas e inativas.

A Citometria de Fluxo tem sido empregada no campo da microbiologia para análise de células desde a década de 70 (WANG *et al.*, 2010). Esta rápida ascensão foi devido a sua habilidade de analisar mais de 5000 células por segundo, para alguns equipamentos, ou até mesmo 100.000 células por segundo nos equipamentos mais modernos. Além dessa rapidez de análise, destacam-se também os múltiplos parâmetros analisados em pouco tempo (DIAZ *et al.*, 2010).

As técnicas avançadas capazes de enumerar a viabilidade em tempo real do micro-organismo probiótico são almejadas tanto pelos pesquisadores quanto pelos fabricantes industriais. Conhecida por sua eficiência superior e versátil aplicação em pesquisa microbiológica, a técnica de citometria de fluxo em combinação com marcadores fluorescentes pode ser um candidato promissor, uma vez que pode instantaneamente coletar vários parâmetros de viabilidade celular em um ensaio e apresentar os resultados em uma perspectiva estatística (CHEN *et al.* 2011).

Quando se pretende avaliar o nível de sobrevivência das células liberadas das microcápsulas, os baixos valores de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) podem ser provenientes de baixas liberações de células das cápsulas ou de altas perdas de viabilidade após a liberação. A citometria de fluxo é muito útil no estabelecimento da população total liberada e permite a interpretação dos dados de UFC de maneira rápida (DOHERTY *et al.*, 2012).

Além disso, uma vantagem importante da citometria de fluxo é a rapidez na determinação da viabilidade celular quando comparada aos métodos tradicionais de enumeração da viabilidade por contagem em meio sólido. Métodos baseados no cultivo de células em meio sólido são trabalhosos, demorados e requerem um longo tempo de incubação (72 horas) antes dos resultados estarem disponíveis. Isso atrasa a tomada de decisões e pode se tornar um gargalo na otimização da produção e controle de qualidade (GENG, *et al.*, 2014).

Trabalhos na literatura comparam citometria de fluxo e contagem em meio sólido e a similaridade de seus resultados. É encontrada alta correlação para muitos gêneros de bactérias, e a citometria de fluxo tem se mostrado como uma alternativa adequada de rápida análise na microbiologia (JEPRAS *et al.*, 1995; MARTIN-DEJARDIN *et al.*, 2013; PEREIRA, 2014; GENG *et al.*, 2014; GANDHI E SHAH, 2015).

A contagem em meio sólido é um método usado pelos microbiologistas por décadas, porém trata-se de um método trabalhoso e lento para se obter resultados. Além do mais, nem todos os micro-organismos tem um bom crescimento em meio sólido, podendo produzir um falso resultado, como no caso das células viáveis, mas não cultiváveis (VEAL *et al.*, 2000; MARTIN-DEJARDIN *et al.*, 2013). Uma célula é geralmente considerada como morta quando não é capaz de originar colônias em meio sólido. No entanto, essa afirmação é muito simplista e a realidade é que a ausência de colônias em meios sólidos não significa necessariamente que as células estão mortas no momento da amostragem, mas podem estar presentes células em estado intermediário ou não cultivável com atividade metabólica reduzida (BARER *et al.*, 1993; NEBE-VON-CARON *et al.*, 2000).

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar o efeito dos processos de microencapsulação na viabilidade e funcionalidade de *B. longum* 5^{1A} incorporada em produtos lácteos e farinha de aveia.

3.2 Objetivos específicos

- Preparar microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} em matriz de alginato de cálcio com amido resistente e outra em matriz de alginato de cálcio revestido com quitosana usando a técnica de microencapsulação por emulsificação.
- Preparar microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} em matriz de leite desnatado em pó reconstituído pela técnica de *spray drying*.
- Determinar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} após os processos de microencapsulação e durante o armazenamento.
- Avaliar *in vitro* a sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada em condições simuladas do trato gastrintestinal.
- Aplicar a Citometria de Fluxo a fim de avaliar a viabilidade e injúrias celulares no microorganismo microencapsulado e comparar com a técnica usual de contagem em meio sólido.
- Caracterizar a morfologia das microcápsulas contendo a linhagem probiótica por Microscopia de Força Atômica e Microscopia Eletrônica de Transmissão.
- Determinar a hidrofobicidade das células livres e encapsuladas por *spray drying*.
- Avaliar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, incorporada em bebida láctea fermentada, leite puro e farinha de aveia, nas formas livre e encapsulada, durante o armazenamento.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado no Laboratório de Microbiologia Industrial e Biocatálise (LAMIB) do Departamento de Alimentos da Faculdade de Farmácia/UFMG em parceria com: Laboratório de Farmacotécnica - Departamento de Produtos Farmacêuticos da Faculdade de Farmácia/UFMG, EDETEC – Indústria Alimentícia SA - BH/MG, Laboratório de Hematologia – Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas da Farmácia/UFMG, Laboratório de Nanoscopia - Centro de Inovação e Tecnologia SENAI / FIEMG - Campus Cetec e com o Centro de Microscopia da UFMG.

4.1 Materiais

O meio de cultura ágar de Man, Rogosa & Sharp (MRS), o caldo MRS e água peptonada, foram adquiridos da Acumedia (Lansing, MI, USA). O alginato de sódio, quitosana de baixo peso molecular, citrato de sódio, pepsina, pancreatina, iodeto de propídio e hexadecano foram obtidos da Sigma Aldrich (Pool, UK). Cloreto de cálcio e ácido clorídrico foram adquiridos da Vetec - Química Fina (Rio de Janeiro, Brasil). Cloreto de sódio, fosfato monossódico, sacarose, glicose, trealose, manitol, glicose e glicerol foram adquiridos da Synth (PA, Brasil). Ácido acético glacial foi obtido da Ecibra (São Paulo, Brasil). Tween 80 e sais biliares foram adquiridos da Merck (Darmstadt, Germany). Leite desnatado em pó foi adquirido da Molico - Nestle® (São Paulo, Brasil). Farinha de aveia foi adquirida da Vita Mais – Yoki Alimentos (São Paulo, Brasil). O amido resistente foi gentilmente doado pela Ingredion (Brasil) e o óleo de Soja foi cedido pela Soya – Bunge® (Gaspar, Brasil). E Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester foi adquirido da Invitrogen – Molecular Probes (Paisley, Reino Unido).

4.2 Micro-organismo e preparo da cultura estoque

Foi utilizada cultura pura de *Bifidobacterium longum* subsp. *longum* 5^{1A}, que faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Ecologia e Fisiologia de Micro-organismos do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) - UFMG. A linhagem foi isolada de fezes de criança sadia e identificada por testes morfotintoriais, respiratórios e bioquímicos, seguidos de PCR-Multiplex, de acordo com Kwon *et al.* (2005). A partir da cultura liofilizada fez-se uma cultura estoque, de acordo com Faleiro *et al.* (2015), em caldo de MRS obtendo-se 8,0 log UFC mL⁻¹. A cultura estoque foi mantida em caldo MRS adicionado de 20% (v/v) de glicerol a -80 °C.

4.3 Preparo da cultura de *B. longum* 5^{1A} para microencapsulação

No momento do uso, as culturas foram preparadas e concentradas por inoculação de 1,0 mL da solução estoque em 10 mL de caldo MRS com incubação a 37 °C. Após 24 horas, 2,0 mL foram transferidos para 20 mL de caldo MRS e novamente incubados a 37 °C por 24 horas. Foi feita uma nova transferência de 3,0 mL do caldo para frascos contendo 300 mL de caldo MRS e mantidos sob a mesma condição de incubação anterior. Não foi usada incubação em anaerobiose, pois em todas as transferências foi mantido mínimo espaço livre nos frascos de forma a garantir um ambiente anaeróbio nos frascos. O tempo de incubação de 24 horas foi utilizado tendo como base a curva de crescimento de *B. longum* 5^{1A} determinada por Pereira (2012).

Após este período, a cultura foi centrifugada (Centrifuga refrigerada SIGMA 2K15, Osterode, Alemanha) por 10 minutos à 2.792 X g a temperatura ambiente. O sobrenadante foi descartado e a massa de células foi adicionada de 30 mL de água destilada estéril e procedida uma nova centrifugação por 10 minutos à 2.792 x g. Após o descarte do sobrenadante foram adicionados 3,0 mL de água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹) constituindo o inóculo, obtendo-se uma concentração de *B. longum* 5^{1A} de aproximadamente 10 log UFC mL⁻¹ que foi determinada por contagem por em ágar MRS, em anaerobiose (Anaerobac, Probac, Brazil) a 37°C por 72 horas. Suspensões de células frescas foram preparadas para cada experimento.

4.4 Microencapsulação

4.4.1 Testes de velocidade de agitação da emulsão

Foram realizados ensaios preliminares para determinação da melhor velocidade de agitação da emulsão para produzir cápsulas com diâmetros próximos de 100 µm, que segundo Annan *et al.* (2008) tem sido tamanhos preferidos para maioria das aplicações por não interferirem na textura dos produtos. Para isso, foram produzidas cápsulas de alginato puro (sem adição de quitosana ou amido resistente), pela técnica de emulsificação, em diferentes velocidades de agitação (IKA Eurostar) durante a formação da emulsão. As velocidades testadas foram 300, 450, 700, 900 e 1200 rpm. E o tamanho das microcápsulas foi determinado seguindo metodologia apresentada no item 4.5, sendo que apenas as cápsulas a 700 rpm foram avaliadas antes e após a liofilização. As demais cápsulas foram medidas antes da liofilização.

4.4.2 Preparo das cápsulas pela técnica de emulsificação

Foram produzidas também microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} pela técnica de emulsificação usando como matriz o alginato de cálcio revestido com quitosana e o alginato de cálcio adicionado de amido resistente. Esses tipos de microcápsulas serão citados ao longo do trabalho com nome resumido, como cápsulas de quitosana e amido resistente, respectivamente.

Foi seguida a metodologia de Brinques & Ayub (2011) para produzir as microcápsulas de alginato por emulsificação (**Figura 7**). Da suspensão de células, 10 mL foram incorporados em 40 mL de alginato de sódio, 2,0 g 100 mL⁻¹ e emulsificados em 250 g de óleo de Soja, adicionado de 0,2 g 100 g⁻¹ de Tween 80 utilizando agitador automático (IKA Eurostar) a 700 rpm por 10 minutos. A quebra da emulsão e a gelificação ocorreram adicionando lentamente 500 mL de solução de CaCl₂ a 0,05 mol L⁻¹ seguida pela agitação da solução por mais 10 minutos à 700 rpm. Em seguida a mistura foi decantada em funil, para facilitar a recuperação das microcápsulas, a fase aquosa foi centrifugada (1000 X g por 10 minutos) e as microcápsulas lavadas com 30 mL de água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹), seguido de centrifugação (nas mesmas condições anteriores) e ressuspensas em 30 mL de água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹).

Para revestimento das microcápsulas de alginato de cálcio com quitosana adicionou-se 15 mL da suspensão de microcápsulas em 100 mL de quitosana 0,4 g 100 mL⁻¹, acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial (para completa dissolução da quitosana) e pH ajustado para 6,0 com adição de NaOH, seguido de agitação em *shaker* a 300 rpm por 20 minutos. As microcápsulas foram coletadas por centrifugação (1000 X g por 10 minutos), lavadas com 30 mL de água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹), seguido de centrifugação (nas mesmas condições anteriores) e ressuspensas em 30 mL de água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹).

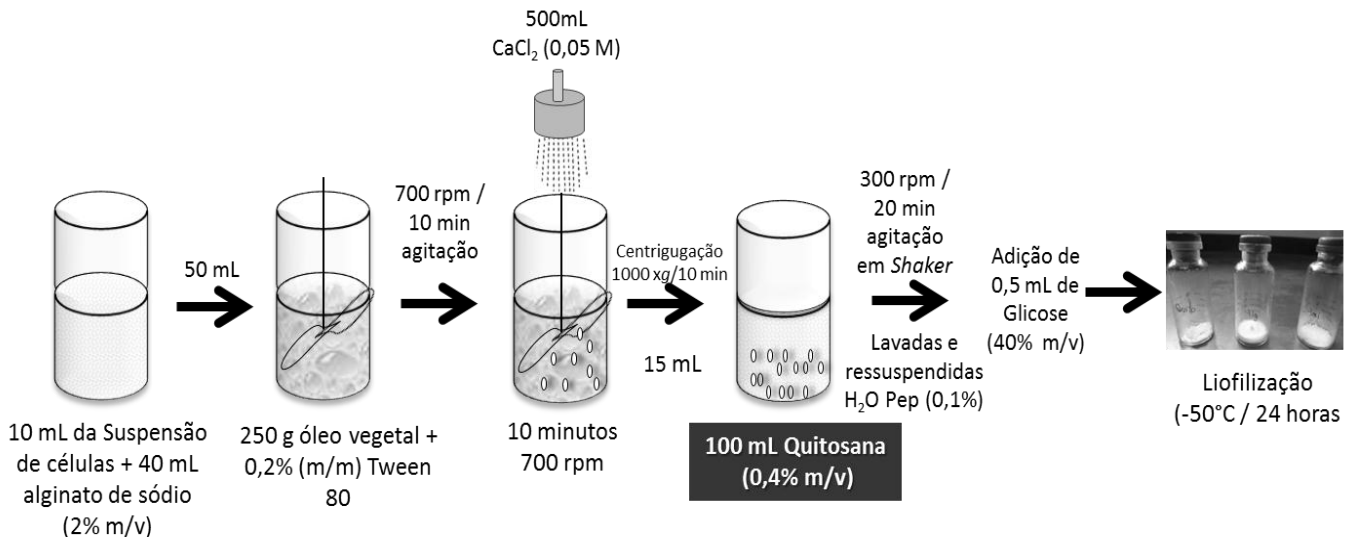


Figura 7 Metodologia de microencapsulação de *B. longum* 5^{1A} por emulsificação usando matriz de alginato de cálcio com revestimento de quitosana.

Já o amido resistente foi adicionado ao alginato de sódio para produzir microcápsulas contendo os dois materiais, seguindo metodologia de Sultana *et al.* (2000). Como demonstrado na **Figura 8**, para produção das microcápsulas de alginato de cálcio com amido resistente seguiu-se o mesmo procedimento anterior sendo que, amido resistente a 2,0 g 100 mL⁻¹ foi incorporado à solução de alginato sódio e não houve recobrimento com quitosana. É importante ressaltar aqui, que para ambas as microcápsulas (quitosana e amido resistente) foram preparadas amostras brancas, com ausência de células.

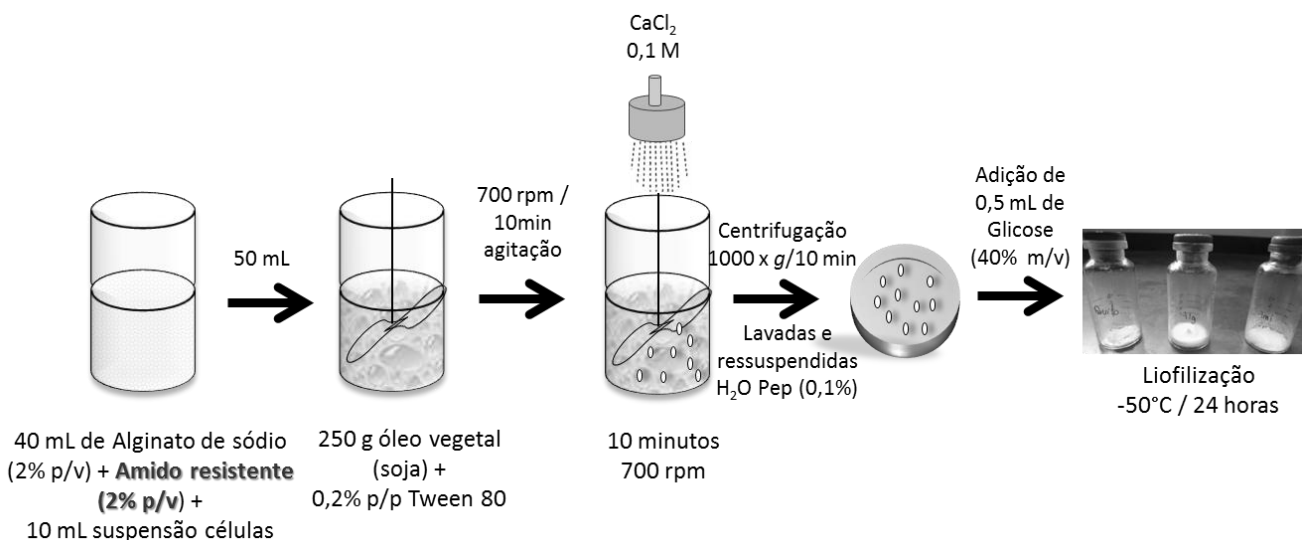


Figura 8 Metodologia de microencapsulação de *B. longum* 5^{1A} por emulsificação usando matriz de alginato cálcio e amido resistente

Ao final do processo de produção das microcápsulas de quitosana e amido resistente, 2,0 mL de cada uma das suspensões de microcápsulas foram transferidos para tubos criogênicos e adicionados de 0,5 mL de glicose 40 g 100 mL⁻¹. A glicose foi escolhida

como melhor crioprotetor dentre cinco compostos avaliados. Em seguida, os tubos foram congelados em nitrogênio líquido e as amostras dessecadas sob vácuo a temperatura $-50\text{ }^{\circ}\text{C}$ / 24 horas em liofilizador (Liotop L101, Liobras, Brasil). As microcápsulas liofilizadas contendo *B. longum* 5^{1A} foram estocadas em freezer ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$), em frascos vedados sob vácuo.

4.4.3 Metodologia para escolha do crioprotetor para técnica de microencapsulação por emulsificação

Para determinação do melhor crioprotetor na manutenção da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} durante o processo de liofilização das microcápsulas feitas por emulsificação, foram avaliados cinco compostos (sacarose, glicose, trealose, manitol e glicose + leite). Para isso, a suspensão final de cápsulas a ser liofilizada foi adicionada de 0,5 mL de crioprotetor a $40\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$, seguindo recomendações encontradas na literatura (CARVALHO *et al.*, 2004; SAARELA *et al.*, 2005; MORGAN *et al.*, 2006; VINDEROLA *et al.*, 2011). Sendo que da mistura glicose + leite, foi utilizado 0,5 mL de cada. A porcentagem de sobrevivência das células foi determinada após a liofilização e durante 42 dias de armazenamento a -20°C . Para cálculo da porcentagem de sobrevivência foi considerada a concentração de células logo após a produção das microcápsulas (antes da liofilização) e a concentração de células viáveis após a liofilização, para certificar qual crioprotetor garantiria maior concentração de células viáveis após a secagem.

4.4.4 Técnica de *spray drying*

A elaboração das microcápsulas pela técnica de *spray drying* foi adaptada de Fritzen-Freire *et al.* (2012). Para o preparo da solução de alimentação, adicionou-se 10 mL de concentrado de células de *B. longum* 5^{1A} ($10\text{ log UFC mL}^{-1}$) em 500 mL de leite desnatado em pó reconstituído a $30\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$, acrescido de $1\text{ g } 100\text{ mL}^{-1}$ de maltodextrina, previamente autoclavados à $100\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 25 minutos. O processo foi realizado em um *spray dryer* LM MSD 1.0 (Labmaq do Brasil, São Paulo, Brasil), com ar constante e temperatura de entrada de 130°C e temperatura de saída de aproximadamente $76 \pm 5.31\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A solução de alimentação contendo as células de *B. longum* 5^{1A} foi mantida a temperatura ambiente e alimentado para dentro da câmara principal por meio de uma bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de $0,54\text{ L h}^{-1}$ e o ar de secagem a 25 L min^{-1} . As amostras foram coletadas na base do ciclone em garrafa de vidro previamente

autoclavada e posteriormente armazenadas em *freezer* a -20 °C. Também foram preparados brancos de microcápsulas, com ausência de células.

4.5 Análise de tamanho das microcápsulas

A distribuição do tamanho médio das microcápsulas foi determinada em analisador de partícula *LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Beckman Coulter)*, capaz de medir a distribuição de tamanho das partículas em suspensão através da dispersão da luz. Para tanto, as microcápsulas foram ressuspensas em água peptonada 0,1% (p/v) no momento da análise, as medidas feitas a temperatura ambiente e em triplicata. A quantidade de amostra das microcápsulas injetada variou dependendo do grau de saturação indicado pelo software do equipamento.

4.6 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A} após microencapsulação e durante armazenamento (-20°C / 90 dias)

Visando determinar o efeito das condições de microencapsulação na viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, foram feitas contagens antes e após o processo de formação das microcápsulas. As células foram liberadas das microcápsulas obtidas por emulsificação resuspendendo as mesmas em solução de citrato de sódio (0,1 g 100 mL⁻¹, pH 6,0) com agitação em vórtex por 5 minutos a temperatura ambiente (KRASAEKOOPT *et al.*, 2004; 2006). Para as microcápsulas produzidas pela técnica de *spray drying*, as células foram liberadas resuspendendo as microcápsulas em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0), e mantendo em agitação por 5 minutos a temperatura ambiente.

Após a liberação das células das microcápsulas, foram feitas diluições seriadas em água peptonada (0,1 g 100 mL⁻¹) e contagem em meio MRS ágar, com semeadura em superfície e incubação em anaerobiose (Anaerobac, Probac, São Paulo, Brasil), a 37 °C por 72 horas. O plaqueamento foi realizado em duplicata das diluições selecionadas. A porcentagem de sobrevivência foi calculada segundo a equação 1:

$$\text{Equação 1: } \%S = \left(\frac{N}{N_0} \right) \times 100$$

Onde:

%S = porcentagem de sobrevivência, N = número de células viáveis por grama após a microencapsulação e N₀ = número de células viáveis por grama antes da microencapsulação.

Visando determinar a eficiência dos processos de microencapsulação de *B. longum* 5^{1A} durante armazenamento (-20 °C), contagens foram realizadas nos dias 0, 7, 14, 21, 28, 40, 60 e 90 do armazenamento. A viabilidade do micro-organismo foi monitorada por contagem em meio sólido como descrito anteriormente.

4.7 Avaliação *in vitro* da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada em condições simuladas do trato gastrointestinal

Para determinar o efeito de soluções similares ao encontrado no estômago e intestino humano sobre *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada adaptou-se a metodologia de Krasaekoopt & Watcharapoka (2014).

A solução gástrica simulada consistiu de HCl 0,08 mol L⁻¹, NaCl 0,2 g 100 mL⁻¹ e Pepsina 0,3 g 100 mL⁻¹, com pH 2,5. Já a solução intestinal simulada consistiu de NaH₂PO₄ 0,05 mol L⁻¹, Sais Biliares 0,45 g L⁻¹ e Pancreatina 1,0 g L⁻¹, com pH 8,0. Ambas as soluções foram preparadas no dia do uso e esterilizadas com membrana de filtração de poro 0,45 µm (MF-Millipore, Billerica MA, USA).

Foi adicionado 1,0 g de microcápsula ou 1,0 mL das células livres (10⁸ UFC mL⁻¹) em 10 mL da solução gástrica simulada. Esta mistura foi agitada em agitador de tubos por 10 segundos e incubada por 120 minutos a 37 °C, sendo realizadas coletas de alíquotas nos tempos 0, 60 e 120 minutos após a adição do microrganismo livre ou microencapsulado. Após o período de incubação, a solução gástrica simulada foi centrifugada a 2.792 X g por 10 minutos e o *pellet* adicionado à 10 mL da solução intestinal simulada. Esta solução permaneceu incubada durante 120 minutos e a coleta das alíquotas foram realizadas nos tempos 60 e 120 minutos. Ao final de cada tempo de incubação o conteúdo de células foi enumerado em ágar MRS a 37°C / 72 h em anaerobiose.

4.8 Citometria de Fluxo

A citometria de fluxo (CF) foi realizada para avaliar o efeito das diferentes técnicas de microencapsulação na viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, identificar possíveis injúrias celulares causadas pelos métodos e para comparar a viabilidade celular obtida por citometria com o método usual de contagem em meio sólido. Adaptou-se a metodologia de Martin-Dejardin *et al.* (2013) como segue abaixo.

Para determinar a viabilidade *B. longum* 5^{1A} utilizou-se o fluorocromo Carboxifluoresceína Diacetato Succinimidil Ester (CFDA-SE), enquanto o fluorocromo de ácido nucléico, Iodeto de Propídio (PI) quantificou injúria e morte celular. Os volumes utilizados de ambos marcadores foram pré-titulados para otimizar a quantidade de CFDA-SE e PI necessários para distinguir as populações celulares (**APÊNDICE A**).

Antes de marcar as células e após a contagem em meio sólido, os tubos contendo citrato de sódio ou tampão fosfato e as células liberadas foram centrifugados a 3500 x g a 4 °C por 15 minutos, lavados duas vezes com tampão fosfato (0,1 M, pH 8,0) e resuspendido em 10 mL do mesmo tampão. Um mililitro desta suspensão foi suplementado com 0,5 µL de CFDA-SE (1,25 mM em DMSO) e incubado a temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo de luz. A suspensão foi então centrifugada nas mesmas condições anteriores e o *pellet* resuspendido em 1,0 mL de tampão fosfato e suplementado com 3,74 µL de PI (2,5 mM em DMSO) e incubado novamente em temperatura ambiente por 10 minutos ao abrigo de luz. Como controle da marcação foram utilizados 3 tubos, cada um contendo células frescas não marcadas ou uma mistura de 50% de células frescas e 50% de células mortas (mantidas durante 60 minutos em água em ebulição) marcada apenas com CFDA-SE ou essa mistura marcada apenas com PI. A diferença de fluorescência entre CFDA-SE e PI foi medida em uma mistura de 50% de células frescas e 50% de células mortas.

As análises foram realizadas em um citômetro de fluxo (BD LSR Fortessa) calibrado a cada leitura com CST (BD Bioscience), equipado com laser de excitação 488 e software BD FACS Diva. Para compensação das cores foram utilizadas beads (BD Bioscience) não marcadas e marcadas com fluorocromos de mesma leitura nos canais do CFDA-SE e PI. A combinação de tamanho (FSC - Forward Scatter) e granulosidade (SSC - Side Scatter) foi usada para discriminar a bactéria do background e os resultados foram analisados no software FlowJo, versão vX0.7. Para cada amostra, foram adquiridos 50.000 eventos.

4.9 Análise de microestrutura das microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} por Microscopia de Força Atômica

Imagens de microscopia de força atômica foram obtidas usando Microscópio de Varredura por Sonda (Nanoscope III) para avaliar a morfologia das microcápsulas e a interação entre o micro-organismo probiótico e os respectivos materiais de matriz.

Para esta caracterização, as amostras foram depositadas em superfície de lâmina de vidro. As medições foram feitas à temperatura ambiente, no ar, sobre um Dimension 3000, monitorado pelo controlador Nanoscope IIIa (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). As imagens foram obtidas no modo *tapping*, usando sondas de silício comerciais de Nanosensors com cantilevers de 228 mm de comprimento, frequências de ressonância de 75- 98 kHz, *spring* constantes de 3,0 – 7,1 N m⁻¹, e raio de curvatura da ponta nominal de 10 nm. A taxa de varredura utilizada foi de 1 Hz. A análise dimensional foi realizada usando software NanoScope (R) III, versão 5.31R1.

4.10 Análise de microestrutura das microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para determinar a microestrutura interna das microcápsulas e visando identificar se houve o aprisionamento das células no interior da matriz, as amostras foram avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. Na literatura, essa determinação é realizada em microscópio eletrônico de varredura operando em baixas temperaturas. Optou-se pelo uso do microscópio de transmissão em virtude da indisponibilidade de um microscópio de varredura com tal tecnologia de operação. Foram avaliadas 2 técnicas:

a) Imediatamente após as amostras serem ressuspendidas em água destilada, cerca de 5,0 µL foram adicionados aos discos de ouro de 3 mm de diâmetro, do Tipo A e B, compatíveis com o equipamento de congelamento, formando um pequeno sanduíche. Estes foram montados nos cartuchos plásticos específicos para congelamento e as amostras foram submetidas ao congelamento sob alta pressão (High Pressure Freezer Leica EM HPM100) e mantidas em nitrogênio líquido até a execução da próxima etapa. Posteriormente, foram criofaturadas (-130 °C) por remoção do suporte do topo em um Freeze Fracture System Leica EM BAF060 e feita a deposição a vácuo de 5nm de platina (ângulo de 45°) e 20 nm de carbono (ângulo 90°). As réplicas foram liberadas por flutuação em hipoclorito de sódio (2,0%), lavadas com água, montadas em telas de cobre (400 mesh) e levadas para aquisição das imagens em Microscópio Eletrônico de Transmissão (Tecnai G2-12, SpiritBiotwin FEI – 120 kV).

b) Foram avaliadas também adaptações da técnica convencional de preparo de amostras para a microscopia eletrônica de transmissão com intuito de possibilitar a melhor visualização da estrutura interna das cápsulas. As amostras foram ressuspendidas em fixador glutaraldeído 2,5% (para preservação das células) em 0,05 mol L⁻¹ tampão fosfato

e deixadas no fixador durante 30 minutos a 5 °C. Em seguida cada amostra foi dividida em 2 grupos diferentes de preparo:

1 - as amostras foram em seguida centrifugadas (1000 x *g* por 5 min), lavadas com água destilada e congeladas por imersão em nitrogênio líquido. Posteriormente, foram criofraturadas em um Freeze Fracture System Leica EM BAF060, seguido de *deep etching* (sublimação da água congelada no material com alteração da temperatura para -115 °C) por 20 minutos e feita a deposição a vácuo de 6nm de platina (ângulo de 45°) e 25 nm de carbono (ângulo 90°). As réplicas foram liberadas por flutuação em hipoclorito de sódio e lavadas com água.

2- As amostras foram lavadas 3x em tampão fosfato e acrescentadas de solução de glicerol 15% em tampão fosfato e mantidas por 4 horas a 5°C. Em seguida, foram centrifugadas (1000 x *g* por 5 min) e adicionadas de solução de glicerol a 30% em tampão fosfato e deixadas *overnight* nesta solução. Posteriormente, foram congeladas por imersão em nitrogênio líquido, criofraturadas e feitas réplicas seguindo o mesmo procedimento citado acima. O glicerol é usado como substância crioprotetora, que têm a capacidade de se ligar à água intra e/ou extracelular, tornando-a não disponível para a formação de cristais de gelo se houver congelamento e, com isso, pode reduzir a presença de artefatos durante o congelamento.

As réplicas nos procedimentos 1 e 2 foram capturadas em telas de transmissão de cobre, de 200 mesh, recobertas com filme de *formvar* e analisadas no Microscópio eletrônico de transmissão Tecnai G2-12 SpiritBiotwin FEI – 120 kV.

4.11 Determinação do perfil de hidrofobicidade de *B. longum* 5^{1A} livre ou microencapsulada

A medida da hidrofobicidade das células livres recém-ativadas (frescas) ou livres liofilizadas foi determinada segundo Souza *et al.*(2012). Para ativação das células livres recém-ativadas (frescas), a cultura foi incubada sob condições de anaerobiose (usando gerador de anaerobiose), a 37 °C por 24 horas, sendo em seguida centrifugada por 10 minutos à 2.792 X *g*. As células foram lavadas, duas vezes, em solução salina tampão fosfato estéril (0,1M), suspensas no mesmo tampão e, a densidade óptica (DOA) ajustada para aproximadamente 1,0 a 560 nm. Então, foi adicionado 0,6 mL de hexadecano a 3,0 mL desta suspensão, que foi homogeneizada por 120 segundos em agitador de tubos, e

incubada a 37 °C por 1 hora. A DO a 560 nm (DOB) foi determinada na fase aquosa e os resultados foram expressos como porcentagem da adesão bacteriana ao solvente, por meio da Equação 2. A medida de hidrofobicidade das células liofilizadas foi determinada da mesma maneira descrita acima, exceto que as células não foram ativadas.

A hidrofobicidade das células após encapsulação foi determinada segundo Vinderola & Reinheimer (2003) e Riveros *et al.* (2009). As células encapsuladas por *spray drying* foram liberadas utilizando solução de tampão fosfato estéril (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0) sendo em seguida centrifugadas por 10 minutos à 2.792 x g. As células foram lavadas, duas vezes, em salina tampão fosfato estéril, suspensas em tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7.0). A absorvância a 560 nm foi medida e considerada como DOA. Então, adicionou-se 0.6 mL de hexadecano a 3.0 mL desta suspensão, que foi homogeneizada por 120 segundos no vórtex, e incubada a 37 °C por 1 hora. A DO a 560 nm (DOB) foi determinada na fase aquosa e os resultados foram expressos como porcentagem da adesão bacteriana ao solvente. A porcentagem de adesão bacteriana ao solvente foi obtida segundo a Equação 2:

$$\text{Equação 2: } H\% = \left[\frac{DOA-DOB}{DOA} \right] \times 100$$

Onde:

H% = porcentagem de hidrofobicidade, DOA = densidade ótica inicial e DOB = densidade ótica final.

4.12 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, nas formas livre e microencapsulada, incorporada em bebida láctea fermentada ou em leite puro durante armazenamento refrigerado.

Foram feitos ensaios preliminares para verificar a sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada (em leite desnatado por *spray drying*) ou livre liofilizada incorporadas em bebida láctea fermentada e em leite 10% (p/v). O preparo da bebida láctea fermentada e a contagem das células nesta matriz foram feitos seguindo a referência de Pereira (2012). Já o leite 10% (p/v) foi esterilizado previamente (100°C / 25 minutos). Ambas as amostras inoculadas com as células microencapsuladas ou com as células livres liofilizadas, foram armazenadas a 5°C por 35 dias e durante esse período foi realizada enumeração das células viáveis por contagem em ágar MRS, em anaerobiose a 37°C / 72 horas.

4.13 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, nas formas livre e microencapsulada, incorporada em farinha de aveia durante armazenamento refrigerado.

Após analisar os diversos tratamentos de microencapsulação propostos, as microcápsulas produzidas por *spray drying* foram escolhidas para serem adicionadas em farinha de aveia, uma vez que estas microcápsulas se mostraram melhores em proteger as células quando comparadas com as demais microcápsulas produzidas. Foi determinada a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada adicionada em farinha de aveia durante armazenamento sob refrigeração.

Para tanto, 5,0 g (7,6 log UFC g⁻¹) de microcápsulas produzidas por *spray drying* foram adicionadas em 15 g de farinha de aveia, previamente esterilizada (121 °C / 15 min). A mistura foi armazenada sob refrigeração (5 °C / 90 dias), e a viabilidade do micro-organismo foi determinada por contagem em meio sólido, como descrito no item 4.6. Como forma de comparação, também foi avaliada a sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre liofilizada na farinha de aveia. Neste caso, 1,0 g (8,6 log UFC g⁻¹) do micro-organismo liofilizado foi adicionado em 15 g de farinha de aveia e acondicionado sob refrigeração. A diferença na quantidade, em gramas, de cada amostra inoculada na aveia foi proposital, com o objetivo de iniciar o armazenamento com contagens (em log) de células viáveis semelhantes entre as amostras. Uma vez que as células livres liofilizadas apresentavam maior concentração de células viáveis por grama de pó.

4.14 Delineamento experimental

Foi utilizado o Delineamento em Blocos Casualizados, com arranjo em parcelas subdivididas, sendo que para cada experimento existiu uma correspondência para as parcelas e subparcelas. Os blocos foram considerados as 3 repetições realizadas para cada experimento.

