

**UFRRJ**  
**INSTITUTO DE TECNOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E**  
**TECNOLOGIA DE ALIMENTOS**

**DISSERTAÇÃO**

**Produção, Caracterização e Viabilidade de Partículas  
Carreadoras de Leveduras Utilizando a Gelificação Iônica**

**Matheus Augusto Silva Santos**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA  
DE ALIMENTOS**

**PRODUÇÃO, CARACTERIZAÇÃO E VIABILIDADE DE PARTÍCULAS  
CARREADORAS DE LEVEDURAS UTILIZANDO A GELIFICAÇÃO  
IÔNICA**

**MATHEUS AUGUSTO SILVA SANTOS**

*Sob a orientação da Professora*  
**Dr<sup>a</sup> Mariana Teixeira da Costa Machado**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Área de Concentração em Ciência de Alimentos.

Seropédica, RJ  
Fevereiro de 2019

Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro  
Biblioteca Central / Seção de Processamento Técnico

Ficha catalográfica elaborada  
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

S237p Santos, Matheus, 1991-  
Produção, caracterização e viabilidade de partículas  
carreadoras de leveduras utilizando a gelificação  
iônica / Matheus Santos. - 2019.  
86 f.

Orientadora: Mariana Teixeira da Costa Machado.  
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural  
do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Ciência  
e Tecnologia de Alimentos, 2019.

1. Encapsulação. 2. Gelificação iônica. 3.  
Saccharomyces cerevisiae. 4. Saccharomyces boulardii.  
I. Teixeira da Costa Machado, Mariana, 1985-, orient.  
II Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.  
Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de  
Alimentos III. Título.

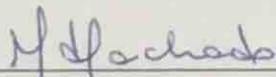
“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”

UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE TECNOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE  
ALIMENTOS

MATHEUS AUGUSTO SILVA SANTOS

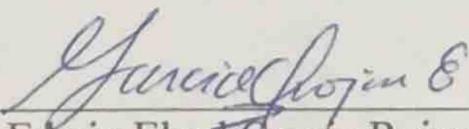
Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos**, no Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, área de Concentração em Ciência de Alimentos.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 15/02/2019.



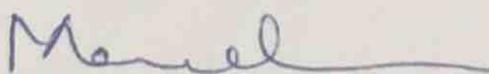
---

Mariana Teixeira da Costa Machado, PhD. UFRRJ  
(Orientadora)



---

Edwin Elard Garcia Rojas, PhD. UFF



---

Mariano Michelin, Dr. PUC-RJ

## DEDICATÓRIA

A minha vó Maria (*in memorian*), que em toda a sua simplicidade soube ser exemplo de determinação, força e fé!

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pela vida! Por me dar força e sabedoria para vencer todos os obstáculos ao longo de toda esta trajetória. Por ser amparo em todas as dificuldades. Por proporcionar tantas realizações e momento de alegria. Por sempre me presentear com pessoas maravilhosas!

A minha mãe Francisca por ser a primeira pessoa deste mundo a acreditar em mim! Por todo o exemplo de força, mostrando que a vida pode sim ser sempre reconstruída! Obrigado também por sempre me incentivar a estudar e dizer sempre que é desta forma que mudamos a nossa vida!

A minha fiel companheira, Ester, sempre ao meu lado, com sua simplicidade, seu jeito meigo e cheio de amor! Obrigado por estar sempre disposta a me ajudar, a me tirar dos pensamentos sombrios, por ter paciência em ouvir meus dramas existenciais. Por ter me tornado uma pessoa melhor, por me fazer acreditar em mim. Te amo!

A tia Zélia, por seu amor, por sua simplicidade e por ser um exemplo de honestidade e perseverança.

A meus irmãos, pelo amor de vocês! A meus sobrinhos, por todos os sorrisos e abraços sinceros!

Aos meus amigos/irmãos que a Rural me deu, Daniel e Bruno, pelo companheirismo, paciência e amizade.

A todos os 'my friends', PC, Camila, Miuri, Jéssica, Clarissa e Bruna, por todos os momentos de descontração, por todos os karaokês no laboratório, por cada risada que me fazem dar.

A minha família de coração, Zé e Almira, por todo o incentivo e oração.

A minha amiga e orientadora Mariana. Por ser um exemplo de caráter e competência profissional. Por todos os ensinamentos, pela paciência e incentivo. Sempre disposta a ajudar a todos. E ainda tive a honra de ser seu primeiro orientado! Obrigado por tudo!

A todos os técnicos do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial, Edlene e Roberto, por todo o apoio e comprometimento.

Aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos, em especial a Prof.a Maria Ivone.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa durante todo o período do Curso de Mestrado, permitindo que meu desse continuidade aos meus estudos e o título de Mestre fosse obtido.

A UFRRJ, por ter possibilitado a minha evolução como pessoa e profissional.

## RESUMO

SANTOS, Matheus Augusto Silva. **Produção, caracterização e viabilidade de partículas carreadoras de leveduras utilizando a gelificação iônica.** 2019. 86p Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

Neste trabalho foram desenvolvidas, caracterizadas e avaliadas em relação a viabilidade, partículas carreadoras de leveduras, obtidas através da encapsulação pelo método de gelificação iônica externa e interna, seguida de secagem. Para isso, a execução do trabalho foi dividida em duas partes. Na primeira etapa foi realizada a comparação de duas técnicas de encapsulação, gelificação iônica externa e interna, como protetoras de células de *Saccharomyces cerevisiae*, seguidas de secagem em estufa. Nesta etapa foram realizadas cinéticas de secagem, e os dados experimentais foram ajustados a modelos matemáticos. Foi calculada a eficiência da encapsulação e da secagem, e as partículas foram analisadas em relação ao teor de umidade, a higroscopicidade, atividade de água e morfologia. Apesar de ambas as técnicas apresentarem similar eficiência de encapsulação, a gelificação iônica interna apresentou óleo residual na superfície das partículas e uma menor eficiência de secagem quando comparada a gelificação iônica externa. Assim, esta última foi selecionada para a segunda parte do trabalho, na qual foi realizada a encapsulação da cepa *Saccharomyces boulardii* por gelificação iônica externa. As partículas obtidas foram secas em quatro temperaturas diferentes (30, 40, 50 e 60 °C), avaliando a cinética de secagem, a eficiência de encapsulação e de secagem, a viabilidade das leveduras antes e depois do processo e a umidade e a higroscopicidade. Foi avaliado também o recobrimento das partículas com quitosana, que, em seguida, foram secas na temperatura que apresentou maior eficiência. A caracterização foi realizada quanto a umidade, higroscopicidade, atividade de água, morfologia, eficiência de encapsulação e por espectroscopia de infravermelhos. Além disso, foram realizadas isotermas de sorção, e o estudo da estabilidade durante o armazenamento e a resistência, quando submetidas a simulação gastrointestinal *in vitro*. A temperatura de secagem selecionada foi a de 40 °C, por apresentar a maior taxa de sobrevivência da levedura *S. boulardii*. As partículas recobertas com quitosana apresentaram uma maior resistência aos fluidos do trato gastrointestinal, e ainda, maior proteção durante o armazenamento em todas as temperaturas analisadas. O desenvolvimento de partículas carreadoras de leveduras a partir da utilização de técnicas de encapsulação, gelificação iônica externa e interna, propicia o aumento da viabilidade deste micro-organismo.

**Palavras chave:** microencapsulação, gelificação iônica, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*.

## ABSTRACT

SANTOS, Matheus Augusto Silva. **Production, characterization and viability of yeast carrier particles using ionic gelation.** 2019. 86p Dissertation (Master in Food Science and Technology). Instituto de Tecnologia, Departamento de Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2019.

In this work, yeast carrier particles, obtained through encapsulation by the external and internal ionic gelation method, were developed, characterized and evaluated in relation to viability, followed by drying. For this, the research was divided into two parts. In the first step, two encapsulation techniques, external and internal ionic gelation, were carried out as *Saccharomyces cerevisiae* cell protectors, followed by oven drying. At this stage, drying kinetics were performed, and the experimental data were fitted to mathematical models. The encapsulation and drying efficiency was calculated, and the particles were analyzed for moisture content, hygroscopicity, water activity and morphology. Although both techniques presented similar encapsulation efficiency, internal ionic gelation had residual oil on the surface of the particles and a lower drying efficiency when compared to external ionic gelation. Thus, the latter was selected for the second part of the work, in which the encapsulation of *Saccharomyces boulardii* strain was carried out by external ionic gelation. The obtained particles were dried at four different temperatures (30, 40, 50 and 60 °C), evaluating drying kinetics, encapsulation and drying efficiency, yeast viability before and after the process and moisture and hygroscopicity. It was also evaluated the coating of the particles with chitosan, which were then dried at the temperature that showed the highest efficiency. The characterization was carried out regarding moisture, hygroscopicity, water activity, morphology, encapsulation efficiency and infrared spectroscopy. In addition, sorption isotherms were performed, and the study of storage stability and resistance, when submitted to gastrointestinal simulation in vitro. The selected drying temperature was 40 °C, as it had the highest survival rate of *S. boulardii* yeast. The particles coated with chitosan presented a greater resistance to the fluids of the gastrointestinal tract, and also, greater protection during the storage in all the temperatures analyzed. The development of yeast-bearing particles from the use of encapsulation techniques, external and internal ionic gelation, enhances the viability of this microorganism.

**Keywords:** microencapsulation, ionic gelation, *Saccharomyces cerevisiae*, *Saccharomyces boulardii*.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura do Alginato de sódio.....	24
Figura 2: a) Estrutura da quitina e b) Estrutura da quitosana. ....	25
Figura 3: Formação do modelo <i>egg-box</i> .....	26
Figura 4: Resumo dos procedimentos do Capítulo 2.....	40
Figura 5: Esquema do processo de gelificação iônica externa. ....	41
Figura 6: Esquema do processo de gelificação iônica interna. ....	41
Figura 7: Microscopia ótica das partículas úmidas: a) partícula obtida a partir da gelificação iônica externa (30x) e b) partícula obtida a partir da gelificação iônica interna (40x).....	46
Figura 8: Cinética de secagem a 30 °C das partículas formadas pela gelificação iônica externa acompanhada das curvas ajustadas aos modelos. ....	47
Figura 9: Cinética de secagem a 30 °C das partículas formadas pela gelificação iônica interna acompanhada das curvas ajustadas aos modelos. ....	47
Figura 10: Resumo dos procedimentos do Capítulo 3.....	57
Figura 11: Esquema do processo de gelificação iônica externa. ....	58
Figura 12: a) Desenho esquemático do recipiente hermético onde foram armazenadas as amostras para a construção de isothermas de sorção e b) Recipientes herméticos experimentais. ....	60
Figura 13: Procedimento realizado na Simulação Gástrica.....	61
Figura 14: Procedimento realizado na Simulação Entérica.....	62
Figura 15: Cinética de secagem e ajuste as modelos: a) secagem a 30 °C; b) secagem a 40 °C; c) secagem a 50 °C; d) secagem a 60 °C. ....	67
Figura 16: Microscopia ótica das partículas úmida com aumento de 30x: a) partícula alginato e b) partícula alginato-quitosana. ....	69
Figura 17: Microscopia eletrônica de varredura das partículas secas com aumento de 500x: a) partícula alginato e b) partícula alginato-quitosana.....	69
Figura 18: Espectro de absorção na região do infravermelho: a) alginato de sódio, b) quitosana, c) partícula de alginato e d) partícula alginato-quitosana.....	71
Figura 19: Viabilidade da <i>S. boulardii</i> durante o armazenamento: a) partículas de alginato de sódio; b) partículas de alginato-quitosana. ....	72
Figura 20: Dados experimentais e ajustados as modelos para isothermas de sorção: a) partículas de alginato e b) partículas de alginato-quitosana.....	75

Figura 21: Dados experimentais obtidos na simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> . .....	77
Figura 22: Curva de concentração microbiana para a cepa <i>S. cerevisiae</i> . .....	84
Figura 23: Curva de concentração microbiana para a cepa <i>S. boulardii</i> . .....	85

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Diâmetro médio das partículas para cada técnica de microencapsulação. ....	19
Tabela 2: Microencapsulação de leveduras do gênero <i>Saccharomyces</i> . ....	23
Tabela 3: Valores para a concentração de leveduras nas partículas ( <sup>1</sup> UFC.g <sup>-1</sup> e <sup>2</sup> log UFC.g <sup>-1</sup> ) e eficiência da microencapsulação e secagem (%). ....	44
Tabela 4: Valores experimentais para umidade (g.100 g <sup>-1</sup> ), higroscopicidade (g.100 g <sup>-1</sup> ), atividade de água das partículas e teor de lipídios (%). ....	45
Tabela 5: Parâmetros dos modelos e análise estatística para secagem de cada técnica. ....	48
Tabela 6: Valores de atividade de água relacionados às soluções salinas saturadas a 30 °C...	59
Tabela 7: Valores para a concentração de levedura nas partículas e eficiência da secagem....	64
Tabela 8: Valores experimentais para umidade (g.100 g <sup>-1</sup> ) e higroscopicidade (g.100 g <sup>-1</sup> ) das partículas.....	65
Tabela 9: Parâmetros relacionados aos dados experimentais ajustados aos modelos de secagem. ....	66
Tabela 10: Valores experimentais para concentração <i>S. boulardii</i> na partícula seca (log UFC.g <sup>-1</sup> ), umidade (g.100 g <sup>-1</sup> ), higroscopicidade (g.100 g <sup>-1</sup> ), atividade de água e eficiência de encapsulação e secagem das partículas (%). ....	68
Tabela 11: Definição de parâmetros para os modelos de isoterma de sorção a 30 ° C . ....	74

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO I</b> .....	13
1 INTRODUÇÃO .....	14
2 Objetivos .....	15
2.1 Objetivo Geral .....	15
2.2 Objetivos Específicos .....	15
3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	16
<b>CAPÍTULO II</b> .....	18
2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....	19
2.1.1 Microencapsulação .....	19
2.1.2 Probióticos .....	19
2.1.3 Gênero <i>Saccharomyces</i> .....	20
2.1.4 Microencapsulação aplicada a micro-organismos .....	21
2.1.5 Materiais de parede .....	24
a) Alginato de sódio .....	24
b) Quitosana .....	24
2.1.6 Microencapsulação por gelificação iônica .....	25
a) Gelificação Iônica Externa .....	25
b) Gelificação Iônica Interna .....	26
2.1.7 Liberação controlada .....	27
2.2 Secagem das partículas .....	28
2.1.8 Aplicação da <i>S. boulardii</i> em alimentos .....	28
2.3 Referências Bibliográficas .....	30
<b>CAPÍTULO III</b> .....	36
RESUMO .....	37
ABSTRACT .....	38
3.1 INTRODUÇÃO .....	39
3.2 MATERIAIS E MÉTODOS .....	39
3.2.1 Materiais .....	39
3.2.2 Armazenamento da cultura e geração de biomassa .....	40
3.2.3 Métodos .....	40
a) Microencapsulação por gelificação iônica externa .....	40
b) Microencapsulação por gelificação iônica interna .....	41
c) Secagem .....	42
3.2.4 Métodos Analíticos .....	42
a) Estimativa da concentração microbiana .....	42
b) Quantificação das leveduras encapsuladas .....	42
c) Eficiência da microencapsulação e secagem .....	42
d) Umidade .....	43
e) Higroscopicidade .....	43
f) Atividade de água .....	43
g) Morfologia .....	43
h) Teor de lipídios .....	43
i) Análise estatística .....	43
3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	43
3.3.1 Quantificação das leveduras encapsuladas, eficiência da microencapsulação e da secagem .....	43
3.3.2 Umidade, higroscopicidade e atividade de água das partículas .....	45
3.3.3 Morfologia .....	46

3.3.4	Cinética da secagem.....	46
3.4	CONCLUSÃO .....	48
3.5	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	49
	<b>CAPÍTULO IV</b> .....	52
	RESUMO .....	53
	ABSTRACT .....	54
4.1	INTRODUÇÃO .....	55
4.2	MATERIAIS E MÉTODOS .....	56
4.2.1	Materiais .....	56
4.2.2	Armazenamento da cultura e geração de biomassa .....	56
4.2.3	Métodos .....	56
a)	Microencapsulação por Gelificação Iônica Externa.....	57
b)	Estudo do processo de secagem .....	58
c)	Recobrimento das partículas .....	59
d)	Isotermas de sorção .....	59
e)	Viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem.....	60
f)	Simulação gastrointestinal.....	60
4.2.4	Métodos analíticos .....	62
a)	Estimativa da concentração microbiana.....	62
b)	Quantificação da levedura encapsulada .....	62
c)	Eficiência da encapsulação e secagem .....	63
d)	Umidade .....	63
e)	Higroscopicidade.....	63
f)	Atividade de água.....	63
g)	Morfologia.....	63
h)	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	63
4.3	RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	64
4.3.1	Estudo do processo de secagem.....	64
4.3.2	Características das partículas encapsuladas com e sem recobrimento de quitosana, secas na temperatura de 40 °C.....	67
a)	Morfologia das partículas.....	68
b)	Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) .....	69
c)	Viabilidade durante a estocagem.....	72
d)	Isotermas de sorção .....	73
e)	Simulação gastrointestinal <i>in vitro</i> .....	75
4.4	CONCLUSÃO .....	77
4.5	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	78
	<b>CONCLUSÃO GERAL</b> .....	83
	APÊNDICE A - Curva de concentração microbiana <i>S. cerevisiae</i> .....	84
	APÊNDICE B - Curva de concentração microbiana para a cepa <i>S. boulardii</i> .....	85

**CAPÍTULO I**  
**INTRODUÇÃO GERAL**

## 1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação é uma tecnologia empregada por diversas áreas industriais, principalmente alimentícia e farmacêutica, e pode ser entendida ou definida como sendo o processo pelo qual vários compostos ou micro-organismos podem ser armazenados dentro de uma estrutura de tamanho microscópico ou revestimento para a proteção e/ou posterior liberação (GARTI e MCCLEMENTS, 2012; GAONKAR et al., 2014).

Muitos estudos utilizam a microencapsulação como métodos protetivos para preservar o núcleo de interesse. Neste processo, o recheio é incorporado em uma matriz capaz de fornecer a proteção contra os fatores externos, durante a produção, armazenamento e ingestão dos alimentos, preservando o material ativo das partículas contra o pH baixo, os sais biliares e outros produtos presentes no trânsito gastrointestinal, e ainda, garantindo a liberação controlada em condições particulares (DUONGTHINGOC et al., 2013; RATHORE et al., 2013; HOLKEM et al., 2017; SHORI, 2017).

No mundo globalizado, a busca por alimentos que possuam funcionalidade tem aumentado a cada ano. Com este propósito, as indústrias de alimentos, farmacêuticas e químicas, procuram inserir em seus produtos micro-organismos probióticos (ZHANG et al., 2016), que são capazes de manter e também restaurar a saúde intestinal, reduzindo problemas como: diarreia, doenças intestinais inflamatórias, úlceras e até mesmo o câncer (SIRESWAR et al., 2017).

O termo probiótico foi utilizado pela primeira vez por Kollath (1953) e se tornou um conceito bastante presente na atualidade. Segundo a FAO/OMS (2002), consiste em micro-organismos vivos que possuem a capacidade de conferir benefícios aos seres humanos e também a outros animais.

As bactérias são comumente utilizadas como probióticas, principalmente as ácido-láticas, como *Lactobacillus* e *Bifidobactérias*, mas também são encontradas a utilização de fungos, *Saccharomyces* e *Aspergillus* (HOSSAIN et al., 2017).

As leveduras, principalmente *Saccharomyces* são utilizadas como agentes terapêuticos e preventivos de doenças intestinais, trazendo benefícios para a saúde humana, tais como a produção de enzimas que degradam toxinas patogênicas, fortalecendo o sistema imunológico (ARSLAN et al., 2015).