Para avaliar a resistência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada frente ao processo de secagem por liofilização ou *spray drying* e durante o armazenamento (90 dias) os 3 tratamentos de microencapsulação (quitosana, amido resistente e *spray drying*) foram considerados as parcelas e os 8 tempos de armazenamento (0, 7, 14, 21, 28, 40, 60 e 90) a -20°C, as subparcelas.

Para avaliar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada sobre as condições simuladas do trato gastrointestinal, existiram 4 parcelas que foram os tipos de microcápsulas (quitosana, amido resistente e *spray drying*) e a célula livre e as subparcelas foram consideradas os 5 tempos de análise no experimento *in vitro* (0, 60, 120 minutos no suco gástrico simulado e 60 e 120 minutos no suco intestinal).

E na avaliação da viabilidade das células livres liofilizadas ou microencapsuladas por *spray drying* na farinha de aveia durante a vida de prateleira, foram consideradas 2 parcelas (a farinha de aveia com as microcápsulas ou com as células livres liofilizadas) e as subparcelas foram consideradas os 90 dias de armazenamento (0, 7, 14, 21, 28, 40, 60 e 90) a -20°C.

E para comparação das médias, dos experimentos acima e da análise de tamanhos das microcápsulas, foi utilizada a análise de variância (ANOVA) e havendo diferença estatística significativa entre as médias ($p < 0,05$) foi usado o teste de Duncan.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaio preliminares para desenvolvimento das microcápsulas

5.1.1 Escolha da velocidade de agitação para técnica de microencapsulação por emulsificação

As primeiras microcápsulas foram feitas pela técnica de emulsificação e como parâmetro inicial de padronização da técnica, foi feita uma avaliação do tamanho das microcápsulas de alginato puro (sem adição de amido resistente ou quitosana) produzidas com diferentes velocidades de rotação (IKA Eurostar) durante a formação da emulsão. Segundo VIVEK (2013), um importante desafio da confecção de microcápsulas envolvendo micro-organismos é o tamanho destas, uma vez que quando grandes demais, podem provocar alterações na textura do produto final influenciando negativamente nos atributos sensoriais.

Na **Figura 9** estão apresentados os tamanhos médios das microcápsulas de alginato puro logo após a produção, usando diferentes velocidades de agitação da emulsão. Na velocidade de 700 rpm estão apresentados também os dados das microcápsulas liofilizadas. O maior tamanho encontrado para as microcápsulas de alginato ($322,73 \pm 214,36 \mu\text{m}$) foi observado na velocidade de 300 rpm. A 900 e 1200 rpm as microcápsulas apresentaram os menores tamanhos, $50,29 \pm 30,29$ e $44,74 \pm 30,77 \mu\text{m}$, respectivamente. Já nas velocidades de 450 e 700 rpm as microcápsulas obtidas apresentaram valores intermediários, $146,8 \pm 94,61$ e $123,3 \pm 117,81 \mu\text{m}$ respectivamente, com tamanhos mais próximos ao recomendado na literatura (ANAL & SHING, 2007). Seguiu-se com a liofilização das microcápsulas obtidas a 700 rpm, que reduziram o tamanho para $88,48 \mu\text{m}$.

Um diâmetro de $100 \mu\text{m}$ foi proposto para oferecer melhor proteção para *Bifidobacterium* spp. quando exposta a condições simuladas do TGI. Como grandes tamanhos de cápsulas podem influenciar negativamente a textura e sensação gustativa na boca, diâmetros inferiores a $100 \mu\text{m}$ tem sido preferidos para a maioria das aplicações (ANAL & SHING, 2007; ANNAN *et al.*, 2008; DING & SHAH, 2009). No entanto, tamanhos muito pequenos como abaixo de $50 \mu\text{m}$ podem não ser muito eficientes para proteção das bactérias (ANNAN *et al.*, 2008).

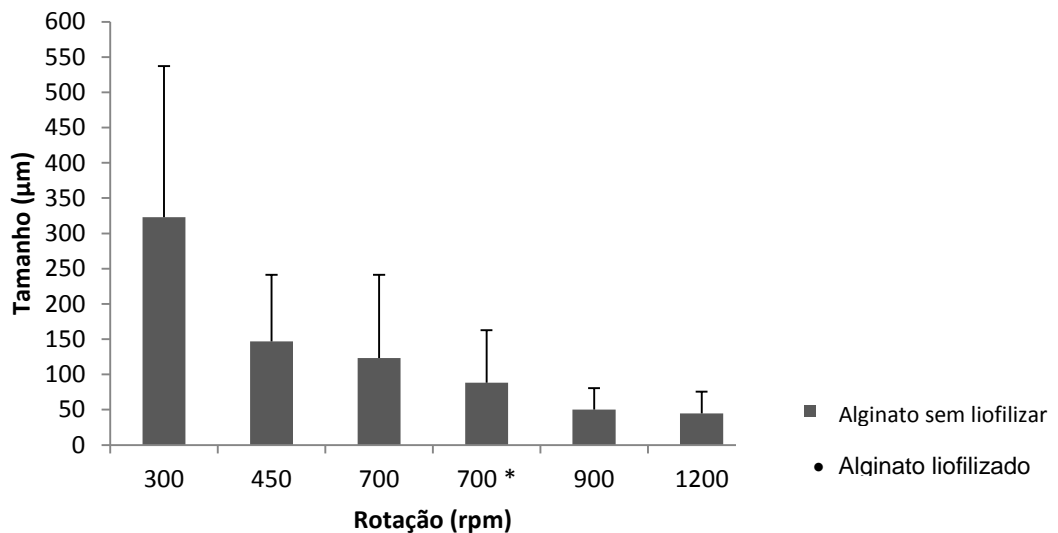


Figura 9 Tamanho médio (μm) das microcápsulas de alginato antes da liofilização, produzidas em diferentes velocidades de agitação da emulsão, e a 700 rpm liofilizada

Sendo assim, optou-se pela velocidade de 700 rpm como a mais adequada para produzir as microcápsulas de alginato com amido resistente e alginato revestido com quitosana, visto que nesta velocidade os tamanhos das microcápsulas de alginato puro estavam dentro do recomendado pela literatura.

5.1.2 Escolha do crioprotetor para técnica de microencapsulação por emulsificação

Outro parâmetro que foi padronizado para produção das microcápsulas por emulsificação foi o crioprotetor a ser utilizado durante o processo de liofilização. Para reduzir a diferença osmótica com o ambiente externo, o crioprotetor a ser utilizado deve acumular no interior das células ou a envolver para melhorar a tolerância ao frio (ETCHEPARE *et al.*, 2016).

Foi avaliada a influência de cinco crioprotetores na manutenção da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} durante o processo de liofilização das microcápsulas feitas por emulsificação a cada 7 dias e durante 42 dias de armazenamento à -20 °C. Para cálculo da porcentagem de sobrevivência foi considerada a concentração de células logo após a produção das microcápsulas (antes da liofilização) e a concentração de células viáveis logo após a liofilização, para certificar qual crioprotetor garantiria maior concentração de células viáveis após a secagem e esta mesma relação foi calculada ao longo dos 35 dias de armazenamento. Estes resultados de porcentagem de sobrevivência estão

apresentados na **Figura 10**. E a concentração de células em log UFC g⁻¹ está apresentada na **Tabela 7** do **Apêndice A**.

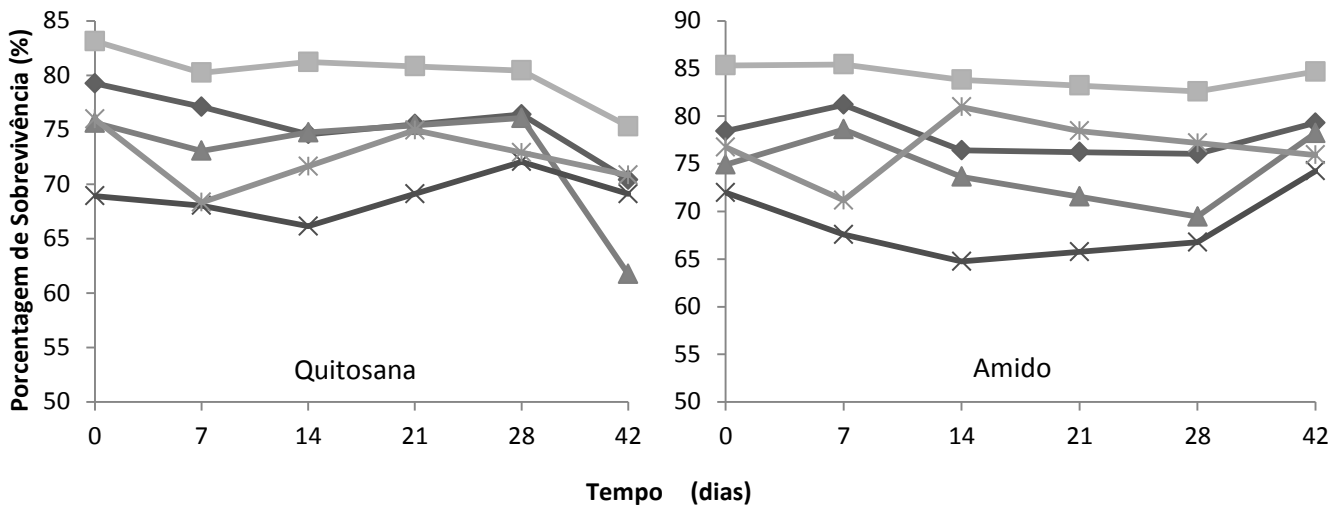


Figura 10 Porcentagem de sobrevivência (42 dias/ -20°C) de *B. longum* 5^{1A} em microcápsulas de Quitosana e Amido resistente, liofilizadas com diferentes crioprotetores: —◆— Sacarose —■— Glicose —▲— Trealose, —×— Manitol e —*— Glicose + Leite.

Dentre os crioprotetores avaliados o que apresentou melhor proteção para as células de *B. longum* 5^{1A}, tanto na microcápsula de quitosana quanto de amido resistente, foi glicose 10%, com porcentagem de sobrevivência acima de 80% durante os 42 dias de armazenamento (-20 °C). A sacarose também demonstrou bons resultados, garantindo 79% de sobrevivência das células nas microcápsulas de quitosana e 78% nas de amido resistente no tempo 0 e ao final de 42 dias, estas microcápsulas apresentavam, respectivamente, 70% e 79% da sobrevivência das células. Já trealose e glicose + leite apresentaram resultados semelhantes para quitosana no tempo 0, com 75% de sobrevivência, no entanto após 42 dias de estocagem a -20 °C as microcápsulas liofilizadas com trealose apresentaram apenas 61% de sobrevivência e glicose + leite caiu para 70%. Em relação as microcápsulas de amido resistente esses dois crioprotetores também apresentaram resultados bem próximos, sendo que a trealose garantiu 74% e 78% de sobrevivência e glicose + leite 76% e 75%, no tempo 0 e após 42 dias respectivamente.

Por último, o resultado menos vantajoso de crioproteção foi encontrado para o manitol 10%, que apresentou 68% de sobrevivência nas microcápsulas de quitosana e 71% para as de amido resistente, no tempo 0. Após 42 dias de estocagem 69% e 74% para quitosana e amido resistente, respectivamente.

Já se esperava que houvesse perda de células viáveis após a secagem, pois durante a liofilização as células experimentam condições ambientais extremas como baixa temperatura e baixa atividade de água que podem induzir danos estruturais e fisiológicos, resultando na perda de viabilidade de muitas espécies (CARVALHO *et al.*, 2004).

Trealose e sacarose são capazes de estabilizar a membrana celular e prevenir a desnaturação das proteínas da célula pela formação de ligações de hidrogênio, que ajuda manter a estrutura terciária das proteínas na ausência de água (LESLIE *et al.*, 1995).

Porém, existe uma dependência acentuada entre o açúcar usado no meio de secagem com o tipo de açúcar previamente incluído no meio de crescimento. Ou seja, o microorganismo fica mais bem protegido durante a liofilização quando é adicionado do mesmo açúcar presente no meio no qual ele cresceu (CARVALHO *et al.*, 2003). Os resultados encontrados vão ao encontro a estes dados da literatura, pois o crioprotetor com melhor desempenho foi glicose 10%, uma vez que este foi o açúcar presente no meio (caldo MRS, 2% p/v de glicose) de crescimento de *B. longum* 5^{1A}. Com base nesses resultados, ficou estabelecida a glicose 10% como crioprotetor padrão para produzir as microcápsulas por emulsificação.

Tendo sido padronizado os parâmetros para elaboração das microcápsulas pela técnica de emulsificação, estas foram produzidas. Elaborou-se também as microcápsulas pela técnica de *spray drying*, e seguiu-se com as análises para avaliar a eficiência de cada técnica na manutenção da viabilidade de *B. longum* 5^{1A}.

5.2 Análise de tamanho das microcápsulas

Na **Figura 11** está apresentada a comparação entre os valores médios de tamanho das microcápsulas de alginato puro, que é a matriz base para produção das microcápsulas por emulsificação, bem como o tamanho daquelas adicionadas de quitosana e amido resistente antes e após a liofilização e também das microcápsulas feitas por *spray drying*.

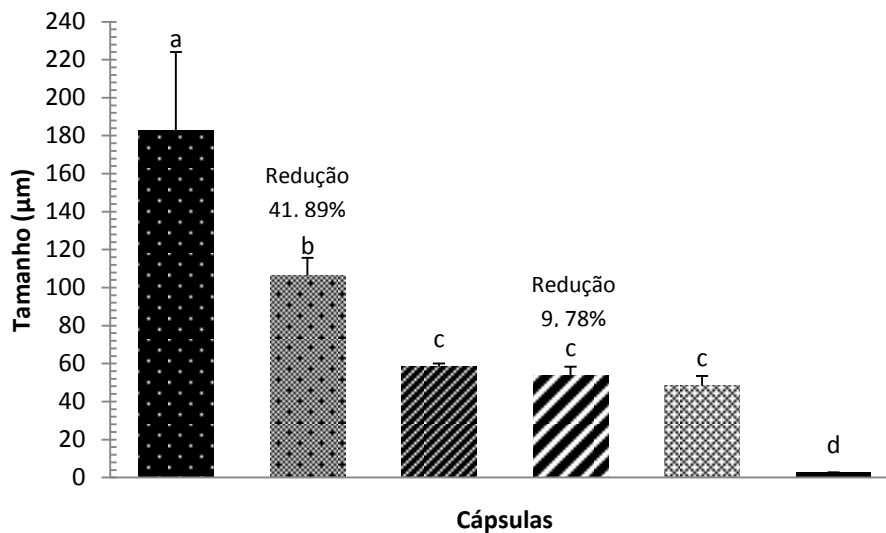


Figura 11 Tamanho (μm) das microcápsulas de *B. longum* 5^{1A}: ■ quitosana sem liofilizar, ■ quitosana liofilizada, ▨ alginato liofilizada, ▩ amido resistente liofilizada, ▧ mido resistente sem liofilizar e ■ *spray drying*. Colunas que apresentam letras iguais não diferem ($p < 0,05$).

O tamanho médio das microcápsulas de quitosana antes da liofilização era de 183 μm e após a secagem reduziu para 106,33 μm , sendo esta diminuição estatisticamente significativa. Esta redução após a liofilização é desejável para aproximar mais o tamanho das microcápsulas de quitosana do tamanho recomendado na literatura para não afetar a qualidade sensorial dos produtos com adição das mesmas. Redução no tamanho da esfera para valores próximos de 100 μm pode ser vantajoso para se obter produtos com uma boa textura, com a possibilidade de adição de probióticos encapsulados a uma ampla gama de alimentos. No entanto, microcápsulas de alginato nesta faixa de tamanho podem não ser eficientes para proteção das bactérias (ANNAN *et al.*, 2007).

Já as microcápsulas adicionadas de amido resistente não diferiram de tamanho antes e após a liofilização, 53,90 μm e 48,63 μm respectivamente, da mesma forma como não diferiram das microcápsulas de alginato puro liofilizadas (58,39 μm). Etchepare *et al.* (2016) não encontraram diferença de tamanho entre as microcápsulas de alginato puro e alginato + amido antes de liofilizar produzidas pela técnica de extrusão. Estes autores encontraram valores maiores para estas partículas liofilizadas quando comparadas ao presente estudo, sendo 114,51 μm para alginato puro e 78,49 μm para alginato + amido.

Esperava-se que o diâmetro das microcápsulas de alginato puro fosse menor do que as partículas de alginato adicionadas de amido resistente por terem menos compostos na formulação da microcápsula. No entanto, esta alteração está relacionada a alta capacidade do alginato em reter água (ETCHEPARE *et al.*, 2016).

A microcápsula de menor tamanho foi a obtida por *spray drying*, com apenas 2,78 μm . Diversos trabalhos apontam para microcápsulas pequenas feitas por *spray drying*, porém com diâmetros acima de 10 μm como no caso do trabalho de Castro-Cislaghi (2012) que relatou tamanho de 11 μm para microcápsulas contendo *Bifidobacterium* BB-12 ou de Fritzen-Freire *et al.* (2012) no qual o diâmetro das microcápsulas com bifidobactéria variou entre 14,45 a 18,78 μm . Os referidos autores utilizaram como matriz para encapsulação por *spray drying* o leite desnatado reconstituído, assim como no presente estudo. Durante as análises de microscopia de força atômica, que serão discutidas no item 5.6, foram encontrados diâmetros de 17 μm para estas mesmas microcápsulas, valor bem mais próximo aos relatados na literatura.

Esta diferença no diâmetro das microcápsulas pode estar relacionada ao tipo de equipamento utilizado para aferição destas medidas. O analisador de partícula LS 13 320 Laser Diffraction Particle Size Analyzer (Beckman Coulter), utilizado para medir os tamanhos submete as microcápsulas por alguns segundos à sonicação para evitar agregação de partículas durante as análises. Este procedimento pode ter desintegrado parte das microcápsulas levando a encontrar, no presente trabalho, medidas de tamanho reduzidas. Esta diferença de tamanho já não foi tão discrepante para as microcápsulas de quitosana e amido resistente quando comparados aos valores obtidos nas técnicas de difração de raio laser e microscopia de força atômica. No entanto, mesmo com esta diferença entre equipamento para aferição do tamanho, as microcápsulas de *spray drying* apresentaram tamanho menor do que as demais microcápsulas estudadas nesse trabalho.

A viabilidade de bactérias encapsuladas tem sido relacionada com o tamanho da microcápsula. Hansen *et al.* (2002) relataram que microcápsulas pequenas de alginato de cálcio (20 – 70 μm) não protegeram significativamente *Bifidobacterium* spp. em fluido gástrico simulado, comparado com as células livres. Fato também observado por Borges *et al.* (2012), para microcápsulas de alginato de cálcio contendo *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (diâmetro médio de 50 – 60 μm).

No entanto, essa menor capacidade de proteção relacionada as microcápsulas de menor diâmetro, não foi observada nas microcápsulas de *spray drying*, mas somente nas de quitosana e amido resistente. Como será demonstrado no item 5.4, as microcápsulas de *spray drying* foram as que garantiram melhor proteção para as células diante das condições simuladas do TGI. Ainda, é importante ressaltar que as microcápsulas feitas

por emulsificação não são uniformes com relação ao tamanho, como pode ser observado nos altos valores de desvio padrão indicados na **Figura 12**.

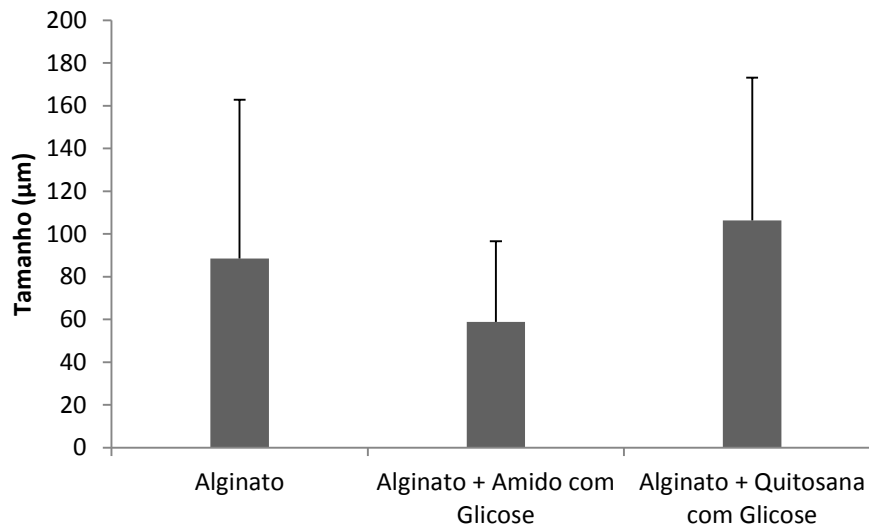


Figura 12 Tamanho (µm) e desvios médios das microcápsulas liofilizadas feitas por emulsificação a 700rpm.

Esta grande variação está relacionada com a técnica de produção das microcápsulas. Uma desvantagem do uso da técnica de emulsificação é a ampla distribuição de tamanho das partículas (DING & SHAH, 2009). Como os desvios são sempre altos, as microcápsulas de quitosana podem apresentar de 39,58 a 173,10 µm ($106,33 \pm 66,75$), as de amido resistente ficam na faixa de 20,97 a 96,61 µm ($58,79 \pm 37,82$) e as microcápsulas de alginato puro podem variar de 14,14 a 162,80 µm ($88,48 \pm 74,32$). No entanto, mesmo com esta grande variabilidade na distribuição de tamanhos para um mesmo tipo de microcápsula, elas continuam dentro do tamanho recomendando na literatura, diâmetro próximo a 100 µm (ANAL & SHING, 2007), e provavelmente não afetariam a textura caso fossem adicionadas em produtos. Por outro lado, esta variação pode ter influenciado fortemente na capacidade das microcápsulas em proteger mais ou menos as células diante de condições adversas do meio.

5.3 Estabilidade das microcápsulas feitas pela técnica de emulsificação e *spray drying* durante armazenamento -20°C

Bruno & Shah (2003) demonstraram que a temperatura de armazenamento a -18°C maximizou a viabilidade de bifidobactéria liofilizada quando comparada à temperatura de 20°C. Simpson *et al.* (2005) encontraram significativa perda de células viáveis em várias espécies de bifidobactérias microencapsuladas por *spray drying*, usando leite desnatado como matriz, e armazenadas a 15 ou 20 °C. Com base nesses dados, foi escolhida a

temperatura de -20 °C para armazenamento das microcápsulas, já que dados da literatura indicam que a viabilidade de probióticos durante o armazenamento em pó está inversamente relacionada à temperatura de estocagem.

Antes de avaliar a estabilidade das microcápsulas durante o armazenamento, é importante avaliar a sobrevivência do micro-organismo diante das condições de cada processo de microencapsulação. A porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} foi quantificada considerando a concentração inicial de células inoculada na matriz de encapsulação e a concentração de células viáveis ao final da produção das microcápsulas, utilizando a equação 1 apresentada no item 4.6.

Como demonstrado na **Tabela 1**, os três métodos de encapsulação levaram a perdas na contagem de células, chegando ao final dos processos de produção das microcápsulas com menos células do que foi inoculado. Na produção da microcápsula de quitosana houve perda de aproximadamente 2,62 log₁₀, na de amido resistente 2,45 log₁₀ e na microcápsula feita por *spray drying* a perda foi de 1,34 log₁₀.

Tabela 1 Concentração média de células (log₁₀ UFC g⁻¹) durante a produção das microcápsulas.

Microcápsulas	Concentração inicial de células na matriz	Concentração final de células nas microcápsulas	% rendimento
(Emulsificação) Quitosana	10,84 ± 0,37	8,22 ± 0,05	75,90 ± 2,44
(Emulsificação) Amido resistente	11,87 ± 0,10	9,42 ± 0,15	79,35 ± 1,57
<i>Spray drying</i> (Leite)	9,27 ± 0,15	7,93 ± 0,34	85,52 ± 3,72

A redução de células viáveis foi maior nas microcápsulas feitas por emulsificação, sendo semelhante nos dois tipos de microcápsulas (alginato + amido resistente ou alginato + quitosana). Apesar do processo de secagem por *spray drying* expor as células a condições mais extremas de temperatura, este método garantiu a melhor viabilidade inicial.

A porcentagem de rendimento nas microcápsulas de quitosana foi maior do que o encontrado por Chavarri *et al.* (2010), que obtiveram apenas $40,2 \pm 2,1\%$ para *Bifidobacterium bifidum* encapsulada por extrusão em microcápsulas de alginato revestidas com quitosana. Outro estudo (KRASAEKOOPT *et al.*, 2004) obteve rendimento de 99,9% para *B. bifidum* na produção de microcápsulas de alginato com e sem revestimento de quitosana. Esta diferença de resultados pode estar relacionada à diferença entre as linhagens, pois o sucesso na microencapsulação é linhagem dependente.

Foi avaliada também a viabilidade celular da bifidobactéria nas microcápsulas durante 90 dias de armazenamento à -20°C . Na **Figura 13** estão apresentados os resultados da porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} para comparação dos três tipos de microcápsulas durante a estocagem e na **Tabela 8** do **Apêndice A** os resultados com a comparação estatística entre as microcápsulas. Aqui a porcentagem de sobrevivência foi calculada pela relação entre a concentração de células no tempo 0 do armazenamento e nos demais tempos.

A porcentagem de sobrevivência das células nas microcápsulas de quitosana é semelhante ($p < 0,05$) a sobrevivência obtida nas de *spray drying* em todos os tempos de armazenamento, chegando ao final de 90 dias com $100,01 \pm 1,92\%$ e $100,92 \pm 8,36\%$ para quitosana e *spray drying*, respectivamente. Já os valores da taxa de sobrevivência na microcápsula de amido resistente diferem significativamente dos valores obtidos para as microcápsulas de quitosana e *spray drying* em todos os tempos avaliados, chegando ao final de 90 dias com porcentagem de sobrevivência de apenas $83,53 \pm 1,88\%$.

Quanto à estabilidade na sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} em cada microcápsula ao longo do armazenamento, a porcentagem de sobrevivência na microcápsula de *spray drying* permanece acima de $97,77 \pm 1,55\%$ durante todo tempo de estocagem, sem redução significativa na porcentagem de sobrevivência. Da mesma forma aconteceu na microcápsula de quitosana, não houve diferença estatística na porcentagem de sobrevivência ao longo dos 90 dias. O que não ocorreu com a microcápsula de amido resistente, na qual houve redução significativa ao longo de todo período avaliado.

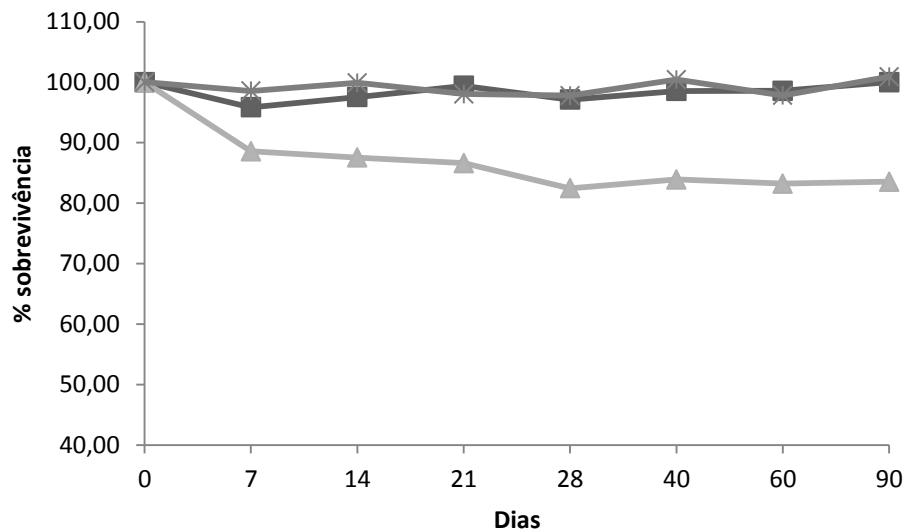


Figura 13 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying*, quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.

Os resultados obtidos pela análise da porcentagem de sobrevivência indicam que as microcápsulas de quitosana e *spray drying* foram mais estáveis e garantiram maior sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} durante o armazenamento. No entanto, é preciso ressaltar a correspondência em \log_{10} UFC g⁻¹ desta porcentagem de sobrevivência. Como pode ser observado na **Tabela 2**, a contagem em log de *B. longum* 5^{1A} nas microcápsulas de quitosana não apresenta diferença ($p < 0,05$) durante os 90 dias e esta contagem é maior do que nas demais microcápsulas desde o tempo 0, exceto quando comparado às microcápsulas de amido resistente nos dias 0 e 7.

A viabilidade de *B. longum* 5^{1A} nas microcápsulas de *spray drying* durante a estocagem também não apresentou diferença entre os períodos de estocagem ($p < 0,05$), como já foi demonstrado no gráfico de porcentagem de sobrevivência, porém observou-se menor quantidade de células viáveis ($7,51 \pm 0,25 \log_{10}$ UFC g⁻¹), após 90 dias, dentre as três microcápsulas avaliadas. No presente estudo foi utilizado leite desnatado como agente encapsulante na microcápsulas obtidas *por spray drying*. Os resultados encontrados podem ser devido ao leite desnatado ser capaz de prevenir a lesão celular por estabilizar a membrana da célula, uma vez que contém proteínas que formam um revestimento protetor para as células (SILVA *et al.*, 2011). Além disso, segundo (CARVALHO *et al.*, 2004) o leite desnatado favorece a sobrevivência das bactérias em baixa temperatura, estabilizando os constituintes da membrana celular e formando um revestimento protetor sobre as proteínas da parede celular. Esta estabilização pode estar diretamente relacionada a lactose. Segundo Meng *et al.* (2008), diversos estudos apontam que a presença de dissacarídeos pode estabilizar a membrana celular durante congelamento e

armazenamento. Já as microcápsulas de amido resistente, sofreram grandes variações na viabilidade de *B. longum* 5^{1A} ao longo do período de estocagem, com redução gradativa no número de células viáveis e chegando ao final dos 90 dias com $7,87 \pm 0,29 \log_{10}$ UFC g⁻¹, que representa uma perda de aproximadamente 1,55 log.

Tabela 2 Viabilidade (\log_{10} UFC g⁻¹) de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying*, quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.

Dias	Log ₁₀ UCF.g ⁻¹							
	0	7	14	21	28	40	60	90
Quitosana	8,22 ± 0,05 ^{aA}	7,88 ± 0,17 ^{aA}	8,03 ± 0,13 ^{aA}	8,17 ± 0,09 ^{aA}	7,98 ± 0,15 ^{aA}	8,10 ± 0,18 ^{aA}	8,10 ± 0,11 ^{aA}	8,22 ± 0,11 ^{aA}
Amido	9,42 ± 0,16 ^{bA}	8,34 ± 0,33 ^{bB}	8,02 ± 0,27 ^{aBCD}	8,16 ± 0,35 ^{aBC}	7,76 ± 0,14 ^{aD}	7,90 ± 0,12 ^{bCD}	7,78 ± 0,09 ^{bCD}	7,87 ± 0,29 ^{bCD}
<i>Spray drying</i>	7,93 ± 0,35 ^{cA}	7,83 ± 0,45 ^{aA}	7,91 ± 0,22 ^{aA}	7,77 ± 0,28 ^{bA}	7,75 ± 0,22 ^{aA}	7,74 ± 0,15 ^{cA}	7,75 ± 0,17 ^{bA}	7,51 ± 0,25 ^{cA}

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

Com base nesta comparação entre porcentagem de sobrevivência e correspondência em log, concluiu-se que as três microcápsulas se mostraram efetivas em proteger *B. longum* 5^{1A} durante o armazenamento, pois o número de células viáveis manteve-se acima de 7 log UFC g⁻¹, atendendo a um requisito essencial para conferir benefícios à saúde (TRIPATHI & GIRI, 2014).

Chavarri *et al.* (2010) também encontraram boa estabilidade de *B. bifidum* encapsulada em alginato revestido com quitosana com contagens de 7,14 log UFC mL⁻¹ após 28 dias de armazenamento a -20 °C. Sugerindo que o armazenamento a baixas temperaturas é mais efetivo para manutenção da viabilidade celular.

Homayouni *et al.* (2008) avaliaram a estabilidade de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 em microcápsulas de alginato contendo amido resistente, produzida pela técnica de emulsificação, e armazenadas a -20 °C. Diferentemente do presente estudo, os autores encontraram uma melhora de 30% na viabilidade do probiótico após 180 dias de armazenamento quando comparado com a célula livre. De acordo com Etchepare *et al.* (2016) esta proteção do amido em conjunto com alginato, está ligada a sua capacidade de promover um efeito sinérgico na gelificação, fornecendo proteção para a célula probiótica.

Simpson *et al.* (2005) avaliaram a sobrevivência de 11 espécies de *Bifidobacterium* encapsuladas por *spray drying* usando leite desnatado reconstituído como agente encapsulante. Do total das espécies avaliadas pelos autores, cinco não apresentaram

diferença significativa na sobrevivência após 90 dias de armazenamento refrigerado e as demais permaneceram com contagens acima de $6 \log_{10}$. Os autores ainda observaram uma correlação positiva entre alta sobrevivência na secagem por *spray drying* e tolerância intrínseca de várias linhagens ao calor, inclusive de *B. longum*.

5.4 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, livre e microencapsulada, diante de condições simuladas do trato gastrointestinal.

Tendo avaliado a capacidade das microcápsulas proteger as células de *B. longum* 5^{1A} durante o armazenamento, tornou-se necessário avaliar se as microcápsulas protegeriam as células quando expostas às condições simuladas do trato gastrointestinal.

Na **Figura 14** e na **Tabela 9** do **Apêndice A** estão apresentados os valores das porcentagens de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A}, livre (cultura fresca) e encapsulada, exposta às soluções gástrica (SGS) e intestinal (SIS) simuladas durante 240 minutos.

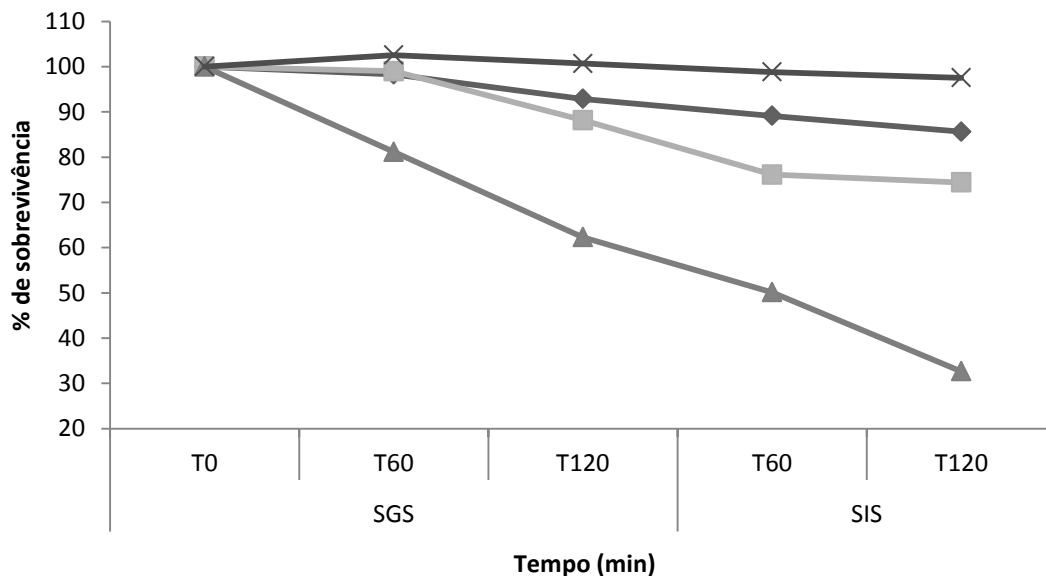


Figura 14 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre (fresca) e microencapsulada em microcápsulas de *spray drying*, quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

A análise estatística indicou que porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} nas microcápsulas de *spray drying* foi maior ($p < 0,05$) do que na microcápsula de amido resistente a partir de 60 minutos em SGS, maior do que quitosana a partir de 120 minutos em SGS e maior do que a célula livre a partir de 60 minutos em SIS.