Entretanto, para que haja um benefício na ingestão de tais micro-organismos, eles devem ser capazes de tolerar o ambiente ácido do estômago e ter sua liberação apenas no colón. Além disso, outros fatores como as condições de armazenamento e processamento podem causar a baixa sobrevivência desses micro-organismos (HOLKEM et al., 2017).

Sendo assim, torna-se necessário a utilização de métodos protetivos que preservem a célula de interesse. Com este propósito, algumas técnicas são empregadas na microencapsulação de micro-organismos probióticos, destacando-se as seguintes: extrusão, atomização ou secagem por pulverização, emulsificação e gelificação iônica (SULTANA et al., 2000; DUONGTHINGOC et al., 2013; ARSLAN et al., 2015; MARTÍN et al., 2015; HOLKEM et al., 2017). A gelificação iônica externa é um dos mais amplos mecanismos de microencapsulação utilizados para formar hidrogéis, seguido pela técnica de gelificação interna. Ambas, baseiam-se na reticulação entre as cadeias poliméricas quando expostas a sais divalentes, principalmente cálcio, imobilizando as células microbianas nas partículas que são formadas (LEONG et al., 2016).

Entre os polímeros mais utilizados e estudados para encapsular células microbianas que podem ser empregados na gelificação iônica, o alginato se destaca por fornecer um ambiente com condições apropriadas para a imobilização da cultura probiótica, usando reagentes biocompatíveis e baixas temperaturas. Porém, após a encapsulação podem ocorrer a formação

de poros na rede do gel, permitindo a difusão do material de interesse para o ambiente externo (SIMÓ et al., 2017).

A fim de aumentar a estabilidade mecânica e química do gel e aprisionar mais fortemente o núcleo, um recobrimento da partícula com um polímero catiônico, como a quitosana, pode ser realizado (CAO et al., 2014).

Além do recobrimento, a secagem das partículas pode contribuir para o aumento da resistência frente as modificações do meio, tanto químicas quanto físicas, das partículas, ou seja, da matriz encapsulante, incrementando ainda mais a estabilidade do produto formado e tornando-o, em relação a estocagem, viável por muito mais tempo.

Alguns métodos de secagem são comumente utilizados em conjunto com a microencapsulação, como: liofilização, *Spray dryer* e leite fluidizado (DUONGTHINGOC et al., 2013; SCHELL e BEERMANN, 2014; ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017; CHEN et al., 2017). Porém, até o momento, não foram encontrados na literatura a secagem utilizando estufa de circulação de ar, de partículas de levedura obtidas a partir da gelificação iônica.

Portanto, torna-se importante investigar a microencapsulação de células de levedura, pelo método da gelificação iônica externa e interna, a fim de que ocorra a preservação das propriedades probiótica destes micro-organismos. Além disso, há a necessidade de se estudar o desenvolvimento e a caracterização das partículas secas, para obter, ao final, partículas estáveis que aumentem a disponibilidade do uso deste ingrediente probiótico em alimentos funcionais com alto valor agregado.

## **2 OBJETIVOS**

### **2.1 Objetivo Geral**

Desenvolver, caracterizar e avaliar a viabilidade de micropartículas carreadoras de levedura, obtidas através da microencapsulação pelo método de gelificação iônica externa e interna, seguida de secagem.

### **2.2 Objetivos Específicos**

- Comparar as técnicas de gelificação iônica externa e interna, em relação ao processo e características das partículas formadas;  
A partir da técnica selecionada:
  - Caracterizar as partículas obtidas quanto a umidade, higroscopicidade, atividade de água e morfologia;
  - Realizar o estudo da cinética de secagem nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C das partículas;
  - Avaliar a estabilidade das partículas secas em relação a estocagem durante 120 dias nas temperaturas de -18, 7 e 30 °C;
  - Realizar a construção de isotermas de sorção e o estudo da resistência, quando submetidas a simulação gastrointestinal, das partículas secas.

### 3 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017. ISSN 0023-6438.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015. ISSN 0023-6438.

CAO, H.; YE, H.; LI, C.; ZHENG, L.-L.; LI, Y.; OUYANG, Q.-F. Effect of microencapsulated cell preparation technology and conditions on the catalytic performance of *Penicillium purpurogenum* Li-3 strain cells. **Process Biochemistry**, v. 49, n. 5, p. 791-796, 2014. ISSN 1359-5113.

CHEN, H.-Y.; LI, X.-Y.; LIU, B.-J.; MENG, X.-H. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 248-255, 2017. ISSN 1756-4646.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782-1788, 2013. ISSN 0308-8146.

GAONKAR, A. G.; VASISHT, N.; KHARE, A. R.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide**. USA: Elsevier, 2014. ISBN 0124047351.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Cambridge: Elsevier, 2012. ISBN 0857095900.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; BARIN, J. S.; FLORES, É. M. M.; MULLER, E. I.; CODEVILLA, C. F.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 216-221, 2017. ISSN 0023-6438.

HOSSAIN, M. I.; SADEKUZZAMAN, M.; HA, S.-D. Probiotics as potential alternative biocontrol agents in the agriculture and food industries: A review. **Food Research International**, 2017. ISSN 0963-9969.

LEONG, J.-Y.; LAM, W.-H.; HO, K.-W.; VOO, W.-P.; LEE, M. F.-X.; LIM, H.-P.; LIM, S.-L.; TEY, B.-T.; PONCELET, D.; CHAN, E.-S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44-60, 2016. ISSN 1674-2001.

MARTÍN, M. J.; LARA-VILLOSLADA, F.; RUIZ, M. A.; MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015. ISSN 1466-8564.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013. ISSN 0260-8774.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. **Food research international**, v. 62, p. 308-314, 2014. ISSN 0963-9969.

SHORI, A. B. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2017. ISSN 1978-3019.

SIMÓ, G.; FERNÁNDEZ-FERNÁNDEZ, E.; VILA-CRESPO, J.; RUIPÉREZ, V.; RODRÍGUEZ-NOGALES, J. M. Research progress in coating techniques of alginate gel polymer for cell encapsulation. **Carbohydrate Polymers**, v. 170, p. 1-14, 2017. ISSN 0144-8617.

SIRESWAR, S.; DEY, G.; SREESOUNDARYA, T. K.; SARKAR, D. Design of probiotic-fortified food matrices influence their antipathogenic potential. **Food Bioscience**, 2017. ISSN 2212-4292.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, 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, n. 1, p. 47-55, 2000. ISSN 0168-1605.

ZHANG, Y.; LI, L.; GUO, C.; MU, D.; FENG, B.; ZUO, X.; LI, Y. Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: a meta-analysis. **BMC gastroenterology**, v. 16, n. 1, p. 62, 2016. ISSN 1471-230X.

**CAPÍTULO II**  
**REVISÃO DA LITERATURA**

## 2.1 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1.1 Microencapsulação

A microencapsulação surgiu a partir da necessidade em proteger compostos bioativos, ingredientes alimentícios, fármacos, componentes de cosméticos e micro-organismos, com o objetivo de aumentar a estabilidade e a resistência a ambientes externos extremos, como as condições gastrointestinais. O processo de microencapsulação consiste no armazenamento de pequenas partículas ou gotas no interior de uma camada de revestimento ou matriz (SHAHIDI e HAN, 1993; GARTI e MCCLEMENTS, 2012).

Os compostos bioativos ou micro-organismos, quando microencapsulados, são chamados de núcleo ativo ou fase interna, enquanto o material que faz o envolvimento deste ativo é, geralmente, chamado de parede, membrana, fase de suporte ou revestimento. É importante que o revestimento seja inerte ao núcleo, podendo ser composto de polissacarídeos naturais ou modificados, lipídios, proteínas, ceras e polímeros sintéticos (F. GIBBS, 1999).

A microencapsulação de um composto bioativo ou micro-organismo também garante a sua liberação controlada, que pode ocorrer ao longo do tempo, como uma liberação sustentada, em um momento determinado, como num estágio específico de processamento ou armazenamento, e ainda, em locais específicos, como no interior do corpo humano, no trato gastrointestinal. São conhecidos diversos mecanismos de liberação tais como, temperatura, dissolução em solvente, pressão ou cisalhamento, pH e ação enzimática (GAONKAR et al., 2014).

As estruturas formadas durante a microencapsulação podem ser agrupadas em categorias, ou seja, microcápsulas ou partículas. Morfologicamente, a primeira denominação ocorre quando o núcleo está completamente envolvido pelo material de parede utilizado, localizado no interior da matriz, enquanto isso, nas partículas a fase interna está distribuída por todo o volume do revestimento, formando uma espécie de ‘esponja’. Existe ainda uma terceira estrutura formada quando as partículas são envolvidas por um recobrimento adicional, originando uma partícula multinucleada (DESAI e JIN PARK, 2005; GAONKAR et al., 2014). Além disso, as micropartículas podem também variar de tamanho dependendo da técnica de microencapsulação utilizada (Tabela 1).

**Tabela 1:** Diâmetro médio das partículas para cada técnica de microencapsulação.

<b>Técnica de Microencapsulação</b>	<b>Diâmetro médio (µm)</b>
<i>Spray Drying</i>	10 a 100
Gelificação iônica por emulsificação	0,1 a 1000
Gelificação iônica por extrusão	100 a 5000
Co-extrusão	100 a 9000
<i>Spray Chilling</i>	1 a 5000

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

### 2.1.2 Probióticos

Os probióticos são definidos como micro-organismos vivos com a capacidade de conferir benefícios ao hospedeiro quando administrado de forma adequada (FAO/WHO, 2002).

As quantidades recomendadas para ingestão podem variar entre os países. No Brasil, a quantidade mínima diária de probióticos é de  $10^8$  a  $10^9$  UFC/g a fim de que se alcance uma ação terapêutica, ou seja, são necessários o consumo de 100 g de alimento que contenham cerca de  $10^6$  a  $10^7$  UFC de micro-organismos probióticos (ANVISA, 2002). Enquanto nos Estados Unidos a exigência é de  $10^8$  UFC/g de produto (DALIRI e LEE, 2015).

A utilização de probióticos na dieta está associada a diminuição do risco de desenvolvimento de inúmeras doenças relacionadas ao trato gastrointestinal humano. Com a recuperação e manutenção da homeostase intestinal e doenças como diarreia, inflamações e irritação no intestino, úlceras estomacais e até mesmo alguns tipos de câncer podem ser evitadas com a ingestão diária de linhagens probióticas (ZHANG et al., 2016).

A ação dos probióticos pode ser entendida por partes. Primeiramente está relacionada com a modulação das defesas do hospedeiro, ou seja, podem influenciar o sistema imunológico através da geração de metabólitos, componentes da parede celular ou DNA. Sendo assim, as células intestinais são o alvo principal. A segunda está vinculada com o efeito que pode ocorrer sobre outros micro-organismos, principalmente os patógenos, buscando reestabelecer o equilíbrio microbiano intestinal. E por fim, podem ser capazes de afetar alguns produtos microbianos como as toxinas (COOK et al., 2012; POLONI et al., 2017).

Além da necessidade em comprovar os efeitos benéficos ao organismo, os probióticos devem ser capazes de sobreviverem, proliferarem e colonizarem locais específicos. Sob nenhuma hipótese podem ser patógenos ou desencadear respostas alérgicas ao hospedeiro. Devem ser estimuladores do sistema imunológico contra patógenos. É importante que estes micro-organismos sejam facilmente cultiváveis e resistentes as condições de manipulação tecnológica, como por exemplo, temperatura, pH e concentração de oxigênio (DALIRI e LEE, 2015).

Como a ação destes micro-organismos ocorre no interior do intestino, uma das primeiras barreiras a ser suportada é a saliva, rica em amilases, seguida pela acidez estomacal e a bile no trato digestivo, antes da chegada ao intestino. Diversas bactérias possuem propriedades probiótica, e os grupos mais estudados são das bactérias lácticas e bifidobactérias. Entretanto, algumas linhagens de leveduras e de fungos filamentosos também são considerados probióticos, com comprovadas ações benéficas ao hospedeiro (TRIPATHI e GIRI, 2014).

### 2.1.3 Gênero *Saccharomyces*

Embora as leveduras sejam utilizadas como micro-organismos produtores de bebidas fermentadas, principalmente cervejas, algumas linhagens possuem propriedades probiótica. São totalmente diferentes do comportamento de bactérias probiótica, com diferentes estruturas fisiológicas e possuem a vantagem de não adquirirem genes resistentes ou não serem afetadas por antibióticos (CINDORUK et al., 2007).

Dentre as linhagens mais utilizadas de *Saccharomyces* se destaca a *Saccharomyces boulardii*. Esta levedura foi isolada pela primeira vez da casca de lichia na Indochina e utilizada para o tratamento de diarreias na França na década de 60. Diversos estudos são encontrados na literatura, em animais e humanos voluntários, indicando um perfil eficaz como método preventivo e terapêutico para o tratamento de diarreias, além de ser seguro para a ingestão oral (MCFARLAND e BERNASCONI, 1993).

Estas leveduras possuem uma taxa de crescimento maior entre as temperaturas de 22 a 30 °C, embora existam linhagens capazes de tolerar a temperaturas mais altas. A *S. boulardii* é uma das poucas que sobrevivem a temperatura de 37 °C e ainda, possuem certa capacidade de tolerar a acidez estomacal em períodos curtos. Quando administrada por via oral, grande parte

é destruída, geralmente a concentração nas fezes é de 100 a 1000 vezes menor que a concentração inicial (MCFARLAND e BERNASCONI, 1993; MCFARLAND, 2010).

Atualmente, as leveduras probiótica são utilizadas em mais de 80 países entre a Europa, América do Sul e do Norte e Oriente Médio. Existem muitos produtos comercializados com linhagens de *Saccharomyces*, na forma de pós liofilizados ou em cápsulas, podendo ainda estar presente em misturas de linhagens probiótica em cápsulas ou em bebidas (FLOCH et al., 2016).

Segundo Mcfarland (2010) a *S. boulardii* os mecanismos de ação desta levedura no cólon podem ser subdivididos em 3 principais áreas, luminal, trófica e como sinalizador na mucosa para efeitos anti-inflamatórios. O autor descreve, ainda, efeitos protetivos desta cepa no organismo humano, a degradação de toxinas patogênicas, interferem na adesão de patógenos, preservam a fisiologia intestinal normal, restauração indiretamente do equilíbrio de ácidos graxos de cadeia curta, também pode agir no aumento dos níveis de IgA (imunoglobulina A).

Os probióticos do gênero *Sacharomyces* foram testados quanto à eficácia clínica em vários tipos de doenças agudas, incluindo diarreia associada aos antibióticos, infecções por *Clostridium difficile*, doença de *Helicobacter pylori* (*H. pylori*), diarreia adulta aguda, diarreia enteral nutricional e diarreia do viajante (MANSOUR-GHANAIE et al., 2003; CINDORUK et al., 2007; SZAJEWSKA et al., 2007).

Sharif et al. (2016) investigaram através de estudos clínicos a eficiência de levedura, *S. boulardii*, no combate dos sintomas da diarreia em crianças. Identificaram que com a administração deste micro-organismo probiótico, há uma diminuição substancial dos sintomas, da gravidade e também do tempo de duração desta doença. Além disso, Hayes e Vargas (2016) encontraram também evidências de melhora da diarreia em crianças quando estas faziam tratamentos com antibióticos.

Recentemente estudos na área animal revelaram que linhagens de *S. cerevisiae* foram capazes de absorver micotoxinas quando utilizadas na alimentação. Este estudo relata ainda que o uso deste método biológico pode substituir a administração de antibióticos, além de ser considerado probiótico (POLONI et al., 2017).

Sendo assim, a utilização de métodos protetivos pode aumentar a resistência destes micro-organismos, e ainda, auxiliar na inserção destas leveduras probiótica em produtos alimentícios industrializados.

#### **2.1.4 Microencapsulação aplicada a micro-organismos**

Os micro-organismos probióticos estão susceptíveis as condições adversas do ambiente em que se encontram, muitas vezes diminuindo ou inibindo sua sobrevivência e proliferação (RATHORE et al., 2013).

A fim de contornar este problema, a microencapsulação das células microbianas tem sido utilizada com o objetivo de melhorar a viabilidade frente aos micro-organismos livres, protegendo e fornecendo resistência no armazenamento, processamento e a ambientes extremos como o trato gastrointestinal (SULTANA et al., 2000; TRIPATHI e GIRI, 2014).

Diversas técnicas de microencapsulação foram investigadas com a finalidade de manter o micro-organismo vivo e em quantidade até o local de interesse. Os métodos de microencapsulação de probióticos mais encontrados na literatura são por *Spray drying* (ZHAO et al., 2008; FRITZEN-FREIRE et al., 2012; ARSLAN, ERBAS, et al., 2015), *Spray chilling* (ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017), gelificação iônica por emulsificação (TAKEI et al., 2010; HOLKEM et al., 2017) e extrusão (MCMASTER et al., 2005; ZHAO et al., 2012).

Estudos sobre a microencapsulação de bactérias lácticas são comuns e encontrados em maior quantidade na literatura, como Sultana et al. (2000), Schell e Beermann (2014) e Holkem et al. (2017), que utilizaram técnicas de microencapsulação a fim de aumentar a resistência de

*Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, durante a simulação gastrointestinal. O encapsulamento de leveduras probiótica também são, em menor quantidade, objeto de estudo, criando a necessidade em explorar métodos adequados a este tipo de cultura.

Segundo Arslan, Erbas, et al. (2015) a microencapsulação de uma cultura de *S. boulardii* utilizando *Spray drying*, aumentou significativamente a resistência das células quando analisadas em relação a sobrevivência na simulação do trato gastrointestinal, melhorando a viabilidade em relação aos micro-organismos livres. Resultado este, que também foi encontrado por Thomas et al. (2014), realizando a microencapsulação por múltiplas camadas.

A Tabela 2 apresenta os estudos encontrados até o momento das técnicas utilizadas na microencapsulação de células de leveduras, e ainda, os materiais de parede empregados.

**Tabela 2:** Microencapsulação de leveduras do gênero *Saccharomyces*.

<b>Levedura</b>	<b>Técnica de microencapsulação</b>	<b>Material de Parede</b>	<b>Referência</b>
<i>S. boulardii</i>	Gelificação iônica externa	Alginato de sódio e quitosana	(GRAFF et al., 2008)
<i>S. boulardii</i>	Gelificação iônica externa	Isolado proteico do soro de leite e alginato de sódio	(HÉBRARD et al., 2010)
<i>S. cerevisiae</i>	Gelificação iônica interna	Alginato de sódio	(TAKEI et al., 2010)
<i>S. boulardii</i>	<i>Spray drying</i>	Isolado proteico do soro de leite	(DUONGTHINGOC et al., 2013; DUONGTHINGOC et al., 2014)
<i>S. boulardii</i>	Layer-by-Layer	Quitosana e sulfato de dextrina	(THOMAS et al., 2014)
<i>S. boulardii</i>	Gelificação iônica externa	Goma xantana, alginato de sódio e inulina	(FRATIANNI et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i> Y235	Gelificação iônica interna	Alginato de sódio e quitosana	(SONG et al., 2014)
<i>S. boulardii</i>	Gelificação iônica externa	Alginato de sódio	(GALLO et al., 2014)
<i>S. cerevisiae</i>	Gelificação iônica externa	Alginato de sódio	(GHORBANI-CHOBOGHLO et al., 2015)
<i>S. boulardii</i>	<i>Spray drying</i>	Maltodextrina DE18, Goma arábica, amido modificado, gelatina, isolado proteico de soro de leite, isolado proteico de pera	(ARSLAN, ERBAS, et al., 2015)
<i>S. boulardii</i>	<i>Spray drying</i> e <i>Spray chilling</i>	Goma arábica, $\beta$ -ciclodextrina, óleo de palma hidrogenado	(ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017)
<i>S. cerevisiae</i>	Coacervação complexa + <i>Spray drying</i>	Isolado proteico do soro de leite e maltodextrina DE10	(DE LA CRUZ-GAVIA et al., 2018)
<i>S. cerevisiae</i>	Gelificação iônica externa	Alginato de sódio e quitosana	(SUVARNA et al., 2018)

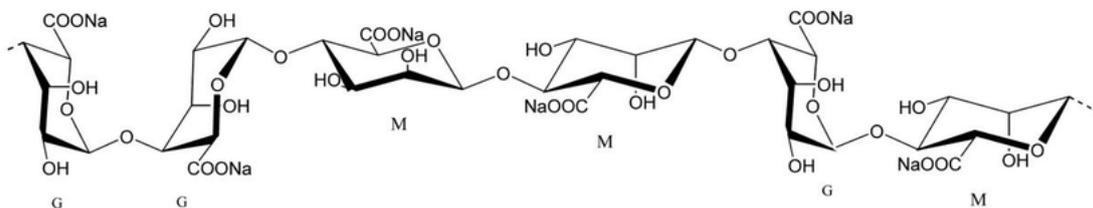
### 2.1.5 Materiais de parede

A escolha do material de parede é de grande importância e deve ser realizada de acordo com a sua compatibilidade com o ativo e com a técnica que será utilizada para a formação das partículas, além disso, é necessário que seja considerado seguro para o consumo humano. Nas subseções seguintes serão apresentados os materiais de parede utilizados nas técnicas de encapsulação deste trabalho, alginato de sódio e quitosana.

#### a) Alginato de sódio

Diversos polímeros naturais possuem a capacidade de formar géis e serem aplicados nos métodos de encapsulamento. O alginato é um dos mais utilizados, pois a partir de íons divalentes e a temperatura ambiente, torna-se possível formar hidrogéis com excelentes características físicas, como poros entre 5 e 200 nm, termicamente estáveis e ainda, são hidrofílicos, sendo adequados na microencapsulação de compostos de alta massa molecular ou materiais hidrofóbicos (LEONG et al., 2016). Através de equipamentos simples, como uma seringa, podem ser produzidas esferas, proporcionando uma grande versatilidade em seu uso.

O alginato de sódio é o sal de sódio derivado do ácido algínico extraído de algas marinhas marrons, é composto por unidades de monómeros, ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e ácido  $\beta$ -D-manurônico (GAONKAR et al., 2014). É um polímero biocompatível e não-tóxico, extremamente empregado como material encapsulante para proteger componentes ativos, principalmente micro-organismos probióticos que são sensíveis a temperatura, pH, oxigênio e outros fatores em que os alimentos são expostos durante o armazenamento e processamento (LEONG et al., 2016). A estrutura do alginato de sódio é apresentada na Figura 1, na qual a indicação G e M representam as unidades do ácido  $\alpha$ -L-gulurônico e ácido  $\beta$ -D-manurônico, respectivamente, com a substituição de um hidrogênio por sódio.



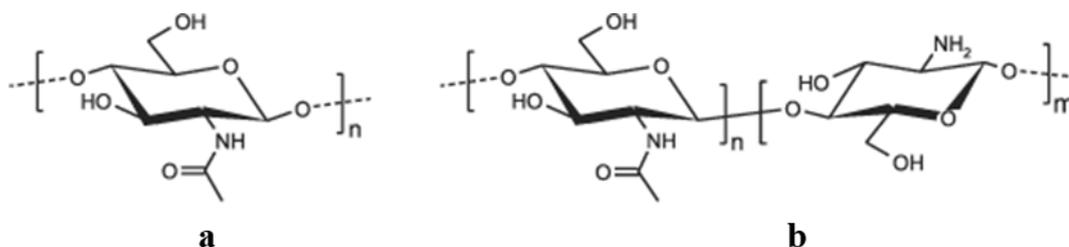
**Figura 1:** Estrutura do Alginato de sódio

Além disso, este material possui a propriedade de formar gel na presença de cálcio, a partir de uma solução de cloreto de cálcio, garantindo a rigidez das partículas formadas, e ainda, não afeta a viabilidade das células microbianas durante a estocagem, e permite a liberação dos compostos imobilizados (CHAN et al., 2002).

Vários métodos de microencapsulação de probióticos, tanto bactérias quanto leveduras, com alginato foram relatados, incluindo secagem por pulverização, extrusão, emulsificação e coacervação (SULTANA et al., 2000; SONG et al., 2014; HOLKEM et al., 2016).

#### b) Quitosana

A quitosana é um polímero semi-sintético, não tóxico, com propriedades de bioadesividade, formado por unidades de N-acetil-D-glicosamina e D-glicosamina, obtida a partir da desacetilação da quitina, polissacarídeo natural, extraído do exoesqueleto de crustáceos. Este polímero, quando submetido a baixos valores de pH apresenta carga positiva (GANDOMI et al., 2016). A estrutura da quitosana é apresentada na Figura 2.



**Figura 2:** a) Estrutura da quitina e b) Estrutura da quitosana.

Este componente tem sido utilizado como um material de recobrimento das partículas que são produzidas a partir de técnicas de encapsulação. Com o recobrimento, os espaços vazios (poros) que eventualmente são formados com a reticulação dos materiais de parede durante a microencapsulação são ocupados, diminuindo a interação do composto ativo com o ambiente externo (TRABELSI et al., 2013; GANDOMI et al., 2016; ANSARI et al., 2017).

Sendo assim, existe a possibilidade de revestir as partículas formadas a partir do alginato de sódio. Ocorre uma interação eletrostática entre os compostos, alginato negativo e quitosana positiva, aumentando a eficiência na proteção de células probiótica com elevação da taxa de sobrevivência destes micro-organismos e maior estabilidade em pH baixo (SHORI, 2017).

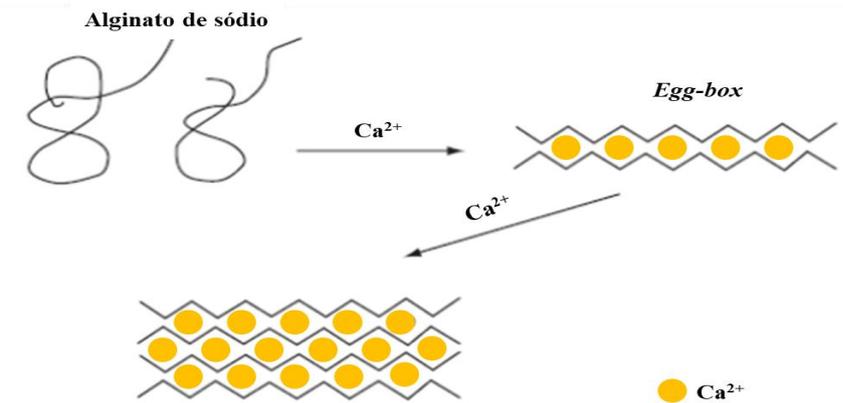
Thomas et al. (2014) realizaram a microencapsulação de *S. boulardii* pela técnica de múltiplas camadas, utilizando sulfato de dextrana e recobrimento com quitosana e observaram a melhoria na resistência em baixo pH. Chávarri et al. (2010) trabalharam com a técnica de encapsulação por extrusão com alginato como material de parede e *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como núcleo, também fizeram o recobrimento das partículas com quitosana, e obtiveram uma maior taxa de sobrevivência quando comparado com as células livres.

### 2.1.6 Microencapsulação por gelificação iônica

#### a) Gelificação Iônica Externa

Considerado um dos mecanismos mais clássicos, a gelificação iônica externa é amplamente utilizada na formação de hidrogéis, principalmente de alginato. É um processo onde ocorre a difusão de cátions entre as cadeias do polímero, forçando uma reticulação e formando uma membrana semissólida. Diversos íons podem ser utilizados nesta técnica, com diferente grau de associação em relação ao alginato, diminuindo conforme a sequência,  $Pb > Cu > Cd > Ba > Sr > Ca > Co, Ni, Zn > Mn$  (MØRCH et al., 2006).

Geralmente, uma solução do polímero é gotejada em uma solução de íons  $Ca^{2+}$ , considerado não-tóxico em relação aos outros cátions, ocasionando a formação de gotículas com um núcleo líquido. O mecanismo de formação das partículas ocorre a partir da formação de ligações cruzadas entre os cátions  $Ca^{2+}$  e o ácido gulurônico do alginato, formando estruturas chamadas de caixa de ovo (*egg-box*), que aprisionam o micro-organismo, a Figura 3 apresenta o desenho esquemático desse processo (LEONG et al., 2016).



**Figura 3:** Formação do modelo *egg-box*.

Ansari et al. (2017) analisaram a sobrevivência de duas linhagens de bactérias lácticas, *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus rhamnosus*, microencapsuladas pela técnica da gelificação externa, utilizando alginato de sódio como material de parede, na simulação *in vitro* do trato gastrointestinal. As células livres obtiveram uma menor resistência em relação aos micro-organismos encapsulados, ou seja, através desta técnica é possível criar uma camada protetora, dependendo do material de parede utilizado, para garantir a liberação controlada do micro-organismo probiótico.

Segundo Halim et al. (2017), o aprisionamento das células bacterianas probióticas *P. acidilactici*, em partículas de alginato, pela técnica de gelificação iônica externa, apresentou um rendimento de cerca de 95%. Esta técnica também foi utilizada na encapsulação de *Lactobacillus plantarum*, aumentando a sobrevivência durante a estocagem. Após 4 semanas de armazenamento na temperatura de 37 °C, houve uma redução de cerca de 80% da viabilidade das células livres quando comparadas às microencapsuladas (CHUN et al., 2014).

Além da aplicação desta técnica em bactérias probióticas, são encontrados na literatura a sua utilização na microencapsulação de leveduras. Gallo et al. (2014) realizaram a microencapsulação de *S. boulardii* pela técnica de gelificação iônica externa utilizando alginato de sódio como material de parede, encontraram um rendimento de microencapsulação de 90%, além disso, houve uma maior resistência das linhagens microencapsuladas frente as células livres na simulação gastrointestinal. Este resultado também foi identificado por Ghorbani-Chobghlo et al. (2015) utilizando cepa de *S. cerevisiae*.

#### b) Gelificação Iônica Interna

A técnica de microencapsulação por gelificação iônica interna como a técnica anterior, é baseada na reticulação das cadeias poliméricas na presença de íons  $\text{Ca}^{2+}$ , com a ocorrência da formação do modelo *egg-box*, porém o processo de obtenção das partículas ocorre em duas etapas. Na primeira etapa uma solução com o material polimérico contendo uma dispersão insolúvel de carbonato de cálcio ( $\text{CaCO}_3$ ) e o composto ou micro-organismo de interesse dispersa em uma fase orgânica, geralmente óleo vegetal, formando uma emulsão água em óleo. Ao final do processo, o meio é acidificado liberando os íons  $\text{Ca}^{2+}$  propiciando a formação de uma rede do polímero internamente (PONCELET et al., 1992; HOLKEM et al., 2016).

Nesta técnica, a liberação do  $\text{Ca}^{2+}$  ocorre no interior das gotículas de alginato presentes na emulsão, isso faz com que a reticulação se inicie no interior destas, aprisionando o ativo. Em contraste com a gelificação iônica externa, a estrutura do gel produzido pela gelificação interna é mais homogênea, embora a formação de poros seja maior, devido a saída do dióxido de

carbono, aumentando a interação entre o composto encapsulado e o ambiente externo (LEONG et al., 2016).

Uma das principais desvantagens da técnica é a dificuldade em retirar a fase oleosa que permanece aderida a superfície das partículas após a separação por filtração ou centrifugação e ainda, o tamanho das partículas é afetado tanto pela reticulação das cadeias poliméricas, dependente da concentração do surfactante, quanto da velocidade da rotação empregada para gerar a mistura de água e óleo (RATHORE et al., 2013).

Alguns estudos indicam que a gelificação iônica interna, como técnica de microencapsulação, possui uma alta taxa de eficiência de encapsulação e proteção do micro-organismo probiótico. Segundo Holkem et al. (2016) esta técnica garante o aumento da viabilidade de células de bactérias lácticas, melhorando a resistência quando submetidas aos fluidos gastrointestinais.

Takei et al. (2010) microencapsularam *S. cerevisiae* por gelificação iônica interna e encontraram uma eficiência superior ao valor de 50%. *Lactobacillus spp.* também foram encapsulados por este método utilizando alginato de sódio. A eficiência da encapsulação encontrada após 150 dias de estocagem em uma temperatura de 25 °C foi superior a 90% (SÁNCHEZ et al., 2017).

Além disso, assim como a gelificação iônica externa, esta técnica tem um custo de processo relativamente baixo, pois utiliza materiais de baixo custo e biocompatíveis, além de ser de possível ampliação a escala industrial.

### **2.1.7 Liberação controlada**

A fim de se realizar a liberação controlada, ocorre a necessidade de desencadear um mecanismo ou o *trigger* (gatilho) para viabilizar a entrega do composto bioativo ou micro-organismo no local desejado, através da escolha tanto dos materiais quanto do método de encapsulação (RATHORE et al., 2013).

Geralmente, a liberação de micro-organismos é desencadeada pela degradação, desintegração ou dissolução das partículas. Portanto, a liberação controlada de probióticos depende do conhecimento da fisiologia complexa do trato gastrointestinal. Diversos mecanismos de entrega podem ser encontrados ao longo da digestão, com base no pH, tempo, pressões peristálticas e na fermentação bacteriana (COOK et al., 2012).

O tempo de passagem do probiótico microencapsulado pelo esôfago está na faixa dos segundos até atingir o estômago. No baixo pH encontrado no estômago, cerca de 1 a 2,5, ocorre a maior perda de viabilidade microbiana, devido a este alto nível de acidez. Além do ácido, a presença de pepsina, enzima proteolítica, pode ocorrer facilmente o rompimento de materiais a base de proteínas. O tempo de retenção nesta fase pode variar de 5 minutos a 2 horas. Esta variação ocorre pela não uniformidade das partículas ingeridas, ou seja, menores partículas possuem menor tempo de retenção (MCCONNELL et al., 2008).

Após a passagem pelo estômago, as microcápsulas ou partículas estarão no intestino delgado, onde permanecem cerca de 3 horas, com um pH estimado em 6 a 7. Finalmente, as partículas chegam ao local de liberação, no cólon, onde o pH reduz ligeiramente, 5 a 6 (COOK et al., 2012).

Portanto, a matriz do revestimento é extremamente importante para a liberação no sistema gastrointestinal. A utilização de amido como revestimento é ideal para a liberação na boca, devido à presença de amilase. Quando utilizado proteína, a liberação ocorre principalmente no estômago, pela presença de pepsina. Polímeros alimentares entéricos como alginato, pectina e goma laca, geralmente são estáveis no estômago e solúveis no cólon, devido ao pH. Por estes motivos, empregam-se polímeros entéricos para estabilizar o componente ativo, com o objetivo de liberá-lo no local de interesse, no cólon (GAONKAR et al., 2014).

## 2.2 Secagem das partículas

Um fator bastante importante a ser tratado é a secagem das esferas que são formadas a partir de técnicas como extrusão, emulsificação e coacervação, onde a maioria dos estudos relatam o uso destas partículas ainda úmidas (SEMYONOV et al., 2012; DIANAWATI et al., 2016).

Com a remoção de água das esferas há o melhoramento das propriedades de armazenamento e também se torna mais fácil a sua aplicação e distribuição nos produtos. Existe uma exigência industrial por ingredientes que tenham um armazenamento por períodos mais longos, a fim de terem atividade tanto na utilização durante a fabricação quanto no momento do consumo dos produtos em que foram adicionados (COGHETTO et al., 2016).

Assim, as esferas probióticas podem ser secas após a produção, sendo isso importante, principalmente, na utilização em produtos secos, como pós para bebidas e cereais. São poucos os estudos encontrados em relação a secagem destas partículas, e estes utilizam geralmente a liofilização (SONG et al., 2014; HOLKEM et al., 2016; CHEN et al., 2017).

A liofilização tem sido utilizada como método de secagem de micropartículas de probiótico, especificamente de bactérias lácticas, após a microencapsulação por gelificação iônica. Estes estudos evidenciam o aumento no tempo de armazenagem deste produto em relação ao úmido, mesmo em temperaturas de armazenamento entre 25 °C e 37 °C, após 60 dias o número de células viáveis reduziu, mas não ultrapassou o limite de contagem recomendada do micro-organismo ( $10^8$ ). A diminuição da atividade de água e o fechamento dos poros podem ter influenciado a estabilidade das esferas (HOLKEM et al., 2016; CHEN et al., 2017; SÁNCHEZ et al., 2017).

No entanto, a secagem por liofilização torna o processo de obtenção de micro-organismos probiótico pela microencapsulação mais caro, contradizendo a alegação de baixo custo da técnica de gelificação iônica. Assim, é importante que hajam estudos que investiguem outros processos de secagem.

### 2.1.8 Aplicação da *S. boulardii* em alimentos

Apesar do amplo emprego de culturas de bactérias probióticas em alimentos, a utilização de linhagens de levedura com potencial probiótico pode ser observada em pesquisas no mundo científico.

Karaolis et al. (2013) estudaram a aplicação de *S. boulardii* em iogurte de leite de cabra e avaliaram tanto a sobrevivência deste micro-organismo durante a estocagem quanto a aceitação sensorial do produto. Os resultados do estudo revelaram que após 4 semanas de estocagem a concentração da cepa de *S. boulardii* foi igual ao inóculo inicial, além disso, a presença desta levedura estimulou o crescimento das bactérias lácticas, significativamente superior ao controle. E ainda, a inserção desta cepa não ocasionou mudanças sensoriais significativas, obteve uma boa aceitabilidade.

O desenvolvimento de um suco simbiótico foi proposto por Fratianni et al. (2014) utilizando frutas vermelhas e micropartículas contendo *S. boulardii* como cultura probiótica. O suco apresentou estabilidade durante as 4 semanas de investigação, mantendo a concentração de células microbianas com concentração de 7,58 log UFC/mL, além disso, ainda evidenciam que as células imobilizadas nas esferas de alginato-inulina-goma xantana possuem uma maior sobrevivência quando comparadas as células livres, tanto durante a fermentação do suco quanto a resistência na digestão, na simulação do trato gastrointestinal.

Psomas et al. (2003) estudaram a assimilação de colesterol por leveduras do gênero *Saccharomyces*, a cepa *S. boulardii* foi a que apresentou a maior quantidade assimilada durante os testes *in vitro*. Em um outro estudo foi realizada a análise da capacidade antioxidante das leveduras deste gênero, Gil-Rodríguez et al. (2015) explicam que a capacidade antioxidante

está vinculada com as inúmeras substâncias que podem ser produzidas por estes microorganismos, como catalase e carotenoides oxigenados, além da composição da parede celular destas espécies, rica em glucanos. Recentemente, uma pesquisa sobre triagem de *S. boulardii* sugeriu que esta cepa possui propriedades antioxidantes (DATTA et al., 2017).

A levedura *S. boulardii* foi encontrada também no desenvolvimento de uma bebida bastante cultural na região da Ásia Central, o boza. Uma cultura starter contendo *Lactobacillus*, *Bifidobacteria* e *S. boulardii* foi utilizada para a produção desta bebida fermentada a base de cereais, neste artigo, há a afirmação de ser uma bebida funcional e segura (ARSLAN, DURAK, et al., 2015).