Já a porcentagem de sobrevivência nas microcápsulas de quitosana foi maior ($p < 0,05$) do que na microcápsula de amido resistente também a partir de 60 minutos em SGS, porém

foi menor do que a célula livre a partir de 60 minutos em SIS. E a porcentagem de sobrevivência nas microcápsulas de amido resistente foi menor ($p < 0,05$) do que as células livres a partir de 60 minutos em SGS.

Quanto a viabilidade das células em \log_{10} UFC mL^{-1} (**Tabela 3**) ao longo da exposição às condições simuladas do TGI, a maior concentração de células viáveis de *B. longum* 5^{1A} foi alcançada nas microcápsulas de *spray drying* permanecendo estável, sem diferença estatística entre os tempos de incubação, chegando ao final do ensaio com contagens de $7,89 \pm 0,47 \log_{10}$ UFC mL^{-1} . Nas microcápsulas de quitosana, a primeira redução significativa na contagem de células aconteceu em 120 minutos de SGS e ocorreu nova queda na contagem após 60 minutos em SIS. Já nas microcápsulas de amido resistente, a redução da viabilidade celular foi gradativa ao longo do período de exposição às soluções, com redução significativa nas contagens em todos os tempos avaliados, atingindo o menor valor ao final do experimento. E por fim, as células livres demonstraram melhor resistência às condições adversas de SGS e SIS do que as células encapsuladas com quitosana ou amido resistente. Apesar de ter ocorrido uma redução significativa na viabilidade celular durante o período de incubação em SGS, o número de células viáveis se manteve estável durante o período de exposição em SIS, atingindo $6,77 \pm 0,24 \log_{10}$ UFC mL^{-1} .

Tabela 3 Contagem (\log_{10} UFC mL^{-1}) de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada em microcápsulas de *spray drying*, quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

Tempo (min)	SGS			SIS		% perda total
	0	60	120	60	120	
Livre	$8,02 \pm 0,97$ ^{aA}	$7,82 \pm 0,72$ ^{aAB}	$7,36 \pm 0,41$ ^{aBC}	$7,05 \pm 0,31$ ^{aC}	$6,77 \pm 0,24$ ^{aC}	15,58
Quitosana	$6,92 \pm 0,26$ ^{bA}	$6,84 \pm 0,15$ ^{bA}	$6,11 \pm 0,59$ ^{bB}	$5,27 \pm 0,46$ ^{bC}	$5,29 \pm 0,09$ ^{bC}	23,55
Amido resistente	$6,88 \pm 0,28$ ^{bA}	$5,59 \pm 0,46$ ^{cB}	$4,31 \pm 0,71$ ^{cC}	$3,44 \pm 0,31$ ^{cD}	$2,24 \pm 0,16$ ^{cE}	67,44
<i>Spray drying</i>	$8,10 \pm 0,61$ ^{aA}	$8,27 \pm 0,27$ ^{aA}	$8,14 \pm 0,44$ ^{aA}	$8,00 \pm 0,61$ ^{aA}	$7,89 \pm 0,47$ ^{dA}	2,59

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

Com base nestes resultados, sugere-se que a matriz utilizada (leite desnatado) na obtenção das microcápsulas de *spray drying* reduz a penetração do fluido gástrico simulado, protegendo as células durante a exposição às condições simuladas do TGI, por permanecerem com contagens estáveis, sem diferença estatística, ao longo de todo

ensaio e por apresentarem resultados melhores do que as demais microcápsulas avaliadas e principalmente, melhor do que as células livres.

O leite tem sido indicado como protetor eficaz de bifidobactérias durante a digestão gastrointestinal simulada, aumentando assim a sua sobrevivência em condições fisiologicamente estressantes (SÁNCHEZ *et al.*, 2010).

A proteção das microcápsulas de quitosana e amido resistente às células diante das condições simuladas do TGI é divergente na literatura. A microencapsulação de probióticos com prebióticos, especificamente no caso do amido resistente, não necessariamente leva a melhora nas propriedades protetoras das microcápsulas (CHEOW *et al.*, 2016). Sultana *et al.* (2000) não encontraram melhora significativa na sobrevivência de *Bifidobacterium longum* subsp. *infantis*, encapsulada em alginato + amido resistente, durante 3 horas de exposição a solução gástrica simulada, com variação de pH de 2 a 4, ou durante 3 horas de exposição a solução intestinal simulada, com concentração de bile variando entre 1,0 e 2,0 %.

Chávarri *et al.* (2010) por sua vez, obtiveram melhora na sobrevivência de *B. bifidum* com o uso de alginato revestido com quitosana, com aumento significativo na sobrevivência quando comparado com células livres expostas a condições gástricas simuladas (pH 2,0, 2 h) e intestinais (3,0% bile, 2 h). Por outro lado, Cook *et al.* (2014) não encontraram boa sobrevivência de *Bifidobacterium breve* encapsulada em alginato revestido com quitosana após exposição à solução gástrica simulada, chegando ao final de 60 minutos com apenas $6,6 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, uma redução de aproximadamente 3 ciclos log quando comparado a concentração inicial de células.

Segundo Anal & Shingh (2007) estudos indicam que a viabilidade dos micro-organismos encapsulados aumenta, quando expostos ao fluido gástrico simulado, quanto maior for o tamanho da microcápsula. No entanto, esta relação não foi observada no presente estudo, uma vez que foram as menores microcápsulas, as de *spray drying*, as que apresentaram melhores resultados diante das condições simuladas do TGI.

Como ressaltado por Souza *et al.* (2015), a comparação direta de resultados entre estudos é dificultada devido a variações de protocolos, incluindo preparo de culturas, condições simuladas, presença ou não de enzimas, diferenças entre espécies e linhagens, dentre outros.

Considerando, portanto, a baixa eficiência das microcápsulas feitas por emulsificação em proteger as células diante de condições adversas como baixo pH e presença de sais biliares, estas foram consideradas inadequadas para o objetivo final do trabalho que é a incorporação das microcápsulas em um produto para consumo de forma que a célula mantenha sua funcionalidade. Visando atingir este objetivo, seguiu-se o trabalho com as microcápsulas feitas por *spray drying*. Além disso, a tecnologia de elaboração de microcápsulas por emulsificação apresenta a dificuldade de aumentar a escala de produção (PICOT & LACROIX *et al.*, 2003), além do baixo rendimento de produção de microcápsulas por essa técnica. O que não acontece com *spray drying* que oferece a vantagem atraente de produzir grandes quantidades de microcápsulas em uma operação contínua e simples (PICOT & LACROIX *et al.*, 2004).

5.5 Determinação por citometria de fluxo da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada e armazenada a -20 °C

Métodos para investigar o efeito dos processos de microencapsulação na fisiologia das células precisam ser desenvolvidos (RATHORE *et al.*, 2013). O conceito tradicional de controle da viabilidade celular como uma ferramenta para determinar o valor probiótico dos alimentos deve ser complementado por uma avaliação da funcionalidade da linhagem (VINDEROLA *et al.*, 2011). Além disso, uma variedade de fatores de *stress* como pressão osmótica, atividade de água reduzida, aumento da concentração de determinados íons ou esgotamento de nutrientes afetam a capacidade de sobrevivência das bactérias, diminuindo assim as suas funcionalidades como probiótico (GANDHI e SHAH, 2015). Utilizou-se então da citometria de fluxo para determinar a viabilidade das células de *B. longum* 5^{1A} e avaliar os possíveis danos causados pelas diferentes técnicas de microencapsulação testadas deste trabalho. A análise por citometria de fluxo é útil na avaliação da integridade da membrana celular e das atividades enzimáticas celulares.

Para tanto, inicialmente foi feito um ajuste de protocolos para o uso dos fluorocromos nas células. Esse ajuste foi nas concentrações de PI e CFDA-SE se deu por meio de titulação dos fluorocromos (**APÊNDICE A**), ficando determinadas as concentrações de 1,25 mM para CFDA-SE e 2,5 mM para PI.

Em citometria de fluxo, para determinar a presença de bactérias, inicialmente é feita uma observação da cultura pura sem a presença de corantes para identificar a característica da população a ser estudada e determinar seu perfil padrão de tamanho (FSC) e

granulosidade (SSC) para seleção da população de interesse nas demais amostras (**Figura 15 - A**). Além disso, as células vivas e uma suspensão contendo um mix de células vivas e mortas também são analisadas inicialmente para determinar a característica e o padrão de resposta das células diante dos corantes utilizados para marcação. Estes padrões estão apresentados na **Figura 15 (B, C, D e E)** na forma de gráficos de distribuição de pontos construídos com combinações das diferentes fluorescências de PI e CFDA-SE.

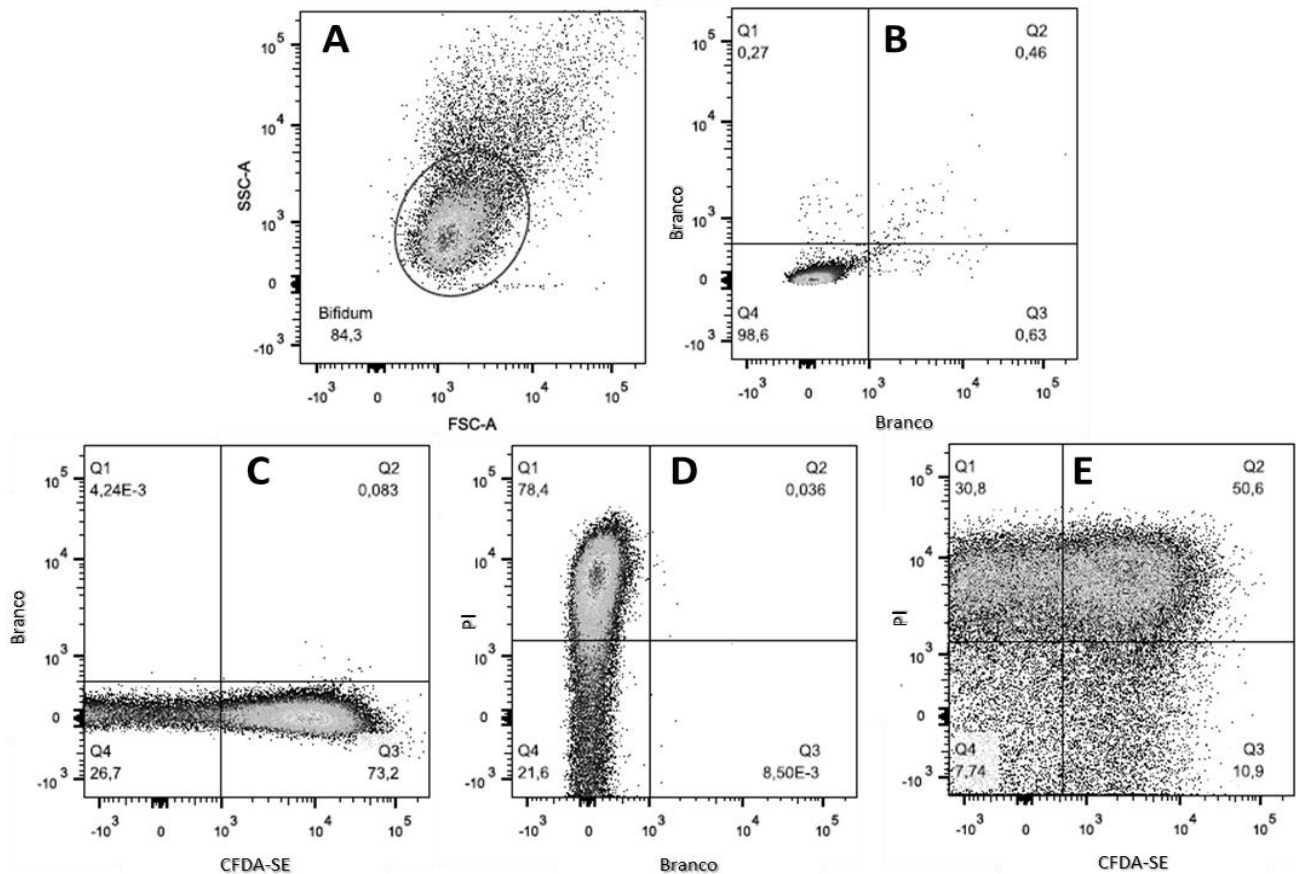


Figura 15 Gráfico de pontos das células de *B. longum* 5^{1A}: (A) SSC (Side-scattered) x FSC (Forward-scattered), (B) células vivas sem marcação, (C) mix de células vivas e mortas marcadas com CFDA-SE, (D) mix de células vivas e mortas marcadas com PI e (E) mix de células vivas e mortas marcadas com CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) e PI (iodeto de propídio).

Os gráficos foram divididos em quatro quadrantes e a frequência dos eventos observada em cada quadrante foi determinada pelo programa FlowJo. A população no quadrante Q1 representa células coradas apenas com PI, indicando que a membrana foi comprometida e que não existe atividade de esterase detectável, ou seja, são as células mortas. No quadrante Q2 estão as células marcadas com ambos os corantes (PI e CFDA-SE), indicando pequeno dano na membrana, porém ainda apresenta atividade de esterases, estas são referidas como células injuriadas. No quadrante Q3 estão as células coradas

apenas com CFDA-SE, indicando ativa atividade de esterases e membrana celular intacta (células vivas). E no quadrante Q4 estão as células sem marcação.

Identificados os padrões de marcação dos fluorocromos nas células de *B. longum* 5^{1A} passou-se para avaliação das células microencapsuladas. Na **Figura 16** estão os gráficos de pontos com as células liberadas das microcápsulas e simultaneamente marcadas com PI e CFDA-SE para avaliar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} após as diferentes técnicas de microencapsulação. As figuras da esquerda representam o perfil padrão de tamanho (FSC) e granulosidade (SSC) das células em cada microcápsula e as figuras da direita representam as células distribuídas nos quadrantes de acordo com sua marcação pelos corantes PI e CFDA-SE.

Na **Figura 16 (A)** estão representadas as células provenientes das microcápsulas de quitosana na sua maioria (85,9%) marcadas como células injuriadas no quadrante Q2, 6,05% de células mortas (Q1) e apenas 22% marcadas como vivas (Q3). Já na **Figura 16 (B)** estão representadas as células recém-liberadas das microcápsulas de amido resistente, sendo que também nestas, a maior parte das células (72,8%) foram identificadas como células injuriadas, 9,93% como células mortas e apenas 9,27% consideradas como vivas. Ou seja, ao final do processo de produção das microcápsulas por emulsificação a maior parte das células se encontra injuriada.

Já na **Figura 16 (C)**, estão as células recém-liberadas das microcápsulas feitas por *spray drying* e nestas 71,4% das células foram marcadas somente com CFDA-SE, portanto são células vivas e intactas, e apenas 17,1% como injuriadas e 1,49% como mortas, indicando que este método de microencapsulação provocou menor dano celular.

Salar-Behzadi *et al.* (2013) também encontraram por citometria de fluxo poucos danos na membrana celular, devido a baixa intensidade de marcação com PI, e melhora da culturabilidade de *B. bifidum* BB-12 encapsulada por *spray drying* utilizando leite desnatado como matriz. Os autores também avaliaram outros excipientes (pectina, goma arábica e gelatina) que apresentaram melhores resultados de proteção das células do que o leite desnatado, no entanto eles ressaltam que este efeito protetor é cultura dependente.

Esta maior quantidade de células intactas observadas nas microcápsulas por *spray drying* está relacionada a capacidade das proteínas do leite em prevenir a injúria celular através da estabilização dos constituintes da membrana celular (SILVA *et al.*, 2011).

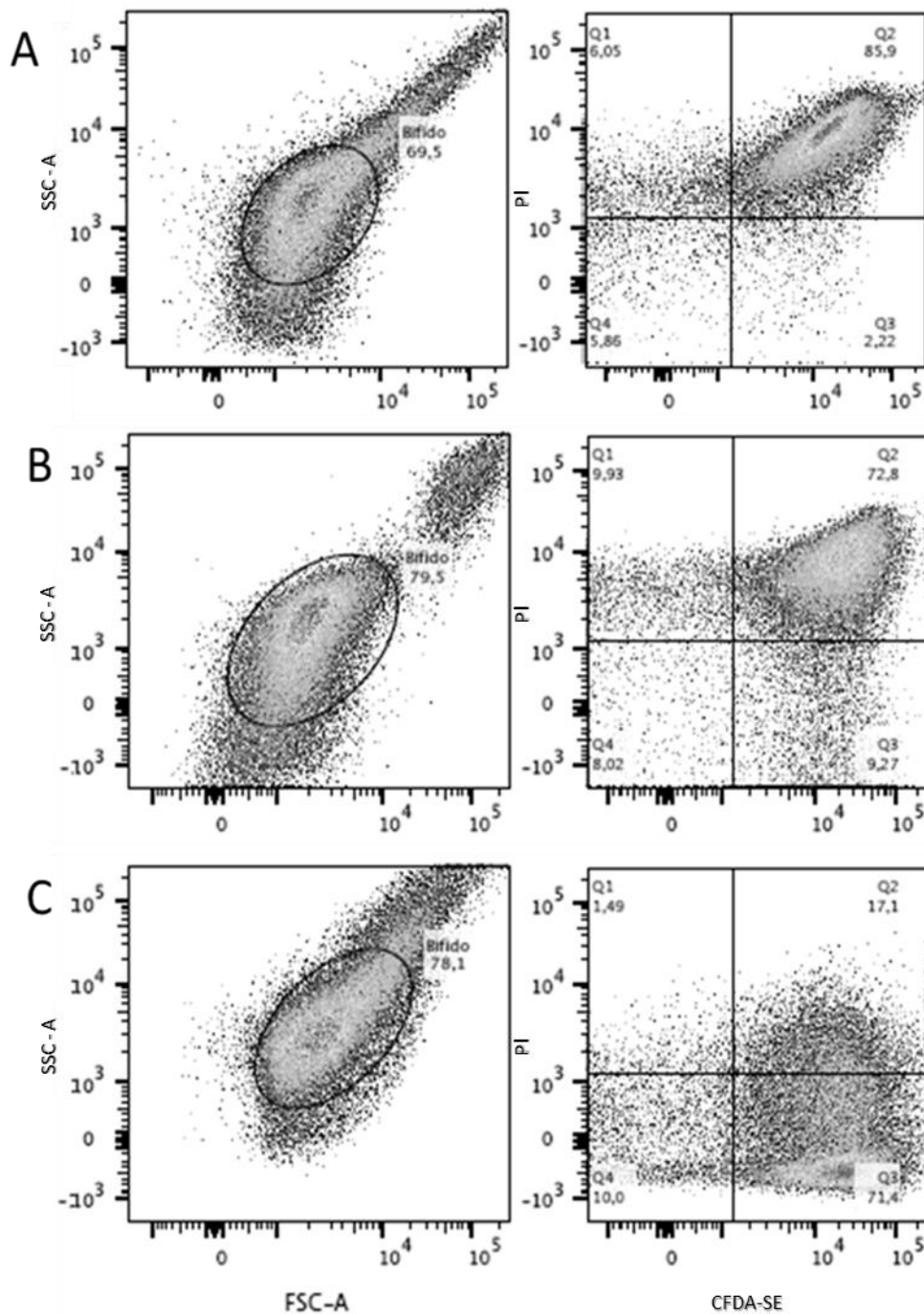


Figura 16 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A) Quitosana, (B) Amido resistente e (C) *Spray drying*. Q1: células mortas, Q2: células injuriadas, Q3: células vivas e Q4: células sem marcação.

A liofilização utilizada no final da elaboração das microcápsulas por emulsificação pode ter sido a responsável pelos danos celulares encontrados no presente estudo. Martin-Dejardin *et al.* (2013) avaliaram por citometria de fluxo a viabilidade de *B. bifidum*, microencapsulada em matriz de alginato-pectinato, antes e após a liofilização. Os autores observaram significativa perda na viabilidade das células após a liofilização, com aumento na porcentagem de células injuriadas e redução na porcentagem de células vivas.

Com base nestes resultados, buscou-se avaliar se o congelamento a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ logo após a obtenção das microcápsulas por emulsificação (microcápsulas de quitosana e amido resistente) causava menos injúrias às células do que o processo de liofilização. As características das células foram determinadas por citometria de fluxo (**Figura 12**).

Como pode ser observado na **Figura 17 (A)**, as células nas microcápsulas de quitosana após o congelamento se encontram 40,9% injuriadas e 52,7% mortas. Já as células nas microcápsulas de amido resistente (**Figura 17 – B**) estão em sua maioria (48,8%) injuriadas e 39,7% estão mortas. Indicando que a produção das microcápsulas de quitosana seguida de congelamento ($-20\text{ }^{\circ}\text{C}$) acarretou perda de viabilidade da maior parte das células. Já nas microcápsulas de amido resistente foram encontradas menos células mortas. Este fato pode estar relacionado à etapa adicional na elaboração das microcápsulas de quitosana, que inclui agitação das microcápsulas de alginato recém-formadas na solução de quitosana para revestimento das mesmas. Esta etapa pode provocar maior incorporação de ar e contato das células de *B. longum* 5^{1A} com oxigênio.

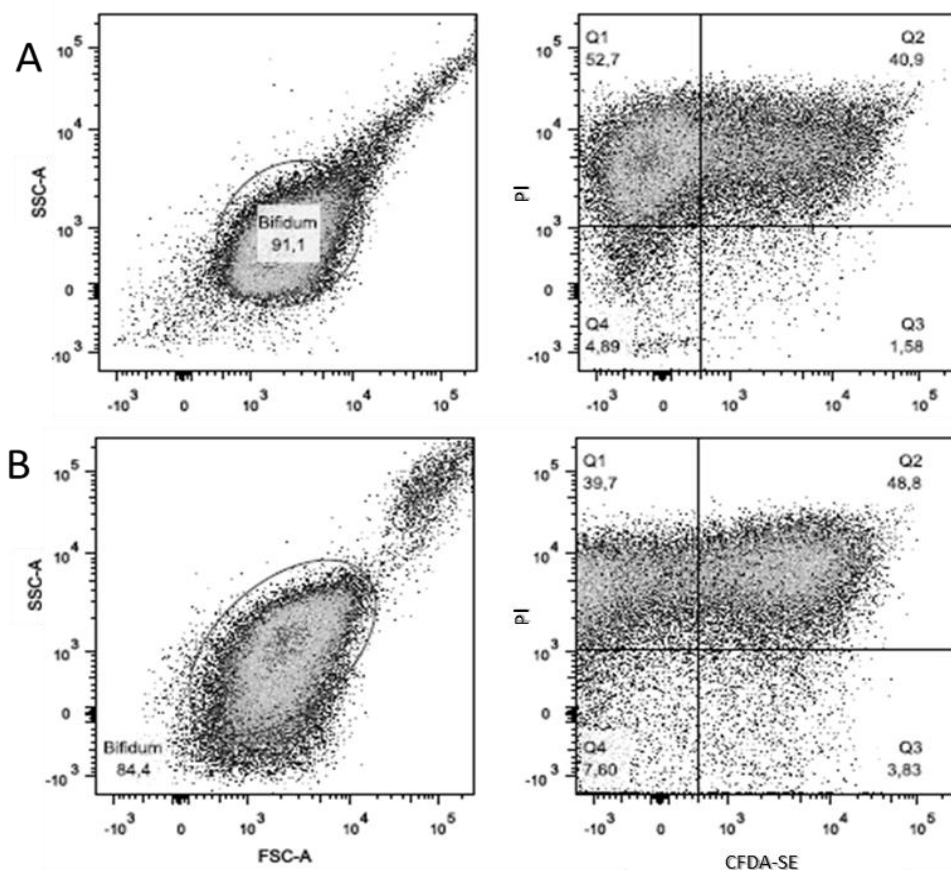


Figura 17 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A) Quitosana e (B) Amido resistente congeladas. Q1: células mortas, Q2: células injuriadas, Q3: células vivas e Q4: células sem marcação.

O congelamento das microcápsulas obtidas por emulsificação não pode ser considerado uma alternativa para substituição da liofilização com o intuito de reduzir a morte celular após a microencapsulação. O uso da liofilização logo após a microencapsulação constitui uma alternativa viável, com o objetivo de eliminar água residual e manter a viabilidade das culturas probióticas (HOLKEM *et al.*, 2016). A enumeração das células em meio sólido, feita durante o preparo das amostras para citometria de fluxo, também mostrou esta diferença, com contagens de 7,15 e 7,23 \log_{10} UFC mL^{-1} para as microcápsulas liofilizadas de quitosana e amido resistente, respectivamente, e para as microcápsulas congeladas (-20°C) de quitosana e amido de 5,70 e 6,64 \log_{10} UFC mL^{-1} , respectivamente. O que indica maior perda de células viáveis nas microcápsulas congeladas. Conrad *et al.* (2000) relataram que a morte celular após o congelamento está relacionada com a formação de cristais de gelo que conduzem a danos estruturais na membrana, incluindo rupturas, o que resulta em alterações no estado fisiológico das células.

Buscou-se também avaliar por citometria o grau de injúria das células nas microcápsulas de quitosana, amido resistente e *spray drying* após exposição das mesmas às condições simuladas do trato gastrintestinal. O objetivo foi identificar se as perdas na viabilidade celular determinadas por plaqueamento e descritas no item 5.4, principalmente para as células nas microcápsulas de quitosana e amido resistente, se relacionavam com o aumento no grau de injúria das células após o *stress* da solução ácida e da presença de sais biliares.

Analisando a **Figura 18**, observou-se que as células nas microcápsulas de quitosana (A), após serem expostas durante 120 minutos às soluções simuladas SGS e SIS, apresentaram número maior de células mortas (46,6%), quando comparado ao perfil inicial de células indicado na **Figura 16 (A)** que era de 6,09% no Q1. Além de considerável quantidade de células injuriadas (46,9%). Já as microcápsulas de amido resistente (B) passaram a apresentar mais células mortas (46,8%) do que injuriadas (28,7%) após a exposição às condições simuladas do TGI.

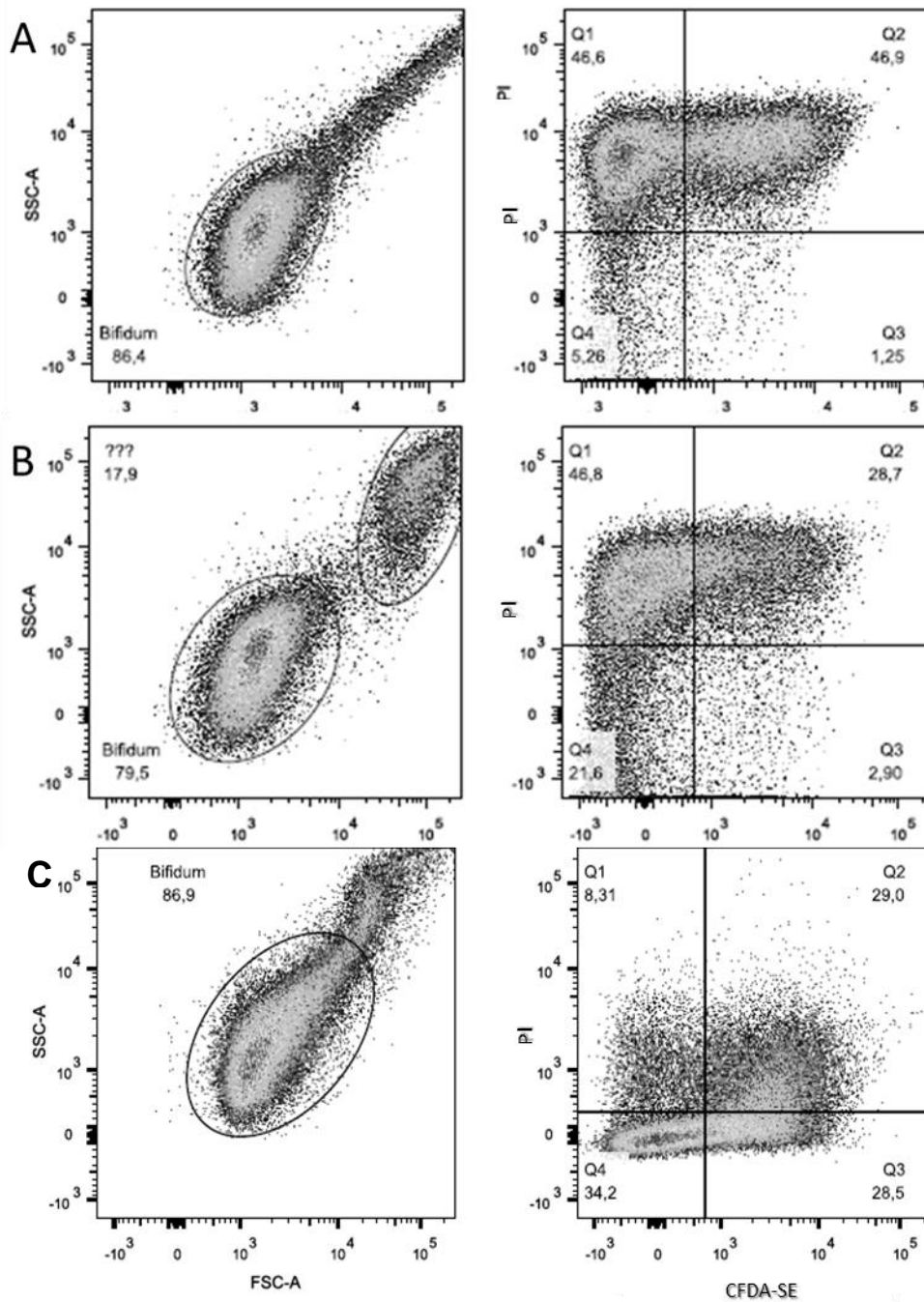


Figura 18 Gráfico de pontos após marcação dupla com PI (iodeto de propídio) e CFDA-SE (carboxifluoresceína diacetato succinimidil ester) das células liberadas das microcápsulas de (A) Quitosana, (B) Amido resistente e (C) *Spray drying* e submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

As microcápsulas de quitosana e amido resistente apresentaram um padrão semelhante de comportamento diante das condições simuladas do TGI, com aumento na quantidade de células mortas, indicando que estas microcápsulas não protegem as células o suficiente contra as condições adversas do meio, como baixo pH e presença de sais biliares, reforçando os dados apresentados no item 5.4. Pode-se supor que as células

nessas microcápsulas não chegariam ativas e viáveis o suficiente para atuar no intestino, caso fossem consumidas.

De fato, bactérias sofrem injúrias quando expostas ao pH baixo do suco gástrico, resultando em respostas irregulares diante do segundo ambiente hostil a ser enfrentado que é a presença de sais biliares no intestino (DICKS & BOTES, 2010). Amor *et al.* (2002) observaram indução de injúria subletal em *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* e *B. adolescentes* quando estas foram expostas a variadas concentrações de sais biliares (0 – 0,25% p/v), possivelmente devido a permeabilização da membrana.

Já as microcápsulas feitas por *spray drying* (**Figura 18 – C**) foram as que apresentaram menor quantidade de células mortas (8,31%) após exposição às condições simuladas do TGI e a maior quantidade de células vivas intactas (28,5%). No entanto, é importante ressaltar que houve considerável aumento na quantidade de células injuriadas (29%) quando comparado com o perfil inicial das células nestas microcápsulas (**ver Figura 16 - C**) que era de 17,1% no Q2. Mesmo assim, dos três tipos de microcápsulas analisados, pode-se supor que as obtidas por *spray drying* entregariam ao intestino a maior quantidade de células viáveis e intactas capazes de exercer seus efeitos benéficos. No intestino, as microcápsulas podem ser desintegradas pela microbiota nativa, por meio do peristaltismo ou devido ao alto pH, liberando enfim as células (Cook *et al.*, 2012).

O leite utilizado como encapsulante no processo de *spray drying* tem sido indicado como protetor eficaz de probióticos durante a digestão gastrointestinal simulada, aumentando a sobrevivência em condições fisiologicamente estressantes (TOMPKINS, MAINVILLE, & ARCAND, 2011). Estes resultados podem estar relacionados ao efeito tampão do leite que protegeria as linhagens contra efeitos nocivos do ambiente gástrico e intestinal (AMINE *et al.*, 2014).

É importante ressaltar também, sobre o aumento na quantidade de células sem marcação após o teste *in vitro* nos três tipos de microcápsulas avaliados. Este perfil de células sem marcação não foi tão expressivo nos outros ensaios, indicando uma possível influência das soluções simuladas do TGI sobre a capacidade de fixação dos corantes nas células. Que é o caso de fluorocromos como CFDA-SE que apresentam espectros de excitação, de emissão ou ambos, dependentes de variação de pH interno da célula. Uma vez que a fluoresceína gerada é sensível ao pH do ambiente e tem seu espectro reduzido quando em valores de pH reduzido (SHAPIRO, 2003). Se a célula não tem habilidade de manter

alto o pH interno em meios de baixo pH, então a capacidade de excitação/emissão de fluorescência da fluoresceína gerada fica comprometida.

Além de células sem marcação, no quadrante 4 pode existir uma pequena parcela de *debris*, que são partículas de sujeiras ou resíduos presentes na amostra (podendo ser resíduos das microcápsulas dissolvidas). Doherty *et al.* (2010) indicaram a necessidade de pré-tratamento para reduzir a interferência dos resíduos de proteína da matriz iogurte antes da análise por citometria. Porém, a concentração recomendável de células para análise em citometria de fluxo deve estar entre 10^5 a 10^6 células mL^{-1} (CHAMPAGNE & RAYMOND, 2015). Segundo Wilkes *et al.* (2012), quando a contagem de células é elevada na amostra e se torna necessário um maior número de diluições da amostra antes da análise por citometria de fluxo, o efeito das partículas da matriz podem se tornar insignificantes.

Considerando-se que as células nas microcápsulas de *spray drying* estavam em altas concentrações e que foi necessária a diluição de 100 vezes antes da análise por citometria, pode-se supor que os 34,2% encontrados no quadrante 4 são em sua maior parte referentes a células sem marcação e não *debris*. E que, provavelmente, parte destas células não marcadas estaria corada por CFDA-SE, uma vez que este é o corante com comprometimento na capacidade de excitação/emissão de fluorescência devido ao baixo pH ao qual as células foram expostas.

De qualquer forma, existe um indício de que parte das microcápsulas de *spray drying* não foi capaz de proteger estas células não coradas das condições adversas das soluções simuladas do TGI, pois as células tiveram seu pH interno alterado após exposição afetando a marcação com CFDA-SE.