### 2.3 Referências Bibliográficas

- ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; JODAT, V.; SAHEBI, J.; ATAEI, A. Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 144, 2017. ISSN 2191-0855.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by *spray drying* and *spray chilling*. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017. ISSN 0023-6438.
- ARSLAN, S.; DURAK, A. N.; ERBAS, M.; TANRIVERDI, E.; GULCAN, U. Determination of microbiological and chemical properties of probiotic boza and its consumer acceptability. **Journal of the American College of Nutrition**, v. 34, n. 1, p. 56-64, 2015. ISSN 0731-5724.
- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by *spray drying*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015. ISSN 0023-6438.
- 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, n. 4, p. 467-483, 2011. ISSN 0260-8774.
- CHAN, L.; LEE, H.; HENG, P. Production of alginate microspheres by internal gelation using an emulsification method. **International journal of pharmaceutics**, v. 242, n. 1, p. 259-262, 2002. ISSN 0378-5173.
- CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F. C.; MARZO, F.; DEL CARMEN VILLARÁN, M. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International journal of food microbiology**, v. 142, n. 1, p. 185-189, 2010. ISSN 0168-1605.
- CHEN, H.-Y.; LI, X.-Y.; LIU, B.-J.; MENG, X.-H. Microencapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* and survival assays under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 29, p. 248-255, 2017. ISSN 1756-4646.
- CHUN, H.; KIM, C. H.; CHO, Y. H. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* DKL 109 using external ionic gelation method. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 34, n. 5, p. 692-699, 2014.
- CINDORUK, M.; ERKAN, G.; KARAKAN, T.; DURSUN, A.; UNAL, S. Efficacy and Safety of *Saccharomyces boulardii* in the 14-day Triple Anti-*Helicobacter pylori* Therapy: A Prospective Randomized Placebo-Controlled Double-Blind Study. **Helicobacter**, v. 12, n. 4, p. 309-316, 2007. ISSN 1523-5378.
- COGHETTO, C. C.; FLORES, S. H.; BRINQUES, G. B.; ZÁCHIA AYUB, M. A. Viability and alternative uses of a dried powder, microencapsulated *Lactobacillus plantarum* without the use of cold chain or dairy products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 54-59, 2016.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56-67, 2012.

DALIRI, E. B.-M.; LEE, B. H. New perspectives on probiotics in health and disease. **Food Science and Human Wellness**, v. 4, n. 2, p. 56-65, 2015. ISSN 2213-4530.

DATTA, S.; TIMSON, D. J.; ANNAPURE, U. S. Antioxidant properties and global metabolite screening of the probiotic yeast *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 97, n. 9, p. 3039-3049, 2017. ISSN 1097-0010.

DE LA CRUZ-GAVIA, A.; PÉREZ-ALONSO, C.; BARRERA-DÍAZ, C. E.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; CARRILLO-NAVAS, H.; GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulated with complex coacervate after freezing process. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 45-52, 2018. ISSN 0268-005X.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005. ISSN 0737-3937.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1685-1716, 2016.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Studies on the viability of *Saccharomyces bouardii* within microcapsules in relation to the thermomechanical properties of whey protein. **Food Hydrocolloids**, v. 42, p. 232-238, 2014. ISSN 0268-005X.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces bouardii*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782-1788, 2013. ISSN 0308-8146.

F. GIBBS, S. K., INTEAZ ALLI, CATHERINE N. MULLIGAN, BERNARD. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213-224, 1999. ISSN 0963-7486.

FLOCH, M. H.; RINGEL, Y.; WALKER, W. A. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology: Implications for Human Health, Prebiotics, Probiotics, and Dysbiosis**. Academic Press, 2016. ISBN 0128040629.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae bouardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014. ISSN 0265-2048.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D.; PINTO, S. S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A. N.; MURAKAMI, F. S. Microencapsulation of *bifidobacteria* by *spray drying* in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306-312, 2012. ISSN 0963-9969.

GALLO, M.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii*, as representative of yeast functional starter cultures. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 2092-2100, 2014.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT-Food Science and Technology**, v. 69, p. 365-371, 2016. ISSN 0023-6438.

GAONKAR, A. G.; VASISHT, N.; KHARE, A. R.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the food industry: a practical implementation guide**. USA: Elsevier, 2014. ISBN 0124047351.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation technologies and delivery systems for food ingredients and nutraceuticals**. Cambridge: Elsevier, 2012. ISBN 0857095900.

GHORBANI-CHOBOGHLO, H.; ZAHRAEI-SALEHI, T.; ASHRAFI-HELAN, J.; YAHYARAEYAT, R.; POURJAFAR, H.; NIKAEIN, D.; BALAL, A.; KHOSRAVI, A. R. Microencapsulation of *Saccharomyces cerevisiae* and its evaluation to protect in simulated gastric conditions. **Iranian Journal of Microbiology**, v. 7, n. 6, p. 337-341, 2015.

GIL-RODRÍGUEZ, A. M.; CARRASCOSA, A. V.; REQUENA, T. Yeasts in foods and beverages: *In vitro* characterisation of probiotic traits. **LWT-Food Science and Technology**, v. 64, n. 2, p. 1156-1162, 2015. ISSN 0023-6438.

GRAFF, S.; HUSSAIN, S.; CHAUMEIL, J.-C.; CHARRUEAU, C. Increased intestinal delivery of viable *Saccharomyces bouardii* by encapsulation in microspheres. **Pharmaceutical Research**, v. 25, n. 6, p. 1290-1296, 2008. ISSN 0724-8741.

HALIM, M.; MUSTAFA, N. A. M.; OTHMAN, M.; WASOH, H.; KAPRI, M. R.; ARIFF, A. B. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during *freeze-drying* and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, 2017. ISSN 0023-6438.

HAYES, S. R.; VARGAS, A. J. Probiotics for the Prevention of Pediatric Antibiotic-Associated Diarrhea. **Explore: The Journal of Science and Healing**, v. 12, n. 6, p. 463-466, 2016.

HÉBRARD, G.; HOFFART, V.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J.-M.; ALRIC, M.; SUBIRADE, M. Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 4, p. 292-302, 2010. ISSN 0265-2048.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; BARIN, J. S.; FLORES, É. M. M.; MULLER, E. I.; CODEVILLA, C. F.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Production of microcapsules containing *Bifidobacterium* BB-12 by emulsification/internal gelation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 216-221, 2017. ISSN 0023-6438.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; NUNES, G. L.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE 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**, v. 71, p. 302-308, 2016. ISSN 0023-6438.

KARAOLIS, C.; BOTSARIS, G.; PANTELIDES, I.; TSALTAS, D. Potential application of *Saccharomyces boulardii* as a probiotic in goat's yoghurt: survival and organoleptic effects. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 48, n. 7, p. 1445-1452, 2013. ISSN 1365-2621.

LEONG, J.-Y.; LAM, W.-H.; HO, K.-W.; VOO, W.-P.; LEE, M. F.-X.; LIM, H.-P.; LIM, S.-L.; TEY, B.-T.; PONCELET, D.; CHAN, E.-S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44-60, 2016. ISSN 1674-2001.

MANSOUR-GHANAELI, F.; DEHBASHI, N.; YAZDANPARAST, K.; SHAFAGHI, A. Efficacy of *Saccharomyces boulardii* with antibiotics in acute amoebiasis. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 9, n. 8, p. 1832, 2003.

MCCONNELL, E. L.; FADDA, H. M.; BASIT, A. W. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 364, n. 2, p. 213-226, 2008. ISSN 0378-5173.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 18, p. 2202, 2010.

MCFARLAND, L. V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*'. A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 6, n. 4, p. 157-171, 1993.

MCMASTER, L.; KOKOTT, S.; REID, S.; ABRATT, V. Use of traditional African fermented beverages as delivery vehicles for *Bifidobacterium lactis* DSM 10140. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, n. 2, p. 231-237, 2005. ISSN 0168-1605.

MØRCH, Ý. A.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471-1480, 2006. ISSN 1525-7797.

POLONI, V.; SALVATO, L.; PEREYRA, C.; OLIVEIRA, A.; ROSA, C.; CAVAGLIERI, L.; KELLER, K. M. Bakery by-products based feeds borne-*Saccharomyces cerevisiae* strains with probiotic and antimycotoxin effects plus antibiotic resistance properties for use in animal production. **Food and Chemical Toxicology**, v. 107, p. 630-636, 2017. ISSN 0278-6915.

PONCELET, D.; LENCKI, R.; BEAULIEU, C.; HALLE, J.; NEUFELD, R.; FOURNIER, A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 39-45, 1992. ISSN 0175-7598.

PSOMAS, E.; FLETOURIS, D.; LITOPOULOU-TZANETAKI, E.; TZANETAKIS, N. Assimilation of cholesterol by yeast strains isolated from infant feces and Feta cheese. **Journal of Dairy Science**, v. 86, n. 11, p. 3416-3422, 2003. ISSN 0022-0302.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013. ISSN 0260-8774.

SÁNCHEZ, M. T.; RUIZ, M. A.; LASSERROT, A.; HORMIGO, M.; MORALES, M. E. An improved ionic gelation method to encapsulate *Lactobacillus spp.* bacteria: Protection, survival and stability study. **Food Hydrocolloids**, v. 69, p. 67-75, 2017. ISSN 0268-005X.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastro-intestinal survival. **Food Research International**, v. 62, p. 308-314, 2014. ISSN 0963-9969.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KOVACS, A.; FRIEDLANDER, L.; SHIMONI, E. Air-suspension fluidized-bed microencapsulation of probiotics. **Drying Technology**, v. 30, n. 16, p. 1918-1930, 2012. ISSN 0737-3937.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science & Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993. ISSN 1040-8398.

SHARIF, M. R.; KASHANI, H. H.; ARDAKANI, A. T.; KHEIRKHAH, D.; TABATABAEI, F.; SHARIF, A. The Effect of a Yeast Probiotic on Acute Diarrhea in Children. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 8, n. 4, p. 211-214, 2016.

SHORI, A. B. Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit. **HAYATI Journal of Biosciences**, v. 24, n. 1, p. 1-5, 2017. ISSN 1978-3019.

SONG, H.; YU, W.; LIU, X.; MA, X. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate–chitosan microencapsulated low density cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 10-16, 2014. ISSN 0144-8617.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, 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, n. 1, p. 47-55, 2000. ISSN 0168-1605.

SUVARNA, S.; DSOUZA, J.; RAGAVAN, M. L.; DAS, N. Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 745-753, 2018. ISSN 1226-7708.

SZAJEWSKA, H.; SKORKA, A.; DYLAG, M. Meta-analysis: *Saccharomyces boulardii* for treating acute diarrhoea in children. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**, v. 25, n. 3, p. 257-264, 2007. ISSN 1365-2036.

TAKEI, T.; IKEDA, K.; IJIMA, H.; KAWAKAMI, K.; YOSHIDA, M.; HATATE, Y. Preparation of polymeric microcapsules enclosing microbial cells by radical suspension polymerization via water-in-oil-in-water emulsion. **Polymer Bulletin**, v. 65, n. 3, p. 283-291, 2010. ISSN 0170-0839.

THOMAS, M. B.; VAIDYANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, K.; RAICHUR, A. M. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan–dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**, v. 136, p. 1-8, 2014. ISSN 0260-8774.

TRABELSI, I.; BEJAR, W.; AYADI, D.; CHOUAYEKH, H.; KAMMOUN, R.; BEJAR, S.; BEN SALAH, R. Encapsulation in alginate and alginate coated-chitosan improved the survival of newly probiotic in oxgall and gastric juice. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 61, n. Supplement C, p. 36-42, 2013. ISSN 0141-8130.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, p. 225-241, 2014. ISSN 1756-4646.

ZHANG, Y.; LI, L.; GUO, C.; MU, D.; FENG, B.; ZUO, X.; LI, Y. Effects of probiotic type, dose and treatment duration on irritable bowel syndrome diagnosed by Rome III criteria: a meta-analysis. **BMC Gastroenterology**, v. 16, n. 1, p. 62, 2016. ISSN 1471-230X.

ZHAO, Q.; MUTUKUMIRA, A.; LEE, S. J.; MADDOX, I.; SHU, Q. Functional properties of free and encapsulated *Lactobacillus reuteri* DPC16 during and after passage through a simulated gastrointestinal tract. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 28, n. 1, p. 61-70, 2012. ISSN 0959-3993.

ZHAO, R.; SUN, J.; TORLEY, P.; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by *spray drying* and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, n. 8, p. 1349-1354, 2008.

## **CAPÍTULO III**

# **ENCAPSULAÇÃO DE LEVEDURA PROBIÓTICA UTILIZANDO GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA E INTERNA: UM ESTUDO COMPARATIVO**

## RESUMO

A microencapsulação tem sido utilizada como uma técnica de imobilização de micro-organismos através do revestimento por um material polimérico. São formadas partículas em uma matriz semipermeável permitindo o isolamento físico das células de levedura num microambiente interno que garante a sobrevivência do micro-organismo de interesse. O objetivo deste estudo foi comparar duas técnicas de microencapsulação, gelificação iônica externa e interna, como protetoras de células de *Saccharomyces cerevisiae*. A geração de biomassa foi realizada em caldo YPD a 30 °C e centrifugadas para a microencapsulação. As partículas foram formadas pelo gotejamento do alginato de sódio 2% em cloreto de cálcio 2%, na gelificação externa, e em óleo de soja para formação das partículas por gelificação interna. Todas as partículas formadas foram secas em estufa na temperatura de 30°C e analisadas quanto ao teor de umidade, a higroscopicidade, atividade de água e morfologia com microscopia ótica, além do ajuste dos dados experimentais da secagem aos modelos de Page e Exponencial. A enumeração dos micro-organismos foi realizada pela técnica da microgota, em meio YPD (yeast, potato, dextrose), e calculada a eficiência da microencapsulação e secagem. As partículas úmidas apresentaram umidade de 96,13% na gelificação externa e de 93,84% na gelificação interna. Quando secas, a umidade foi de 13,05% e 12,01%, higroscopicidade de 10,69% e 7,39% e atividade de água igual a 0,274 e 0,373 para gelificação externa e interna, respectivamente. Morfologicamente, as partículas formadas nas gelificações apresentaram uma estrutura regular. A eficiência de microencapsulação não apresentou diferença significativa entre as técnicas, porém a gelificação iônica externa após a secagem apresentou maior viabilidade dos microorganismos. Foi possível com os métodos de gelificação iônica produzir partículas carreadoras da cepa *S. cerevisiae*, sendo a gelificação iônica externa a mais eficiente para produzir partículas secas com alta viabilidade celular.

**Palavras-chave:** partículas de alginato, levedura, viabilidade, microscopia, cinética de secagem.

## ABSTRACT

Microencapsulation has been used as a technique for immobilizing microorganisms by polymeric material coating. Particles are formed in a semipermeable matrix allowing the physical isolation of the yeast cells in an internal microenvironment that guarantees the survival of the microorganism. Thus, the objective of this study was to compare two microencapsulation techniques, external and internal ionic gelation, as protectors of *Saccharomyces cerevisiae* cells. The biomass generation was carried out in YPD broth at 30 °C and centrifuged before microencapsulation. The particles were formed by dripping 2% sodium alginate in 2% calcium chloride for external gelation and by emulsification method using soybean oil for internal gelation. All microspheres formed were oven dried at 30 °C and analyzed for moisture content, hygroscopicity, water activity and morphology, besides the adjustment of the experimental data of the drying to Page and Exponential models. The enumeration of the microorganisms was carried out by the microtake technique, in YPD medium, and the microencapsulation and drying efficiency was calculated. The moist form particles showed 96.13% moisture in the external gelation and 93.84% in the internal gelation. After drying, the moisture content was 13.05% and 12.01%, hygroscopicity was 10.69% and 7.39% and water activity was equal to 0.274 and 0.373 for external and internal gelation, respectively. Morphologically, the particles formed in the both gelation showed a regular structure. The efficiency of microencapsulation for both techniques did not present significant difference, but the external ionic gelation after the drying showed higher microorganisms' viability. It was possible with the ionic gelation methods to produce carrier particles of *S. cerevisiae*, being external ionic gelation the most efficient for producing dried particles with high cellular viability.

**Key-words:** alginate particles, yeasts, viability, microscopy, drying kinetics.

### 3.1 INTRODUÇÃO

Atualmente, a busca por alimentos saudáveis, e principalmente, os que trazem um apelo de funcionalidade, através de compostos bioativos e micro-organismos probióticos tem alto crescimento, impulsionando o desenvolvimento de ingredientes que possam ser utilizados pelas indústrias alimentícias e químicas para tal propósito.

Os micro-organismos probióticos estão susceptíveis as condições adversas do ambiente em que se encontram, muitas vezes diminuindo ou inibindo sua sobrevivência e proliferação (RATHORE et al., 2013). Desta forma, a investigação de metodologias que proporcionem alguma forma de proteção destas células torna-se importante para aplicação destes como ingredientes em alimentos com alegações funcionais.

Algumas técnicas, com a microencapsulação, são utilizadas como forma de facilitar a utilização destes compostos ou micro-organismos em matrizes alimentícias, bem como protegê-los de fatores ambientais, que podem diminuir ou até mesmo anular sua ação potencial (GAONKAR et al., 2014). Esta tecnologia consiste na preservação de um ativo o envolvendo em um material de parede. Entre as técnicas de microencapsulação utilizadas para micro-organismos probióticos estão a gelificação iônica externa e interna (GARTI e MCCLEMENTS, 2012).

A gelificação iônica externa é considerada um dos mecanismos mais clássicos e amplamente utilizada na formação de hidrogéis, principalmente de alginato de sódio. É um processo onde ocorre a difusão de cátions entre as cadeias do polímero, forçando uma reticulação e formando uma membrana semissólida (MØRCH et al., 2006). Hébrard et al. (2010) utilizaram esta técnica na microencapsulação de linhagens de *Saccharomyces* utilizando isolado proteico do soro de leite e alginato de sódio.

Já a gelificação iônica interna diferencia-se da anterior no processo de obtenção das partículas, que ocorre a partir da formação de uma emulsão, e posterior formação do gel, que aprisiona os micro-organismos (PONCELET et al., 1992). Song et al. (2014) estudaram este processo na formação de partículas de *Saccharomyces*, com alginato de sódio, em uma emulsão de parafina.

Ainda, a secagem das partículas formadas pelas técnicas de microencapsulação pode contribuir para o aumento da resistência e prolongar o tempo de armazenamento, devido à redução da umidade e porosidade da partícula formada, tornando o ingrediente mais estável e ampliando suas possibilidades de utilização. Holkem et al. (2016) utilizaram a liofilização em esferas de bifidobacterias obtidas a partir da gelificação iônica interna. Porém, este método de secagem apresenta alto custo, sendo, assim, interessante um estudo de um processo de secagem com menor custo, mantendo esta mesma vantagem do método de microencapsulação por gelificação iônica.

Desta forma, é importante realizar o estudo da comparação entre a gelificação iônica externa e interna na produção de partículas estáveis da cepa de *S. cerevisiae*, com o intuito de identificar as vantagens e desvantagens e a influência de cada uma delas, utilizando uma secagem com menor custo, com a secagem em estufa. Sendo assim, este trabalho tem como objetivo a comparação das técnicas de gelificação iônica externa e interna, em relação ao processo e características das partículas formadas, além da sua caracterização pós secagem.

### 3.2 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.2.1 Materiais

O alginato de sódio (SIGMA-Aldrich) foi utilizado nos processos de microencapsulação como material de parede. Como ativo da partícula utilizou-se a cepa *S. cerevisiae* NPMM 10

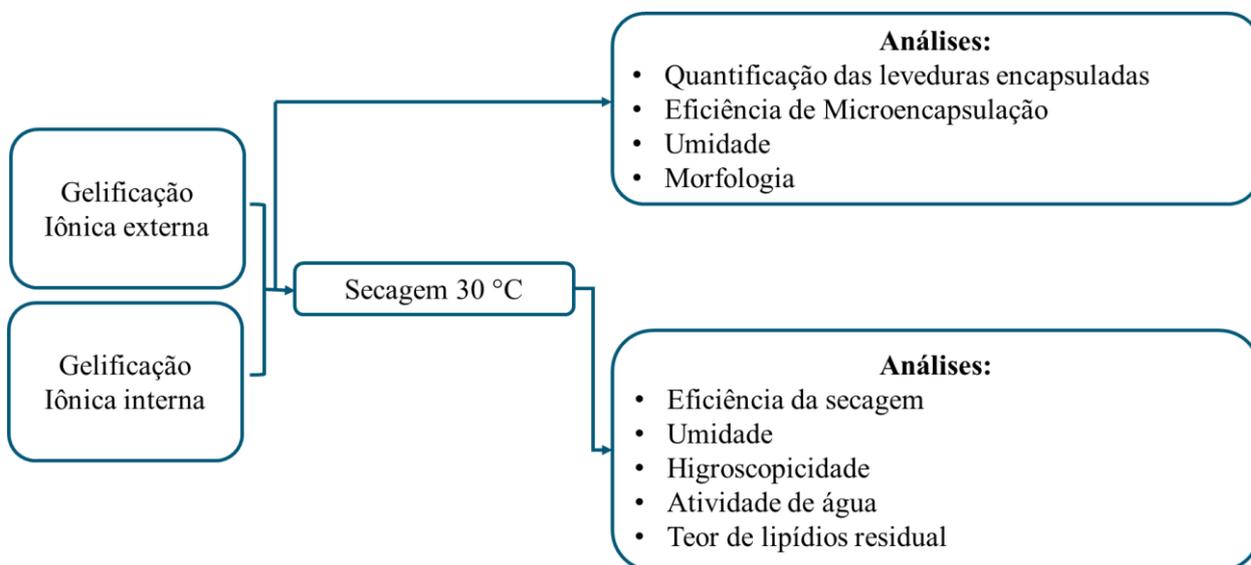
fornecida pelo Departamento de Medicina Veterinária da Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

### 3.2.2 Armazenamento da cultura e geração de biomassa

A cepa de *S. cerevisiae* foi cultivada em ágar YPD (yeast, potato, dextrose) e mantida sob temperatura de refrigeração (7 °C), a fim de que se mantivesse a viabilidade celular. Para a geração de biomassa a cepa foi cultivada em caldo YPD a 30 °C durante 36 horas sob agitação no SHAKE (Bunker). Em seguida, foram centrifugadas, 1000 rpm por 5 min., com a finalidade de separar as células do caldo de crescimento. As células foram suspensas em 10 mL de água destilada para aplicação no processo de encapsulação.

### 3.2.3 Métodos

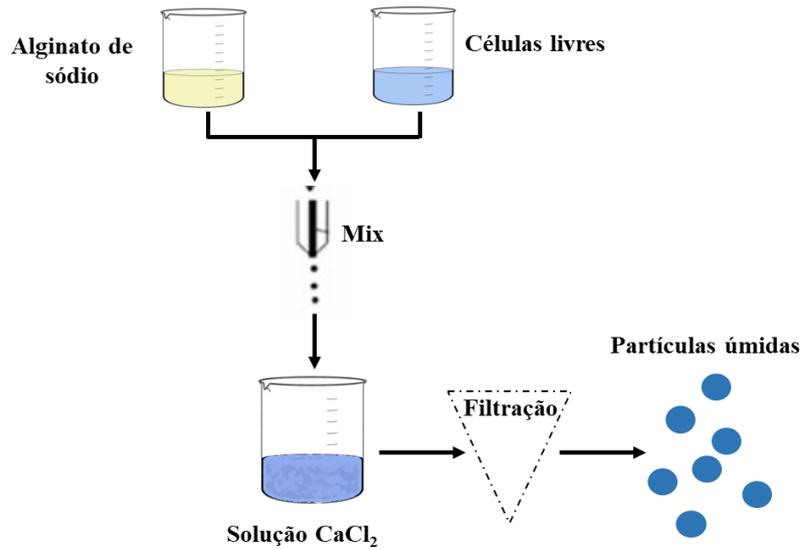
A Figura 4 apresenta a organização dos métodos e das análises realizadas neste capítulo. As partículas de leveduras foram produzidas a partir de duas técnicas de microencapsulação, gelificação iônica externa e interna. A solução de alginato de sódio (2% m/v) foi previamente autoclavada a temperatura de 121°C por 15 minutos, para que houvesse a menor contaminação possível durante o processo encapsulamento.



**Figura 4:** Resumo dos procedimentos do Capítulo 3.

#### a) Microencapsulação por gelificação iônica externa

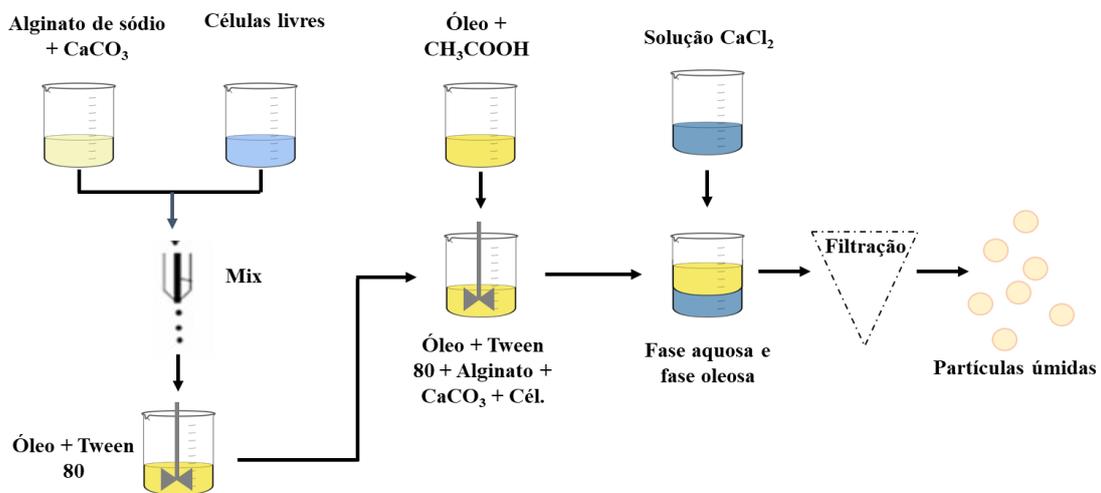
A microencapsulação por gelificação iônica externa foi realizada através da metodologia empregada por Skjåk-Bræk et al. (1989) com modificações, como observada na Figura 5. Uma alíquota de 10 mL do micro-organismo cultivado foi misturada em 90 mL de solução de alginato de sódio, de modo que a concentração final desta solução fosse igual a 2%. Esta mistura foi gotejada em 200 mL de solução de cloreto de cálcio a 2%. O gotejamento foi realizado utilizando-se uma sonda de PVC estéril com diâmetro interno liso de 2 mm e abertura de 0,15 mm, acoplada a uma bomba dosadora peristáltica (Milan Equipamentos Científicos). Após 30 minutos, filtrou-se e lavou-se com água destilada as partículas formadas.



**Figura 5:** Esquema do processo de gelificação iônica externa.

b) Microencapsulação por gelificação iônica interna

As partículas foram produzidas segundo a técnica de gelificação iônica interna descrita por Poncelet et al. (1992) com algumas modificações observada na Figura 6. Misturou-se uma alíquota de 10 mL do micro-organismo cultivado em 40 mL de solução de alginato de sódio a 2% e 2,7 mL de uma solução de  $\text{CaCO}_3$  (2%). Esta mistura foi gotejada, com auxílio de uma seringa (25 mL) sobre 200 mL de óleo de soja contendo 1,5% de Tween 80 a uma rotação de 800 rpm, utilizando um agitador mecânico (Fisatom modelo 711, São Paulo, Brasil), de três hélices (hélices navais de 60 mm de diâmetro) durante 15 minutos, a fim de que se formasse uma emulsão de água em óleo. Ainda sob agitação, 40 mL de óleo de soja contendo 215  $\mu\text{L}$  de ácido acético glacial foram adicionados a emulsão. Após 5 minutos, interrompeu-se a agitação e em seguida foram adicionados 300 mL de uma solução de  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (2%). Após a separação completa das partículas na fase aquosa, descartou-se o óleo e as partículas foram filtradas e lavadas com água destilada.



**Figura 6:** Esquema do processo de gelificação iônica interna.

### c) Secagem

As esferas, formadas, a partir de ambos processos e gelificação, foram secas em estufa de circulação forçada e renovação de ar SL 102 (SOLAB, Piracicaba, Brasil) com temperatura de 30 °C. Para identificar o tempo de secagem foi realizada a cinética de secagem e os dados experimentais ajustados ao modelo de Page (PAGE, 1949) e Exponencial (CARLESSO et al., 2007), utilizando-se o *Software* Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).

Os dados das curvas da cinética de secagem foram ajustados a partir de dois modelos empíricos, que utilizam o adimensional de umidade (Y, Equação 1) em função do tempo (t) em minutos. As Equações 2 e 3 apresentam o modelo empírico de Page e Exponencial, respectivamente.

$$Y = \frac{X_t - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} \quad \text{Equação 1}$$

$$Y = e^{(-Gt^m)} \quad \text{Equação 2}$$

$$Y = e^{-kt} \quad \text{Equação 3}$$

onde Y é o conteúdo adimensional da umidade em função do tempo, X a umidade (g.100 g<sup>-1</sup>), G e k são as constantes dos modelos (min<sup>-1</sup>) e m é o parâmetro do modelo (constante adimensional).

A raiz quadrada do erro médio (RQEM) foi calculado segundo a Equação 4.

$$REQM = \left[ \frac{100}{GLR} \sum_{i=1}^N (Y - \hat{Y})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 4}$$

onde GLR é o grau de liberdade do grupo de dados, Y o valor experimental e  $\hat{Y}$  o valor estimado pelo modelo.

### 3.2.4 Métodos Analíticos

#### a) Estimativa da concentração microbiana para determinação da concentração inicial

A concentração estimada de leveduras foi baseada na medida por densidade óptica. Após o inóculo do micro-organismo no caldo YPD e incubação durante 48 horas a 30 °C, foram realizadas diluições e suas respectivas leituras no espectrofotômetro (BEL Photonics SP 1105) com o comprimento de onda de 600 nm. Assim, após o plaqueamento em superfície do inóculo, a absorvância e a contagem microbiana foram relacionadas de forma gráfica (BEGOT et al., 1996).

#### b) Quantificação das leveduras encapsuladas

As esferas foram rompidas utilizando-se uma solução tampão fosfato em pH 7,0, previamente autoclavada a 121 °C por 15 minutos (SHEU e MARSHALL, 1993). Quantificou-se as leveduras através da contagem em placas em YPD após incubação a 30 °C durante 24 horas (ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017). A contagem das células foi realizada segundo Favarin et al. (2015) utilizando a técnica da microgota.

#### c) Eficiência de encapsulação e secagem

As taxas de sobrevivência da levedura nas esferas foram calculadas como a relação entre a contagem de levedura nas esferas e a contagem de levedura da solução de alimentação com

base na matéria seca (GUIMARÃES et al., 2013). De forma analoga, a eficiência da secagem foi calculada em relação a esfera úmida e seca. Para o cálculo da eficiência utilizou-se a Equação 5 e 6.

$$E_u(\%) = \frac{C_{partículas}}{C_{suspensão}} * 100 \quad \text{Equação 5}$$

$$E_s(\%) = \frac{S_{partículas secas}}{S_{partículas úmidas}} * 100 \quad \text{Equação 6}$$

onde  $E_u$  e  $E_s$  são a eficiência da encapsulação e da secagem, respectivamente.  $C_{partículas}$  refere-se ao conteúdo total de micro-organismos na partícula e  $C_{suspensão}$  o conteúdo de micro-organismos na solução inicial.  $S$  refere-se ao conteúdo de micro-organismos nas partículas secas e úmidas.

#### d) Umidade

A umidade das partículas úmidas e secas produzidas foram determinadas segundo o método oficial da AOAC (AOAC, 1970).

#### e) Higroscopicidade

Para a determinação da higroscopicidade das partículas secas foi empregada a metodologia descrita por Cai e Corke (2000), com algumas modificações. Aproximadamente 1 g da amostra foi pesada, em triplicata, e acondicionada em recipiente hermético contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa de 75,3%). Após uma semana, as amostras foram pesadas e calculou-se a higroscopicidade expressa em gramas de umidade adsorvida por 100 g de massa seca da amostra.

#### f) Atividade de água

A atividade de água das partículas secas foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices. Pullman, WA).

#### g) Morfologia

As partículas foram analisadas utilizando-se um microscópio óptico (Biofocus - BIO1600BA-L-BI) equipado com câmera, através do *software* DinoCapture versão 1.4.2.D.

#### h) Teor de lipídios

As partículas formadas a partir da microencapsulação por gelificação iônica interna úmidas e secas foram analisadas em relação ao conteúdo de lipídios residual. A análise foi realizada segundo os procedimentos descritos por Bligh e Dyer (1959).

#### i) Análise estatística

Os resultados das análises foram submetidos ao teste de variância, seguido de regressão pelo método de mínimos quadrados utilizando-se o *software* Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA), para um nível confiança de 95% ( $p < 0,05$ ).

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 3.3.1 Quantificação das leveduras encapsuladas, eficiência da microencapsulação e da secagem

A Tabela 3 apresenta os dados referentes ao impacto causado tanto pelas técnicas de microencapsulação, gelificação iônica externa e interna, quanto pela secagem das partículas

úmidas na sobrevivência das células de levedura encapsuladas. Estes valores fornecem um panorama geral da influência de cada uma das técnicas, relacionado ao stress mecânico ou químico, e também da interferência térmica, na etapa de secagem, sobre a perda microbiana.

**Tabela 3:** Valores para a concentração de leveduras nas partículas (<sup>1</sup>UFC.g<sup>-1</sup> e <sup>2</sup>log UFC.g<sup>-1</sup>) e eficiência da microencapsulação e secagem (%).

Partícula	Gelificação Iônica	Externa	Interna
Úmida	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>	2,46E+09	2,40E+09
	<i>S. cerevisiae</i> <sup>2</sup>	9,39 <sup>a</sup> ±0,05	9,38 <sup>a</sup> ±0,04
	Eficiência de encapsulação	99,16 <sup>a</sup> ±0,41	99,15 <sup>a</sup> ±0,37
Seca	<i>S. cerevisiae</i> <sup>1</sup>	3,47E+08	2,29E+08
	<i>S. cerevisiae</i> <sup>2</sup>	8,54 <sup>a</sup> ±0,02	8,36 <sup>b</sup> ±0,02
	Eficiência de secagem	90,97 <sup>a</sup> ±0,26	89,17 <sup>b</sup> ±0,21

Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

A concentração do inóculo inicial utilizado na suspensão de células vivas ao início de cada técnica de encapsulação foi igual a 9,46±0,01 UFC.g<sup>-1</sup>. Ao comparar este valor com os dados de sobrevivência dos micro-organismos, tanto da gelificação iônica externa quanto interna, verifica-se que não houve redução logarítmica de leveduras nas partículas úmidas. Além disso, não foi identificado uma diferença significativa entre ambas as técnicas, considerando-se o teste de comparação entre as médias com nível de significância de 95%.

Da mesma forma, Hébrard et al. (2010) estudaram a microencapsulação de leveduras probióticas utilizando a gelificação iônica externa com alginato de sódio e proteína isolada do soro de leite como uma mistura de materiais de parede, e encontraram valores similares, sem variação logarítmica, entre o inóculo inicial e a concentração de micro-organismos nas partículas. Song et al. (2014) pesquisaram a utilização da gelificação iônica interna, com a utilização de alginato de sódio como material de parede e um processo de emulsão com parafina, também de leveduras probióticas, e não observaram redução entre a concentração inicial e final, nas partículas.

Foi observada uma alta resistência dos micro-organismos aos processos de microencapsulação, com uma eficiência próxima a 99%, não havendo novamente diferença significativa entre as técnicas ( $p < 0,05$ ). Estes resultados estão de acordo com as informações encontradas em diferentes pesquisas, onde a eficiência de microencapsulação, geralmente, é maior que 90% (FRATIANNI et al., 2014; LEONG et al., 2016; HOLKEM et al., 2017).

Após a secagem, a concentração de leveduras apresentou diferença significativa entre as técnicas de gelificação iônica, sendo a externa com um valor ligeiramente maior daquele encontrado na interna. Quando comparado em relação a eficiência da secagem, ou seja, em qual das técnicas seguidas da remoção de água houve maior sobrevivência dos micro-organismos, observa-se um valor maior nas partículas formadas pela gelificação iônica externa.

A sobrevivência dos micro-organismos foi menor na gelificação iônica interna seguida de secagem. Esta ocorrência pode ser atribuída a formação de maiores diâmetros de poros das partículas, devido a utilização de carbonato de cálcio no processo de gelificação interna, o qual se dissocia, liberando o íon cálcio, importante para a formação da estrutura de caixa de ovo;

assim, o dióxido de carbono contribui de forma negativa, aumentando os poros e formando uma matriz mais maleável quando comparada com a matriz formada pela gelificação iônica externa (PONCELET et al., 1992; HOLKEM et al., 2017).

Em um estudo realizado por Song et al. (2014), que microencapsularam *S. cerevisiae* Y235 por gelificação iônica interna, a partir da formação de emulsão com parafina, e também realizaram a secagem, embora tenha sido por liofilização, encontraram uma taxa de sobrevivência de micro-organismos de 90,58%, valor bastante próximo ao encontrado neste trabalho.

A taxa de sobrevivência dos micro-organismos após a secagem de partículas obtidas em outra técnica, como a microencapsulação de *S. boulardii* por Spray Drying, utilizando goma arábica, foi de aproximadamente 84% (ARSLAN et al., 2015), valor inferior ao encontrado na secagem das partículas por ambas as técnicas de gelificação iônica deste estudo.

### 3.3.2 Umidade, higroscopicidade e atividade de água das partículas

As características físico químicas, como umidade, higroscopicidade e a atividade de água das partículas produzidas pelas técnicas de gelificação iônica, tanto úmidas quanto secas, são apresentadas na Tabela 4.

A umidade é um parâmetro importante, principalmente na conservação e estabilidade de produtos secos (CHAMPAGNE et al., 1996). Um alto valor de umidade pode ser observado nas partículas úmidas, resultado este já esperado, devido as características de formação das partículas, como no estudo desenvolvido por Holkem et al. (2017) que apresentou uma umidade de 96% das partículas obtidas por gelificação iônica interna de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*.

**Tabela 4:** Valores experimentais para umidade (g.100 g<sup>-1</sup>), higroscopicidade (g.100 g<sup>-1</sup>), atividade de água das partículas e teor de lipídios (%).

Partícula	Gelificação Iônica	Externa	Interna
Úmida	Umidade	96,13 <sup>a</sup> ±0,02	93,84 <sup>b</sup> ±0,01
	Umidade	13,05 <sup>a</sup> ±0,11	12,01 <sup>b</sup> ±0,05
Seca	Higroscopicidade	10,69 <sup>a</sup> ±0,49	7,39 <sup>b</sup> ±0,19
	Atividade de água - Aa	0,274 <sup>a</sup> ±0,004	0,373 <sup>b</sup> ±0,001
	Teor de lipídios	-	3,53±0,32

Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

O teor de lipídios observado nas partículas secas do processo de gelificação iônica interna foi de 3,53% (Tabela 4), confirmando a presença de óleo residual na superfície da matriz. Holkem et al. (2017) encontraram um valor igual a 2,24% em suas microesferas de alginato produzidas pela mesma técnica.

Segundo Takei et al. (2010), o baixo teor de umidade encontrado nas partículas formadas pelo processo de gelificação iônica interna em relação ao processo de gelificação iônica externa, deve-se ao fato da presença deste óleo residual na superfície das partículas.