Na **Figura 19** está indicada a relação entre a porcentagem de células vivas (Q3) obtida durante as análises por citometria de fluxo e a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} obtida pelo método padrão de enumeração em meio sólido. E na **Figura 20** está indicada a mesma relação, porém as células injuriadas (Q2) foram levadas em consideração e somadas à porcentagem de células vivas para análise da correlação dos métodos. Como pode ser observado na **Figura 19**, se for considerada apenas a porcentagem de células vivas (Q3), o coeficiente de correlação determinado entre os métodos é insignificante ($r = 0,1970$). Porém, ao somar a porcentagem de células injuriadas + vivas (Q2+Q3) a correlação entre

os métodos aumenta ($r = 0,7246$) (**Figura 20**), indicando que as células injuriadas apresentadas em Q2 são cultiváveis em meio sólido.

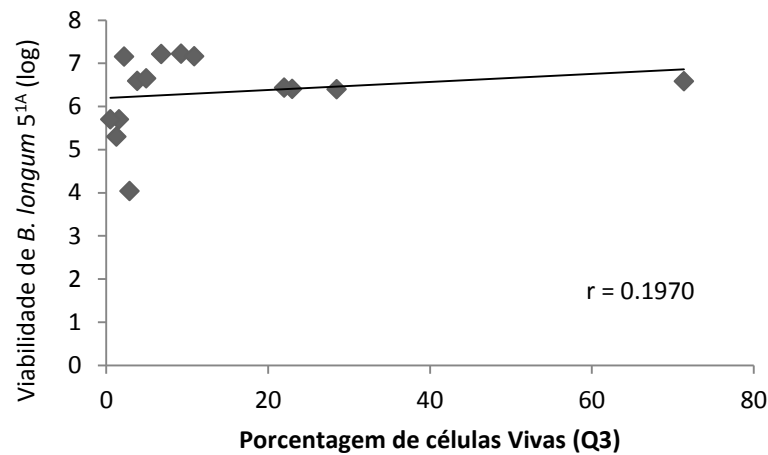


Figura 19 Relação entre a porcentagem de células vivas coradas (Q3) obtida por citometria de fluxo e a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} (\log_{10} UFC mL⁻¹) obtida por enumeração em meio sólido

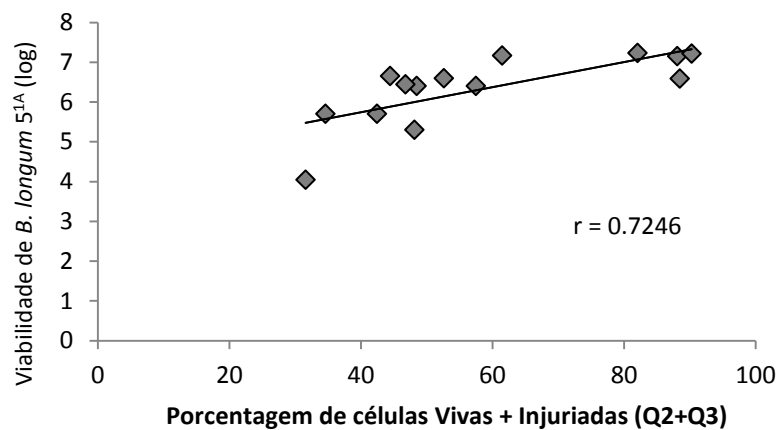


Figura 20 Relação entre a porcentagem de células vivas coradas + células injuriadas (Q2+ Q3) obtida por citometria de fluxo e a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} (\log_{10} UFC.mL⁻¹) obtida por enumeração em meio sólido

Como já foi ressaltado, as células com danos parciais ou mínimos na membrana celular podem recuperar e ainda aparecer como colônias em placas de ágar (GANDHI e SHAH, 2015). Em células sob *stress*, o iodeto de propídio pode entrar na célula durante ou imediatamente após a aplicação do *stress*, mas um curto período de recuperação permitirá que os danos da membrana sejam reparados e que PI não seja mais capaz de penetrar na célula (DAVEY & HEXLEY, 2011b).

As células nas microcápsulas de quitosana e amido resistente apresentaram danos parciais na membrana, pois a maior parte é corada por PI e CFDA-SE, mas se recuperam

o suficiente quando em condições adequadas de crescimento e formam colônias em meio sólido.

Esses resultados apontam a limitação do método de contagem em meio sólido na investigação da viabilidade ou de injúrias celulares, pois é incapaz de indicar o estado real da célula, e se limita a quantificar quantas bactérias são capazes de replicar nas condições previstas para o crescimento (DAVEY, 2011a). Além disso, um número limitado de estudos tem monitorado possíveis lesões induzidas pelo *stress* dos processos de microencapsulação ao probiótico. A técnica tradicional de enumeração em meio sólido para estudar a reprodutibilidade de células é utilizada, no entanto, não pode fornecer informações detalhadas sobre o grau de injúria e atividade metabólica das células.

Por praticidade, em microbiologia é considerada como evidência de viabilidade as repetidas divisões das células na superfície do ágar para produzir uma colônia visível (DAVEY, 2011b). No entanto, algumas células podem ser metabolicamente ativas e capazes de replicar, enquanto outras podem mostrar atividade metabólica com membrana intacta, mas não são capazes de se reproduzir. Outras células ainda podem ser inativas e dormentes, estar com a membrana permeabilizada e comprometida ou estar danificada de tal modo que a respiração não é viável (DOHERTY *et al.*, 2010).

A citometria de fluxo, por sua vez, com a combinação de corantes de ácidos nucleicos e da atividade enzimática permite a discriminação de estados fisiológicos adicionais que o plaqueamento celular não pode distinguir (TRACY, GAIDA E PAPOUTSAKIS, 2010). Além disso, outra vantagem importante da citometria de fluxo é a rapidez na determinação da viabilidade celular quando comparada aos métodos tradicionais de enumeração da viabilidade por contagem em meio sólido. Métodos baseados no cultivo de células em meio sólido são trabalhosos, demorados e requerem um longo tempo de incubação (72 horas) antes dos resultados estarem disponíveis. Isso atrasa a tomada de decisões e pode se tornar um gargalo na otimização da produção e controle de qualidade (GENG, *et al.*, 2014). Portanto, o método de citometria de fluxo estabelecido no presente estudo pode ser um candidato promissor na indústria de alimentos como método robusto para análise rápida do impacto dos métodos de microencapsulação sobre a viabilidade celular.

5.6 Análises de microestrutura das microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} por microscopia de força atômica

Embora a microscopia de força atômica (MFA) não seja ideal para avaliar toda a microestrutura das microcápsulas, visto que por esta técnica não é possível observar o interior das mesmas, ela permitiu uma avaliação preliminar da morfologia das amostras, além de comprovar que houve formação das microcápsulas com os agentes encapsulantes utilizados.

Antes de conhecer a microestrutura das microcápsulas, foi necessário determinar a aparência das células livres de *B. longum* 5^{1A} por MFA para ser possível identificá-las no material de interesse. Na **Figura 21** estão as imagens da morfologia das células livres por MFA de um cultivo fresco (1 e 2) e nas imagens B3 e B4 a morfologia das células livres após a liofilização (3 e 4).

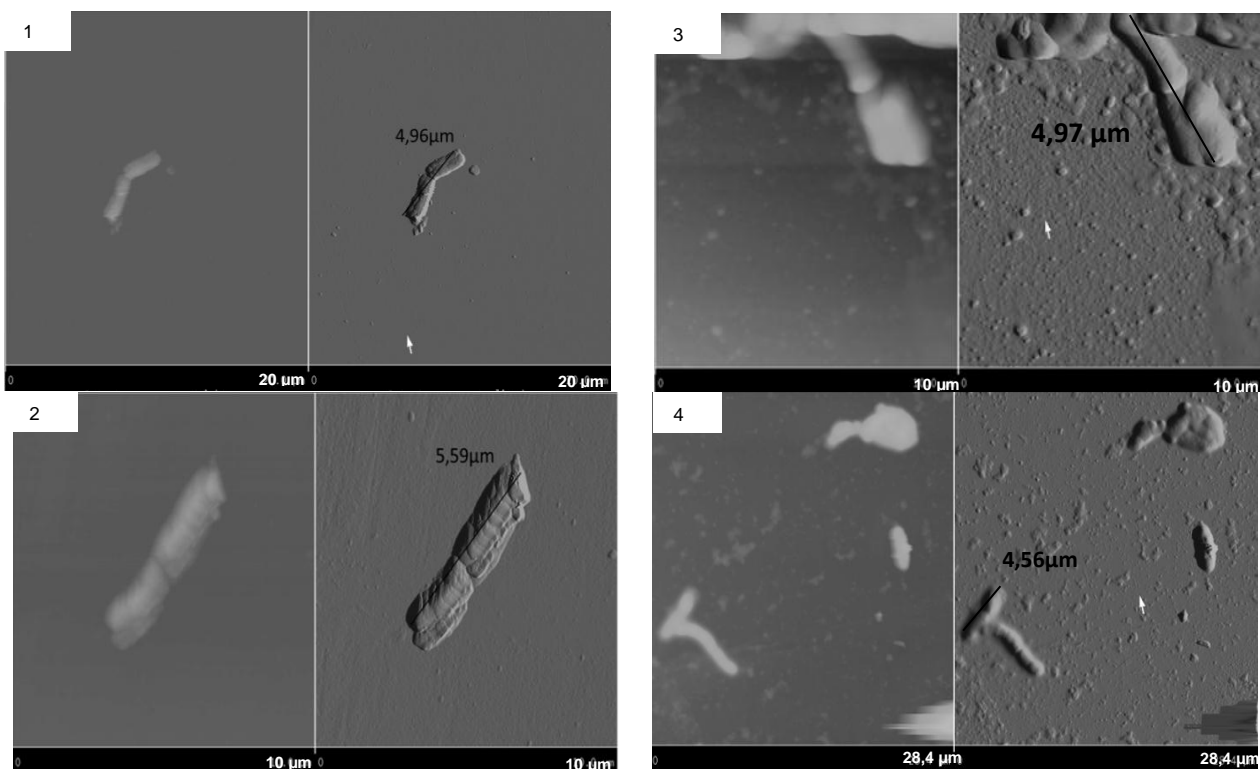


Figura 21 Morfologia das células livres de *B. longum* 51^A por Microscopia de Força Atômica em cultura fresca (1 e 2) ou liofilizada (3 e 4)

As células livres em cultura fresca tem um tamanho variável, entre 4,5 e 5,6 μm. Observou-se uma divisão no meio da célula, que poderia ser a bifurcação que daria a aparência de V ou Y se a célula fosse vista em outra dimensão. Como pode ser visto na **Figura 21 - 2**, a superfície da célula não é lisa, mas tem aparência escamosa ao longo de

sua estrutura. Foroni *et al.* (2011) também estudaram a estrutura de 4 espécies de bifidobactéria por AFM e nas imagens obtidas por esses autores foi possível identificar esta mesma superfície escamosa na estrutura do micro-organismo recém-cultivado.

No entanto é importante ressaltar que as células presentes nas microcápsulas passaram pelo processo de secagem, seja por liofilização ou *spray drying*. Sendo assim, tornou-se importante avaliar a microestrutura por MFA das células após ter passado por esse processo.

Uma dificuldade apresentada para análise por MFA das células liofilizadas foi a interferência do crioprotetor. A presença da glicose nas amostras levou a obtenção de imagens com uma película sobre as células (**Figura 21 - 4**), tornando a imagem embaçada, o que dificultou a visualização da topografia exata das células liofilizadas. Porém, em alguns campos da lâmina foi possível encontrar células sem o filme de crioprotetor (**Figura 21 - 3**), indicando células sem escamas, diferente da livre, e aparentemente lisas. Além disso, o tamanho das células continuou semelhante ao das células frescas e a divisão, geralmente no meio de célula, ainda foi observada.

Tendo, portanto conhecido o perfil topográfico das células livres de *B. longum* 5^{1A}, seguiu-se para as análises das microcápsulas.

Para melhorar a compreensão das análises de microestrutura das microcápsulas feitas por emulsificação, foram elaboradas microcápsulas de alginato puro (sem quitosana ou amido resistente) e microcápsulas brancas (sem células), com intuito de entender melhor a microestrutura das microcápsulas de amido resistente ou quitosana, uma vez que estas têm em sua constituição o polissacarídeo alginato.

Na **Figura 22 – 1 e 2** pode-se visualizar as microcápsulas de alginato liofilizadas, com tamanho aproximado de 54,46 µm. Apresentaram-se com superfície rugosa e nas imagens de aproximação foi possível identificar a presença de células (**Figura 22 – 2**) com tamanho aproximado de 3,52 µm. De uma maneira geral a superfície é mais homogênea, sem a presença de sulcos ou depressões muito marcantes como serão observados nas microcápsulas de quitosana e amido resistente. Já as microcápsulas brancas liofilizadas (**Figura 22 – 3 e 4**), tem diâmetro menor (27,21 µm), com aparência de microcápsula murcha, pois as bordas são mais altas do que o meio e são também rugosas, porém sem as proeminências características da presença de células.

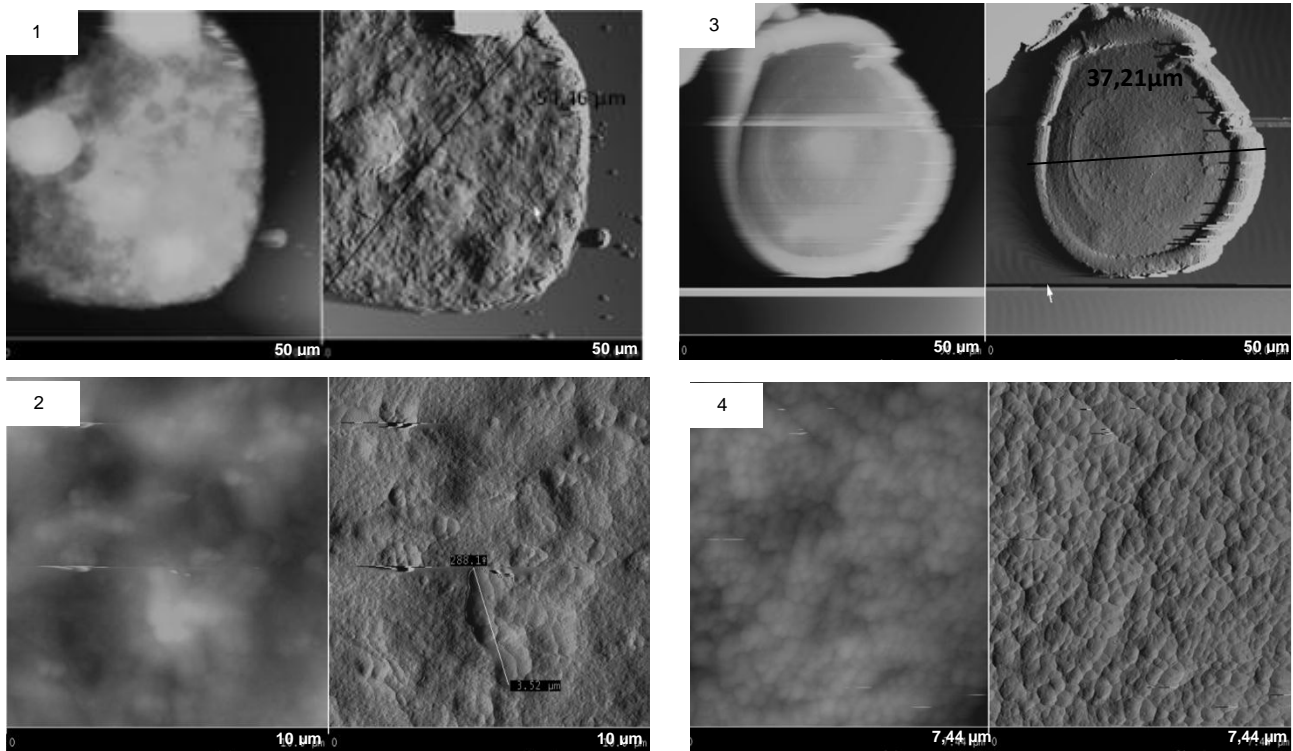


Figura 22 Morfologia das microcápsulas de alginato liofilizadas (1 e 2) e das microcápsulas brancas liofilizadas (3 e 4) obtidas por Microscopia de Força Atômica

Nas imagens seguintes estão os diferentes tipos de microcápsulas produzidas pelas técnicas de emulsificação (matriz de alginato com quitosana ou amido resistente) e *spray drying* (matriz de proteína de leite) e as diferenças de microestrutura observadas por meio da microscopia de força atômica. São apresentadas também as imagens de cada tipo de microcápsula sem a presença de *B. longum* 5^{1A}, denominadas como microcápsulas brancas, que foi utilizada como padrão de comparação com as microcápsulas contendo a bifidobactéria.

Na figura **Figura 23** podem ser observadas as microcápsulas de quitosana contendo as células antes e após a liofilização, além das microcápsulas brancas antes e após a secagem.

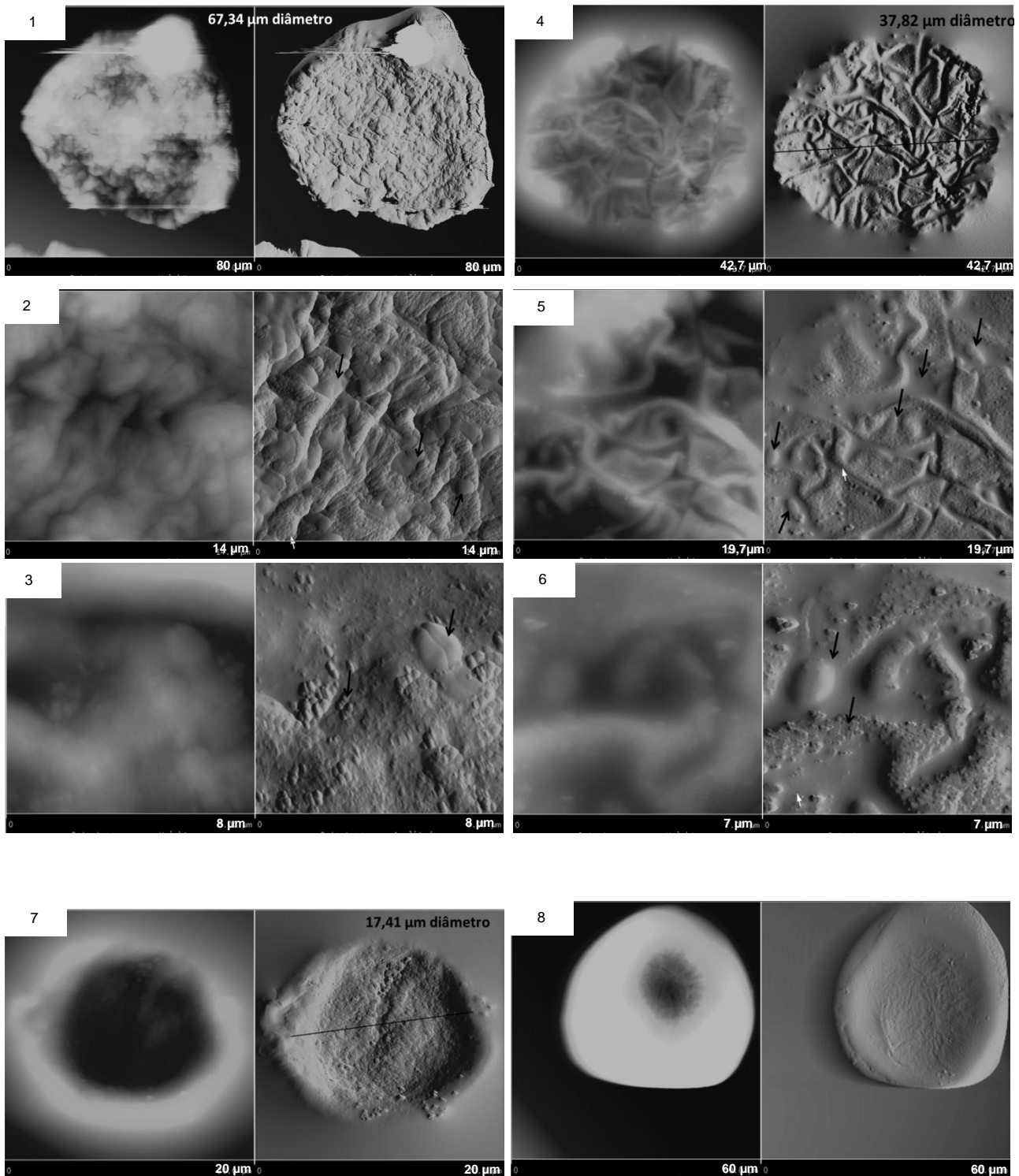


Figura 23 Morfologia das microcápsulas de alginato revestido com quitosana antes (1, 2 e 3) e após (4, 5 e 6) a liofilização e das microcápsulas brancas antes (7) e após (8) a liofilização obtidas por Microscopia de Força Atômica

As microcápsulas de quitosana foram avaliadas antes e após o processo de liofilização. Antes da liofilização elas se apresentaram com maior diâmetro na MFA, como na **Figura 23 - 1**. Porém não foi possível determinar a altura destas microcápsulas, pois a sonda não foi capaz de fazer ao mesmo tempo imagens das microcápsulas e da superfície sobre a qual elas se encontravam, dando um indício de que as microcápsulas eram altas.

Ao fazer imagens de aproximação nestas microcápsulas, observou-se que a superfície era irregular, com presença de estruturas lisas e rugosas fazendo parte da microestrutura, como indicado pelas setas na **Figura 23 – 2 e 3**, sugerindo a presença de células distribuídas na superfície. Geralmente as estruturas lisas se encontram em plano mais baixo do que as rugosas. Algumas destas estruturas lisas foram associadas a células recobertas pela matriz de alginato (**Figura 23 - 2**), ao passo que as partes rugosas foram associadas com a camada de quitosana usada no revestimento das microcápsulas. Já na **Figura 23 - 3**, a estrutura indicada na seta da direita foi associada com *B. longum* 5^{1A} parcialmente descoberta pelo material da matriz da microcápsula, sendo possível observar alguns fragmentos de quitosana dispersos na superfície da célula. Sugerindo que nem todas as células ficam totalmente protegidas com o revestimento de quitosana.

As microcápsulas liofilizadas (**Figura 23 – 4, 5 e 6**) apresentaram estruturas semelhantes às descritas anteriormente, com a diferença de que a aparência geral da microcápsula foi mais enrugada com menor diâmetro e com sulcos mais definidos, indicando a perda de água consequência do processo de secagem. Além disso, a diferença entre as estruturas lisas e rugosas da superfície foi mais aparente e marcante (**Figura 23 – 5 e 6**).

Já as microcápsulas brancas (**Figura 23 – 7 e 8**) a topografia é regular e mais lisa, sem grandes variações de altura na superfície. São microcápsulas de bordas altas e região central funda, como uma microcápsula murcha. Além disso, nestas microcápsulas sem liofilizar também foi possível observar os pequenos fragmentos de quitosana vistos nas microcápsulas anteriores.

Nas microcápsulas de quitosana, sempre que era identificada a presença de células na superfície, a camada rugosa associada ao revestimento de quitosana estava afastada das células criando sulcos na superfície da microcápsula. Indicando que a célula poderia ter perturbado a gelificação do alginato naquele local e conseqüentemente sua ligação à quitosana. Uma possível explicação para esta observação é que a presença de bactérias perturba a gelificação do alginato na sua imediata vizinhança (SULTANA *et al.* 2000; HANSEN *et al.*, 2002). Estes autores observaram espaços vazios em torno da bactéria em microcápsulas de alginato e também alginato com amido resistente quando analisadas por microscopia de varredura.

Na sequência (**Figura 24**), seguem as imagens das microcápsulas de amido resistente contendo as células antes e após a liofilização bem como as microcápsulas brancas antes e após a liofilização.

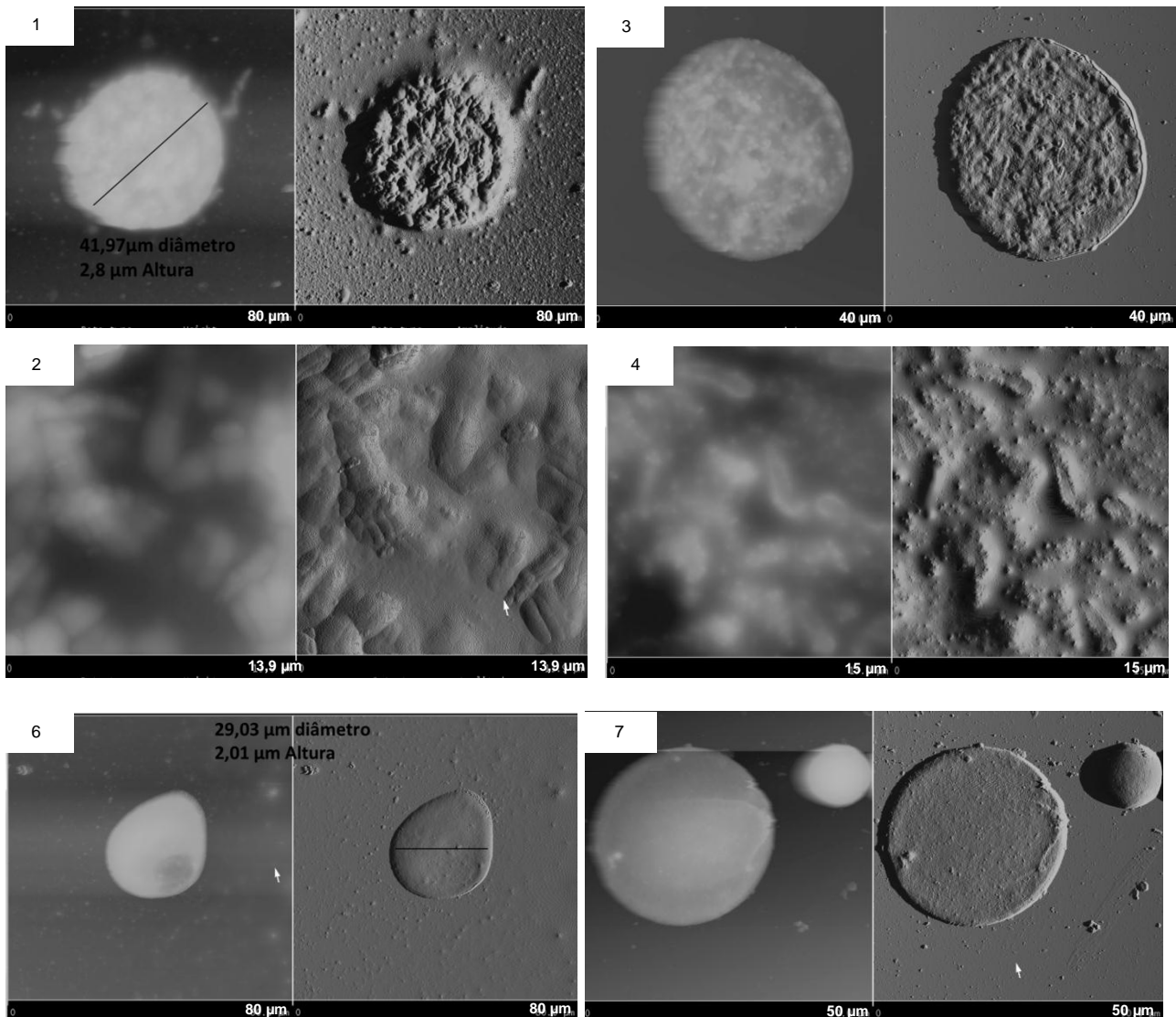


Figura 24 Morfologia das microcápsulas de alginato com amido resistente antes (1 e 2) e após (3 e 4) a liofilização e das microcápsulas brancas antes (6) e após (7) a liofilização obtidas por Microscopia de Força Atômica

A topografia das microcápsulas de amido resistente se assemelha muito às microcápsulas de quitosana. Apesar de serem menores em diâmetro, têm superfície irregular, com aparência enrugada indicando a presença de células (**Figura 24 - 1**). Ao contrário das microcápsulas de quitosana, nas de amido resistente foi possível determinar a altura em relação à superfície da lâmina, com altura aproximada de 2,8 μm. Da mesma forma como nas de quitosana, nas microcápsulas liofilizadas os sulcos na superfície são mais proeminentes dando aspecto de material seco.

Já nas microcápsulas brancas (**Figura 24 – 6 e 7**), a topografia foi regular, lisa, sem grandes variações de altura sobre a microcápsula. Apresentaram diâmetro menor, quando comparadas às microcápsulas de amido resistente com células, porém elas pouco se diferiram em relação à altura comparadas à superfície sobre a qual elas foram depositadas.

Por fim, na **Figura 25** estão apresentadas as imagens das microcápsulas feitas por *spray drying* contendo as células e das microcápsulas brancas, que tiveram como matriz para encapsulação o leite desnatado.

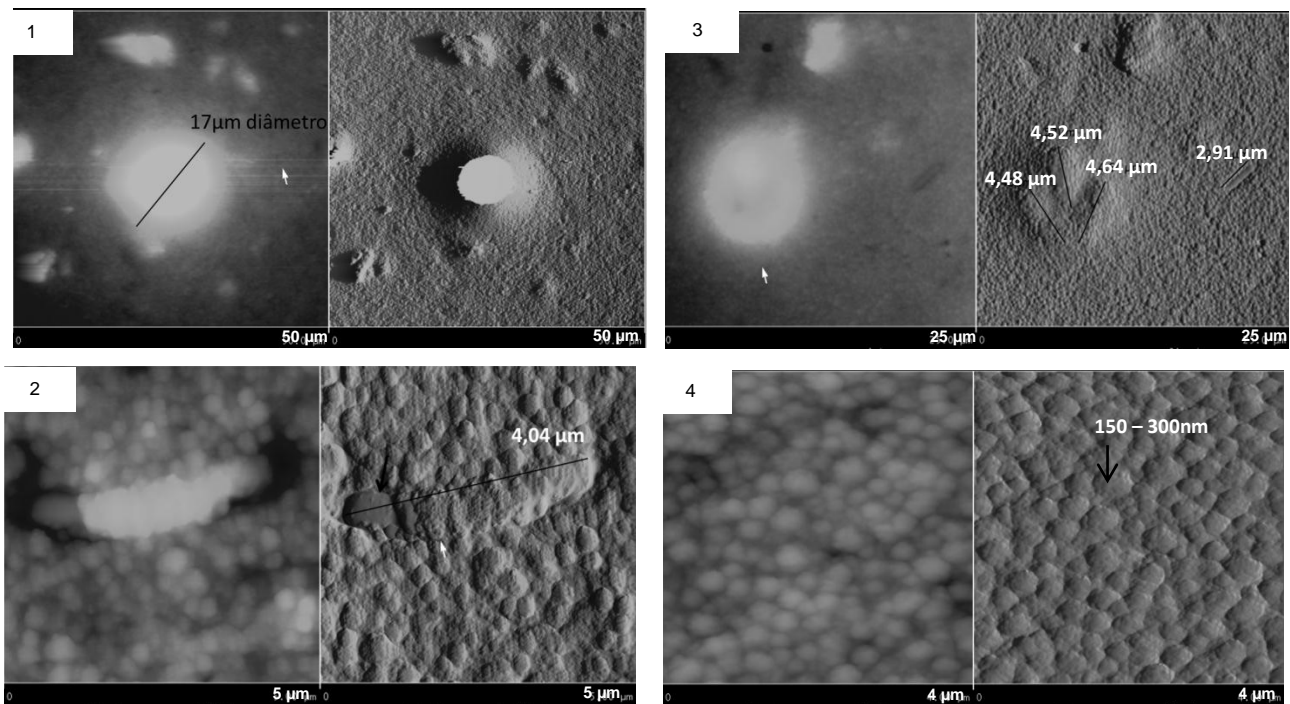


Figura 25 Morfologia das microcápsulas obtidas por *spray drying* contendo as células (1, 2 e 3) e das microcápsulas brancas (4) obtidas por Microscopia de Força Atômica

Uma das principais diferenças observadas nas microcápsulas feitas por *spray drying* quando comparadas com os demais tipos de microcápsulas deste estudo foi a altura das mesmas, que vai além da capacidade de detecção da sonda. Como pode ser observado na **Figura 25 – 1**, a sonda não foi capaz de formar imagem no centro da microcápsula, que é a região com maior intensidade de brilho, indicando ser uma região mais alta. Também foram as menores cápsulas, com aproximadamente 17 µm de diâmetro.

Além disso, foi possível identificar possíveis células recobertas pelo material da matriz na **Figura 25 – 3**, uma vez que estas estruturas têm tamanhos muito semelhantes ao tamanho das células de *B. longum* 5^{1A} livres. Também nesta imagem, observou-se um

possível fragmento de célula sem recobrimento, podendo ser a metade de uma célula em virtude do tamanho aproximado de 2,91 μm .

Já na **Figura 25 – 2**, pode-se observar uma célula de tamanho aproximado de 4,04 μm , coberta pelo material da matriz de leite, representado pelos grânulos polidispersos que estão em um plano acima da célula. Isso é representado pela imagem da esquerda indicando esses grânulos como estruturas mais brilhantes e, portanto, mais altas. No entanto, uma das extremidades desta célula encontra-se descoberta, sem material de recobrimento, apresentando-se como uma extremidade mais lisa e mais funda.

Ao avaliar a microcápsula branca de proteína de leite (**Figura 25 – 4**), observou-se as mesmas estruturas em formato de glóbulos polidispersos, sem a presença de estruturas lisas que se assemelhassem às células.

Esses grânulos polidispersos da matriz de leite foram associados às micelas caseína, com tamanhos que variaram de 150 a 350 nm aproximadamente, e que são capazes de se agrupar em torno das células, compatível com as micelas observadas por Ouanezar *et al.* (2012), com tamanho de aproximadamente 200 nm. Já De Kruif e Holy (2003) ressaltam que as micelas podem variar de 50 a 600 nm. As caseínas do leite representam cerca de 80% das proteínas do leite e cerca de 95% das caseínas estão na forma de micelas de caseína, sendo que estas partículas formam geralmente esferas grosseiras, polidispersas (HO RNE, 2009).

Algumas das forças que estão envolvidas na associação das caseínas e micelas de caseína com outras porções são interações hidrofóbicas, atração de Van der Waals e ligações de hidrogênio. Gelificação induzida pelo calor produz ligação sulfidrilica entre proteínas do soro e κ -caseína (YAZDI & CORREDIG, 2012).

No leite, as caseínas são bastante estáveis ao aquecimento, mas em temperaturas superiores a 60 °C, as proteínas do soro desnaturam e interagem entre si e com micelas de caseína, formando agregados através de interações hidrofóbicas e ponte dissulfeto e uma quantidade significativa de proteínas de soro de leite torna-se associado com a superfície das micelas de caseína (DONATO & GUYOMARC'H, 2009).

Segundo esses autores esse agregado das proteínas do soro do leite que se unem às micelas de caseína, tem aproximadamente 30 nm, no entanto não foram observadas estrutura tão pequenas nas imagens de MFA. É possível que seja esta associação entre

as proteínas do soro e leite com a formação desses agregados que leva ao aprisionamento das células.

5.7 Análises da microestrutura das microcápsulas contendo *B. longum* 5^{1A} por microscopia de eletrônica de transmissão (MET)

Foram avaliadas várias metodologias de preparo das amostras de microcápsulas para determinar qual garantiria melhor preservação da estrutura das microcápsulas para a análise no MET. A metodologia de congelamento das amostras sob alta pressão (*High Pressure Freezing*) garantiu melhor preservação das estruturas nas microcápsulas feitas por *spray drying* (Figura 26 – 1 e 2). No entanto, o número de estruturas disponíveis nas telas de avaliação no microscópio foi reduzido, limitando a captura de imagens a poucos campos. Além disso, nos campos avaliados, não foram observadas estruturas que caracterizassem a ocorrência de fratura nas microcápsulas.

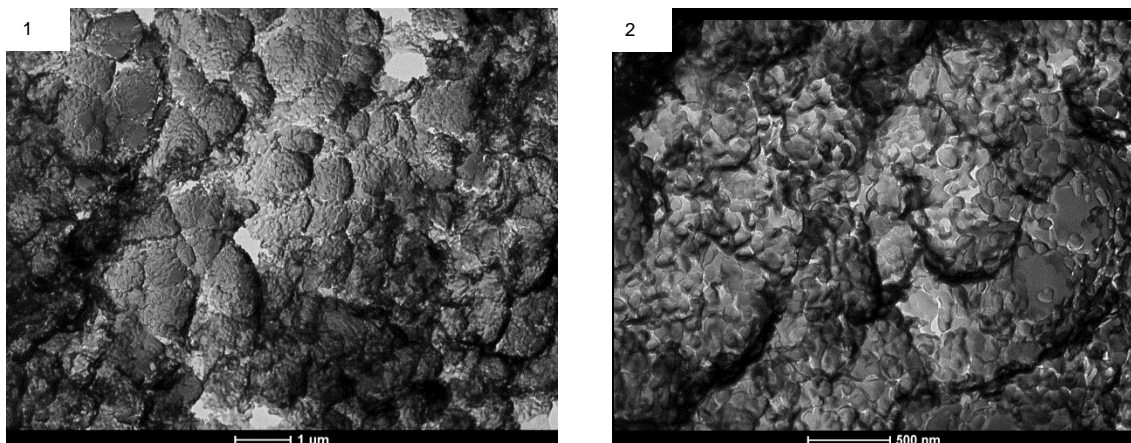


Figura 26 Morfologia das microcápsulas produzidas por *spray drying*, congeladas sob alta pressão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

No entanto, as estruturas encontradas nas microcápsulas obtidas por *spray drying* na microscopia eletrônica de transmissão foram condizentes com as imagens feitas por microscopia de força atômica apresentadas no item 5.6. A presença de caseínas na matriz é responsável por estruturas mais enrugadas e densas (SADEK *et al.*, 2014). Gaiani *et al.* (2010) reportaram que independente da temperatura de secagem no *spray drying*, as proteínas estarão preferencialmente localizadas na superfície, enquanto a lactose é localizada no núcleo da micropartícula. Essa característica é ainda mais pronunciada quando o processamento se dá em baixas temperaturas de saída, como foi o caso do trabalho atual (76°C).

Já as microcápsulas de quitosana (**Figura 27 – 1 e 2**) e amido resistente (**Figura 27 – 3**) não tiveram suas estruturas bem preservadas, como indicado nas imagens abaixo, apresentando rachaduras (espaços brancos), típicas de falhas na técnica de preparo. Isso porque, durante o corte pode ocorrer a formação de microtrincas, que são muitas vezes erroneamente interpretadas como cavidades ou fratura na amostra. E apesar da característica da superfície ser enrugada, não foi possível identificar a presença de células na superfície das amostras como apontado nas imagens feitas por microscopia de força atômica. E da mesma forma como nas cápsulas de *spray drying*, não foram observados campos que indicassem a fratura das microcápsulas.

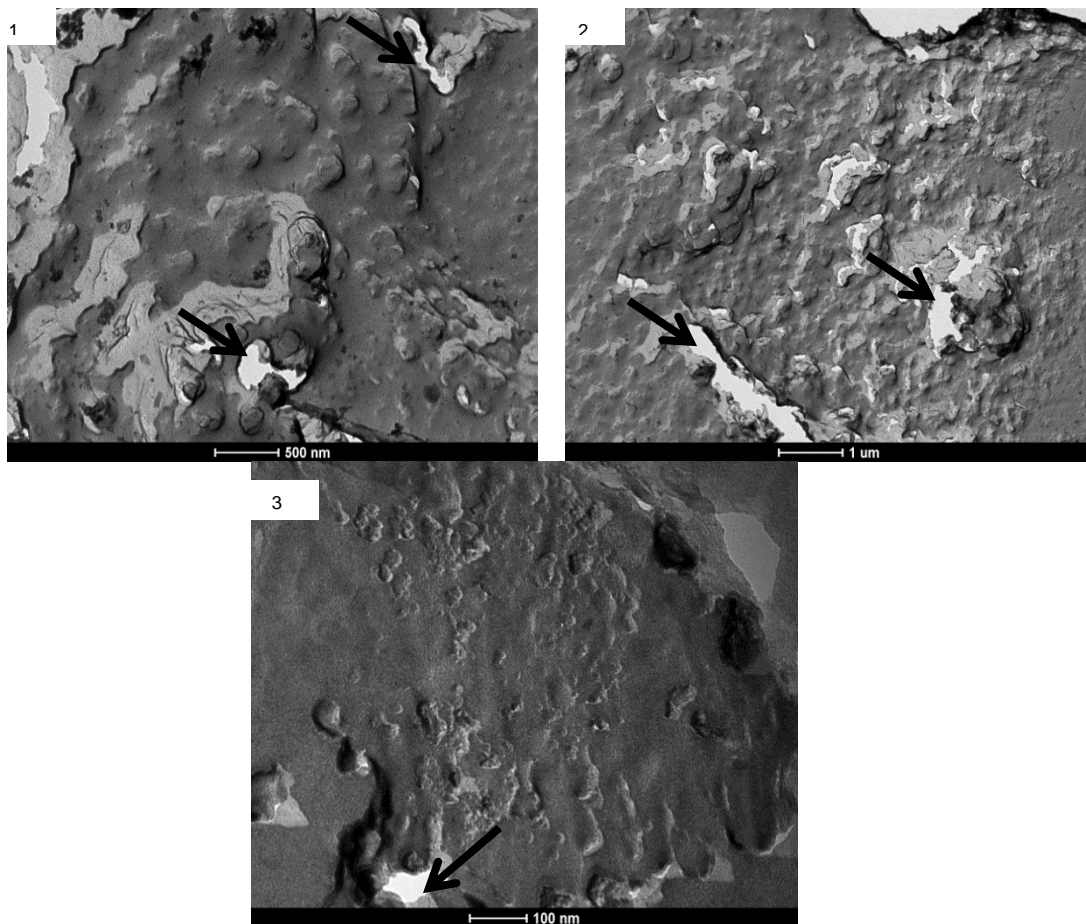


Figura 27 Morfologia das microcápsulas de quitosana (1 e 2) e amido resistente (3), congeladas sob alta pressão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Na técnica de congelamento por imersão em nitrogênio líquido, nenhuma das amostras foi bem preservada durante o preparo e não geraram boas imagens no MET, como pode ser visto nas imagens abaixo referentes às cápsulas obtidas por *spray drying* (**Figura 28 – 1 e 2**).

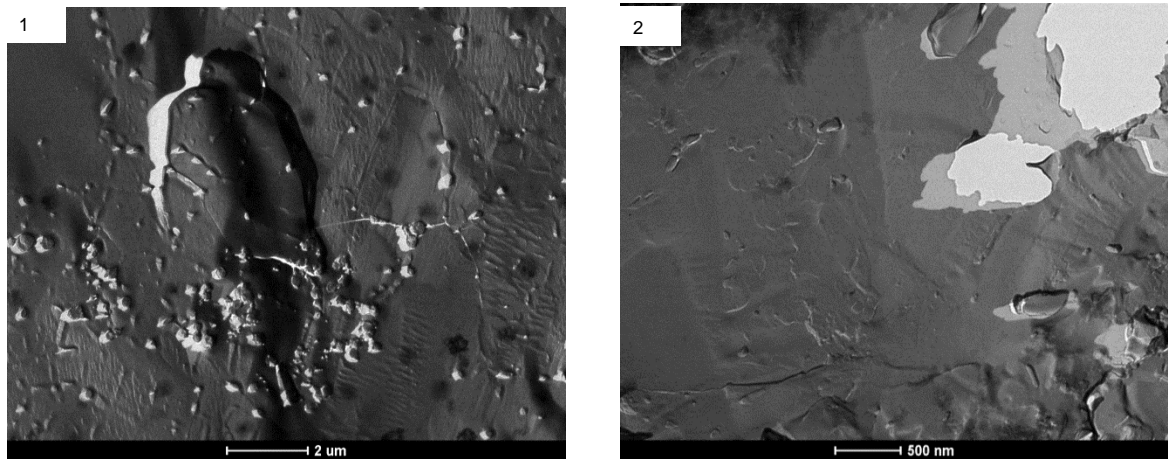


Figura 28 Morfologia das microcápsulas produzidas por *spray drying*, congeladas por imersão e crio-fraturadas, obtidas por Microscopia Eletrônica de Transmissão

Para as cápsulas de *spray drying* (Figura 28 – 1 e 2) a metodologia de congelamento por imersão alterou a superfície das cápsulas, tornando-as com aspecto liso. Enquanto as cápsulas de amido resistente e quitosana se desintegraram durante o preparo das amostras, impossibilitando a captura de imagens. A desintegração das microcápsulas de quitosana e amido resistente pode estar relacionada à etapa de preparo das amostras que ficaram 30 minutos em solução de glutaraldeído em tampão fosfato. As microcápsulas de alginato se desintegram na presença de tampão fosfato, pois o alginato apresenta baixa estabilidade na presença de agentes quelantes como fosfatos, que possui afinidade pelo cálcio e desestabiliza o gel formado (LORENZ *et al.*, 2009).

Não foi possível alcançar o objetivo esperado com as análises de microscopia eletrônica de transmissão, que era fazer a caracterização da microestrutura interna das microcápsulas. Apesar do uso generalizado de microscopia eletrônica para a análise da estrutura de microcápsulas, as informações disponíveis na literatura ainda são limitadas sobre os detalhes da preparação das amostras, sendo necessários ajustes nas técnicas e adequações nas metodologias de acordo com cada material empregado como matriz das microcápsulas. E, portanto, das três técnicas de preparo avaliadas, nenhuma delas possibilitou realizar a fratura das microcapsulas, de modo que a adequação da metodologia ainda se faz necessária para o alcance deste objetivo.

5.8 Avaliação da viabilidade de *B. longum* 5^{1A} incorporada em bebida láctea e leite puro nas formas livre liofilizada ou microencapsulada, durante o armazenamento refrigerado

Depois de caracterizar e determinar a microcápsula obtida por *spray drying* como a melhor para manutenção da viabilidade e proteção as células de *B. longum* 5^{1A}, seguiu-se para a próxima etapa do trabalho que foi a incorporação do micro-organismo microencapsulado em um produto. Foram feitos ensaios preliminares para verificar a sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada (em leite desnatado por *spray drying*) ou livre liofilizada adicionadas em bebida láctea fermentada e em leite 10% (p/v). O preparo da bebida láctea e a contagem das células nesta matriz foram feitos seguindo a referência de Pereira (2012) e os testes foram feitos em duplicata.

Na **Figura 29** estão os resultados destes ensaios, indicando a baixa sobrevivência das células microencapsuladas adicionadas tanto na bebida láctea fermentada, quanto no leite puro. A concentração inicial de células inoculadas na bebida láctea ou no leite puro foi de 7,6 e 8,6 log UCF g⁻¹ nas microcápsulas de *spray drying* ou das células liofilizadas, respectivamente. Sendo que a primeira determinação de viabilidade celular foi feita após 24 horas, indicando que já no primeiro dia do armazenamento houve redução na sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} em comparação com a concentração inicial de células viáveis. Pois, a viabilidade das células no dia 01 do armazenamento foi de aproximadamente 6,0 e 5,0 log UCF g⁻¹ na bebida láctea ou leite, respectivamente, adicionados de microcápsulas obtidas por *spray drying*; e 8,0 log UCF g⁻¹ quando bebida láctea ou leite foram adicionados da célula livre liofilizada.

As células nas microcápsulas de *spray drying* não apresentaram crescimento no 14^o dia de armazenamento refrigerado tanto em bebida láctea quanto em leite puro. Já as células livres liofilizadas reduziram gradativamente a contagem de células viáveis ao longo do armazenamento. Começaram o armazenamento em bebida láctea fermentada ou leite com contagens próximas a 8 log₁₀ e permaneceram com contagens acima de 6 log₁₀ até 21 ou 35 dias, respectivamente. Sendo que o pH final de cada produto foi de 4,9 para bebida láctea e de 6,2 para o leite após 35 dias.

Muitos fatores afetam a viabilidade e atividade de culturas desidratadas por *spray drying* ou liofilização e o processo de reidratação dessas culturas pode ser crucial na sobrevivência das mesmas (CARVALHO *et al.*, 2004).

A microcápsula reidratada, seja no leite puro ou na bebida láctea, não foi capaz de proteger as células durante o armazenamento, diante das condições de acidez, temperatura, presença de oxigênio ou metabólitos de outros micro-organismos. Supõe-se que a reidratação liberou as células das microcápsulas durante o armazenamento, expondo as mesmas às condições adversas do meio.

Por outro lado, a maior sobrevivência das células livres liofilizadas, seja no leite ou na bebida láctea, pode ser justificada inicialmente pela maior quantidade de inóculo. Como encontrado também por Capella *et al.* (2006) que observaram maior viabilidade de uma combinação de probióticos, contendo inclusive *B. longum*, durante o armazenamento de iogurte liofilizado quando a quantidade de inóculo era maior (próximo de $8 \log_{10}$ UFC g^{-1}).

Além disso, tendo em vista que o processo de liofilização é mais demorado, a célula tem tempo para responder ao stress pelo choque frio durante a liofilização (IACONELLI *et al.*, 2015) e o stress induz uma série de estratégias de sobrevivência que proporcionam proteção ao micro-organismo após a secagem (MORGAN *et al.*, 2006). A adaptação bacteriana a temperaturas baixas é um processo ativo, resultando em aumento de ácidos graxos insaturados e síntese de polipeptídios (GIRGIS *et al.*, 2002) que aumentam a fluidez da membrana da célula e é crucial para a sobrevivência das bactérias em baixas temperaturas durante o armazenamento (BEALES, 2004).

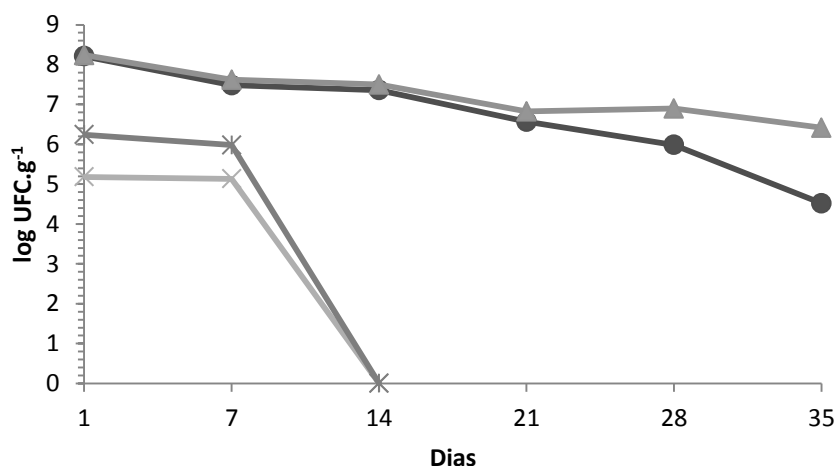


Figura 29 Sobrevivência (\log_{10} UFC g^{-1}) de *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada ● na bebida láctea, ▲ no leite puro e microencapsulada por *spray drying* adicionada na ★ bebida láctea e no ✱ leite puro

No entanto, apesar da alta sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada em leite ou bebida láctea, será discutido mais adiante que a capacidade de adesão, que é

determinado pelas estruturas superficiais das células, pode sofrer alterações durante o processo de produção de células probióticas, afetando como ressaltado, a funcionalidade das células sem afetar a viabilidade (VINDEROLA *et al.*, 2011).

Com efeito, a sobrevivência de bactérias probióticas não está necessariamente correlacionada com a preservação dos seus efeitos benéficos (IACONELLI *et al.*, 2015). Além disso, probióticos não-viáveis também podem, por exemplo, demonstrar aderência à mucosa intestinal para posterior efeito imunodulador (VINDEROLA *et al.*, 2005). Por outro lado, o armazenamento de probióticos em baixa atividade de água durante longos períodos de estocagem influencia consideravelmente na retenção da atividade enzimática do micro-organismo (DIANAWATI & SHAH, 2011). Buscou-se então avaliar a sobrevivência de *B. longum* 5^{1A}, incorporada em farinha de aveia nas formas livre ou encapsulada por *spray drying*, durante o armazenamento.

5.9 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A}, incorporada em farinha de aveia nas formas livre liofilizada ou microencapsulada, durante o armazenamento refrigerado

Tendo em vista a baixa sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada e adicionada em bebida láctea fermentada ou leite puro durante armazenamento refrigerado, buscou-se um produto com baixa atividade de água e sem a presença de outros micro-organismos competidores para incorporação das microcápsulas ou da célula livre liofilizada. Para tanto, optou-se pela farinha de aveia que foi incorporada de microcápsulas de *B. longum* 5^{1A} produzidas por *spray drying* ou de *B. longum* 5^{1A} na forma livre liofilizada.

A temperatura de refrigeração (5°C) usada para armazenamento foi escolhida pensando-se na farinha de aveia como acompanhamento no momento do consumo de bebida láctea ou iogurte, que são armazenados em temperatura de refrigeração, assemelhando-se a produtos lácteos que são comercializados no mercado acompanhados de cereais.

Também, levou-se em consideração exaustivos trabalhos na literatura que indicam a temperatura ambiente como desfavorável para manutenção da viabilidade de micro-organismos probióticos microencapsulados (GARDINER *et al.* 2000; BRUNO & SHAH, 2003; RODRIGUES *et al.*, 2011a; DE CASTRO-CISLAGHI *et al.*, 2012; HOLKEM *et al.*, 2016). E que produtos secos contendo linhagens probióticas sofrem dramáticas perdas na viabilidade quando armazenados a temperatura ambiente, prejudicando gravemente a

vida útil do produto (ROSS, DESMOND, FITZGERALD & STANTON, 2005; UBBINK & KRUEGER, 2006). No entanto, estudos em andamento no grupo de pesquisa irão determinar a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying* durante armazenamento em temperatura ambiente com controle da umidade relativa.

Observou-se (**Tabela 4**) que a viabilidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying* manteve-se com contagens acima de $6,70 \pm 0,21 \log_{10}$ UFC g⁻¹ durante 90 dias de armazenamento refrigerado em farinha de aveia.

Tabela 4 Viabilidade (\log_{10} UFC g⁻¹) de *B. longum* 5^{1A} incorporada em farinha de aveia nas formas microencapsulada por *spray drying* ou livre liofilizada, armazenadas a 5 °C por 90 dias.

Dias	Log ₁₀ UCF.g ⁻¹							
	1	7	14	21	28	40	60	90
<i>Spray drying</i>	7,62 ± 0,02 ^{aA}	7,52 ± 0,11 ^{aA}	7,33 ± 0,06 ^{aA}	6,56 ± 0,26 ^{aB}	6,82 ± 0,05 ^{aB}	6,82 ± 0,07 ^{aB}	6,76 ± 0,13 ^{aB}	6,70 ± 0,21 ^{aB}
Livre e liofilizada	8,60 ± 0,31 ^{bA}	8,51 ± 0,08 ^{bA}	8,49 ± 0,17 ^{bA}	8,29 ± 0,19 ^{bAB}	8,27 ± 0,28 ^{bA}	7,73 ± 0,39 ^{bB}	7,64 ± 0,49 ^{bB}	7,54 ± 0,60 ^{bB}

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

De acordo com ANVISA (2008), a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10⁸ a 10⁹ UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. A resolução da ANVISA (2003) não estabelece a porção diária de farinha de aveia, mas sim de aveia em flocos, e esta deve ser de 30 g do produto pronto para consumo, o que equivaleria a uma concentração de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying* de aproximadamente $7,70 \pm 0,21 \log_{10}$ em uma porção de farinha de aveia ao final de 90 dias de armazenamento. Dentro desta recomendação da ANVISA (2008), a porção de farinha de aveia com as microcápsulas de *B. longum* 5^{1A} estaria 0.3 log abaixo do recomendado após 90 dias de armazenamento da aveia, e estaria dentro do estabelecido pela legislação até 14 dias. Esse ajuste, para atender a legislação, pode ser alcançado aumentando a concentração de células encapsuladas a serem adicionadas na farinha de aveia, passando a adicionar 10 g ao invés de 5,0 g de microcápsulas ou aumentando o volume ou a concentração de células a serem inoculadas na solução de alimentação para a secagem no *spray drying*.

Já a célula livre liofilizada apresentou contagem mais alta, $7,54 \log_{10}$ UFC g⁻¹ durante 90 dias de armazenamento. Esta contagem maior das células liofilizadas se deve ao fato da concentração inicial de células liofilizadas inoculada na farinha de aveia ter sido 1 \log_{10} superior à concentração de células microencapsuladas. Sendo assim, já se esperava que

houvesse diferença estatística entre as amostras (células encapsuladas ou liofilizadas) ao se fazer a comparação da viabilidade através de \log_{10} UFC g^{-1} , como pode ser observado na **Tabela 4**. Esta amostra de farinha de aveia com células liofilizadas se manteria dentro do estabelecido pela ANVISA (2008), que é a concentração mínima de 10^8 UFC g^{-1} na recomendação diária do produto, até os 90 dias de armazenamento, com concentrações de aproximadamente $8,54 \log_{10}$ UFC g^{-1} na porção de 30 gramas de farinha de aveia. Por outro lado, comparando-se a perda de células viáveis das duas amostras ao final dos 90 dias analisados, observou-se que a perda foi de $0,92 \log_{10}$ UFC g^{-1} para as células microencapsuladas por *spray drying* e de $1,06 \log_{10}$ UFC g^{-1} para as células livres liofilizadas.

Como forma de comparar melhor os resultados de viabilidade das células nas microcápsulas com as células livres liofilizadas durante o armazenamento, foi calculada a porcentagem de sobrevivência (**Tabela 5**) das células como forma de igualar o valor inicial das duas amostras de acordo com a equação 3:

$$\text{Equação 3: } \% S = \left[\frac{\log \text{ final}}{\log \text{ inicial}} \right] \times 100.$$

Onde:

%S = porcentagem de sobrevivência, log final = número de células viáveis por grama em cada tempo do armazenamento em farinha de aveia e log inicial = número de células viáveis por grama logo após a incorporação em farinha de aveia.

Tabela 5 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} incorporada em Farinha de Aveia nas formas microencapsulada por *spray drying* ou livre liofilizada, ambas armazenadas a 5°C por 90 dias.

Dias	% de Sobrevivência							
	0	7	14	21	28	40	60	90
<i>Spray drying</i>	100 ± 0 ^{aA}	97,04 ± 2,60 ^{aAB}	96,15 ± 0,87 ^{aAB}	91,79 ± 1,18 ^{aBC}	90,48 ± 1,19 ^{aC}	89,52 ± 0,58 ^{aC}	88,71 ± 1,32 ^{aC}	87,90 ± 2,76 ^{aC}
Livre e Liofilizada	100 ± 0 ^{aA}	99,12 ± 2,74 ^{aAB}	98,94 ± 4,56 ^{aAB}	93,96 ± 1,87 ^{aBC}	94,31 ± 4,22 ^{aABC}	90,20 ± 6,63 ^{aCD}	89,14 ± 7,66 ^{aCD}	88,09 ± 7,54 ^{aD}

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

^{a, b, c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

Ao comparar a porcentagem de sobrevivência da célula livre liofilizada com a microencapsulada, adicionadas à farinha de aveia, observou-se que elas não diferem significativamente entre si quando comparadas no mesmo tempo de armazenamento, ou seja, a variação observada na sobrevivência foi a mesma ao longo dos 90 dias em ambos os tratamentos, chegando ao final do período avaliado com a mesma porcentagem de sobrevivência.

Considerando os dados acima, poder-se-ia concluir que apesar da célula encapsulada por *spray drying* e a livre liofilizada terem atingido ao final de 90 dias a mesma porcentagem de sobrevivência, para atender melhor à legislação vigente seria indicado usar a célula livre liofilizada como forma de consumo de *B. longum* 5^{1A} na farinha de aveia, por ela apresentar maior contagem em log.

No entanto, como foi discutido anteriormente no item 5.5, a viabilidade por meio da enumeração de células em meio sólido não reflete fielmente o estado de injúria das células. Sendo assim, buscou-se avaliar a sobrevivência das células livres liofilizadas diante das condições simuladas do trato gastrointestinal e avaliar o perfil de hidrofobicidade das células nas duas condições (liofilizada e microencapsulada por *spray drying*) para identificar se haveriam respostas diferentes nas células que indicassem maior ou menor injúria celular.

5.10 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A} livre liofilizada diante de condições simuladas do trato gastrointestinal

Também foi usado aqui para comparação dos resultados as células livres recém-ativadas (frescas). Como já se conhecia o perfil de sobrevivência das células encapsuladas por *spray drying* e das células livres frescas diante das condições simuladas do TGI, apresentados no item 5.2, o objetivo foi identificar se esta condição de *stress* levaria a danos nas células livres liofilizadas alterando sua viabilidade e conseqüentemente sua capacidade de atuação no TGI após o consumo.

Diante das condições simuladas do TGI (**Figura 30 e Tabela 10 – Apêndice A**) pôde-se observar que as células microencapsuladas por *spray drying* demonstraram maior ($p < 0.05$) porcentagem de sobrevivência do que as células livres liofilizadas ou a célula livre fresca. Esta diferença é significativa nos tempos 60 e 120 no SIS. Além de permanecerem com contagens estáveis, sem diferença significativa, durante os 240 minutos de exposição às soluções simuladas do TGI (**Tabela 6**). A célula livre fresca tem porcentagem de sobrevivência igual as demais amostras até 120 minutos em SGS, mas após 60 minutos em SIS sofre redução na contagem de células e passa a ser menor ($p < 0,05$) do que a sobrevivência das células encapsuladas por *spray drying*. Porém, ainda é semelhante a sobrevivência da célula livre liofilizada. Essa última, por sua vez, sofre redução nas células viáveis após 60 minutos em SIS e chega ao final do experimento com 85,70% de sobrevivência, valor estatisticamente semelhante ao das células livres frescas.

O comportamento das células livres, frescas ou liofilizada, foi o mesmo ao longo do experimento.

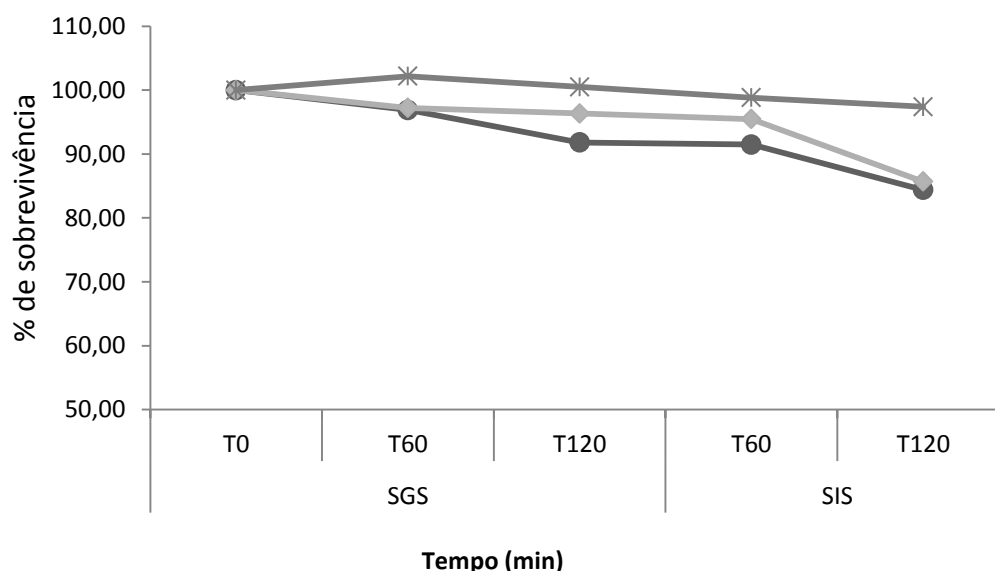


Figura 30 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre fresca ●, livre liofilizada ◻ e microencapsulada em microcápsulas de *spray drying* *, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

É importante ressaltar aqui também que a equivalência em log destas porcentagens de sobrevivência coloca a célula livre liofilizada em vantagem quanto a concentração de células (**Tabela 6**), pois chegou ao final do experimento com $9,40 \pm 0,07 \log_{10}$ UFC mL⁻¹, valor maior ($p < 0,05$) do que a célula microencapsulada $7,89 \pm 0,47 \log_{10}$ UFC mL⁻¹. No entanto, a célula microencapsulada teve contagem estável, sem diferença significativa, durante o tempo analisado. Ao contrário da célula livre liofilizada que sofre duas reduções significativas na contagem de células, após 60 e depois 120 minutos em SIS. Da mesma forma que a célula livre fresca, que sofre a primeira redução significativa após 120 minutos em SGS e uma nova queda após 120 minutos em SIS.

Tabela 6 Viabilidade de *B. longum* 5^{1A} (\log_{10} UFC mL⁻¹) livre fresca, livre liofilizada e microencapsulada em microcápsulas de *spray drying*, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

Tempo (min)	SGS			SIS		% perda total
	0	60	120	60	120	
Livre	8,02 ± 0,97 ^{aA}	7,82 ± 0,72 ^{aA}	7,36 ± 0,41 ^{aB}	7,05 ± 0,31 ^{aBC}	6,77 ± 0,24 ^{aC}	15,58
Livre Liofilizada	10,98 ± 0,08 ^b A	10,67 ± 0,04 ^b AB	10,57 ± 0,08 ^{bAB}	10,48 ± 0,14 ^{bB}	9,40 ± 0,07 ^{bC}	14,38
<i>Spray drying</i>	8,10 ± 0,61 ^{aA}	8,27 ± 0,27 ^{aA}	8,14 ± 0,44 ^{aA}	8,00 ± 0,61 ^{aA}	7,89 ± 0,47 ^{aA}	2,59

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

^{a,b,c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan $p < 0,05$).

Ou seja, ao contrário da célula microencapsulada por *spray drying*, as células livres são instáveis diante das condições simuladas do trato gastrointestinal. Esta diferença de comportamento entre as células livres e as encapsuladas diante da situação de *stress* poderia favorecer a escolha das células microencapsuladas para adição na farinha de aveia. Uma vez que, a atuação delas no TGI seria mais eficiente após serem consumidas, já que nesta condição não há redução de células viáveis e, como consequência, possivelmente não haveria alteração na funcionalidade do micro-organismo quando consumido até atingir o órgão alvo, que é o cólon.

Além disso, outros fatores podem ser somados ao favorecimento da escolha das células microencapsuladas. A secagem por *spray drying* tem sido sugerida como uma alternativa à secagem por liofilização, pois oferece vantagens como baixo custo, eficiência e elevada taxa de produção (rendimento) (MENSHUTINA *et al.*, 2010; DIANAWATI, 2014). E a liofilização é considerada como processo mais dispendioso de tempo e custo (COOK *et al.*, 2012).

5.11 Perfil de hidrofobicidade de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada por *spray drying*

Comparou-se a hidrofobicidade das células livres frescas, liofilizadas ou microencapsuladas por *spray drying* para avaliar a associação com possíveis injúrias celulares durante os processos de secagem (liofilização ou *spray drying*). Com esta análise, a hidrofobicidade bacteriana mostrou ser processo dependente e indicou menor injúria nas células encapsuladas.

Na **Figura 31** estão apresentados os percentuais de hidrofobicidade das células de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying* no tempo 0 e após 30 dias de armazenamento (-20°C) bem como das células livre fresca e livre liofilizada no tempo 0 e após 30 dias de armazenamento (-20°C).

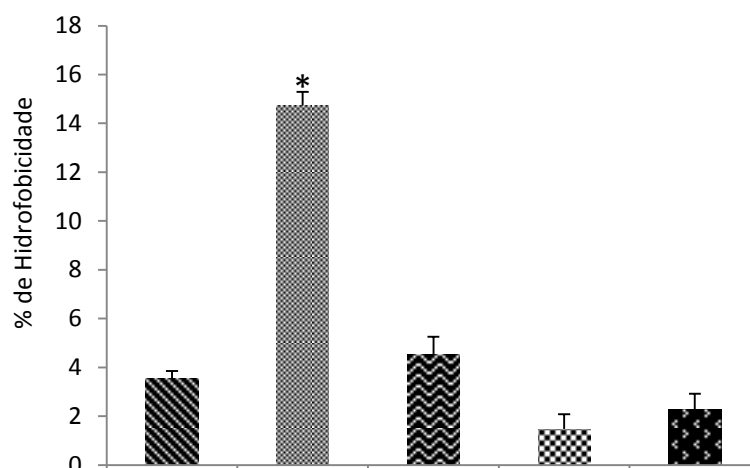


Figura 31 Percentual de hidrofobicidade de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por spray drying no tempo 0 de armazenamento, spray drying após 30 dias de armazenamento (-20°C), *B. longum* 5^{1A} livre fresca, *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada no tempo 0 de armazenamento e *B. longum* 5^{1A} livre e liofilizada após 30 dias de armazenamento (-20°C). * Há diferença significativa ($p < 0,05$).

Observou-se que as células microencapsuladas por *spray drying*, após 30 dias de armazenamento, apresentaram maior ($p < 0,05$) hidrofobicidade (14,72%) do que no tempo 0 (3,53%) ou do que as células livres frescas (4,52%), liofilizadas no tempo 0 (1,47%) ou após 30 dias de armazenamento (2,28%). Confirmando que o processo de liofilização tende a afetar a capacidade de adesão da célula.

Ou seja, o processo de microencapsulação por *spray drying* manteve o perfil hidrofóbico de *B. longum* 5^{1A} sem alteração significativa, pois tanto a célula livre quanto a célula microencapsulada por *spray drying* apresentaram valores iniciais estatisticamente iguais de hidrofobicidade. Além disso, a célula microencapsulada foi capaz de aumentar seu perfil hidrofóbico ao longo do armazenamento.

Esta característica pode estar relacionada ao fato do processo de secagem por *spray drying* apresentar um tempo de secagem extremamente curto (ANANDHARAMAKRISHNAN *et al.*, 2010), desta forma, existiria pouco tempo para que o micro-organismo apresentasse alguma alteração à secagem, e com isso, após ressuspensão, as bactérias secas por *spray drying* devem estar no mesmo estado fisiológico de antes do processo de secagem (IACONELLI *et al.*, 2015).

É difícil, no entanto, comparar os perfis de hidrofobicidade com os dados da literatura, uma vez que esse perfil é linhagem dependente (PAN, LI & LIU, 2006). Porém, Souza

(2012) avaliou a hidrofobicidade de *B. longum* 5^{1A} livre, encontrando valores médios de $24,4 \pm 3,05\%$. Ao comparar esta porcentagem de hidrofobicidade com a obtida no presente estudo observou-se que no armazenamento refrigerado as células microencapsuladas por *spray drying* tenderam a recuperar seu perfil hidrofóbico original. Além disso, o baixo valor inicial de hidrofobicidade encontrado para as células livres de *B. longum* 5^{1A} do presente estudo, quando comparado ao trabalho de Souza (2012), pode estar relacionado ao fato das culturas cedidas para o preparo do estoque terem sido fornecidas liofilizadas, ao passo que Souza (2012) usou culturas que não tinham passado pelo processo de liofilização.