Após a secagem, a diferença entre os teores de umidade das técnicas também diferiu estatisticamente, explicado também pela presença de óleo (TAKEI et al., 2010) e o aumento

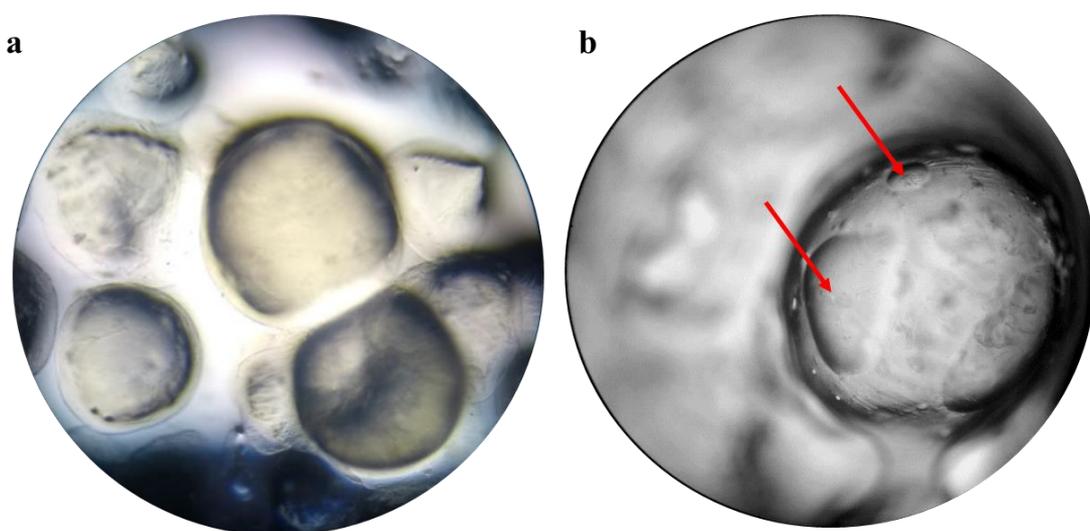
dos poros (HOLKEM et al., 2017), na partícula formada pela gelificação iônica interna, como discutido na seção anterior, que aumentam o caminho de difusão da água para o ambiente.

A higroscopicidade é a capacidade de absorção de água do ambiente por um alimento ou partícula. Esta absorção pode afetar negativamente a viabilidade dos micro-organismos, principalmente durante a estocagem e em ambientes de alta umidade relativa (BHANDARI et al., 2013). O valor menor apresentado pelas partículas obtidas a partir da técnica de gelificação iônica interna deve-se novamente ao fato da formação de uma película de óleo residual na superfície, o que diminui a absorção de água do ambiente.

As partículas secas produzidas pela técnica de extrusão apresentaram valores de atividade de água abaixo de 0,30 o que favorece a viabilidade dos micro-organismos, impedindo a sua multiplicação, permanecendo na forma inativa (DAMODARAN et al., 2009). Segundo Arslan-Tontul e Erbas (2017) que microencapsularam *S. boulardii* por *Spray Drying* encontraram uma atividade de água de 0,53, bastante superior ao encontrado neste estudo.

### 3.3.3 Morfologia

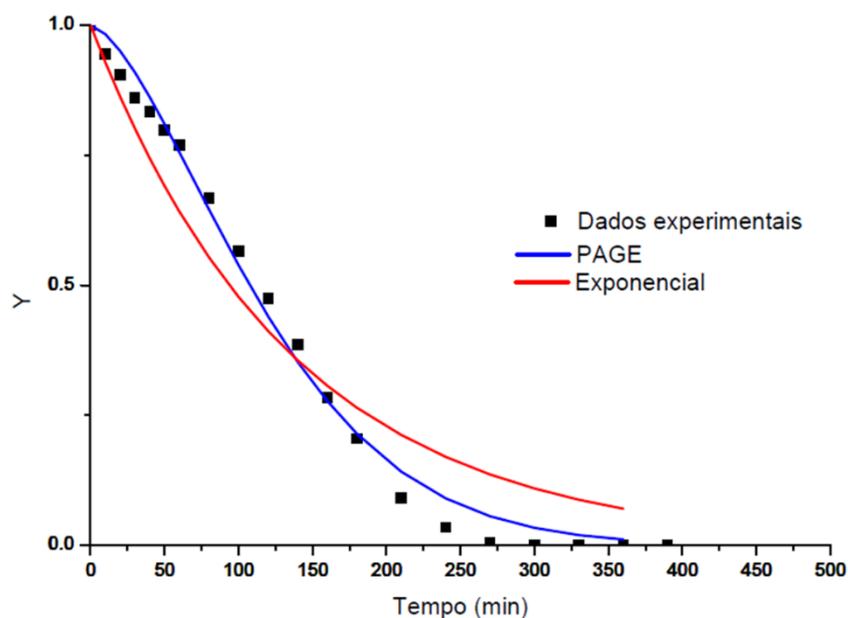
A morfologia das partículas úmidas obtidas por ambos os métodos pode ser observada na Figura 7 a partir da microscopia ótica. As partículas apresentaram, de forma geral, geometria esférica. Ao observar a esfera formada pela gelificação iônica interna (Figura 7-b), foi possível identificar a presença de óleo na superfície do material. Ainda, pode-se observar que houve uma variação no diâmetro, em ambas técnicas de encapsulação, apesar de não ter sido possível sua medição. As imagens são similares as apresentadas no estudo de Holkem et al. (2017), que na microencapsulação pelo processo de emulsificação, também observou a presença de óleo na superfície das partículas.



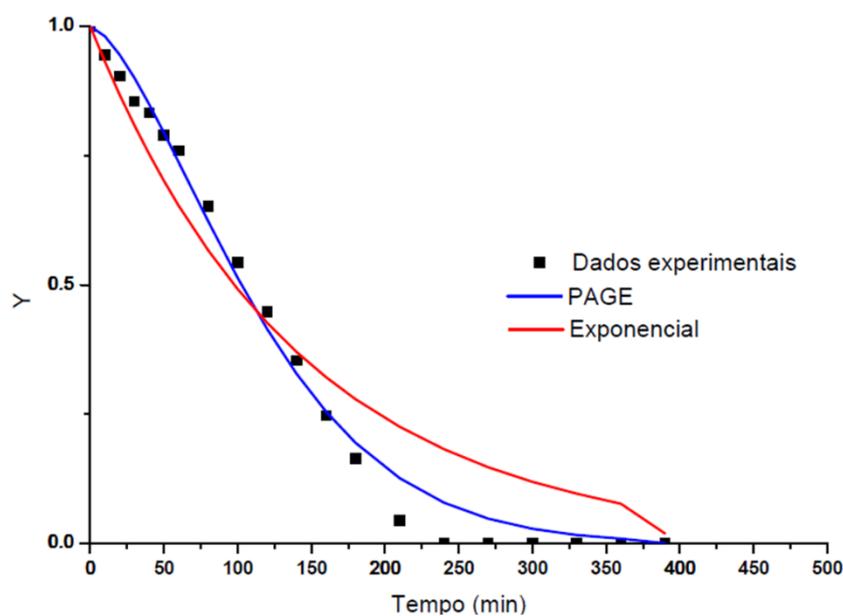
**Figura 7:** Microscopia ótica das partículas úmidas: a) partícula obtida a partir da gelificação iônica externa (30x) e b) partícula obtida a partir da gelificação iônica interna (40x).

### 3.3.4 Cinética da secagem

As Figura 8 e 9 apresentam os dados experimentais e ajustados aos modelos de Page e Exponencial da secagem das partículas por ambas as técnicas de microencapsulação, gelificação iônica externa e interna.



**Figura 8:** Cinética de secagem a 30 °C das partículas formadas pela gelificação iônica externa acompanhada das curvas ajustadas aos modelos.



**Figura 9:** Cinética de secagem a 30 °C das partículas formadas pela gelificação iônica interna acompanhada das curvas ajustadas aos modelos.

Ao analisar as curvas de secagem para cada técnica de microencapsulação (Figura 8 e 9) identifica-se uma diferença no tempo total para a remoção da água, sendo maior nas partículas obtidas pela gelificação iônica externa, aproximadamente 260 minutos, enquanto na outra técnica é de 240 minutos. Uma possível explicação desta diferença é a formação de uma matriz com maior número de poros deste último método, como já citado anteriormente, que facilitariam a saída de água.

A utilização de modelos empíricos pode auxiliar no ajuste dos dados experimentais obtidos para a construção das curvas de secagem, sendo comumente utilizados o Modelo de

Page e Modelo de Lewis ou Exponencial. Além disso, os parâmetros obtidos a partir das equações dos respectivos modelos contribuem para melhor análise do comportamento das curvas de cinética. Estes parâmetros, juntamente com o coeficiente de determinação e a raiz quadrada de erro médio (RQEM) são apresentadas na Tabela 5.

**Tabela 5:** Parâmetros dos modelos e análise estatística para secagem de cada técnica.

Modelo	Parâmetro	Gelificação iônica	
		Externa	Interna
Page	G ( $10^{-4} \text{ s}^{-1}$ )	4,821	5,784
	M	1,554	1,531
	R <sup>2</sup>	0,992	0,991
	RQEM	3,411	3,618
Exponencial	K ( $10^{-3} \text{ s}^{-1}$ )	7,390	7,101
	R <sup>2</sup>	0,943	0,953
	RQEM	9,086	8,382

Ao analisar a Tabela 5 observa-se que os valores do coeficiente de determinação (R<sup>2</sup>) se aproximaram mais do valor unitário nos dados ajustados ao modelo de Page. E ainda, a raiz do erro quadrático médio, uma medida bastante utilizada para aferir a qualidade do ajuste de um modelo aos dados experimentais, estabelecendo uma correlação dos valores preditos com aqueles observados, também aponta um melhor ajuste dos dados ao modelo de Page, com valores inferiores a 5 %. Os parâmetros G e M, do modelo de Page, e K, do modelo de Lewis, mantiveram-se na mesma ordem de grandeza para ambas as técnicas de microencapsulação.

### 3.4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados, é possível concluir que, apesar das diferenças das propriedades físicas, como umidade, atividade de água e higroscopicidade entre as técnicas de microencapsulação, a taxa de sobrevivência das leveduras probióticas não mostrou diferença significativa ( $p < 0,05$ ), além de ter apresentado uma alta eficiência de encapsulação. Após a secagem, observou-se uma maior resistência das partículas provenientes da gelificação iônica externa, que apresentou uma maior concentração de micro-organismos. E ainda, as partículas obtidas no processo de gelificação iônica interna apresentaram óleo residual na superfície, o que pode interferir na sua aplicação, diminuindo as possibilidades de incorporação em algumas matrizes alimentares, além da maior quantidade de poros na superfície da matriz. Apesar das desvantagens apresentadas por esta última técnica, ambos os processos de microencapsulação por gelificação iônica, externa e interna, são promissoras e aumentam a possibilidade de uso para a proteção de culturas de leveduras probióticas.

### 3.5 REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.**, 1970.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017. ISSN 0023-6438.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT-Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685-690, 2015. ISSN 0023-6438.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 3, p. 225-232, 1996. ISSN 0167-7012.

BHANDARI, B. R.; BANSAL, N.; ZHANG, M.; SCHUCK, P. **Handbook of food powders: processes and properties.** Elsevier, 2013. ISBN 0857098675.

BLIGH, E. G.; DYER, W. J. A rapid method of total lipid extraction and purification. **Canadian Journal of Biochemistry and Physiology**, v. 37, n. 8, p. 911-917, 1959. ISSN 0576-5544.

CAI, Y.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, 2000. ISSN 1750-3841.

CARLESSO, V. D. O.; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F. D.; DETMANN, E. Avaliação de modelos de secagem em camada fina de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, 2007. ISSN 0101-3122.

CHAMPAGNE, C. P.; MONDOU, F.; RAYMOND, Y.; ROY, D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 29, n. 5-6, p. 555-562, 1996. ISSN 0963-9969.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Química de Alimentos de Fennema.** Artmed Editora, 2009. ISBN 8536323345.

FAVARIN, L.; LAUREANO-MELO, R.; LUCHESE, R. H. Survival of free and microencapsulated *Bifidobacterium*: effect of honey addition. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 4, p. 329-335, 2015. ISSN 0265-2048.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* *boulardii* to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014. ISSN 0265-2048.

GAONKAR, A. G.; VASISHT, N.; KHARE, A. R.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the Food Industry: a Practical Implementation Guide.** USA: Elsevier, 2014. ISBN 0124047351.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals**. Cambridge: Elsevier, 2012. ISBN 0857095900.

GUIMARÃES, R. R.; VENDRAMINI, A. L. D. A.; SANTOS, A. C. D.; LEITE, S. G. F.; MIGUEL, M. A. L. Development of probiotic beads similar to fish eggs. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 968-973, 2013. ISSN 1756-4646.

HÉBRARD, G.; HOFFART, V.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J.-M.; ALRIC, M.; SUBIRADE, M. Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 4, p. 292-302, 2010. ISSN 0265-2048.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; BARIN, J. S.; FLORES, É. M. M.; MULLER, E. I.; CODEVILLA, C. F.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 216-221, 2017. ISSN 0023-6438.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; NUNES, G. L.; CICHOSKI, A. J.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE 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**, v. 71, p. 302-308, 2016. ISSN 0023-6438.

LEONG, J.-Y.; LAM, W.-H.; HO, K.-W.; VOO, W.-P.; LEE, M. F.-X.; LIM, H.-P.; LIM, S.-L.; TEY, B.-T.; PONCELET, D.; CHAN, E.-S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44-60, 2016. ISSN 1674-2001.

MØRCH, Ý. A.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471-1480, 2006. ISSN 1525-7797.

PAGE, G. E. Factors Influencing the Maximum Rates of Air Drying Shelled Corn in Thin layers. 1949.

PONCELET, D.; LENCKI, R.; BEAULIEU, C.; HALLE, J.; NEUFELD, R.; FOURNIER, A. Production of alginate beads by emulsification/internal gelation. I. Methodology. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 38, n. 1, p. 39-45, 1992. ISSN 0175-7598.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013. ISSN 0260-8774.

SHEU, T.; MARSHALL, R. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 3, p. 557-561, 1993. ISSN 1750-3841.

SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, n. 1, p. 31-54, 1989. ISSN 0144-8617.

SONG, H.; YU, W.; LIU, X.; MA, X. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate–chitosan microencapsulated low density cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 10-16, 2014. ISSN 0144-8617.

TAKEI, T.; IKEDA, K.; IJIMA, H.; KAWAKAMI, K.; YOSHIDA, M.; HATATE, Y. Preparation of polymeric microcapsules enclosing microbial cells by radical suspension polymerization via water-in-oil-in-water emulsion. **Polymer Bulletin**, v. 65, n. 3, p. 283-291, 2010. ISSN 0170-0839.

## **CAPÍTULO IV**

### **ENCAPSULAÇÃO DE *S. BOULARDII* POR GELIFICAÇÃO IÔNICA EXTERNA: CARACTERIZAÇÃO, ESTABILIDADE E VIABILIDADE NAS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADA**

## RESUMO

A gelificação iônica externa é uma técnica que permite o aprisionamento de micro-organismos em polímeros, geralmente alginato de sódio, aumentando a resistência das células microbianas em condições ambientais adversas. Ainda, para agregar proteção, um revestimento desta partícula pode ser empregado utilizando, por exemplo, quitosana. Neste estudo, foram desenvolvidas partículas de alginato e alginato-quitosana, de *S. boulardii*, secas, nas temperaturas de 30, 40, 50 e 60 °C em estufa de circulação de ar. As partículas secas na temperatura de 30 e 40 °C não apresentaram diferença significativa ( $p < 0,05$ ) em relação a sobrevivência da levedura. Foi realizada a caracterização das partículas de alginato e alginato-quitosana secas a 40 °C quanto a umidade, higroscopicidade, atividade de água e morfologia, e ainda, buscou-se identificar a diferença entre as duas formulações em relação ao aumento da viabilidade durante o armazenamento, a simulação gastrointestinal *in vitro* e a construção de isotermas de sorção. Durante o armazenamento foi observado uma maior proteção da levedura nas partículas alginato-quitosana, com redução de 1,05 ciclos logaritmos na temperatura de estocagem de 30 °C, enquanto isso, nas partículas alginato o declínio foi de 2,21 ciclos logaritmos. Observou-se uma maior resistência na simulação gastrointestinal das células encapsuladas em relação as livres, a concentração variou de  $9,15 \pm 0,06$  para  $8,01 \pm 0,18$  log UFC.g<sup>-1</sup> nas partículas alginato e de  $9,25 \pm 0,36$  a  $8,82 \pm 0,18$  log UFC.g<sup>-1</sup> nas de alginato-quitosana. A encapsulação de *S. boulardii* produziu partículas com maior resistência aos fatores ambientais, possibilitando a entrega de um ingrediente que poderá ser utilizado para agregar valor à produtos alimentares.

**Palavras-chave:** levedura, probiótico, FTIR, isotermas de sorção.

## ABSTRACT

External ionic gelation is a technique that allows the entrapment of microorganisms into polymers usually sodium alginate increasing the resistance of microbial cells under adverse environmental conditions. Further, to provide protection, a coating of this particle may be employed using, for example, chitosan. In this study, alginate and alginate chitosan particles, from *S. boulardii*, were developed at temperatures of 30, 40, 50 and 60 °C in an air circulation oven. Drying particles at temperatures of 30 and 40 °C did not show significant difference ( $p < 0,05$ ) in relation to yeast survival. The characterization of dry alginate and alginate-chitosan particles was carried out in terms of moisture, hygroscopicity, water activity and morphology, and it was also sought to identify the difference between the two formulations in relation to increased viability during storage, simulation gastrointestinal *in vitro* and the construction of sorption isotherms. During storage a greater protection of the yeast in the alginate-chitosan particles was observed, with a reduction of 1,05 log cycles at the storage temperature of 30 °C, meanwhile, in the alginate particles, the decline was 2,21 log cycles. A greater resistance in the gastrointestinal simulation of encapsulated versus free cells was observed, the concentration ranged from  $9,15 \pm 0,06$  to  $8,01 \pm 0,18$  log CFU.g<sup>-1</sup> in the alginate particles and  $9,25 \pm 0,36$  to  $8,82 \pm 0,18$  log CFU.g<sup>-1</sup> alginate-chitosan. The encapsulation of *S. boulardii* produced particles with greater resistance to environmental factors, allowing the delivery of an ingredient that could be used to add value to food products.

**Key-words:** yeast, probiotic, FTIR, sorption isotherms.

## 4.1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação de micro-organismos tem sido amplamente empregada no intuito de conferir uma maior proteção a estas células quando submetidas a diversas condições ambientais, como durante o processamento de alimentos, o armazenamento e até mesmo a passagem pelo trato gastrointestinal (FRATIANNI et al., 2014; ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017; HOLKEM et al., 2017). As técnicas de encapsulação consistem em aprisionar, tanto compostos ativos quanto bactérias e leveduras, em matrizes na maioria das vezes poliméricas (GARTI e MCCLEMENTS, 2012).

As leveduras têm sido pouco exploradas como micro-organismos probióticos, mas sua utilização vai além da produção de bebidas fermentadas (GALLO et al., 2014). A cepa de *S. boulardii* é uma levedura probiótica, utilizada no tratamento e também na prevenção de doenças intestinais. Os principais mecanismos de ação envolvem a interação com a microbiota normal, efeitos contra toxinas patogênicas, e ainda, pode causar uma resposta imune no organismo, como um imune regulador (MCFARLAND, 2010).

Os micro-organismos probióticos estão susceptíveis as condições adversas do ambiente em que se encontram, muitas vezes diminuindo ou inibindo sua sobrevivência e proliferação (RATHORE et al., 2013). Desta forma, a encapsulação torna-se uma ferramenta importante na proteção destas células, a fim de que seja possível sua aplicação em matriz alimentícia. Diversas técnicas são utilizadas com este propósito, *Spray drying* (DE LA CRUZ-GAVIA et al., 2018), *Spray chilling* (ARSLAN-TONTUL et al. 2017), coacervação (ERATTE et al. 2018) e gelificação iônica (HOLKEM et al. 2017).

A gelificação iônica externa, considerada um dos processos mais utilizados no desenvolvimento de partículas, consiste no envolvimento do micro-organismo, quando empregada no ponto de vista microbiológico, por um material de parede, geralmente alginato de sódio (LEONG et al., 2016). Este polímero possui a capacidade de reticulação na presença de íons bivalentes como o cálcio, a partir de um mecanismo de troca iônica (MØRCH et al., 2006).