É bem conhecido no meio científico que a liofilização afeta a atividade metabólica de muitas bactérias, como resultado das condições de *stress* (JAYAMANNE & ADAMS, 2006). E que esse *stress* promove diferentes respostas que são observadas no proteoma e ao nível de membrana como alterações em lipídeos da membrana (mudança do estado físico), que afetam a permeabilidade da mesma, ou como mudanças na estrutura de proteínas sensíveis na célula (CARVALHO *et al.*, 2003; MENG, *et al.*, 2008; WANG *et al.*, 2010).

Além disso, as altas temperaturas utilizadas no *spray drying* podem induzir o microorganismo a desenvolver uma resposta de tolerância ao *stress* (MORGAN, 2006) como produção de proteínas de choque térmico (chaperonas). O papel dessas proteínas é evitar ligações indesejáveis entre aminoácidos intracelulares, além de promoverem o enovelamento correto de polipeptídeos nascentes, a montagem de proteínas complexas e degradação e translocação de proteínas, e seu aumento favorece a atividade metabólica durante e após *spray drying*, sendo valiosas para fase de recuperação após secagem (FOSTER, 1991; DE ANGELIS & GOBBETTI, 2004; SHOKRI, 2015). Em estudo feito por Shakirova *et al.* (2010) foi reportado um aumento na hidrofobicidade da superfície celular em relação a um aumento no teor de proteínas celulares, detectada por espectroscopia FT-IR, em *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 e *Lactobacillus acidophilus* LA5.

Conclui-se então que a célula microencapsulada por *spray drying* teria melhor atuação no TGI, pois chegaria com contagem de células ainda aceitáveis ao intestino, tendo em vista os resultados do teste *in vitro* e com maior capacidade de aderir à mucosa tendo em vista seu aumento do perfil hidrofóbico.

5.12 Custos da microencapsulação

Segundo De Prisco & Mauriello (2016), o custo da microencapsulação de probióticos com diferentes técnicas, nunca foi revisado, embora muitos autores ressaltem ser um processo industrialmente viável (BURGAIN *et al.*, 2011).

Lorenz (2009) calculou os custos relativos à adição da cultura probiótica livre ou microencapsulada no sorvete a partir da cotação do pacote de cultura pura e liofilizada DVS LA-5, fornecida pela Christian Hansen Indústria e Comércio Ltda., e do rendimento da cultura livre em relação ao processo de microencapsulação por *spray drying*. Obtendo um incremento de R\$ 0,29/L para adição da cultura probiótica livre e de R\$ 9,21/L para adição da cultura microencapsulada ao sorvete.

Seguindo o raciocínio do referido autor para o cálculo de custo no presente trabalho, seria necessário usar como base o preço de uma cultura probiótica comercial. Tomando-se como base o preço atual do sachê de 25 g de uma cultura de bifidobacteria liofilizada da Christian Hansen® (R\$ 251,30 com 10^{11} UFC g^{-1}), essa quantidade seria suficiente para produzir 2.500 Kg de farinha de aveia probiótica com a concentração final de no mínimo 10^6 UFC g^{-1} , que é o mínimo requerido para exercer seus efeitos benéficos (TRIPATHI & GIRI, 2014). Com isso, o incremento adicional no preço da farinha de aveia com adição da cultura livre liofilizada seria de $\frac{R\$ 251,30}{2.500.000 \text{ g}} = R\$0,0001 /g$. Já 1 g da cultura de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada tem a concentração média de 10^7 UFC g^{-1} , e 25 g dessa cultura seria suficiente para produzir somente 250g de farinha de aveia probiótica. Assim, o incremento ao custo do grama da farinha de aveia pela adição da cultura microencapsulada seria de $\frac{R\$ 251,30}{250 \text{ g}} = R\$1,0052 /g$. É um aumento pequeno considerando o benefício da cultura probiótica microencapsulada, tendo em vista que, a microencapsulação foi essencial para a manutenção da sobrevivência e funcionalidade das células de *B. longum* 5^{1A} durante armazenamento e frente às condições simuladas do trato gastrintestinal.

No entanto, este é um cálculo simplista, pois não foram considerados gastos como preço e manutenção de equipamentos (*spray dryer* e liofilizador), consumo de energia, perdas de material ao longo do processamento ou secagem. Este, porém não foi o foco do presente trabalho, pois para fazer análise de custos também seria necessário aproximar os experimentos ao máximo da escala industrial para que o cálculo fosse representativo

da realidade e pudesse ser usado como parâmetro no uso ou não do *spray drying*. Porém, a planta piloto de *spray drying*, na qual é possível aumentar a escala, é muito cara (SCHUCK, 2013). Além disso, é difícil extrapolar análises de custos com equipamentos de escala laboratorial devido a diferença entre as dimensões dos equipamentos, rendimento em gramas, eficiência e parâmetros de secagem. Segundo Fu & Chen (2011), resultados obtidos em laboratório usando *spray drying* não podem ser aplicados para escala piloto ou industrial, por causa das diferenças nos equipamentos usados, resultando em considerável variação nos parâmetros de operação.

Já com relação à liofilização, essa tem custos de investimento e operacional muitas vezes maior, sendo sempre recomendável verificar a aplicabilidade do *spray*, preferindo sempre este caso não haja implicações de qualidade no produto seco. Outra vantagem do *spray* frente ao liofilizador é a produtividade, a qual é sempre muito superior na secagem por atomização (SCHUCK, 2013) e quando comparado a liofilização, *spray drying* representa menor custo com energia (HUANG *et al.*, 2017). Culturas secas são geralmente produzidas por liofilização. No entanto, liofilizadores em escala comercial são uma saída cara e a produção é baixa (ZAMORA *et. al.*, 2006). Já *spray drying* possui custos de processamento comercialmente viáveis, apresentando custo dez vezes inferior ao processo de liofilização (SCHUCK, 2013).

Assim, com base nos dados da literatura, percebe-se que a secagem por *spray drying* constitui um processo promissor alternativo à secagem por liofilização para produção de culturas bacterianas secas devido ao seu menor custo e maior taxa de produção (HUANG *et al.*, 2016).

CONCLUSÕES

As formulações de microcápsulas a base de alginato (quitosana e amido resistente) não foram eficazes na manutenção da sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} durante o armazenamento ou diante das condições simuladas do trato gastrointestinal. Além disso, são microcápsulas que apresentaram estrutura muito irregular, com possíveis células aparentes na superfície e sem recobrimento pelo material da matriz.

Os resultados demonstraram ser possível a microencapsulação de *B. longum* 5^{1A} por *spray drying* e a sua incorporação em farinha de aveia, por apresentarem microcápsulas que mantem a viabilidade do micro-organismo durante o armazenamento e são capazes de protegê-lo diante de condições simuladas do TGI. É um processo que não altera grandemente a permeabilidade da membrana e mantém a atividade enzimática da célula praticamente estável. Além de possibilitar à célula maior capacidade de adesão ao epitélio devido a recuperação no perfil de hidrofobicidade após a encapsulação. A microcápsula apresentou estrutura mais homogênea e com raras células sem recobrimento pelo material da matriz. Concluindo-se que, as microcápsulas produzidas por *spray drying* são adequadas para serem adicionadas em farinha de aveia e que as células se mantem estáveis neste produto durante os 90 dias de armazenamento avaliados.

Conclui-se também que a viabilidade através da enumeração de células em meio sólido não reflete fielmente o estado de injúria das mesmas, existindo uma limitação do método para investigação da funcionalidade, dos danos sub-letais ou injúria celular, comprovado pelos resultados apresentados pela análise de citometria de fluxo. Enfatiza-se, portanto, a necessidade de mais estudos sobre o impacto dos processos de microencapsulação sobre a funcionalidade dos micro-organismos e não somente viabilidade.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMINE, K.M.; STÉPHANE, C.P.; RAYMOND, Y.; GELAIS, D.; BRITTEN, M.; FUSTIER, P.; SALMIERI, S. & LACROIX, M. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*, n.37, p.193-199, 2014.

AMOR, K.B.; BREEUWER, P.; VERBAARSCHOT, F.M.; ROMBOOTS, A.D.; AKKERMANS, W.M.; DE VOS & ABEE, T. Multiparametric flow cytometry and cell sorting for the assessment of viable, injured, and dead bifidobacterium cells during bile salt stress. *Applied and Environmental Microbiology*, n. 68, p.5209–5216, 2002.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C.; GIMBUN, J.; STAPLEY, A.G.F & RIELLY, C.D. A study of particle histories during *spray drying* using computational fluid dynamic simulations. *Drying Technology*, v. 28, n. 5, p. 566-576, 2010.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.; MOREAU, D.L.; ALLAN-WOJTAS, P.M. & HANSEN, L.T. Effect of process variables on particle size and viability of *Bifidobacterium lactis* Bb-12 in genipin-gelatin microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v.24, p. 152–162, 2007.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D. & HANSEN, L.T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*. v. 41, p.184–193, 2008.

ANAL, A.K & SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. *Trends in Food Science and Technology*, v.18, p. 240-251, 2007.

ANANTA, E., VOLKERT, M., & KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spraydried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International Dairy Journal*, n.15, p.399–409, 2005.

ARENA, M.P.; RUSSO, P.; CAPOZZI, V.; RASCÓN, A.; FELIS, G.R.; SPANO, G. & FIOCCO, D. Combinations of cereal β -glucans and probiotics can enhance the anti-inflammatory activity on host cells by a synergistic effect. *Journal of Functional Foods*, n.23, p.12–23, 2016.

AUGUSTIN, M.A & HEMAR, Y. Nano- and micro-structured assemblies for encapsulation of food ingredients. *Chemical Society Reviews*, v.38, p. 902-912, 2009.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: aplicação a tecnologia de alimentos. *Alimentos e Nutrição*, v.16, p. 89-97, 2005.

BARER, M.R.; GRIBBON, L.T.; HARWOOD, C.R; NWOGUH, C.E. The viable but nonculturable hypothesis and medical microbiology. *Reviews in Medical Microbiology*, v.4, p.183–191, 1993.

BEALES N. Adaptation of microorganisms to cold temperatures, weak acid preservatives, low pH, and osmotic stress: A review. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, n.3(1), p.1–20, 2004.

BELITZ, H.D.; GROSCH, W. & SCHIEBERLI, P. *Food Chemistry*. Ed. 3, Springer, New York, 2009.

BERNAL, O. L. M. Desenvolvimento de uma bebida fermentada a partir de extrato hidrossolúvel de soja, contendo agentes probióticos e prebióticos. 2004. 103 f. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

BERTHO, ÁLVARO LUIZ. “Citometria de fluxo.” *FIOCRUZ*, Rio de Janeiro, 2001.

BIBILONI, R.; PEREZ, P.F.; GARROTE, G.L; DISALVO, E.A. & DE ANTONI, G.L. Surface characterization and adhesive properties of bifidobacteria. *Methods in Enzymology*, v. 336, p.411 – 427, 2001.

BICUDO, M.O.P. Composição fenólica, atividade antioxidante e microencapsulação de frutos de juçara (*Euterpe edulis*): aspectos de interesse para a indústria de alimentos. Tese de doutorado, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Federal do Paraná, 2014.

BINDELS, L.B.; DELZENNE, N.M; CANI, P.D. & WALTER, J. Towards a more comprehensive concept for prebiotics. *Nature Reviews: Gastroenterology and Hepatology*. n.12(5), p.303–310, 2015.

BOONYAI, P.; BHANDARI, B. & HOWES, T. Stickiness measurement techniques for food powders: a review. *Powder Technology*, n.145, p.34-46, 2004.

BORGES, S.; BARBOSA, J.; CAMILO, R.; CAMILO, A.; SILVA, J.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; TEIXEIR, P. & FREITA, A.A. Effects of encapsulation on the viability of probiotic strains exposed to lethal conditions. *International Journal of Food Science and Technology*, n.47, p.416–42, 2012.

BOSCARIOLLI, M.P.M. Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete. Dissertação de Mestrado. Engenharia de Processos Químicos e Bioquímicos, Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, 2010.

BOZA, Y.; BARBIN, D. & SCAMPARINI, A. R. P. Effect of *spray-drying* on the quality of encapsulated cells of *Beijerinckia sp.* *Process Biochemistry*, v. 39, p.1275 – 1284, 2004.

BRASIL. ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Aprova Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 26 dez. 2003. Disponível em: <<http://e-legis.anvisa.gov.br/leisref/public/showAct.php?id=9058>>. Acesso em: 26 de julho de 2015.

BRASIL. ANVISA (Agencia Nacional de Vigilância Sanitária). Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos: lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Atualizado em julho 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em: 12 de julho de 2015.

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*, n.103, p.123–128, 2011.

BRUNO, F. A. & SHAH, N. P. Viability of two freeze-dried strains of *Bifidobacterium* and commercial preparations at various temperatures during prolonged storage. *Food Microbiology and Safety*, n. 68, p. 2336–2339, 2003.

BURGAIN, J.; GAIANI, C. & LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*. v.104, p.467–483, 2011.

CANZI, E.; GUGLIELMETTI, S.; MORA, D.; TAMAGNINI, I. & PARINI, C. Conditions affecting cell surface properties of human intestinal bifidobacteria *Antonie van Leeuwenhoek. Springer*. v. 88, p. 207 – 219, 2005.

CAPELA, P.; HAY, T.K.C. & SHAH, N.P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-dried yoghurt. *Food Research International*, v.39, p.203–211, 2006.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. *et al.* *Bifidobacterium Bb-12* microencapsulated by *spray-drying* with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, n.2, p.186-193, 2012.

CARRARO, T.C.M.M. DESENVOLVIMENTO, CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E BIOLÓGICA DE NANOPARTÍCULAS POLIMÉRICAS CONTENDO ANFOTERICINA B. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Unicentro, Guarapuava, Paraná, 2013.

CARVALHO, A. S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F. X. & GIBBS, P. Effect of different sugars added to the growth and drying medium upon thermotolerance and survival during storage of freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. *Biotechnology Progress*, n. 20, p.248–254, 2003.

CARVALHO, A.S.; SILVA, J.; HO, P.; TEIXEIRA, P.; MALCATA, F.X. & GIBBS, P. Relevant factors for the preparation of freeze-dried lactic acid bacteria. *Intrnational Dairy Journal*, n.4, p.835–47, 2004.

CHAMPAGNE C. P. & FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. *Current Opinion in Biotechnology*, v.18, p.184–190, 2007.

CHAMPAGNE, C.P. & RAYMOND, Y. The use of flow cytometry to accurately ascertain total and viable counts of *Lactobacillus rhamnosus* in chocolate. *Food Microbiology*, n. 46, p.176-183, 2015.

CHARTERIS W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. & COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p.759 – 768, 1998.

CHARALAMPOPOULOS, D.; WANG, R.; PANDIELLA, S.S & WEBB, C. Application of cereals and cereal components in functional foods: a review. *International Journal of Food Microbiology*, n.15; p.131–141, 2002.

CHARTERIS W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L. & COLLINS, J.K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. *Journal of Applied Microbiology*, v. 84, p.759 – 768, 1998.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F. & VILLARÁN, M.C. 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, S.; FERGUSON, L.R.; SHU, Q. & GARG, S. The application of flow cytometry to the characterisation of a probiotic strain *Lactobacillus reuteri* DPC16 and the evaluation of sugar preservatives for its lyophilization. *LWT - Food Science and Technology*, n.44, p.1873-1879, 2011.

CHEOW, W.S.; KIEW, T.Y. & HADINOTO, K. Effects of adding resistant and waxy starches on cell density and survival of encapsulated biofilm of *Lactobacillus rhamnosus* GG Probiotics. *LWT - Food Science and Technology*, n.69, p.497-505, 2016.

CHEVILLE N.F. & STASKO J. Techniques in electron microscopy of animal tissue. *Veterinary Pathology*, p. 1 – 14, 2013.

COOK, M.T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. & KHUTORYANSKIY, V.V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery: review. *Journal of Controlled Release*, v.162 , p. 56 - 67, 2012.

CONRAD, P. B.; MILLER, D. P.; CIENLENSKI, P. R. & PABLO, J. J. Stabilizations and preservation of *Lactobacillus acidophilus* in saccharide matrices. *Cryobiology*, n.41, p.17–24, 2000.

CRITTENDEN, R.; LAITILA, A.; FORSSELL, P.; MATTTO, J.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T. & MYLLÄRINEN, P. Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. *Applied and Environmental Microbiology*, n.8, p.3469–3475, 2001.

CROWE, J.H. *et al.* Stabilization of dry phospholipid bilayers and proteins by sugars. *Biochemical Journal*, v. 242, n. 1, p. 1, 1987.

DAVE, R.I. & SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. *International Dairy Journal*, v.7, p.31-41. 1997.

DAVEY, H. M. Life, death, and in-between: meanings and methods in microbiology. *Applied and Environmental Microbiology*, v.77, p. 5571-5576, 2011a.

DAVEY, H. M. & P. HEXLEY. Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environmental Microbiology*, v.13, p.163–171, 2011b.

DE ANGELIS, M. & GOBBETTI, M. Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics*, v. 4, p. 106–122, 2004.

DEL RE, B.; SGORBATI, B.; MIGLIOLI, M. & PALENZONA, D. Adhesion, autoaggregation and hydrophobicity of 13 strains of *Bifidobacterium longum*. *Letters in Applied Microbiology*, v. 31, p. 438 – 442, 2000.

DELUDE, RUSSELL L. “Flow cytometry.” *Critical care medicine*, S426-S428, 2005.

DE KRUIF, C. G. & HOLT, C. Casein micelle structure, functions and interactions. In P. L. H. McSweeney & P. F. Fox (Eds.), *Advanced dairy chemistry*, v. 1, p. 233–276, 2003. New York, NY: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

DE PRISCO, A. & MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. *Trends of Food Science and Technology*, n.48, p.27–39, 2016.

DE VOS, P.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M. & SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. *International Dairy Journal*, v.20, p.292–302, 2010.

DIANAWATI, D & SHAH, N. Enzyme Stability of Microencapsulated *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* Bb12 after Freeze Drying and during Storage in Low Water Activity at Room Temperature. *Journal of Food Science*, v.76, n.6, 2011.

DIANAWATI, D. Survival of encapsulated probiotic bacteria during storage at low water activity at ambient temperature. Thesis. College of Health and Biomedicine. Victoria University, Australia, 2014.

DÍAZ, M.; HERRERO, M.; GARCÍA, L.A. & COVADONGA, Q. Application of flow cytometry to industrial microbial bioprocesses., vol. 48, n. 3, p. 385-407, 2010.

DICKS, L.M.T. & BOTES, M. Probiotic lactic acid bacteria in the gastro-intestinal tract: health benefits, safety and mode of action. *Benefices Microbes*, n.1, p.11-29, 2010.

DING, W.K. & SHAH, N.P. An improved method of microencapsulation of probioticobacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. *Journal Of Food Science*, n.74, 2009.

DOHERTY, S.B.; WANG, L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; & BRODKORB, A. Use of viability staining in combination with flow cytometry for rapid viability assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG in complex protein matrices. *Journal of Microbiological Methods*, n.82, p.301–310, 2010.

DONATO, L. & GUYOMARC'H, F. Formation and properties of the whey protein/casein complexes in heated skim milk - A review. *Dairy Science & Technology*, EDP sciences/Springer, n. 89 (1), p.3-29, 2009.

ETCHEPARE, M.A.; RADDATZ, G.C.; CICHOSKI, A.J.; FLORES, E.M.M.; BARIN, J.S.; ZEPKA, L.Q.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C.R.F. & MENEZES, C.R. Effect of resistant starch (Hi-maize) on the survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. *Journal of Functional Foods*, n. 21, P. 321–329, 2016.

FALEIRO, L.R., PEREIRA, B.S, LACERDA, IC., NICOLI, J.R., SOUZA, T.C., NUNES, A.C., ET AL. Influence of different strains of *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yogurt starter cultures on selective enumeration of *Bifidobacterium* spp. *African Journal of Microbiology Research*, n.9, p.373 -281, 2015.

FAO/WHO (Food and Agriculture Organization/World Health Organization). *Working Group Report on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food*. Londres, Ontario, Canada: FAO/WHO, 11, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C. S. & GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. *Journal of Microencapsulation*, v. 19, p. 485-494, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; PINHO, S.C. & ROCHA, G.A.; Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. *Brazilian Journal of Food Technology*, v.11, p.103-112, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; HEINEMANN, R.J.B. & PEDROSO, D.L. Review: Developments in probiotic encapsulation. *CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, v. 6, n° 004, 2011.

FERREIRA, A.A.P. & YAMANAKA, H. Microscopia de força atômica aplicada em imunoensaios. *Quimica Nova*, v. 29, p.137-142, 2006.

FONSECA, J.F. Efeito de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* WpK4 em giardíase experimental. Dissertação de Mestrado, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, 2015.

FOGH, J.; FOGH, J.M. & ORFEO, T. One hundred and twenty seven cultured tumor cell lines producing tumors in nude mice. *Journal of National Cancer Institute*. v. 59, p. 221 – 226, 1977.

FORONI, E.; SERAFINI, F.; AMIDANI, D.; TURRONI, F.; HE, F.; BOTTACINI, F.; MOTHERWAY, M.O.; VIAPPANI, A.; ZHANG, Z.; RIVETTI, C.; SINDEREN, D.V. & VENTURA, M. Genetic analysis and morphological identification of pilus-like structures in members of the genus *Bifidobacterium*. *Microbial Cell Factories*, n.10, 2011.

FOSTER, JOHN W. Salmonella acid shock proteins are required for the adaptive acid tolerance response. *Journal of Bacteriology*, v. 173, n. 21, p. 6896-6902, 1991.

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

FUENTES-ZARAGOZA, E.; RIQUELME-NAVARRETE, M.J.; SÁNCHEZ-ZAPATA, E. & PÉREZ-ÁLVAREZ, J.A. Resistant starch as functional ingredient: A review. *Food Research International*, v.43, p.931–942, 2010.

FU, N., & CHEN, X. D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying process. *Food Research International*, n.44, p.1127-1149, 2011.

GAIANI, C.; MORAND, M.; SANCHEZ, C.; TEHRANY, E.A.; JACQUOT, M.; SCHUCK, P.; JEANTET, R.; SCHER, J. How surface composition of high milk proteins powders is influenced by spray-drying temperature. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, n.75, p.377–384, 2010.

GANDHI, A. & SHAH, N.P. Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. *Food microbiology*, n. 49, v.8, p.197-202, 2015.

GARCÍA-CAYUELA, T.; KORANY, A. M.; BUSTOS, I.; DE CADIÑANOS, L. P. G.; REQUENA, T.; PELÁEZ, C. & MARTÍNEZ-CUESTA, M. C. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. *Food Research International*, v. 57, p. 44 - 50, 2014.

GARDINER, G.E.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A.E; FITZGERALD, G.F; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P. & STANTON C. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. *Applied and Environmental Microbiology*, n.6, p.2605-2612, 2000.

GBASSI, G. K. & VANDAMME, T. Probiotic encapsulation technology: From microencapsulation to release into the gut. *Pharmaceutics*, v.4, p.149-163, 2012.

GENG, J.; CHIRON, C. & COMBRISSE, J. Rapid and specific enumeration of viable Bifidobacteria in dairy products based on flow cytometry technology: A proof of concept study. *International Dairy Journal*, v.37, n.1, p. 1-4, 2014.

GIBSON, G. R. & ROBERFROID, M. B. Dietary modulation of the human colonic microbiota: introducing the concept of prebiotics. *Journal Nutrition*, v.125, n.6, p.1401-1412, 1995.

GIRGIS, H.S.; SMITH, J.; LUCHANSKY, J.B. & KLAENHAMMER, T.R. Stress adaptations of lactic acid bacteria. In: Microbial adaptation to stress and safety of new-generation foods. Yousef, A.E. and Juneja, V.K. (eds.): CRC Press, NY. p. 159-212, 2002.

GOMBOTZ, W.R. & WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. *Advanced Drug Delivery Reviews*, v. 31, p. 267- 285, 1998.

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.

GROSSO, C.R.F. & FAVARO-TRINDADE, C.S. Stability of free and immobilized *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in acidified milk and of immobilized *B. lactis* in yogurt. *Brazilian Journal of Microbiology*, v.35, p.151 – 156, 2004.

GUERGOLETTO, K.B. Desenvolvimento de simbiótico à base de *Lactobaccillus casei* aderido a fibras vegetais desidratadas. Dissertação de Mestrado, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Estadual de Londrina, 2009.

GUERRA, P.V.; LIMA, L.N.; SOUZA, T.C.; MAZOCHI, V.; PENNA, F.J.; SILVA, A.M.; NICOLI, J.R. & GUIMARAES, E.V. Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: a crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal of Gastroenterology*, v.17, p. 3916-3921, 2011.

GUGLIELMETTI, S.; TAMAGNINI, I.; MINUZZO, M.; ARIOLI, S.; PARINI, C.; COMELLI, E. & MORA, D. Study of the adhesion of *Bifidobacterium bifidum* MIMBb75 to human intestinal cell lines. *Current Microbiology*, v. 59, p. 167-172, 2009.

HANSEN, L.T.; WOJTAS, P.M.A.; JIN, Y.L. & PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulates *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v.19, p.35-45, 2002.

HOLKEM, A.T.; RADDATZ, G.C.; NUNES, G.L.; CICHOSKI, A.J.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C.R.F.; MENEZES, C.R. Development and characterization of alginate microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 produced by emulsification/internal gelation followed by freeze drying, *LWT - Food Science and Technology*, n.71, p.302-308, 2016.

HOMAYOUNI, A.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; YARMAND, M. S., & RAZAVI, S. H. Effect of microencapsulation and resistant starch on the probiotic survival and sensory properties of symbiotic ice cream. *Food Chemistry*, n.11(1), p. 50–55, 2008.

HORNE, D.S. Casein micelle structure and stability. In A. Thompson, M. Boland, & H. Singh (Eds.), *Milk proteins: From expression. To food* (pp. 133 e 179). San Diego: Academic Press. 2009.

HOWLAND, R. & BENATAR, L.. *A Practical Guide to Scanning Probe Microscopy*, Park Scientific Instruments, 2000.

HUANG, S. & CHEN, X.D. Significant effect of Ca²⁺ on improving the heat resistance of lactic acid bacteria. *FEMS Microbiology Letters*, n.344, p. 31–38, 2013.

HUANG, S.; YANG, Y.; FU, N.; QIN, Q.; ZHANG, L. & CHEN, X.D. Calcium-aggregated milk: a potential new option for improving the viability of lactic acid bacteria under heat stress. *Food and Bioprocess Technology*, v.7, p. 3147–3155, 2014.

HUANG, S.; RABAH, H.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V.; PARAYRE, S.; MAILLARD, M.; LE LOIR, Y.; CHEN, X.D.; SCHUCK, P.; JEANTET, R. & JANB, G. Hyperconcentrated sweet whey, a new culture medium that enhances *Propionibacterium freudenreichii* stress tolerance. *Applied and Environmental Microbiology*, n.15, p. 4641-4651, 2016.

HUANG, S.; VIGNOLLES, M.-L.; CHEN, X.D.; LE LOIR, Y.; JAN, G.; SCHUCK, P. & JEANTET, R. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, n.x, p. x-x, 2017.

HUI, Y.H. & EVRANUZ, E.O. *Handbook of Plant-Based Fermented Food and Beverage Technology*. Taylor & Francis Group, New York, 2012.

IACONELLI, C.; LEMETAIS, G.; KECHAOU, N.; CHAIN, F.; BERMÚDEZ-HUMARÁN, L.G.; LANGELLA, P.; GERVAIS, P. & BENEY L. Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of biotechnology*, v. 214, p. 17-26, 2015.

IN VITRO TECHNOLOGIES. Bunchi B290 Mini Spray dryer. Disponível em: <<https://industrialscience.invitro.com.au/products/s/BU44699/Buchi-B290-Mini-spray-dryer/>>. Acesso em: 14/03/2017.

JAHAN-TIGH, R.R.; RYAN, C.; OBERMOSER, G. & SCHWARZENBERGER, K. "Flow cytometry." *Journal of Investigative Dermatology*, 2012.

JAYAMANNE, V.S. & ADAMS, M.R. Determination of survival, identity and stress resistance of probiotic bifidobacteria in bio-yoghurts. *Letters in Applied Microbiology*, n.42, p.189-94, 2006.

JAYALALITHA, V.; PALANI, D.R.; DHANALAKSHMI, B.; ELANGO, A. & NARESH, K.C. Yoghurt with encapsulated probiotics. *Wayamba Journal of Animal Science*, p.65-68, 2011.

JEPRAS, R I; CARTER, .; PEARSON, S.C.; PAUL, F.E. & WILKSON, M.J. Development of a robust flow cytometric assay for determining numbers of viable bacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, v. 6, n.7, p.2696-2701, 1995.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. *Current Issues in Intestinal Microbiology*, v.3, p.39-48, 2002.

KATARIA , J.; NAN, L.; WYNN, J.L. & NEU, J. Probiotic microbes: do they need to be alive to be beneficial? *Nutrition Review*, v.67, 546–550, 2009.

KESTENBACH, H. & BOTTA FILHO, W.J. *Microscopia electronica: transmissão e varredura*. São Paulo: Associação Brasileira de Metais, 1989.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B. & DEETH, H. Review Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v.13, p.3–13, 2003.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B. & DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, v.14, p.737–743, 2004.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B. & DEETH, H.C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. *LWT- Food Science and Technology*, v.39, p.177–183, 2006.

KRASAEKOOPT, W. & WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads

coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, v.57, p. 761 e 766, 2014.

KUNTSCHEA, J.; HORSTB, J.C. & BUNJES. H. Cryogenic transmission electron microscopy (cryo-TEM) for studying the morphology of colloidal drug delivery systems. *International Journal of Pharmaceutics*, v.417, p. 120– 137, 2011.

KWON, H.S.; YANG, E.H.; LEE, S.H.; YEON, S.W.; KANG, B.H., & KIM, T.V. Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbioly Letters*, 250, 55-62, 2005.

LEAHY, S.C.; HIGGINS, D.G.; FITZGERALD, G.F.; van SIDEREN, D. Getting better with bifidobactéria. *Journal of Applied Microbiology*, v98, p.1303-1315, 2005.

LEBEER, S.; VANDERLEYDEN, J. & DE KEERSMAECKER, S.C.J. Genes and molecules of lactobacilli supporting probiotic action. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, n.4, p 728–764, 2008.

LESLIE, S.B.; ISRAELI, E.; LIGHTHART, B.; CROWE, J.H. & CROWE, L.M. Trehalose and sucrose protect both membranes and proteins in intact bacteria during drying. *Applied and Environmental Microbiology*, n.61 (10), p. 3592–3597, 1995.

LEROY, F. & VUYST, L. Lactic acid bacteria as functional starter cultures for the food fermentation industry. *Trends in Food Science & Technology*, v.15, p.67-78, 2004.

LIONG, M. Probiotics: A Critical review of their potential role as antihypertensives, immune modulators, hypocholesterolemics, and perimenopausal treatments. *Nutrition Reviews*, v. 65, p. 316-328, 2007.

LY, M.H.; NAÏTALI-BOUCHEZ, M.; MEYLHEUC,T.; BELLON-FONTAINE, M.-N.; LE, T.M.; BELIN, J.-M. & WACHÉ, Y. Importance of bacterial surface properties to control the stability of emulsions, *International Journal of Food Microbiology*, n.112, p.26–34, 2006.

LORENZ, J.G. Comparação dos métodos de emulsificação e *spray drying* na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (la-5) e aplicação em sorvete. Dissertação de Mestrado. Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, 2009.

MALKKI, Y. & VIRTANEN, E. Gastrointestinal effects of oat bran and oat gum. A review. *Food Science and Technology*, v. 34, n.6, p. 337 – 347, 2001.

MALMUD, L.S.; FISHER, R.S.; KNIGHT, L.C. & ROCK, E. Scintigraphic evaluation of gastric emptying. *Seminars in Nuclear Medicine*, v.12, p. 116–125, 1982.

MARTIN-DIANA, A. B.; JANER, C.; PELAEZ, C. & REQUENA, T. Development of a fermented goat's milk containing probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 13(10), 27–833, 2003 apud NARDI, R.M.D.; NEVES, M.J. & NICOLI, J.R. Utilização de leveduras como probióticos. *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v.5, p.1-13, 2005.

MARTIN-DEJARDIN, F., EBEL, B., LEMETAIS, G., NGUYEN THI MINH, H., GERVAIS, P., CACHON, R., et al. A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, n.49, p.166-174, 2013.

MARTIN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A., & MORALES, M. E. Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716. *Lwt - Food Science and Technology*, n.53, p.480-486, 2013.

MASELLI, L & HEKMAT, S. Microbial vitality of probiotic milks supplemented with cereal or pseudocereal grain flours. *Journal of Food Research*; v.5, n.2, 2016.

MATALANIS, A.; JONES, O.G. & MCCLEMENTS, D.J. Structured biopolymer-based delivery systems for encapsulation, protection, and release of lipophilic compounds. *Food Hydrocolloids*, v.25, p.1865-1880, 2011.

MAZOCHI, V. Produção de iogurte probiótico com leite de cabra adicionado de *Bifidobacterium* spp. Dissertação de mestrado. Tecnologia de Alimentos, Centro Universitário de Belo Horizonte, 2009.

MCKNIGHT, C. A.; KU, A. & GOOSEN, M. F. A. Synthesis of chitosan-alginate microencapsule membranes. *Journal of Bioactive and Compatible Polymers*, v.3, p. 334–354, 1988. apud KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. *International Dairy Journal*, v.13, p.3–13, 2003.

MEDICAL UNIVERSITY OF SOUTH CAROLINA. What is flow cytometry ? Disponível em: < <http://regmed.musc.edu/flowcytometry/flowcytometry.html> > Acesso em: 14/03/2017.

MEILE, L.; BLAY, G.L.; THIERRY, A. Safety assessment of dairy microorganism: *Propionibacterium* and *Bifidobacterium*. *International Journal of Food Microbiology*. v.126, p.316-320, 2008.

MENG, X.C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; DALY, C. & ROSS, R.P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. *Food Chemistry*, n.106, p.1406–1416, 2008.

MENSHUTINA, N.; GORDIENKO, M. & VOINOVSKIY A. Spray drying of probiotics: process development and scale-up. *Drying Technology*, n.28, p.1170–7, 2010.

MOKARRAM, R.R.; MORTAZAVI, S.A.; HABIBI, M.B.N. & SHAHIDI, F. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. *Food Research International*, v.42, p.1040–1045, 2009.

MONDRAGÓN-BERNAL, O. L.; MAUGERI FILHO, F. ; ALVES, J. G. L. F. ; Rodrigues, Maria Isabel . Synbiotic Soy Beverages: Principles and Sensory Attributes. In: Hui, Y. H.. (Org.). *Handbook of Plant-Based Fermented Foods and Beverages*, Second Edition. 2ed. Boca Raton/Florida: CRC Press-Taylor & Francis Group, 2012, v. 1, p. 103-130.

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

MORRIS, V.J.; KIRBY, A.R. & GUNNING, A.P. *Atomic force microscopy for biologists*. London: Imperial College Press), 1999.

NEBE-VON-CARON, G.; STEPHENS, P.J.; HEWITT, C.J.; POWELL, J.R. & BADLEY, R.A. Analysis of bacterial function by multi-colour fluorescence flow cytometry and single cell sorting, *Journal of Microbiology Methods*, n. 42, p.97–114. 2000.

NICOLI, J.R. & VIEIRA, L.Q. Microbiota gastrointestinal normal na doença e na saúde. In: CASTRO, L.P.; COELHO, L.G.V. (Eds.). *Gastroenterologia*, Rio de Janeiro: Médica e Científica Ltda, p. 1037-1047, 2004.

NISSIM, G. Delivery and controlled release of bioactives in foods and nutraceuticals. woodhead publishing in food science, *Technology and Nutrition*, 2008.

OLIVARES, M.L.; PASSEGGI., M.C.G.; FERRÓN, J.; ZORRILLA, S.E. & RUBIOLO, A.C. Study of milk/k-carrageenan mixtures by atomic force microscopy. *Food Hydrocolloids*, n.24, p.776-782, 2010.

OLIVEIRA, C.A. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsuladas por coavervação, seguida de secagem por *spray drying* e leite de jorro. Dissertação de Mestrado, Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade de São Paulo, 2006.

OUANEZAR, M.; GUYOMARC'H, F. & BOUCHOUX, A. AFM Imaging of milk casein micelles: evidence for structural rearrangement upon acidification. *Langmuir*, n.28, p.4915-4919, 2012.

PAN, W.H.; LI, P.L. & LIU, Z. Food microbiology: The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, v.12(3), p.148 – 152, 2006 .

PEDERSEN, K. & TANNOCK, G.W. Colonization of the porcine gastrointestinal tract by lactobacilli. *Applied Environmental Microbiology*, v. 55, p. 279 – 283, 1989.

PENNER, R; FEDORAK, R.N. & MADSEN, K.L. Probiotics and nutraceuticals: non-medicinal treatments of gastrointestinal disease. *Current Opinion in Pharmacology*, v.5, p.596-603, 2005.

PEREIRA, B.S. Seleção de meio de cultura para determinação da viabilidade de bifidobactérias durante a vida de prateleira de bebida láctea fermentada com soro de leite nanofiltrado. Dissertação de Mestrado. Ciência de Alimentos, Universidade Federal de Minas Gerais, 2012.

PEREIRA, C. R. Estudo da aplicação da citometria de fluxo (D-count®) na avaliação higiênica de superfícies e na pesquisa de *Bacillus cereus* e *Escherichia coli*. Dissertação de Mestrado. Engenharia Biológica, Universidade do Minho, UM, 2014.

PICOT, A. & LACROIX, C. Production of multiphase water insoluble microcapsules for cell microencapsulation using an emulsification/spray-drying technology. *Journal of Food Science*, v.68, p.2693 – 2700, 2003.

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

PRASANNA, P. H. P.; GRANDISON, A. S. & CHARALAMPOPOULOS, D. Bifidobacteria in milk products: An overview of physiological and biochemical properties, exopolysaccharide production, selection criteria of milk products and health benefits. *Food Research International*, n. 55, p.247-262, 2014.

PRATEADA, M.L.J. Microorganismos probióticos encapsulados en polímeros microbianos: evaluación de la capacidad protectora de la encapsulación para su administración oral. Tese (Doutorado em Microbiologia). Faculdade de Farmacia, Universidade de Granada, 2010.

RAHMAN, M.D.; KIM, W.S; KUMURA, H. & SHIMAZAKI, K. Autoaggregation and surface hydrophobicity of bifidobacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, v. 24, n. 8, p. 1593-1598, 2008.

RAMIAH, K.; VAN REENEN, C.A. & DICKS, L.M. Surface-bound proteins of *Lactobacillus plantarum*423 that contribute to adhesion of Caco-2 cells and their role in competitive exclusion and displacement of *Clostridium sporogenes* and *Enterococcus faecalis*. *Research in Microbiology*, v. 159, p. 470 – 475, 2008.

RATHORE, S.; DESAI, P.M.; LIEW, C.V.; CHAN, L.W.; HENG, P.W.S. Review Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, n.116, p.369–381, 2013.

RAYMENT, P.; WRIGHT, P.; HOAD, C.; CIAMPI, E.; HAYDOCK, D.; GOWLAND, P. & BUTLER, M.F. Investigation of alginate beads for gastro-intestinal functionality, Part 1: In vitro characterization. *Food Hydrocolloids*, v. 23, p. 816–822, 2009.

RENSING, K. Artifacts in cryo preparation for Electron Microscopy. *Microscopy Microanalysis*, n.22, 2016.

RIVEROS, B., FERRER, J., & BORQUEZ, R. Spray-drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, n.27, p.123–132, 2009.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; MALCATA, F.X.; LOBO, J.M.S.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H. & FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. *International Dairy Journal*, v.21, p.869-976, 2011a.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; MALCATA, F.X.; LOBO, J.M.S.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H. & FREITAS, A.C. On the viability of five probiotic strains when immobilized on various polymers. *International Journal of Dairy Technology* v. 64, p.137-144, 2011b.

ROKKA, S. & RANTAMÄKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. *European Food Research and Technology*, v.231, p.1–12, 2010.

ROSS, R.P.; DESMON, C.; FITZGERAL, G.F. & STANTO, C. REVIEW: Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. *Journal of Applied Microbiology*, v.98, p.1410–1417, 2005.

RUSSO, C.J. & PASMORE, L.A. Progress towards an optimal specimen support for electron cryomicroscopy. *Current Opinion in Structural Biology*, n.37, p.81–89, 2016.

SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G. & FARIA, J.A.F. *Probióticos e prebióticos em alimentos: fundamentos e aplicações tecnológicas*. 1ª ed. São Paulo: Varela, 669 p., 2011.

SAARELA, M; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J. & MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. *Journal of Biotechnology*. v. 84, p. 197-215, 2000.

SAARELA, M.; VIRKAJARVI, I.; ALAKOMI, H.L.; MATTILA-SANDHOLM, T.; VAARI, A.; SUOMALAINEN, T. & MATTO, J. Influence of fermentation time, cryoprotectant and neutralization of cell concentrate on freeze-drying survival, storage stability, and acid and bile exposure of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* cells produced without milk-based ingredients, *Journal of Applied Microbiology*, v.99, p.1330–1339, 2005.

SADEK, C.; LI, H.; SCHUCK, P.; FALLOURD, Y.; PRADEAU, N.; FLOCH-FOUERE, C.L. & JEANTET, R. To what extent do whey and casein micelle proteins influence the

morphology and properties of the resulting powder? *Drying Technology*, n. 32, p.1540-1551, 2014.

SALAR-BEHZADI, S.; WU, S.; TOEGEL, S.; HOFRICHTER, M.; ALTENBURGER, I.; UNGER, F.M.; WIRTH, M. & VIERNSTEIN, H. Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Research International*, v.54, p.93–10, 2013.

SANCHEZ, B.; FERNANDEZ-GARCIA, M.; MARGOLLES, A.; DE LOS REYES-GAVILAN, C.G. & RUAS-MADIEDO, P. Technological and probiotic selection criteria of a bile-adapted *Bifidobacterium animalis* subsp *lactis* strain. *International Dairy Journal*, n.20, p.800–805, 2010.

SCHADLER, S; BURKHARDT, C. & KAPPLER, A. Evaluation of electron microscopic sample preparation methods and imaging techniques for characterization of cell-mineral aggregates. *Geomicrobiology Journal*, n.25, p.228–239, 2008.

SCHUCK, P.; DOLIVET, A.; MÉJEAN, S.; HERVÉ, C. & JEANTET, R. Spray drying of dairy bacteria: New opportunities to improve the viability of bacteria powders. *International Dairy Journal*, n.1, p.12-17, 2013.

SHAKIROVA, L.; AUZINA, L.; ZIKMANIS, P.; GAVARE, M. & GRUBE, M. Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* cells and characteristics by FT-IR spectra. *Spectroscopy*, v.24, p.251–255, 2010.

SHAPIRO, H.M.: *Practical Flow Cytometry*. edn 4. New York: Wiley-Liss; 2003.

SHARMA, A.; YADAV, B.S. & RITIKA, Resistant starch: physiological roles and food applications. *Food Reviews International*, v. 24, p. 194 – 234, 2008.

SHOKRI, Z., FAZELI, M.R., ARDJMAND, M., MOUSAVI, S.M., & GILANI, K. Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*. n.23, 2015.

SILVA, J.; FREIXO, R.; GIBBS, P & TEIXEIRA, T. Spray drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, v. 64, 2011.

SIMPSON, P. J.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F. & ROSS, R. P. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray-drying and storage. *Journal of Applied Microbiology*, n.99, p.493–501, 2005.

SMIDSRØD, O. & SKJAK-BRÆK, G. Alginate as immobilization matrix for cells. *Trends in Biotechnology*, v.8, p.71–78, 1990.

SOUZA, T.C.; ZACARÍAS, M.F.; SILVA, A.M.; BINETTI, A.; REINHEIMER, J.; NICOLI, J.R. & VINDEROLA, G. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 5^{1A} are differentially affected by technological variables in fermented milks. *Journal of Applied Microbiology*, v.112, p. 1184 – 1192, 2012.

SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; DUARTE, A.C.; RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.A.P & FREITAS, A.C. Characterization of freezing effect upon stability of, probiotic loaded, calcium-alginate microparticles. *Food and bioproducts processing*, n.9, p.90–97, 2015.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N., ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P. & KAILASAPATHYA, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. *International Journal of Food Microbiology*, v. 62, p.47–55, 2000.

THAMER, K.G.; PENNA, A.L.B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebiótico. *Ciência e Tecnologia de Alimentos*, v 26, p.589-595, 2006.

THORNTON, T. et al. *Scanning Probe Microscopy Training Notebook*, Digital Instruments, 2000.

TOMPKINS, T.A.; MAINVILLE, I. & ARCAND, Y. The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, n.2, p.295-03, 2011.

TRACY, B.P.; GAIDA, S.M. & PAPOUTSAKIS, E.T. Flow cytometry for bacteria: enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion um Biotechnology*, n. 21, p.85-99, 2010.

TRIPATHI, M.K. & GIRI, S.K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, n. 9, p.225–241, 2014.

UBBINK, J. & KRUEGER, J. Physical approaches for the delivery of active ingredients in foods. *Trends in Food Science & Technology*, n.17, p.244-254, 2006.

VANDAMME, T.F.; LENOURRY, A.; CHARRUEAU, C. & CHAUMEIL, J.C. The use of polysaccharides to target drugs to the colon: a review. *Carbohydrate Polymers*, v.48, p. 219-231, 2002.

VASILJEVIC, T. & SHAH, N.P. Probiotics – From Metchnikoff of bioactives. *International Dairy Journal*, v.18, p.714-728, 2008.

VEAL, D A.; DEERE, D.; FERRARI, B.; PIPER, J. & ATTFIELD, P.V. Fluorescence staining and flow cytometry for monitoring microbial cells. *Journal of immunological methods*, p.191-210, 2000.

VIEIRA, A.T.; GALVÃO, I.; AMARAL, F.A.; TEIXEIRA, M.M.; NICOLI, J.R. & MARTINS, F.S. Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Beneficial Microbes*, n.6, p.799-806, 2015.

VIEIRA, A.T.; ROCHA, V.M.; TAVARES, L.; GARCIA, C.C.; TEIXEIRA, M.; OLIVEIRA, S.C.; *et al.* Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. *Microbes and Infection*, n.18, p.180-189, 2016.

VINDEROLA, C.G.; PROSELLO, W.; GHIBERTO, T.D. & REINHEIMER, J.A. Viability of probiotic (*Bifidobacterium*, *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus casei*) and non probiotic microflora in Argentinian fresco cheese. *Journal Dairy Science*, n.9, p.1905-1911, 2000.

VINDEROLA, C.G. & REINHEIMER, J.A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: a comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, n.36, p.895–904, 2003.

VINDEROLA, G.; MATAR, C. & PERDIGON, G. Role of intestinal epithelial cells in immune effects mediated by Gram-positive probiotic bacteria: involvement of toll-like receptors. *Clinical Diagnostic Laboratory Immunology*, n.12, p.1075–1084, 2005.

VINDEROLA, G.; BINETTI, A.; BURNS, P. & REINHEIMER, J.. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, v.2, p.1-6, 2011.

VIVEK, K.B. Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. *International Journal of Food*, v. 3, p. 188-199, 2013.

WANG, X.; DUAN, X; LIU, I.; FANG, Y. & TAN, Y. Carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester fluorescent dye for cell labeling. *Acta Biochimica et Biophysica Sinica*, v. 37(6), p. 379–385, 2005.

WANG, Y.; HAMMES, F.; DE ROY, K.; VERSTRAETE, W. & BOON, B. Past, present and future applications of flow cytometry in aquatic microbiology. *Trends Biotechnology*, v.28, n. 8, 2010.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I. & MARCO, M.L. Short Communication: Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? *International Journal of Food Microbiology*, n.136, p.364–367, 2010.

WOJTAS, P.A.; HANSEN, L.T. & PAULSON, A.Y. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. *LWT*, n.41, p.101–108, 2008.

WU, Q.X.; XU, X.; XIE, Q.; TONG, W.Y. & CHEN, Y. Evaluation of chitosan hydrochloride-alginate as enteric micro-probiotic carrier with dual protective barriers. *International Journal of Biological Macromolecules*, n.93, p.665–671, 2016.

YAZDI, S. R. & CORREDIG. M. Heating of milk alters the binding of curcumin to casein micelles. A fluorescence spectroscopy study. *Food Chemistry*, n.132, p1143-1149, 2012

ZAMORA, L.M.; CARRETERO, C. & PARÉS, D. Comparative survival rates of lactic acid bacteria isolated from blood, following spray-drying and freeze-drying. *Food Science and Technology International*, n.12, p.77–84, 2006.

ZUIDAM, N.J. & SHIMONI, E. Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them. In: Zuidam, N.J., Nedovic, V. (Eds.), *Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing*. Springer-Verlag, New York, p. 3–29, 2009.

APÊNDICE A

Tabela 7 Concentração de células em log UFC g⁻¹ de *B. longum* 5^{1A} em microcápsulas de quitosana e amido resistente liofilizadas com diferentes crioprotetores.

		log UFC g ⁻¹						
		Antes liofilização	0	7	14	21	28	42
Quitosana	Sacarose 10%		7,079181	6,886491	6,662758	6,743568	6,824377	6,28868
	Glicose 10%		7,424882	7,166381	7,254624	7,219587	7,18455	6,727483
	Trealose 10%	8,932473765	6,755875	6,526463	6,677005	6,735988	6,79497	5,515174
	Manitol 10%		6,156431	6,076816	5,907871	6,172527	6,437183	6,172741
	Glicose + Leite		6,759377	6,079181	6,374359	6,669538	6,485737	6,301936
Amido resistente	Sacarose 10%		7,069719	7,318063	6,886834	6,870554	6,854274	7,147588
	Glicose 10%		7,690799	7,700895	7,555112	7,499803	7,444494	7,632934
	Trealose 10%	9,014285626	6,752081	7,085728	6,637731	6,449195	6,26066	7,050342
	Manitol 10%		6,487107	6,090432	5,83729	5,927796	6,018303	6,691895
	Glicose + Leite		7,109279	6,592415	7,49947	7,266298	7,266298	7,033126

Tabela 8 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} microencapsulada por *spray drying*, quitosana e amido resistente e armazenadas a -20 °C por 90 dias.

Dias	% de Sobrevivência							
	0	7	14	21	28	40	60	90
<i>Spray drying</i>	100,0 ± 0,0 ^{bA}	98,56 ± 1,55 ^{aA}	99,89 ± 1,52 ^{aA}	98,04 ± 1,55 ^{aA}	97,77 ± 2,36 ^{aA}	100,42 ± 3,86 ^{aA}	97,80 ± 2,82 ^{aA}	100,92 ± 8,36 ^{aA}
Quitosana	100,0 ± 0,0 ^{aA}	95,86 ± 2,38 ^{aA}	97,55 ± 1,78 ^{aA}	99,41 ± 1,46 ^{aA}	97,12 ± 2,38 ^{aA}	98,55 ± 2,69 ^{aA}	98,57 ± 1,98 ^{aA}	100,01 ± 1,92 ^{aA}
Amido resistente	100,0 ± 0,0 ^{aA}	88,57 ± 4,41 ^{bB}	87,53 ± 3,42 ^{bBD}	86,60 ± 4,24 ^{bBCD}	82,46 ± 2,80 ^{bC}	83,91 ± 2,44 ^{bBC}	83,21 ± 0,72 ^{bCD}	83,53 ± 1,88 ^{bBC}

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

^{a, b, c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

Tabela 9 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre e microencapsulada por *spray drying*, quitosana e amido resistente, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

Tempo (min)	SGS			SIS	
	0	60	120	60	120
<i>Spray drying</i>	100 ± 0 ^{aA}	102,57 ± 4,63 ^{aA}	100,68 ± 2,27 ^{cA}	98,80 ± 0,13 ^{dA}	97,54 ± 1,71 ^{dA}
Livre fresca	100 ± 0 ^{aA}	98,28 ± 6,09 ^{aA}	92,87 ± 6,38 ^{acAB}	89,12 ± 6,68 ^{aB}	85,60 ± 7,03 ^{aB}
Quitosana	100 ± 0 ^{aA}	98,99 ± 1,94 ^{aA}	88,12 ± 5,43 ^{aB}	76,12 ± 4,71 ^{bC}	74,40 ± 1,54 ^{bC}
Amido resistente	100 ± 0 ^{aA}	81,14 ± 4,19 ^{bB}	62,29 ± 8,37 ^{bC}	50,13 ± 6,02 ^{cD}	32,65 ± 3,20 ^{cE}

^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

^{a, b, c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

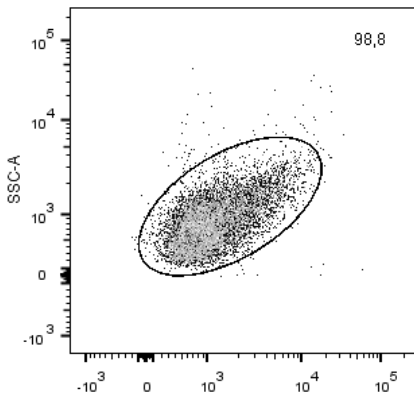
Tabela 10 Porcentagem de sobrevivência de *B. longum* 5^{1A} livre fresca, livre e liofilizada e microencapsulada por *spray drying*, submetidas à solução simulada gástrica (SGS) e intestinal (SIS) durante 120 minutos de incubação em cada solução.

Tempo (min)	SGS			SIS	
	0	60	120	60	120
<i>Spray drying</i>	100 ± 0 ^{aA}	102,57 ± 4,63 ^{aA}	100,68 ± 2,27 ^{aA}	98,80 ± 0,13 ^{bA}	97,54 ± 1,71 ^{bA}
Livre fresca	100 ± 0 ^{aA}	98,28 ± 6,09 ^{aA}	92,87 ± 6,38 ^{aB}	89,12 ± 6,68 ^{aBC}	85,60 ± 7,03 ^{aC}
Livre Liofilizada	100 ± 0 ^{aA}	97,20 ± 0,43 ^{aA}	96,34 ± 0,65 ^{aA}	95,46 ± 1,34 ^{abA}	85,70 ± 1,13 ^{aB}

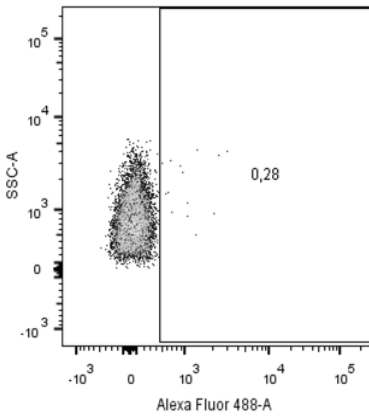
^{A,B,C} Médias na mesma linha seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

^{a, b, c} Médias na mesma coluna seguidas por letras distintas são diferentes (Duncan p<0,05).

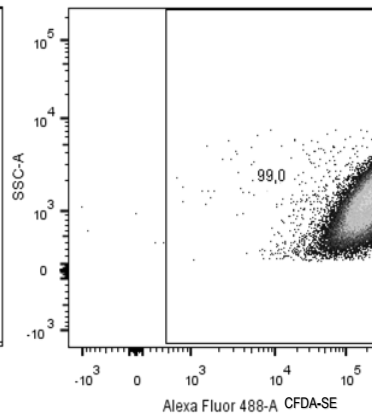
Titulação da concentração de CFDA-SE



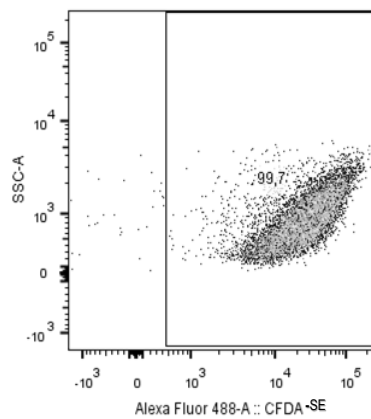
Tamanho x Granulosidade



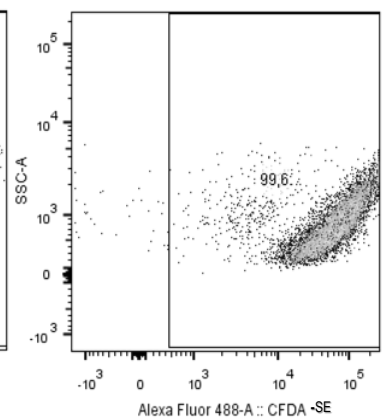
Branco



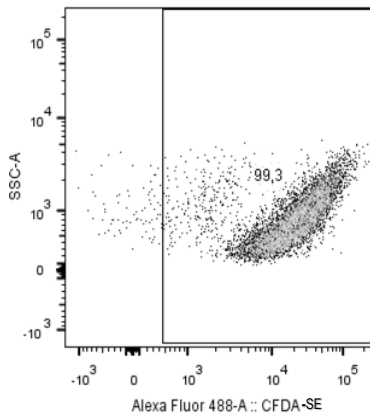
20 mM



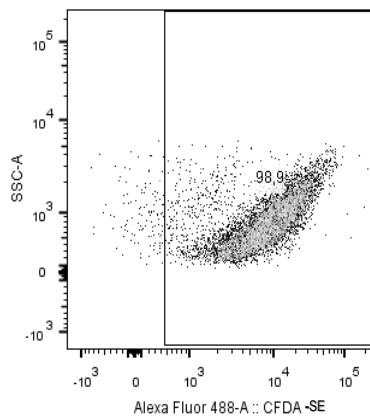
10 mM



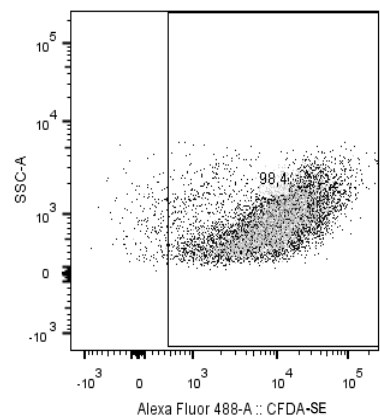
5 mM



2,5 mM

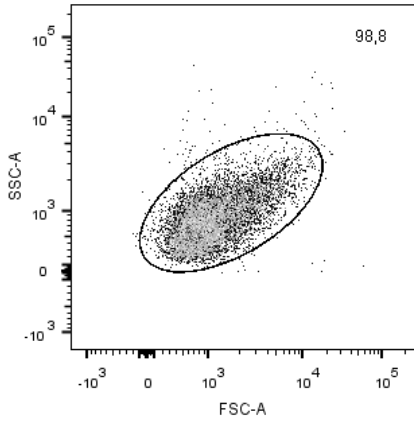


1,25 mM

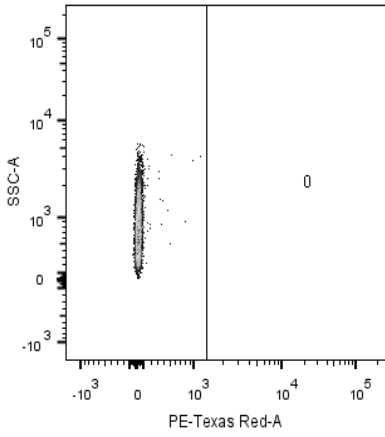


0,65 mM

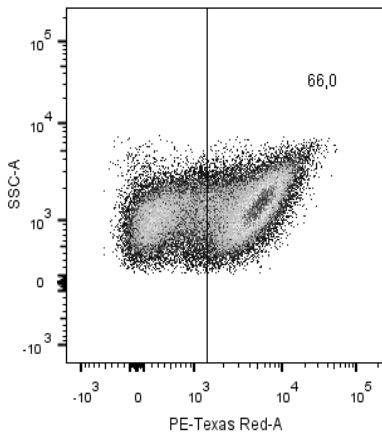
Titulação da concentração de Iodeto de Propídio



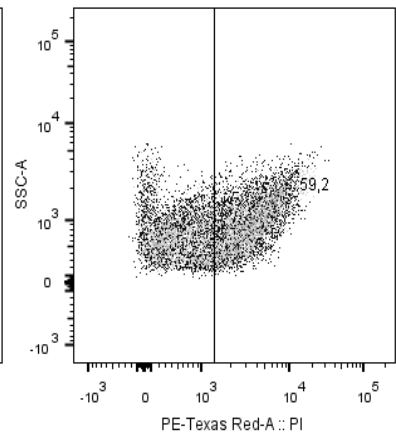
Tamanho X Granulosidade



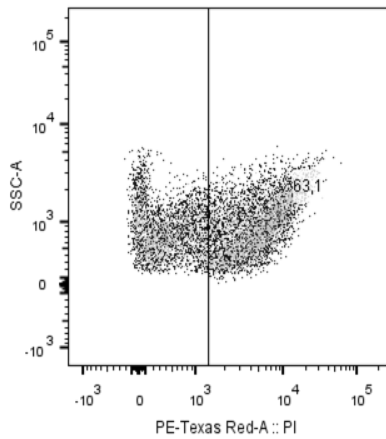
Branco



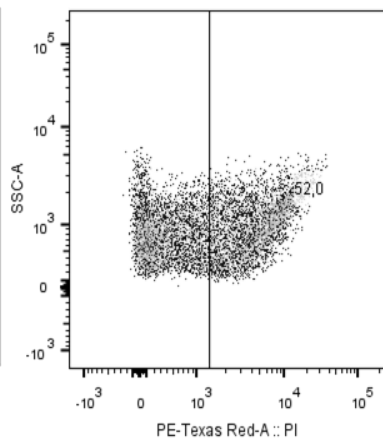
20 mM



10 mM



5 mM



2,5 mM



Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 5^{1A}



Beatriz S.P. Bernucci^a, Cristina M.G. Loures^b, Sávia C.A. Lopes^c, Mônica C. Oliveira^c, Adriano P. Sabino^b, José M.C. Vilela^d, Margareth S. Andrade^d, Inayara C. Lacerda^a, Jacques R. Nicoli^e, Evelyn S. Oliveira^{a,*}

^a Department of Food Science, School of Pharmacy, Federal University of Minas Gerais (Universidade Federal de Minas Gerais - UFMG), CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^b Department of Clinical and Toxicological Analysis, School of Pharmacy, UFMG, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^c Department of Pharmaceutical Products, School of Pharmacy, UFMG, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

^d Laboratory of Nanoscopy, Centre for Innovation and Technology SENAI/FIEMG, Cetec Campus, CEP: 31035-536, Belo Horizonte, MG, Brazil

^e Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, UFMG, CEP: 31270-901, Belo Horizonte, MG, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:

Received 31 October 2016

Received in revised form

26 January 2017

Accepted 19 February 2017

Available online 22 February 2017

Keywords:

Bifidobacterium

Microencapsulation

Spray drying

Functionality

Flow cytometry

Chemical compounds studied in this article:

Chitosan (PubChem CID: 71853)

Starch (PubChem CID: 439341)

Sodium Alginate (PubChem CID: 5102882)

Tween 80 (PubChem CID: 5281955)

Calcium chloride (PubChem CID: 5284359)

ABSTRACT

This study aimed to evaluate cell injuries in *Bifidobacterium longum* 5^{1A} caused by different microencapsulation processes. For this purpose, the probiotic was microencapsulated by emulsification using alginate with starch or chitosan as well as by spray drying using skim milk as the matrix. The microcapsules were characterized by atomic force microscopy, and cell viability was determined by plate count during storage (−20 °C/90 days). Under simulated gastrointestinal conditions cell injury was analysed using fluorescence of two probes followed by flow cytometry, and the hydrophobicity of cells was evaluated by bacterial adhesion to hexadecane. During storage, *B. longum* 5^{1A} remained above 7.51 log₁₀ CFU g^{−1} in all microcapsules. However, flow cytometry showed that only microencapsulation by spray drying maintained the cells without injury and ensured viability under simulated gastrointestinal conditions. The microstructural analysis showed few cells without coating in these microcapsules. In addition, flow cytometry showed the limitation of plate count method to assess cell viability, indicating that even when injured the bacterial cells grow in culture medium. Microencapsulation by spray drying also ensured the recovery of hydrophobicity during storage. Spray drying microcapsules can be an alternative to preserve the viability and functionality of probiotics to be incorporated into foods.

© 2017 Elsevier Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

The successful survival of microorganisms in the human digestive tract is a challenge for the development of probiotic product due to the unfavourable conditions encountered during exposure to processing, storage, and gastrointestinal (GI) environment, which can cause loss of viability (Schell & Beermann, 2014).

The strain used in this study, *Bifidobacterium longum* 5^{1A}, was found to be effective in the treatment of constipation in children in clinical trials (Guerra et al., 2011), presenting the greatest

sensitivity to antimicrobials, the best growth rate and the highest capacity to produce antagonistic substances against various pathogenic microorganisms (Souza et al., 2012), protecting mice against *Salmonella* Typhimurium infection in addition to inducing IgA + cell proliferation in the gut (Souza et al., 2012), and reducing the inflammatory response in an experimental murine model of gout, suggesting its usefulness as adjuvant treatment in patients with gout and that was able to modulate the inflammatory response even beyond the gut (Vieira et al., 2015). In addition, this bacterial strain reduced the parasitic load in animals infected with *Giardia lamblia*, suggesting an increase in mucus production as one of the mechanisms used by the probiotic to reduce the parasitic load (Fonseca, 2015). Additionally, during *Klebsiella pneumoniae* (Kp) infection in mice, oral treatment with *B. longum* 5^{1A} prevents

* Corresponding author.

E-mail address: evelynsolopes@yahoo.com.br (E.S. Oliveira).

detrimental lung inflammation, by activating innate immune sensing of bacteria thereby facilitating pathogen bacterial clearance (Vieira et al., 2016).

A probiotic must have high survival rates in the GI tract to provide the expected health benefits. In this context, microencapsulation has been studied to protect the microorganism against adverse conditions (Tripathi & Giri, 2014). However, microencapsulation itself can also affect cell viability (Rathore, Desai, Liew, Chan, & Heng, 2013), and a limited number of studies have monitored possible injuries to probiotics induced by the stress of microencapsulation processes (Iaconelli et al., 2015; Zheng, Fua, Huang, Jeantet, & Chen, 2016). Thus, after technological processing, the control of cell viability must be complemented by functionality studies to evaluate the preservation of the beneficial effects of probiotics (Vinderola, Binetti, Burns, & Reinheimer, 2011). In addition, to facilitate the study of strain functionality, flow cytometry (FC) helps to discriminate additional cell physiological states, such as cell injury (Tracy, Gaida, & Papoutsakis, 2010), being considered a sensitive and rapid technique for routine analysis.

Thus, the present study evaluated the effect of different microencapsulation matrices and techniques on two viability parameters (plate count and cell injury via FC) and two functional parameters (tolerance to simulated GI tract conditions and hydrophobicity) for *Bifidobacterium longum* 5^{1A}.

2. Materials and methods

2.1. Microorganism and culture preparation

Bifidobacterium longum 5^{1A} was isolated from the faeces of healthy children and identified by Multiplex PCR at the Laboratory of Ecology and Physiology of Microorganisms, Department of Microbiology, Institute of Biological Sciences, Federal University of Minas Gerais (Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG), according to Kwon et al. (2005). From the freeze-dried culture, a stock (8.0 log₁₀ colony forming units (CFU) mL⁻¹) was made according to Faleiro et al. (2015). Immediately before use, three successive activations of the culture (24–48–72 h) were performed in 10–20–300 mL of Man, Rogosa & Sharp broth (MRS, Acumedia, Lansing, MI, USA), respectively, at 37 °C, to ensure final concentration next to 10.0 log₁₀ CFU mL⁻¹. Then, the culture was centrifuged (Sigma 2K15, Osterode, Germany) for 10 min at 2792×g, washed with sterile distilled water, and resuspended in 3 mL of peptone water (1 mg mL⁻¹), to obtain next to 10.0 log₁₀ CFU mL⁻¹.

2.2. Microencapsulation by emulsification

The method used for this microencapsulation was adapted from Brinques and Ayub (2011). For the preparation of calcium alginate microcapsules coated with chitosan (CaAIC), 10 mL of the cell suspension (10.0 log₁₀ CFU mL⁻¹) were incorporated into 40 mL of 20 mg mL⁻¹ sodium alginate (Sigma-Aldrich, Pool, UK) and emulsified in 250 g of soya oil (Soya - Bunge®, Gaspar, Brazil) supplemented with 2 mg g⁻¹ Tween 80 (Merck, Darmstadt, Germany) using an automatic stirrer (IKA Eurostar) at 700 rpm for 10 min. Gelation occurred by adding 500 mL of 0.05 mol L⁻¹ CaCl₂ (Vetec, Química Fina, Rio de Janeiro, Brazil) with stirring for 10 min at 700 rpm. The mixture was decanted using a funnel, the aqueous phase was centrifuged (1000 g for 10 min), and the microcapsules were washed and resuspended, in both procedures, in peptone water (1 mg mL⁻¹). For coating with chitosan, 15 mL of the suspension of calcium alginate microcapsules were added to 100 mL of 4 mg mL⁻¹ chitosan (Sigma-Aldrich, Pool, UK), and the pH was adjusted to 6.0 with 0.4 mL of glacial acetic acid (Ecibra, São Paulo, Brazil), followed by shaking at 300 rpm for 20 min. The

microcapsules were collected by centrifugation (1000×g for 10 min), washed and resuspended, in both procedures, in peptone water (1 mg mL⁻¹) at 4 °C. For the production of calcium alginate microcapsules with resistant starch (CaAISr), the same procedure was followed; however, the resistant starch (Ingredion, Brazil) at 20 mg mL⁻¹ was added to 40 mL of 20 mg mL⁻¹ sodium alginate, and there was no coating with chitosan. For both microcapsules, control samples without cells were prepared. At the end of the microencapsulation, 100 mg mL⁻¹ of glucose were added to 2 mL of the microcapsule suspensions in cryogenic tubes, which were frozen in liquid nitrogen and lyophilized (Liotop L101, Liobras, Brazil) at -50 °C for 24 h. Finally, the vials were sealed under vacuum and stored at -20 °C.