No entanto, as partículas formadas por esta técnica podem conter poros em sua superfície, como relatado por Yao et al. (2017) e Vaziri et al. (2018), diminuindo a viabilidade do micro-organismo encapsulado. Para contornar esta desvantagem, um procedimento de revestimento destas partículas pode ser realizado, aumentando a barreira entre o meio e as células microbianas, e reduzindo a quantidade de poros (SONG et al. 2014).

Com este propósito, a quitosana, um polímero semi-sintético, é um dos materiais que vem sendo empregado (ANSARI et al., 2017; SUVARNA et al. 2018), pois interage eletrostaticamente com o alginato de sódio (RAMOS et al. 2018), aderindo a superfície externa das partículas, contribuindo com o aumento da estabilidade da partícula, e ainda, com a maior resistência na simulação gastrointestinal (MORENO et al. 2018).

Além disso, a secagem das partículas formadas pelas técnicas de microencapsulação pode contribuir para o aumento da resistência e prolongar o tempo de armazenamento, devido à redução da umidade, tornando o ingrediente mais estável e ampliando suas possibilidades de utilização.

Sendo assim, torna-se promissor o estudo da encapsulação desta levedura através da gelificação iônica externa. Neste capítulo, o objetivo foi caracterizar estas partículas, revestidas ou não com quitosana, quanto a propriedades físico-químicas, a operação de secagem destas, e ainda, realizar o estudo da estabilidade, a construção de isotermas de sorção e analisar a resistência, quando submetidas a simulação gastrointestinal.

## **4.2 MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.2.1 Materiais**

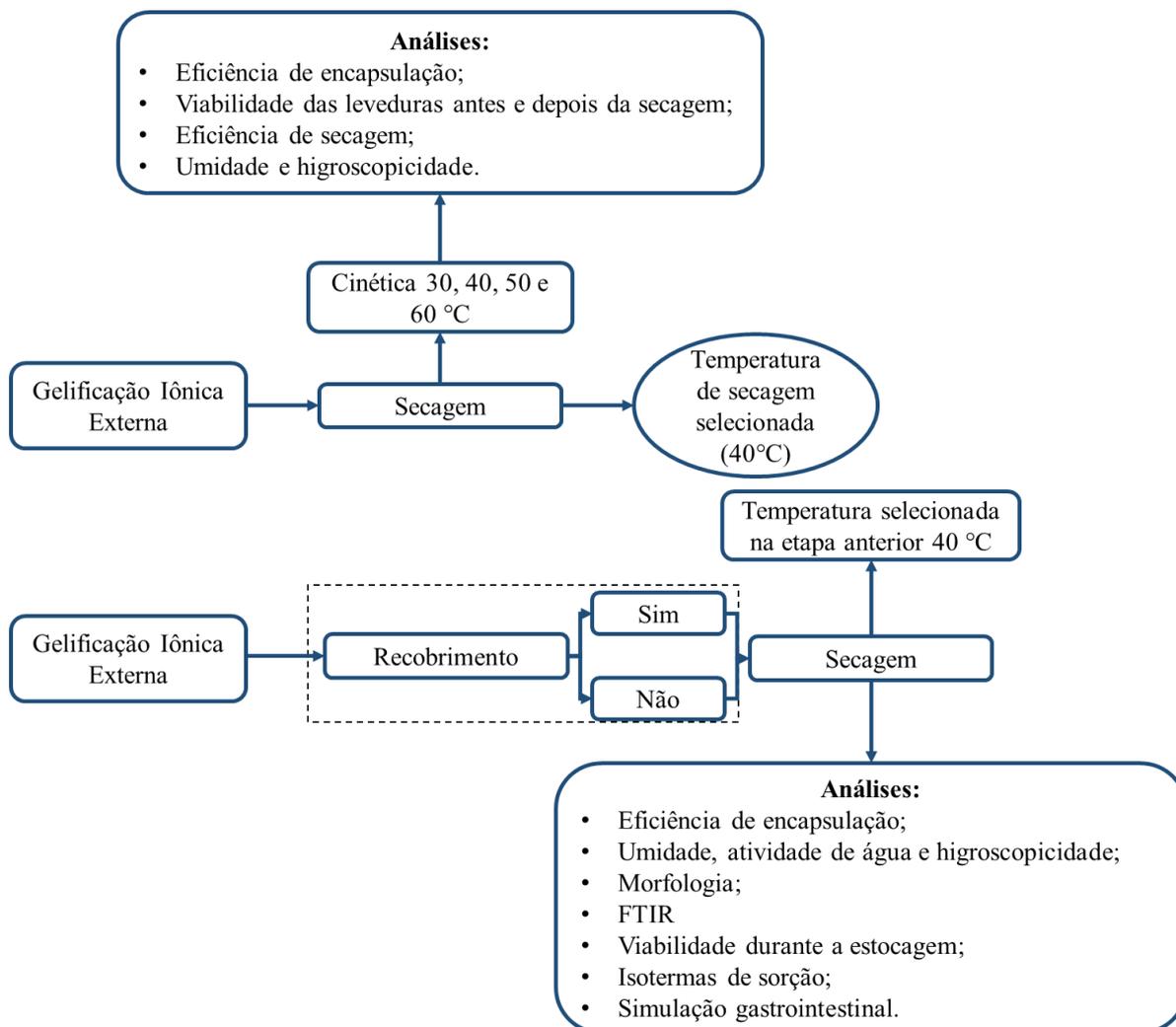
O alginato de sódio (SIGMA-Aldrich) e a quitosana (SIGMA-Aldrich) foram utilizados no processo de microencapsulação como materiais de parede. Como ativo da partícula utilizou-se a cepa *S. boulardii* liofilizada obtida a partir do Floratil (Biocodex, França). Os demais materiais, como os utilizados na elaboração dos meios de cultivo do micro-organismo está descrito juntamente com a metodologia.

### **4.2.2 Armazenamento da cultura e geração de biomassa**

A cepa de *S. boulardii* foi cultivada em ágar YPD (*yeast, potato, dextrose*) e mantida sob temperatura de refrigeração (7 °C), a fim de que se mantivesse a viabilidade celular. Para a geração de biomassa a cepa foi cultivada em caldo YPD a 30 °C durante 36 horas sob agitação no SHAKE (NT 712-Bunker, Piracicaba, Brasil). Em seguida, foram centrifugadas, 1000 rpm por 5 minutos, com a finalidade de separar as células do caldo de crescimento. As células foram suspendidas em água destilada para aplicação no processo de microencapsulação.

### **4.2.3 Métodos**

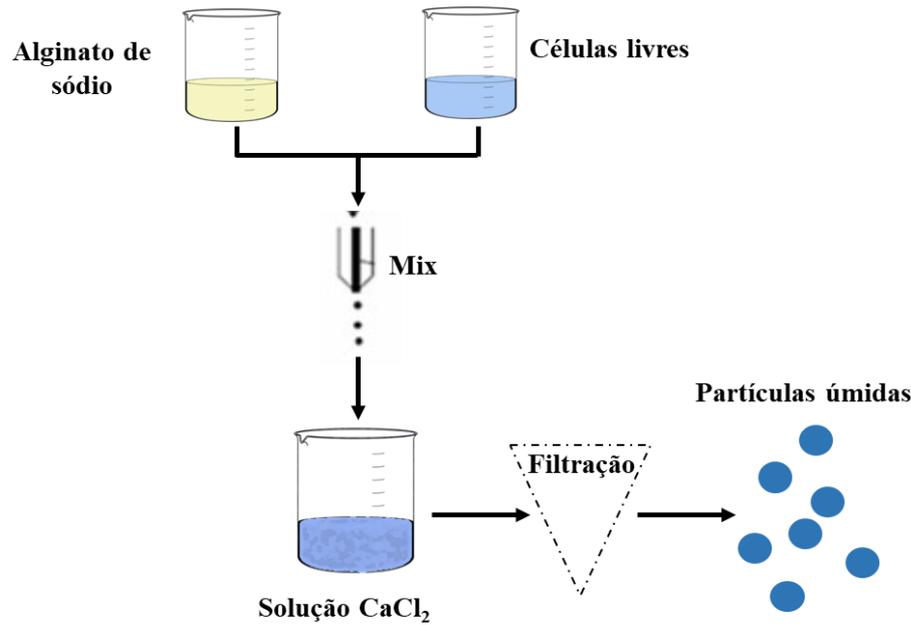
A Figura 10 apresenta a organização dos métodos e das análises realizadas neste capítulo. As partículas de levedura foram produzidas a partir da técnica de microencapsulação por gelificação iônica externa recobertas ou não com quitosana e secas. As soluções de alginato de sódio (2%) e quitosana (1%), que foi solubilizada em pH 3,6 adicionando-se ácido acético glacial, foram previamente autoclavadas a temperatura de 121°C por 15 minutos, para que houvesse a menor contaminação possível durante o processo de encapsulamento.



**Figura 10:** Resumo dos procedimentos do Capítulo 4.

#### a) Microencapsulação por Gelificação Iônica Externa

A microencapsulação por gelificação iônica externa foi realizada através da metodologia empregada por Skjåk-Bræk et al. (1989) com modificações, como observada na Figura 11. Uma alíquota de 10 mL do micro-organismo cultivado foi misturada em 90 mL de solução de alginato de sódio, de modo que a concentração final desta solução fosse igual a 2%. Esta mistura foi gotejada em 200 mL de solução de cloreto de cálcio a 2%. O gotejamento foi realizado utilizando-se uma sonda de PVC estéril com diâmetro interno liso de 2 mm e abertura de 0,15 mm, acoplada a uma bomba dosadora peristáltica (Milan Equipamentos Científicos, Colombo, Brasil). Após 30 minutos, filtrou-se e lavou-se com água destilada as partículas formadas.



**Figura 11:** Esquema do processo de gelificação iônica externa.

b) Estudo do processo de secagem

As partículas de alginato foram secas em estufa de circulação forçada e renovação de ar SL 102 (SOLAB, Piracicaba, Brasil). Foram testadas 4 temperaturas de secagem, 30, 40, 50 e 60 °C. Para cada temperatura estudada, foi realizada a cinética de secagem até peso constante e os dados experimentais foram ajustados segundo os modelos de Page (PAGE, 1949) e Exponencial (CARLESSO et al., 2007), utilizando-se o Software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA). Para a escolha da temperatura de secagem, realizou-se a enumeração das células, nas esferas, antes e depois da operação.

As curvas da cinética de secagem foram construídas a partir do adimensional de umidade ( $Y$ , Equação 7) em função do tempo ( $t$ ) em minutos. As Equações 8 e 9 apresentam o modelo empírico de Page e Exponencial, respectivamente.

$$Y = \frac{X_t - X_{eq}}{X_0 - X_{eq}} \quad \text{Equação 7}$$

$$Y = e^{(-Gt^m)} \quad \text{Equação 8}$$

$$Y = e^{-kt} \quad \text{Equação 9}$$

onde  $Y$  é o conteúdo adimensional da umidade em função do tempo,  $X$  é a umidade em  $\text{g} \cdot 100 \text{g}^{-1}$  e  $G$  e  $k$  são as constantes dos modelos ( $\text{min}^{-1}$ ) e  $m$  é o parâmetro do modelo (constante adimensional).

A raiz quadrada do erro médio (RQEM) foi calculado segundo a Equação 10.

$$RQEM = \left[ \frac{100}{GLR} \sum_{i=1}^N (Y - \hat{Y})^2 \right]^{\frac{1}{2}} \quad \text{Equação 10}$$

onde  $GLR$  é o grau de liberdade do grupo de dados,  $Y$  o valor experimental e  $\hat{Y}$  o valor estimado pelo modelo.

c) Recobrimento das partículas

O recobrimento das partículas formadas foi realizado utilizando-se uma solução de quitosana a 1%. Esta solução foi preparada adicionando-se 1 g de quitosana a 100 mL de água destilada acidificada com 0,4 mL de ácido acético glacial, atingindo o pH de 3,6, para que houvesse a dissolução do polímero e, em seguida, autoclavada. As partículas foram imersas na solução de quitosana e agitadas durante 30 minutos, com o auxílio de uma barra magnética. Após este intervalo de tempo, foram filtradas e lavadas com água destilada (KRASAEKOOPT et al., 2004).

d) Isotermas de sorção

Para a determinação da umidade de equilíbrio das partículas secas foi utilizado o método gravimétrico estático proposto por Labuza e Schmidl (1985). Para isso, foram utilizadas soluções salinas saturadas em água destilada, de acordo com determinada faixa de umidade relativa, como pode ser observada na Tabela 6.

**Tabela 6:** Valores de atividade de água relacionados às soluções salinas saturadas a 30 °C.

Sal	<i>A<sub>w</sub></i>
KOH	0,074
MgCl <sub>2</sub>	0,324
Mg(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub>	0,514
KI	0,679
NH <sub>4</sub> Cl	0,779
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	0,806
KCl	0,836

FONTE GREENSPAN 1977

As amostras foram colocadas em recipientes e, em seguida, armazenadas em potes herméticos, que podem ser observados na Figura 12, com as respectivas soluções salinas para cada valor de umidade relativa, a 30 °C. As amostras foram então pesadas em balança analítica em intervalos regulares de tempo, até que atingissem o equilíbrio (cerca de 4 semanas). Após o equilíbrio ter sido atingido, a umidade de equilíbrio das amostras foi calculada somando-se o teor de umidade inicial a quantidade de água absorvida de cada amostra. Os dados experimentais foram, por sua vez, ajustados aos modelos de GAB, BET e pelo modelo empírico de Oswin, encontrados na literatura para isotermas de sorção (BRUNAUER et al., 1938), Equações 11, 12 e 13, respectivamente. Os dados foram tratados com o Software Statistica 8.0 (Statsoft, Tulsa, EUA).



**Figura 12:** a) Desenho esquemático do recipiente hermético onde foram armazenadas as amostras para a construção de isothermas de sorção e b) Recipientes herméticos experimentais.

Equação 11

$$X_e = \frac{X_m C_{BET} a_w [1 - (N + 1)(a_w)^N + N(a_w)^{N+1}]}{(1 - a_w)[1 - (1 - C_{BET})a_w - C_{BET}(a_w)^{N+1}]}$$

Equação 12

$$X_e = \frac{X_m C_{GAB} K_{GAB} a_w}{[(1 - K_{GAB} a_w)(1 - K_{GAB} a_w + C_{GAB} K_{GAB} a_w)]}$$

Equação 13

$$X_e = C \left( \frac{a_w}{1 - a_w} \right)^D$$

onde  $X_e$  é a umidade de equilíbrio ( $\text{g água.g}^{-1}$  sólidos secos),  $X_m$  a umidade na monocamada molecular ( $\text{g água.g}^{-1}$  sólidos secos),  $N$  o número de camadas moleculares,  $a_w$  a atividade de água,  $C_{BET}$ ,  $C_{GAB}$ ,  $K_{GAB}$ ,  $C$  e  $D$  são constantes dos respectivos modelos.

#### e) Viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem

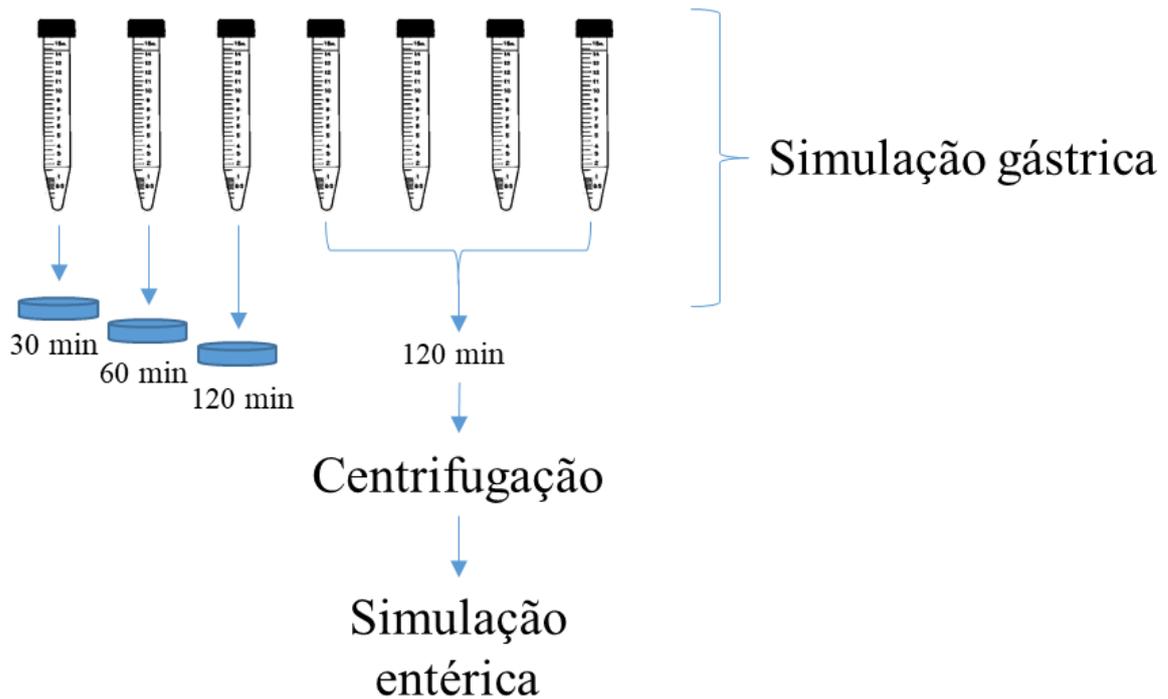
Para observar a viabilidade dos micro-organismos encapsulados durante a estocagem, as amostras foram acondicionadas em recipientes herméticos, e armazenados nas temperaturas de  $-18\text{ }^\circ\text{C}$ ,  $7\text{ }^\circ\text{C}$  e  $30\text{ }^\circ\text{C}$ . Foi realizada a contagem em placas, em ágar YPD, pela técnica da microgota, nos seguintes intervalos de tempo, 0, 15, 30, 45, 60, 75, 90, 105 e 120 dias.

#### f) Simulação gastrointestinal

Para a análise da sobrevivência da levedura, células livres e microencapsuladas, ao trato gastrointestinal, foram realizadas a simulação dos fluidos estomacal (SGF) e intestinal (SEF), a partir de adaptações das metodologias propostas por Picot e Lacroix (2004) e Favarin et al. (2015).