2.3. Microencapsulation by spray drying (SD)

The microcapsules produced by SD were prepared according to the methodology adapted from Fritzen-Freire et al. (2012). For the feeding solution, 10 mL of cell concentrate (10.0 log₁₀ CFU mL⁻¹) were added to 500 mL of skim milk powder (Molico, Nestlé®, São Paulo, Brazil) at 300 mg mL⁻¹ and supplemented with 10 mg mL⁻¹ maltodextrin, which was previously autoclaved at 100 °C for 25 min. A spray LM MSD 1.0 dryer (Labmaq Brazil, São Paulo, Brazil) was used with inlet temperature of 130 °C, outlet temperature of 76 ± 5.31 °C, feed flow rate of 0.54 L h⁻¹, and drying air at 25 L min⁻¹. The powder was collected at the cyclone base and stored at -20 °C. Control microcapsules without cells were also prepared.

2.4. Viability during storage of microencapsulated *B. longum* 5^{1A}

Cells were released from the microcapsules prepared by emulsification by resuspension in sodium citrate (1 mg mL⁻¹, pH 6.0) and vortexing for 5 min (adapted from Krasaekoopt, Bhandari, & Deeth, 2004). The cells microencapsulated by SD were released by shaking in phosphate buffer (0.1 mol L⁻¹, pH 7.0). Cell viability was determined after 0, 7, 14, 21, 28, 40, 60, 90 days of storage (-20 °C) by plate counts on MRS agar (Acumedia) incubated at 37 °C for 72 h anaerobically (Anaerobac, Probac, São Paulo, Brazil).

2.5. Atomic force microscopy (AFM)

For characterization by AFM, the microcapsules were placed on a glass slide, and measurements were performed at room temperature, in air, using a Dimension 3000 atomic force microscope, monitored by Nanoscope IIIa controller (Digital Instruments, Santa Barbara, CA). The images were obtained in the tapping mode, using commercially available silicon probes from Nanosensors™ with cantilevers measuring 228 μm in length, resonance frequency of 75–98 kHz, spring constants of 3.0–7.1 N m⁻¹, and nominal tip radius of curvature of 10 nm, with a scan rate of 1 Hz. The dimensional analysis was performed with NanoScope software (R) III, version 5.31R1.

2.6. Cell viability, injury, and death analysis by flow cytometry

For the determination of cell viability after exposure to simulated GI tract conditions, 1 g of microencapsulated cells was added to 10 mL of simulated gastric solution (SGS). The SGS consisted of 0.08 mol L⁻¹ HCl, 2 mg mL⁻¹ NaCl, and 3 mg mL⁻¹ pepsin (Sigma-Aldrich), pH 2.5. This mixture was vortexed for 10 s, incubated for 120 min at 37 °C, centrifuged at 2792g for 10 min, and the pellet was added to 10 mL of simulated intestinal solution (SIS) and incubated for 120 min. At the end of the incubation, the SIS was centrifuged at 2792g for 10 min and the cells were released from

the capsules as described in Section 2.4 and evaluated by FC. The SIS consisted of $0.05 \text{ mol L}^{-1} \text{ NaH}_2\text{PO}_4$, 0.45 mg mL^{-1} bile salts (Merck, Darmstadt, Germany), and 1 mg mL^{-1} pancreatin (Sigma-Aldrich), pH 8.0. The solutions were sterilized by filtration through a $0.45 \mu\text{m}$ pore membrane (MF-Millipore, Billerica, MA, USA) (Adapted from Krasaekoopt & Watcharapoka, 2014).

The FC analyses followed the method adapted from Martin-Dejardin et al. (2013). The fluorochrome carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFDA-SE) (1.25 mM in DMSO, BD Biosciences, Le Pont de Claix, France) was used to assess viability, and the nucleic acid fluorochrome propidium iodide (PI) (2.5 mM in DMSO, Sigma, St. Louis, MO, USA) was used to quantify cell injury and death.

The analyses were performed in flow cytometer (BD LSR Fortessa) calibrated at every reading with cytometer setup and tracking (CST) beads (BD Bioscience), equipped with 488-nm excitation laser and BD FACS Diva software. For colour compensation, unlabelled beads (BD Bioscience) and fluorochrome-labelled beads were read in the same CFDA-SE and PI channels. The combination of size (FSC - Forward Scatter) and granularity (SSC - Side Scatter) was used to discriminate the bacteria from the background (Fig. 2 - A1, B1, and C1) and the results were analysed with the FlowJo software, version vX0.7. Fifty thousand events per sample were acquired.

2.7. Assessing the hydrophobicity of free or microencapsulated cells by SD

The hydrophobicity of free, newly activated (fresh) or lyophilized (lyophilization occurring as described in Section 2.2) cells was compared with that of cells microencapsulated by SD. The hydrophobicity of fresh or lyophilized free cells was determined according to Souza et al. (2013), wherein fresh free cells were previously cultured in MRS broth at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 24 h. In turn, the hydrophobicity of the SD microencapsulated cells was determined by adapting the methodology of Vinderola and Reinheimer (2003) and Riveros, Ferrer, and Borquez (2009). Cells were released from the microcapsules as described in Section 2.4, centrifuged for 10 min at $2792\times g$, washed twice in phosphate buffered saline, resuspended in phosphate buffer and the absorbance measured at 560 nm (ODa). Then, 0.6 mL of hexadecane (Sigma-Aldrich, Pool, UK) was added to 3 mL of the cell suspension, which were incubated at $37 \text{ }^\circ\text{C}$ for 1 h, and the absorbance at 560 nm (ODb) was measured in the aqueous phase. The percentage of bacterial adhesion to hexadecane was expressed according to the equation: $\text{H}\% = \left[\frac{\text{ODa} - \text{ODb}}{\text{ODa}} \right] \times 100$, where H% = percentage of hydrophobicity, ODa = initial optical density, and ODb = final optical density.

2.8. Statistical analysis

The experiments were performed in triplicate. The results were submitted to analysis of variance (ANOVA), and when significant difference between the means existed, the Duncan test was used, considering significant difference for $p < 0.05$.

3. Results and discussion

3.1. Viability during the storage of microencapsulated *B. longum* 5^{1A}

The three types of microcapsules evaluated (CaAlC, CaAlSr, and SD) were effective in protecting *B. longum* 5^{1A} during storage, as the number of viable cells remained above $7.0 \log_{10} \text{ CFU g}^{-1}$ (Table 1), which is considered the population level necessary to confer health benefits (Tripathi & Giri, 2014). The cell viability in the CaAlC and SD microcapsules did not decrease significantly ($p < 0.05$) during

storage at $-20 \text{ }^\circ\text{C}/90$ days, unlike the CaAlSr cells, which suffered significant reductions ($p < 0.05$) in viability but still retaining in high counts at the end of storage.

Chavarrí et al. (2010), in contrast with the present study, obtained a lower viability of *B. bifidum* microencapsulated in alginate with chitosan after 28 days of cold storage ($4 \text{ }^\circ\text{C}$) ($7.14 \log_{10} \text{ CFU mL}^{-1}$), suggesting that storage at $-20 \text{ }^\circ\text{C}$ is more effective in maintaining cell viability. By contrast, the stability of the cells in the SD microcapsules during storage may be related to the milk present in the matrix of these microcapsules. Milk can prevent cell damage by stabilizing the constituents of the membrane through the formation of a protective coating over the cell wall proteins (Silva, Freixo, Gibbs, & Teixeira, 2011).

3.2. Characterization of the microcapsules by AFM

The CaAlC (Fig. 1 - A2) and CaAlSr (Fig. 1 - B2) microcapsules showed an irregular topography, suggesting the presence of cells on the surface, whereas in the control microcapsules (no cells) (Fig. 1 - A1, B1), the topography showed to be continuous and without large height variations on the surface. In Fig. 1 - A2, smooth structures could be associated with the cells coated with calcium alginate, and the rough ones with the chitosan-coated cells (as indicated by the arrows), suggesting that not all the cells were fully protected by with the chitosan coating.

In the control SD microcapsules (Fig. 1 - C1), polydispersed spheres with sizes ranging from 150 to 350 nm were observed, which could be associated with the casein micelles, similarly to the micelles described by Ouanezar, Guyomarc'h, and Bouchoux (2012). These spheres clustered around the cells in way that cells uncoated or partially coated by the matrix material were rare (as shown by the arrow in Fig. 1 - C2). In milk above $60 \text{ }^\circ\text{C}$, the whey proteins denature and interact with each other and with casein micelles, forming aggregates through hydrophobic interactions and disulphide bonds. Consequently, significant amount of whey protein becomes associated with the surface of casein micelles (Donato & Guyomarc'h, 2009) and it is possible that these aggregates lead to cell entrapment.

3.3. Cell viability, injury, and death of microencapsulated *B. longum* 5^{1A} analysed by FC

The analysis by FC allowed to evaluate *B. longum* 5^{1A} viability and the possible damage caused by the microencapsulation techniques.

In both CaAlC (Fig. 2 - A2) and CaAlSr (Fig. 2 - B2) microcapsules, most cells were double labelled by propidium iodide and carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (85.9% and 72.8%, respectively), indicating that when produced by emulsification, most cells are injured in the microcapsules. By contrast, in the microcapsules prepared by SD (Fig. 2 - C2), 71.4% of the cells were only labelled with CFDA-SE, meaning that they were alive and intact, which indicates that this microencapsulation method caused less cell damage. Salar-Behzadi et al. (2013) also detected (by FC) little damage in cell membrane of *B. bifidum* BB-12 microencapsulated by SD using skim milk as the matrix. The larger number of intact cells in SD microcapsules is probably related to the ability of milk proteins to prevent cell injuries (Silva et al., 2011).

The present study also sought to evaluate (by FC) the degree of cell injury in the CaAlC, CaAlSr, and SD microcapsules after their exposure to simulated GI tract conditions. The high intensity of the PI staining in Q1 indicated increase of dead cells in the CaAlC (46.6%) (Fig. 2 - A3) and CaAlSr (46.8%) microcapsules (Fig. 2 - B3), compared with the initial profile (Fig. 2 - A2 and B2), which was of 6.09% and 9.93% in Q1, respectively. That is, these microcapsules did

Table 1
Viability (\log_{10} CFU g^{-1}) of microencapsulated *B. longum* 5^{1A} during storage at -20 °C, for 90 days. CaAIC = calcium alginate with chitosan; CaAlSr = calcium alginate with resistant starch; SD = spray drying.

Days	Log UFC g^{-1}							
	0	7	14	21	28	40	60	90
CaAIC	8.22 ± 0.05 ^a	7.88 ± 0.17 ^a	8.03 ± 0.13 ^a	8.17 ± 0.09 ^a	7.98 ± 0.15 ^a	8.10 ± 0.18 ^a	8.10 ± 0.11 ^a	8.22 ± 0.11 ^a
CaAlSr	9.42 ± 0.16 ^a	8.34 ± 0.33 ^b	8.02 ± 0.27 ^{bcd}	8.16 ± 0.35 ^{bc}	7.76 ± 0.14 ^d	7.90 ± 0.12 ^{cd}	7.78 ± 0.09 ^{cd}	7.87 ± 0.29 ^{cd}
SD	7.93 ± 0.35 ^a	7.83 ± 0.45 ^a	7.91 ± 0.22 ^a	7.77 ± 0.28 ^a	7.75 ± 0.22 ^a	7.74 ± 0.15 ^a	7.75 ± 0.17 ^a	7.51 ± 0.25 ^a

^{a, b, c} Means ± standard deviation followed by different letters differ statistically in the same line (Duncan test $p < 0.05$). Values are the means ± standard deviation of triplicates.

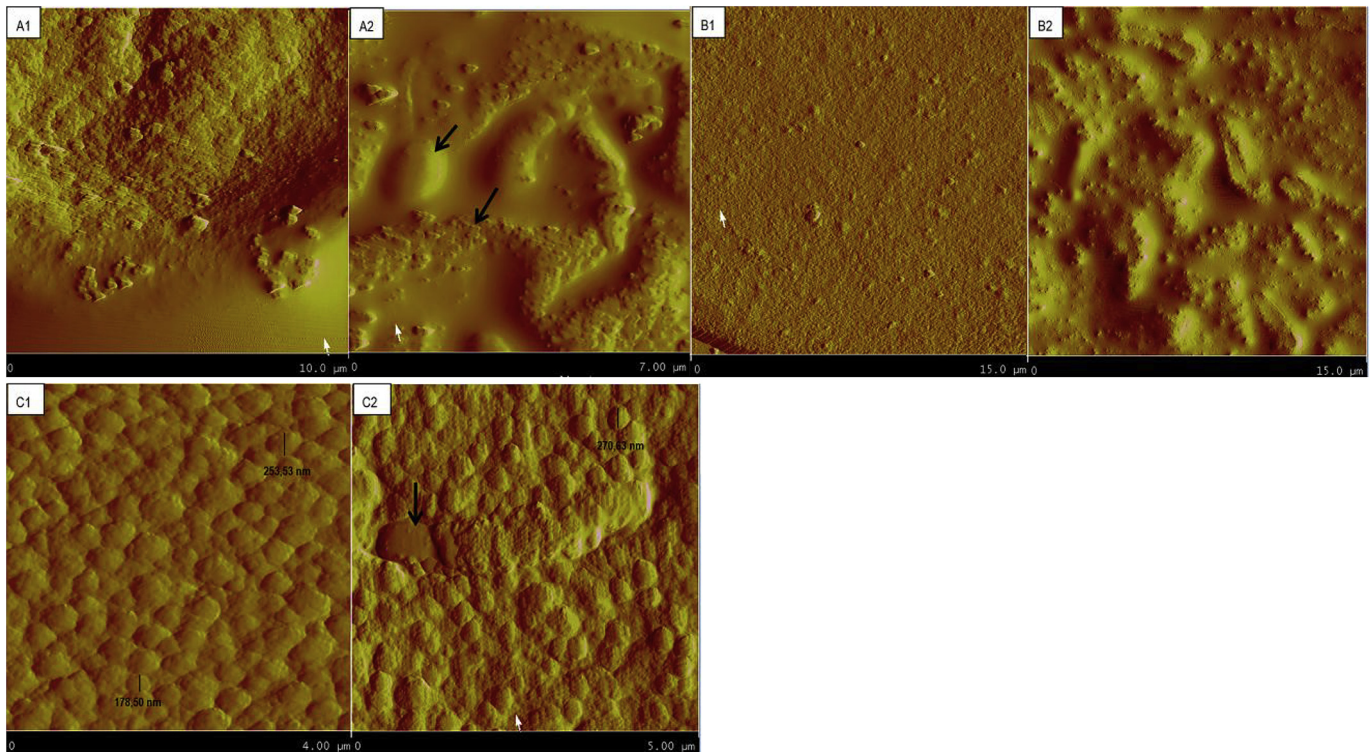


Fig. 1. Atomic force microscopy images of control CaAIC (A1), CaAlSr (B1), and SD (C1) microcapsules and CaAIC (A2), CaAlSr (B2), and SD (C2) microcapsules containing cells. CaAIC = calcium alginate with chitosan; CaAlSr = calcium alginate with resistant starch; SD = spray drying.

not adequately protect the cells against the sequential exposition to adverse conditions of the simulated GI tract solutions. In fact, bacteria suffer injuries when initially exposed to the low pH of simulated gastric juice, resulting in irregular responses to second exposition to the intestinal hostile environment, which involves the presence of bile salts (Dicks & Botes, 2010).

The SD microcapsules (Fig. 2 - C3) provided higher cell protection under the simulated GI tract conditions as demonstrated by fewer dead cells (8.31%) and more intact living cells (28.5%). Therefore, this type of microcapsule enables the influx of greater amount of viable and intact cells to the intestine, where they are able to exert their beneficial effects. In the intestine, microcapsules may be degraded by the indigenous microbiota, by peristalsis, or due to low pH (Cook, Tzortzis, Charalampopoulos, & Khutoryanskiy, 2012). Milk has been indicated as effective protector of probiotics during simulated GI digestion, probably due to its buffering effect, which protects bacterial strains against the harmful effects of the gastric and intestinal environment (Amine et al., 2014; Tompkins, Mainville, & Arcand, 2011). The increased number of unlabelled cells (Fig. 2 A3, B3, and C3 - Quadrant 4) following the *in vitro* test was associated with the lower binding capacity of the CFDA-SE

fluorochrome. This marker shows excitation/emission spectra dependent on the internal pH of the cell, and the spectrum of the fluorescein generated is reduced at low pH values (Shapiro, 2003). If the cell does not have the ability to maintain neutral internal pH in low pH environments, then the fluorescence excitation/emission ability is compromised.

3.4. Comparison between FC and plate count

Fig. 3A shows the correlation analysis between the percentage of living cells in Quadrant 3 obtained by FC and number of viable cells of *B. longum* 5^{1A} obtained by plate count, which indicated low correlation between the methods ($r = 0.1970$) (extra points from other analysis performed were added, data not shown). However, when the sum of injured (Quadrant 2) and alive (Quadrant 3) cell numbers obtained by FC was used for the analysis, the correlation with the standard plate count method increased ($r = 0.7246$) (Fig. 3B). This indicates that injured cells can also grow on count medium and shows the limitation of the plate count method in the analysis of cell viability or injury, which is unable to indicate the actual cell condition and is limited to quantifying the number of

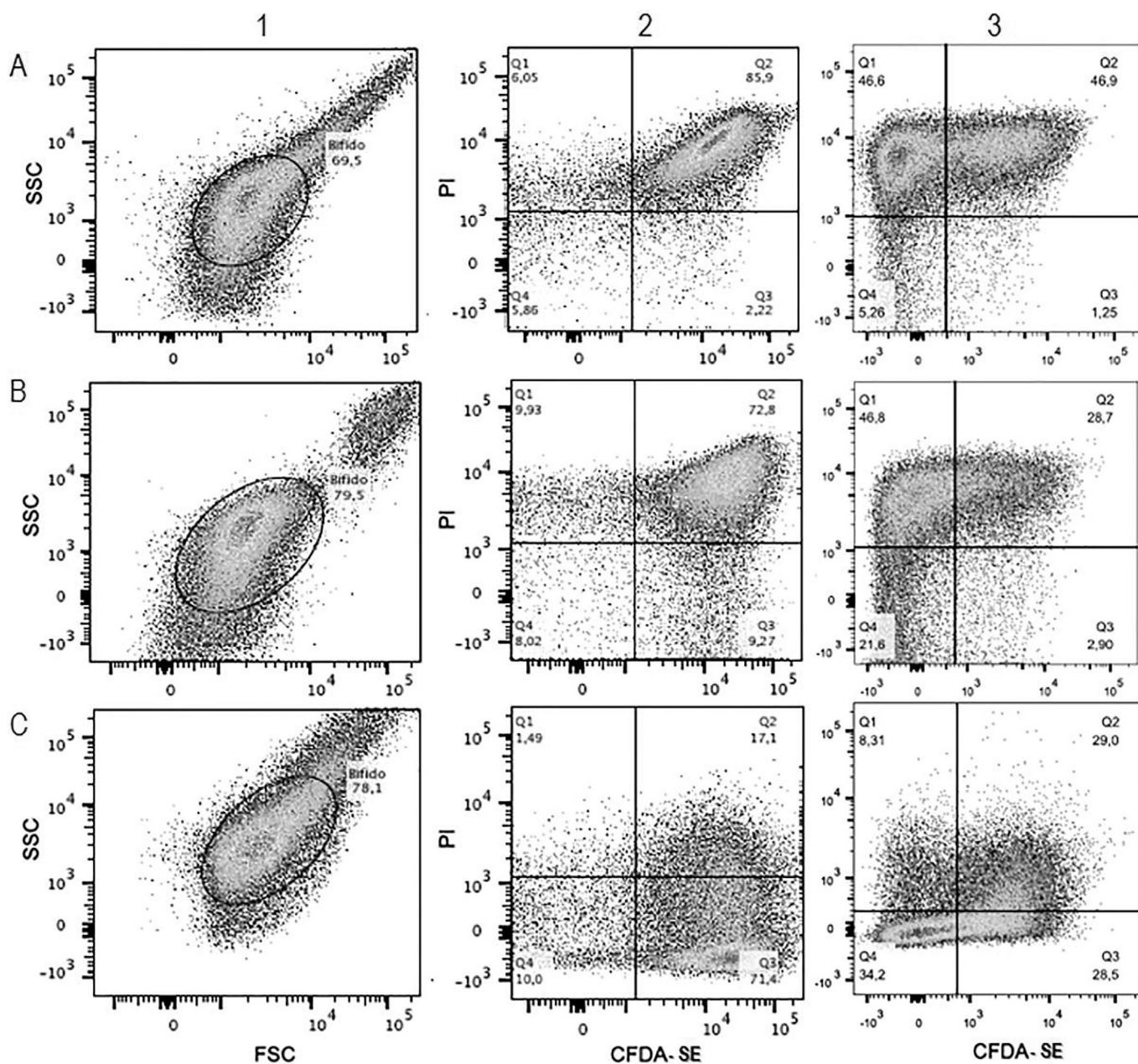


Fig. 2. Size (FSC) and granularity (SSC) profiles of the *B. longum* 5^{1A} cell population in the CaAIC (A1), CaAlSr (B1), and SD (C1) microcapsules. Dot plots after double staining with PI and CFDA-SE of the cells released from the CaAIC (A2), CaAlSr (B2), and SD (C2) microcapsules and the cells released from CaAIC (A3), CaAlSr (B3), and SD (C3) microcapsules after exposure to simulated intestinal and gastric solutions for 120 min. Q1: dead cells, Q2: injured cells, Q3: live cells, and Q4: unstained cells. CaAIC = calcium alginate with chitosan; CaAlSr = calcium alginate with resistant starch; SD = spray drying.

bacteria able to replicate under the growth conditions (Davey & Huxley, 2011).

Therefore, the FC method established in this study was found appropriate and reliable for assessing cell injury and may be useful in the food industry as robust method for rapid analysis of the impact of microencapsulation methods on cells.

3.5. Hydrophobicity of free or SD-microencapsulated *B. longum* 5^{1A}

The hydrophobicity of fresh cells, freeze-dried cells, or cells microencapsulated by SD was compared (Fig. 4) to assess the association with possible injury during the drying process (lyophilization or SD). The cells microencapsulated by SD showed higher

($p < 0.05$) hydrophobicity (14.72%) after 30 days of storage than at time 0 (3.53%). This was not observed for fresh and lyophilized cells (4.52% and 1.47%, respectively, at time 0 and 2.28% after 30 days of storage). According to Gandhi and Shah (2015), during lyophilization, the concentration of certain ions affects the survival capacity of bacteria, reducing their functionality as probiotics. However, the hydrophobicity profiles obtained here are difficult to compare with data in the literature because this profile is strain dependent (Pan, Li, & Liu, 2006).

By contrast, given that SD takes place within an extremely short period (Anandharamakrishnan, Gimbut, Stapley, & Rielly, 2010), there would be little time for the microorganism to undergo any sort of change due to drying. Thus, after resuspension, the bacteria

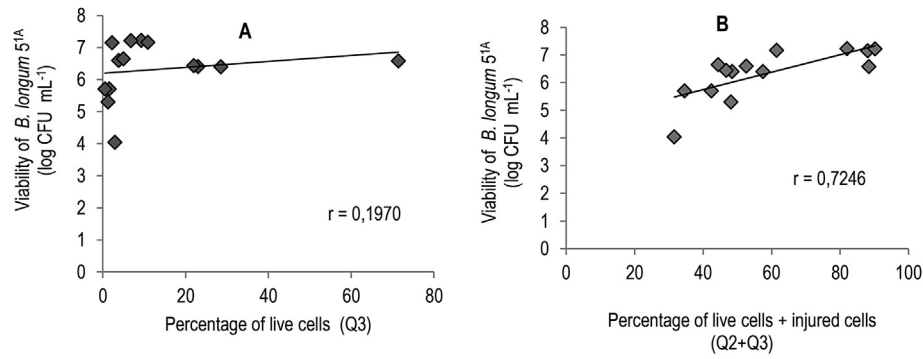


Fig. 3. Relationship between the (A) percentage of live cells (Q3) or the (B) percentage of live cells + injured cells (Q2 + Q3) obtained by FC and the viability of *B. longum* 5^{1A} (log CFU mL⁻¹) obtained by plate counts.

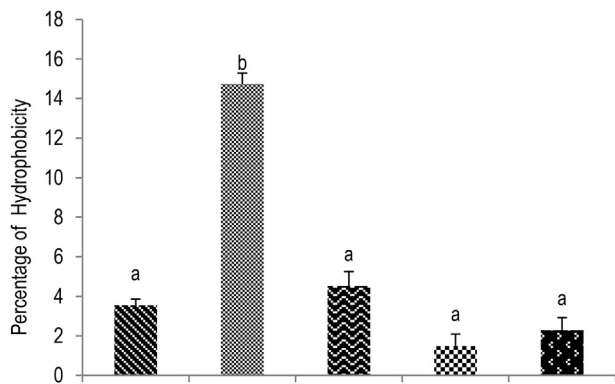


Fig. 4. Percentage of hydrophobicity of *B. longum* 5^{1A} microencapsulated by SD (spray drying) at storage time 0 (–20 °C), SD after 30 days of storage, *B. longum* 5^{1A} free and fresh, *B. longum* 5^{1A} free and lyophilized at storage time 0 (–20 °C), and *B. longum* 5^{1A} free and lyophilized after 30 days of storage. ^{a, b} Different letters indicate significant differences (Duncan test $p < 0.05$).

are most likely in the same physiological state as before the process (Iaconelli et al., 2015). In addition, the high temperatures used in SD may induce stress tolerance response (Morgan, Herman, White, & Vesey, 2006), such as the production of heat shock proteins, which favour metabolic activity after SD and are valuable for the recovery phase after drying (De Angelis & Gobbetti, 2004; Shokri, Fazeli, Ardjmand, Mousavi, & Gilani, 2015). Shokriova, Auzina, Zikmanis, Gavare, and Grube (2010) reported an increase in cell surface hydrophobicity alongside the increase in cell protein content detected by FT-IR spectroscopy in *B. animalis* subsp. *lactis* Bb12 and *L. acidophilus* LA5.

4. Conclusions

Microencapsulation with CaAlC or CaAlSr was not effective in maintaining cell survival under simulated GI tract conditions. In addition, these microcapsules have irregular structures, with possible cells present on the surface and without coating by the matrix material. By contrast, *B. longum* 5^{1A} SD microcapsules can be an alternative to preserve the viability and functionality of probiotics incorporated into foods because these microcapsules preserved cell survival and ensured cell protection and integrity under simulated GI tract conditions. In addition, SD microcapsules have increased capacity to adhere to the epithelium due to the recovery of hydrophobicity after microencapsulation. Moreover, microcapsules with homogenous structure and few cells uncoated by the matrix material are produced. It is also concluded that viability

assessment by plate count does not reflect the injury state of cells, suggesting a limitation of this method for analysing sub-lethal damages. Thus, more studies regarding the impact of microencapsulation processes on the functionality of microorganisms and not only their viability are required.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The study was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa de Minas Gerais (FAPEMIG) (APQ-00995-13), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and Pró Reitoria de Pesquisa – Universidade Federal de Minas Gerais (PRPQ, UFMG). The authors want to acknowledge the EDETEC – Indústria Alimentícia SA for technical support.

References

- Amine, K. M., Champagne, C. P., Raymond, Y., St-Gelais, D., Britten, M., Fustier, P., et al. (2014). Survival of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in Cheddar cheese during production and storage. *Food Control*, 37, 193–199.
- Anandharamkrishnan, C., Gimbut, J., Stapley, A. G. F., & Rielly, C. D. (2010). A study of particle histories during spray drying using computational fluid dynamic simulations. *Drying Technology*, 28, 566–576.
- Brinques, G. B., & Ayub, M. A. Z. (2011). Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. *Journal of Food Engineering*, 103, 123–128.
- Chavarri, M., Marañón, I., Ares, R., Ibáñez, F. C., Marzo, F., & Villarán, M. C. (2010). 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.
- Cook, M. T., Tzortzis, G., Charalampopoulos, D., & Khutoryanskiy, V. V. (2012). Review. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. *Journal of Controlled Release*, 162, 56–67.
- Davey, H. M., & Hexley, P. (2011). Red but not dead? Membranes of stressed *Saccharomyces cerevisiae* are permeable to propidium iodide. *Environmental Microbiology*, 13, 163–171.
- De Angelis, M., & Gobbetti, M. (2004). Environmental stress responses in *Lactobacillus*: A review. *Proteomics*, 4, 106–122.
- Dicks, L. M. T., & Botes, M. (2010). Probiotic lactic acid bacteria in the gastrointestinal tract: Health benefits, safety and mode of action. *Beneficial Microbes*, 1, 11–29.
- Donato, L., & Guyomarç'h, F. (2009). Formation and properties of the whey protein/casein complexes in heated skim milk - a review. *Dairy Science and Technology*, 89, 3–29.
- Faleiro, L. R., Pereira, B. S., Lacerda, I. C., Nicoli, J. R., Souza, T. C., Nunes, A. C., et al. (2015). Influence of different strains of *Streptococcus thermophilus* isolated from commercial yogurt starter cultures on selective enumeration of *Bifidobacterium* spp. *African Journal of Microbiology Research*, 9, 373–381.
- Fonseca, J. F. (2015). Efeito de *Bifidobacterium longum* 5^{1A} e *Weissella paramesenteroides* Wpk4 em giardiase experimental. Masters of Science, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais.
- Fritzen-Freire, C. B., Prudêncio, E. S., Amboni, R. D. M. C., Pinto, S. S., Negrão-

- Murakami, A. N., & Murakami, F. S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, 45, 306–312.
- Gandhi, A., & Shah, N. P. (2015). Effect of salt on cell viability and membrane integrity of *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei* and *Bifidobacterium longum* as observed by flow cytometry. *Food Microbiology*, 49, 197–202.
- Guerra, P. V., Lima, L. N., Souza, T. C., Mazochi, V., Penna, F. J., Silva, A. M., et al. (2011). Pediatric functional constipation treatment with *Bifidobacterium*-containing yogurt: A crossover, double-blind, controlled trial. *World Journal of Gastroenterology*, 17, 3916–3921.
- Iaconelli, C., Lemetais, G., Kechaou, N., Chain, F., Bermúdez-Humarán, L. G., Langella, P., et al. (2015). Drying process strongly affects probiotics viability and functionalities. *Journal of Biotechnology*, 214, 17–26.
- Krasakoopt, W., Bhandari, B., & Deeth, H. (2004). The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. *International Dairy Journal*, 14, 737–743.
- Krasakoopt, W., & Watcharapoka, S. (2014). Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. *LWT - Food Science and Technology*, 57, 761–766.
- Kwon, H. S., Yang, E. H., Lee, S. H., Yeon, S. W., Kang, B. H., & Kim, T. V. (2005). Rapid identification of potentially probiotic *Bifidobacterium* species by multiplex PCR using species-specific primers based on the region extending from 16S rRNA through 23S rRNA. *FEMS Microbiology Letters*, 250, 55–62.
- Martin-Dejardin, F., Ebel, B., Lemetais, G., Nguyen Thi Minh, H., Gervais, P., Cachon, R., et al. (2013). A way to follow the viability of encapsulated *Bifidobacterium bifidum* subjected to a freeze-drying process in order to target the colon: Interest of flow cytometry. *European Journal of Pharmaceutical Sciences*, 49, 166–174.
- Morgan, C. A., Herman, N., White, P. A., & Vesey, G. (2006). Preservation of microorganisms by drying. A review. *Journal of Microbiological Methods*, 66, 183–193.
- Ouanezar, M., Guyomarc'h, F., & Bouchoux, A. (2012). AFM imaging of milk casein micelles: Evidence for structural rearrangement upon acidification. *Langmuir*, 28, 4915–4919.
- Pan, W. H., Li, P. L., & Liu, Z. (2006). The correlation between surface hydrophobicity and adherence of *Bifidobacterium* strains from centenarians' faeces. *Anaerobe*, 12, 148–152.
- Rathore, S., Desai, P. M., Liew, C. V., Chan, L. W., & Heng, P. W. S. (2013). Review. Microencapsulation of microbial cells. *Journal of Food Engineering*, 116, 369–381.
- Riveros, B., Ferrer, J., & Borquez, R. (2009). Spray-drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. *Drying Technology*, 27, 123–132.
- Salar-Behzadi, S., WU, S., Toegel, S., Hofrichter, M., Altenburger, I., Unger, F. M., et al. (2013). Impact of heat treatment and spray drying on cellular properties and culturability of *Bifidobacterium bifidum* BB-12. *Food Research International*, 54, 93–10.
- Schell, D., & Beermann, C. (2014). Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. *Food Research International*, 62, 308–314.
- Shakirova, L., Auzina, L., Zikmanis, P., Gavare, M., & Grube, M. (2010). Influence of growth conditions on hydrophobicity of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* cells and characteristics by FT-IR spectra. *Spectroscopy*, 24, 251–255.
- Shapiro, H. M. (2003). *Practical flow cytometry* (4th ed.). New York: Wiley-Liss.
- Shokri, Z., Fazeli, M. R., Ardjmand, M., Mousavi, S. M., & Gilani, K. (2015). Factors affecting viability of *Bifidobacterium bifidum* during spray drying. *DARU Journal of Pharmaceutical Sciences*, 23(7).
- Silva, J., Freixo, R., Gibbs, P., & Teixeira, T. (2011). Spray-drying for the production of dried cultures. *International Journal of Dairy Technology*, 64.
- Souza, T. C., Silva, A. M., Drews, J. R., Gomes, D. A., Vinderola, C. G., & Nicoli, J. R. (2012). In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. 4, 179–186.
- Souza, T. C., Silva, A. M., Drews, J. R. P., Gomes, D. A., Vinderola, C. G., & Nicoli, J. R. (2013). In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. *Beneficial Microbes*, 4, 179–186.
- Tompkins, T. A., Mainville, L., & Arcand, Y. (2011). The impact of meals on a probiotic during transit through a model of the human upper gastrointestinal tract. *Beneficial Microbes*, 2, 295–303.
- Tracy, B. P., Gaida, S. M., & Papoutsakis, E. T. (2010). Flow cytometry for bacteria: Enabling metabolic engineering, synthetic biology and the elucidation of complex phenotypes. *Current Opinion in Biotechnology*, 21, 85–99.
- Tripathi, M. K., & Giri, S. K. (2014). Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. *Journal of Functional Foods*, 9, 225–241.
- Vieira, A. T., Galvão, I., Amaral, F. A., Teixeira, M. M., Nicoli, J. R., & Martins, F. S. (2015). Oral treatment with *Bifidobacterium longum* 5^{1A} reduced inflammation in a murine experimental model of gout. *Beneficial Microbes*, 6, 799–806.
- Vieira, A. T., Rocha, V. M., Tavares, L., Garcia, C. C., Teixeira, M., Oliveira, S. C., et al. (2016). Control of *Klebsiella pneumoniae* pulmonary infection and immunomodulation by oral treatment with the commensal probiotic *Bifidobacterium longum* 5^{1A}. *Microbes and Infection*, 18, 180–189.
- Vinderola, C. G., Binetti, A., Burns, P., & Reinheimer, J. A. (2011). Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. *Frontiers in Microbiology*, 2, 1–6.
- Vinderola, C. G., & Reinheimer, J. A. (2003). Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative "in vitro" study of probiotic characteristics and biological barrier resistance. *Food Research International*, 36, 895–904.
- Zheng, X., Fua, N., Huanga, S., Jeantet, R., & Chen, X. D. (2016). Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique. *Food Research International*, 90, 226–234.