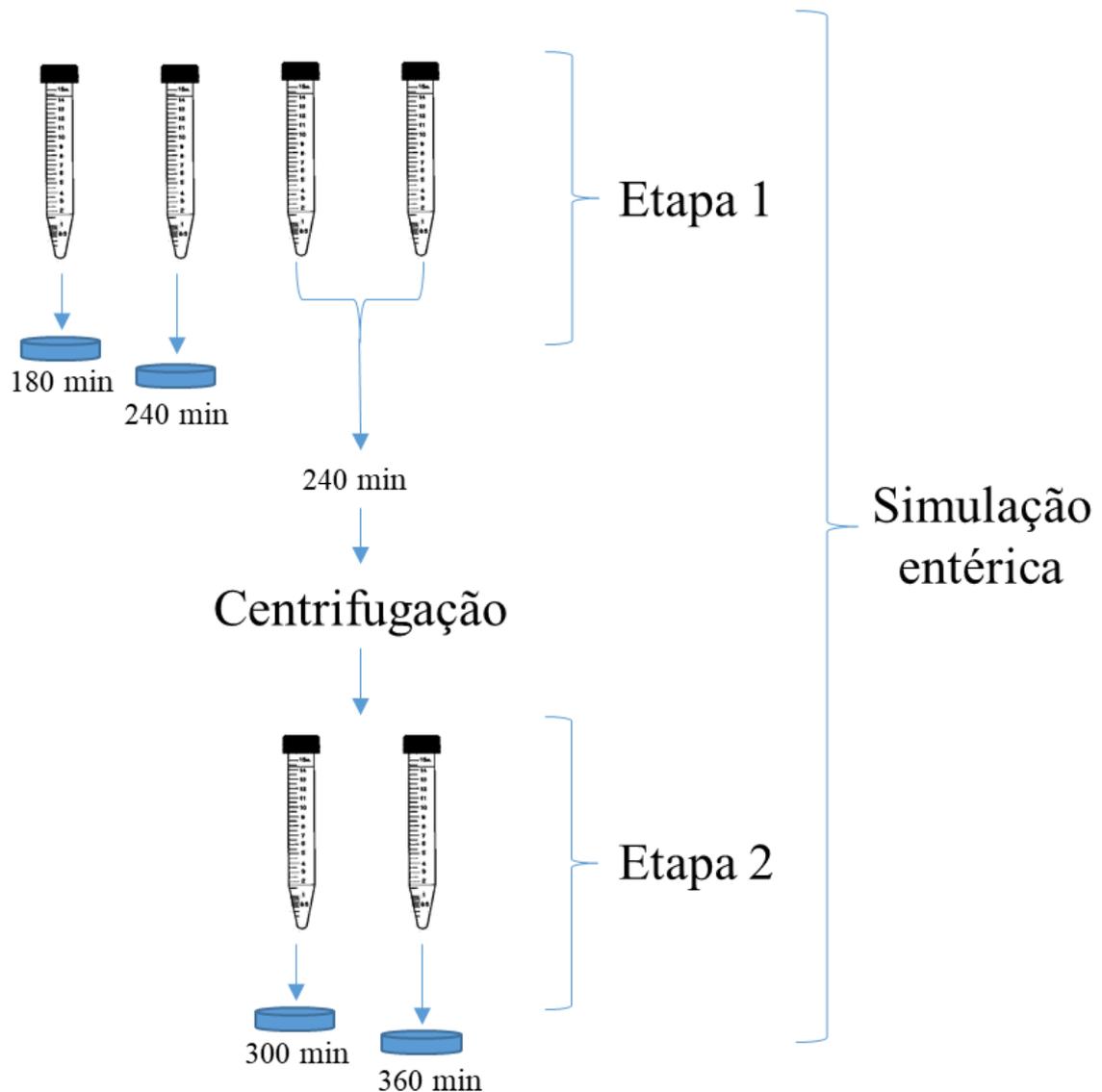
A solução estomacal foi preparada utilizando-se os seguintes sais,  $2,00\text{ g.L}^{-1}$  de NaCl,  $1,12\text{ g.L}^{-1}$  de KCl,  $0,40\text{ g.L}^{-1}$  de  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  e as enzimas  $0,26\text{ g.L}^{-1}$  de pepsina e  $3,50\text{ g.L}^{-1}$  de mucina tipo III. O pH desta solução foi ajustado para 2,00 com HCl. A solução intestinal foi preparada com a seguinte composição,  $6,5\text{ g.L}^{-1}$  NaCl,  $0,84\text{ g.L}^{-1}$  KCl e  $0,22\text{ g.L}^{-1}$   $\text{CaCl}_2$ , adicionando-se também pancreatina ( $1,95\text{ g.L}^{-1}$ ) e sais de bile ( $10\text{ g.L}^{-1}$ ). A simulação da fase entérica foi subdividida em duas etapas, com modificações no pH, utilizando solução de  $\text{NaHCO}_3$ , entre 4,30 e 5,20 (SEF1) e 6,50 e 7,20 (SEF2), respectivamente.

A enumeração dos micro-organismos na simulação gástrica foi realizada segundo Thomas et al. (2014), onde 0,1 g da amostra foi submetida a 10 mL da solução gástrica durante diferentes períodos de incubação, 0, 30, 60 e 120 minutos. A cada intervalo de tempo as células foram centrifugadas e determinadas em relação a sobrevivência pelo método de contagem em placas pela técnica da microgota. A Figura 13 apresenta a etapa referente a simulação gástrica.



**Figura 13:** Procedimento realizado na Simulação Gástrica

Para simular a fase intestinal, a solução entérica foi dividida e o pH ajustado, como descrito anteriormente. Após a simulação gástrica, as amostras foram centrifugadas e adicionadas da solução SF1, permanecendo sob agitação durante 2 horas com quantificação das células vivas nos intervalos 180 e 240 minutos. Este procedimento foi repetido na segunda etapa da simulação entérica, com duração de 2 horas e enumeração dos micro-organismos nos intervalos de 320 e 360 minutos. Na Figura 14 é possível observar o desenvolvimento desta fase.



**Figura 14:** Procedimento realizado na Simulação Entérica

#### 4.2.4 Métodos analíticos

##### a) Estimativa da concentração microbiana

A concentração estimada de levedura foi baseada na medida por densidade óptica. Após o inóculo do micro-organismo no caldo YPD e incubação durante 48 horas a 30 °C, foram realizadas diluições e suas respectivas leituras no espectrofotômetro (BEL Photonics SP 1105) com o comprimento de onda de 600 nm. Assim, após o plaqueamento em superfície do inóculo, a absorvância e a contagem microbiana foram relacionadas de forma gráfica (BEGOT et al., 1996).

##### b) Quantificação da levedura encapsulada

As esferas foram rompidas utilizando-se uma solução tampão fosfato em pH 7,0, previamente autoclavada a 121 °C por 15 minutos (SHEU e MARSHALL, 1993). Quantificou-se a levedura através da contagem em placas em YPD após incubação a 30 °C durante 24 horas

(ARSLAN-TONTUL e ERBAS, 2017). A contagem das células foi realizada segundo Favarin et al. (2015) utilizando a técnica da microgota.

c) Eficiência da encapsulação e secagem

As taxas de sobrevivência das levedura nas esferas foram calculadas como a relação entre a contagem de levedura nas partículas e a contagem de levedura da solução de alimentação da encapsulação com base na matéria seca (GUIMARÃES et al., 2013). De forma analoga, a eficiência da secagem foi calculada em relação a esfera úmida e seca. Para o cálculo da eficiência utilizou-se a Equação 14 e 15.

$$E_u(\%) = \frac{C_{partículas}}{C_{suspensão}} * 100$$

Equação 14

$$E_s(\%) = \frac{S_{partículas secas}}{S_{partículas úmidas}} * 100$$

Equação 15

onde  $E_u$  e  $E_s$  são a eficiência da microencapsulação e da secagem, respectivamente.  $C_{partículas}$  refere-se ao conteúdo total de micro-organismos na partícula e  $C_{suspensão}$  o conteúdo de micro-organismos na solução inicial.  $S$  refere-se ao conteúdo de micro-organismos nas partículas secas e úmidas.

d) Umidade

A umidade das partículas úmidas e secas produzidas foram determinadas segundo o método oficial da AOAC (AOAC, 1970).

e) Higroscopicidade

Para a determinação da higroscopicidade das partículas secas foi empregada a metodologia descrita por Cai e Corke (2000), com algumas modificações. Aproximadamente 1 g da amostra foi pesada, em triplicata, e acondicionada em recipiente hermético contendo solução saturada de NaCl (umidade relativa de 75,3%). Após uma semana, as amostras foram pesadas e calculou-se a higroscopicidade expressa em gramas de umidade adsorvida por 100 g de massa seca da amostra.

f) Atividade de água

A atividade de água das partículas secas foi determinada utilizando-se o equipamento AQUALAB (Decagon Devices. Pullman, WA).

g) Morfologia

As esferas úmidas foram analisadas através do microscópio ótico Carl Zeiss (modelo Axio Scope A1, Gottingen, Alemanha) e as partículas secas utilizando a microscopia eletrônica de varredura (MEV).

As análises por MEV foram realizadas segundo a metodologia descrita por ROSENBERG e Young (1993). Fixou-se as amostras a uma fita adesiva em porta-espécimes metálicos (*stubs*) e, em seguida, as recobriu com uma fina camada de ouro em um aparelho metalizador. As amostras foram mantidas em um recipiente fechado até o momento da observação no microscópio eletrônico de varredura (TM 3000, Hitachi, Japão).

h) Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

Para a caracterização dos materiais de parede das partículas e verificar a encapsulação da levedura e a interação entre o alginato e a quitosana nestas, ou seja, a presença dos materiais

de paredes nas partículas, a espectroscopia na região do infravermelho foi realizada na faixa de onda entre 4000 e 600  $\text{cm}^{-1}$  utilizando o equipamento Perkin Elmer FT-IR Spectrometer (Massachusetts-EUA) com auxílio do software Origin®.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Estudo do processo de secagem

As células de *S. boulardii* foram encapsuladas através da técnica da gelificação iônica externa, a partir de um inóculo inicial, com concentração de  $9,46 \pm 0,01 \text{ UFC.g}^{-1}$ . Esta concentração foi mensurada a partir da curva de concentração microbiana, apresentada no Apêndice B.

A Tabela 7 apresenta os dados da concentração microbiana antes e após a secagem, nas diversas temperaturas, e ainda, a eficiência da secagem.

**Tabela 7:** Valores para a concentração de levedura nas partículas e eficiência da secagem

Temperatura de secagem (°C)	Antes da secagem (log UFC.g <sup>-1</sup> )	Após a secagem (log UFC.g <sup>-1</sup> )	Eficiência da secagem (%)
30	9,39 <sup>Aab</sup> ±0,05	9,43 <sup>Aa</sup> ±0,02	100,11 <sup>a</sup> ±0,44
40	9,78 <sup>Aa</sup> ±0,11	9,44 <sup>Aa</sup> ±0,16	96,46 <sup>a</sup> ±0,61
50	9,19 <sup>Ab</sup> ±0,02	8,40 <sup>Bb</sup> ±0,07	91,43 <sup>b</sup> ±0,72
60	9,60 <sup>Aa</sup> ±0,13	8,25 <sup>Bc</sup> ±0,05	85,96 <sup>c</sup> ±1,64

Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras maiúsculas iguais nas linhas e minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

A operação de secagem pode interferir na sobrevivência da levedura encapsulada, como pode ser observada nas contagens do micro-organismo antes e após o processo, pode ser notada a diferença significativa entre estes valores quando considerada diferentes temperaturas. Na secagem a 30 e 40 °C a concentração de levedura não apresentou variação, o que não foi observado em 50 e 60 °C, que apresentaram redução logarítmica na contagem das células.

Portanto, em temperaturas superiores a 40 °C identifica-se um declínio na viabilidade da levedura encapsulada, inferindo que a encapsulação pode não ter sido suficiente para garantir a proteção da cepa a estas temperaturas de exposição. Segundo Mcfarland e Bernasconi (1993) a temperatura ótima de crescimento da cepa *S. boulardii* é de 37 °C, valores acima deste podem causar injúrias na célula, podendo provocar a lise das mesmas.

Em um estudo, Arslan-Tontul e Erbas (2017) realizaram a microencapsulação de um mix de micro-organismos probióticos, dentre eles *S. boulardii*, com goma arábica e  $\beta$ -ciclodextrina como materiais de parede, a partir da técnica de *Spray Dryng*, utilizando uma temperatura de 120 °C no ar de entrada, e encontraram uma taxa de eficiência de aproximadamente 95 %, com uma contagem final de 7,07 log UFC.g<sup>-1</sup>.

Thomas et al. (2014) avaliaram a eficiência da utilização de liofilização de *S. boulardii* encapsuladas pela técnica de camadas, com uma e duas camadas, e encontraram valores de 60 e 83 % respectivamente. O emprego de baixas temperaturas de pressões na remoção da água

não garantiu a sobrevivência da levedura, sendo inferior a secagem em estufa em todas as temperaturas estudadas.

A Tabela 8 apresenta os dados experimentais obtidos nas análises de umidade e higroscopicidade das partículas em cada uma das temperaturas de secagem.

**Tabela 8:** Valores experimentais para umidade ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) e higroscopicidade ( $\text{g} \cdot 100 \text{ g}^{-1}$ ) das partículas.

	Antes	Após secagem ( $^{\circ}\text{C}$ )			
	Secagem	30	40	50	60
Umidade	96,13 $\pm$ 0,02	13,05 <sup>b</sup> $\pm$ 0,11	15,87 <sup>a</sup> $\pm$ 0,41	12,00 <sup>c</sup> $\pm$ 0,47	15,14 <sup>a</sup> $\pm$ 0,48
Higroscopicidade	-	10,69 <sup>a</sup> $\pm$ 0,49	7,99 <sup>b</sup> $\pm$ 0,81	11,63 <sup>a</sup> $\pm$ 0,23	7,54 <sup>b</sup> $\pm$ 0,58

Resultados expressos em média $\pm$ desvio padrão. Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

As propriedades físico-químicas com umidade e higroscopicidade nos fornecem importantes características sobre as partículas secas, principalmente para a conservação e a manutenção da viabilidade de tais produtos. A umidade, quando exibe um alto valor pode diminuir a qualidade das partículas quando armazenadas, assim como a alta capacidade de absorção de água que acarreta o aumento da umidade, gerando a degradação dos materiais de parede e a proliferação de bolores (CHAMPAGNE et al., 1996; BHANDARI et al., 2013).

Não se observa uma tendência clara em relação ao aumento da temperatura e os valores obtidos para umidade e higroscopicidade das partículas (Tabela 8). As partículas apresentaram umidade inferior a 16 % de umidade e higroscopicidade abaixo de 12 %. Arslan-Tontul e Erbas (2017) ao realizarem a microencapsulação de *S. boulardii* com secagem por *Spray drying* encontraram valores similares a este estudo, com umidade abaixo de 13 %. Em outro estudo, Albadran et al. (2015) produziram partículas de *Lactobacillus plantarum* com 9 % de umidade após o processo de liofilização.

Para o estudo da secagem das partículas úmidas optou-se em realizar a cinética, para identificar, principalmente o tempo de remoção de água, embora não tenha sido descartada a importância da sobrevivência da levedura a esta operação. Além disso, o estudo deste processo elucidou o comportamento das partículas em relação aos fenômenos de transferência de calor e massa com o ar de secagem (DE FARIA et al., 2012). Os modelos utilizados neste experimento têm sido empregados no estudo de secagem de produtos agrícolas, grãos e vegetais (AKPINAR et al., 2003), mas podem ser estendidos às partículas deste estudo, devido à proximidade em teores de umidade e características de formação.

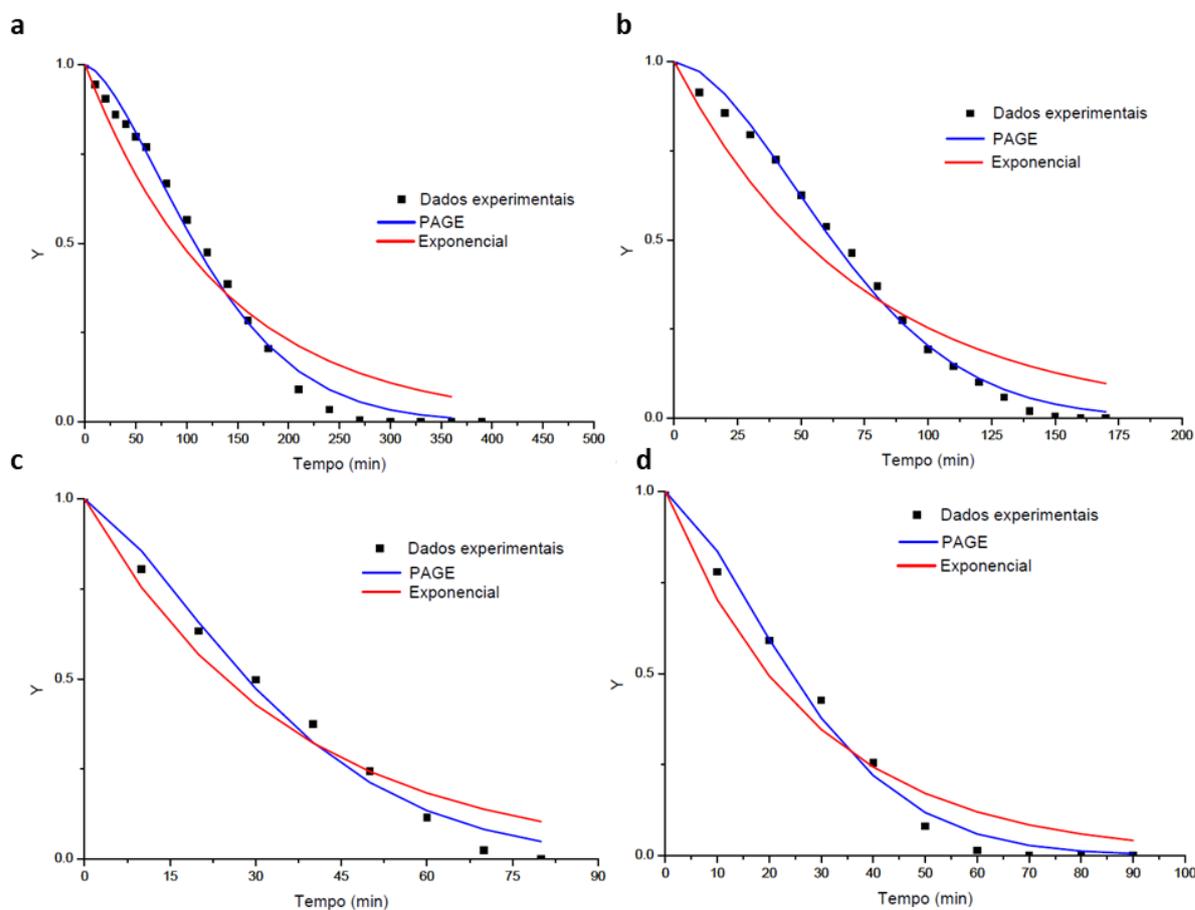
Os parâmetros de ajuste dos dados experimentais aos modelos PAGE e exponencial para a cinética de secagem em diferentes temperaturas são apresentados na Tabela 9, onde também se observa o coeficiente de determinação ( $R^2$ ) e a raiz quadrada do erro médio (RQEM). O modelo de PAGE forneceu o melhor ajuste para as curvas de secagem em todas as temperaturas analisadas, onde o coeficiente de determinação apresentou resultados próximos a 1, e ainda, os menores valores de RQEM.

**Tabela 9:** Parâmetros relacionados aos dados experimentais ajustados aos modelos de secagem.

Modelo	Parâmetro	Temperatura			
		30 °C	40 °C	50 °C	60 °C
Page	G ( $10^4 \text{ min}^{-1}$ )	4,8228	5,0508	5,8910	5,1860
	M	1,5540	1,7500	1,4244	1,5392
	R <sup>2</sup>	0,9921	0,9933	0,9932	0,9909
	RQEM (%)	3,4107	2,8468	3,8255	3,5033
Exponencial	K ( $10^4 \text{ min}^{-1}$ )	7,3935	13,7460	28,3101	35,3597
	R <sup>2</sup>	0,9430	0,9214	0,9781	0,9561
	RQEM (%)	9,0857	9,3483	7,2938	7,7104

Os valores de G e K apresentaram uma ligeira dependência com a temperatura, ou seja, quando ocorre o aumento da temperatura pode-se observar um aumento deste valor. Este resultado está de acordo com Brooker et al. (1992) que afirmam a dependência destes valores com a variação de temperatura, e ainda, com o teor de umidade inicial.

A Figura 15 mostra as curvas de secagem e indicam que o aumento da temperatura interferiu na remoção da água das partículas, ocasionando em uma maior taxa de secagem. Como esperado, o tempo total do processo reduziu, alcançando menores valores nas temperaturas de 50 e 60 °C, apesar disso, como discutido anteriormente, a sobrevivência da *S. boulardii* foram as menores entre as temperaturas avaliadas, inviabilizando este parâmetro de processo. Na temperatura de 40 °C, escolhida para este estudo, observa-se que a umidade permanece constante a partir do tempo de 2,5 horas, e manteve uma alta concentração de levedura.



**Figura 15:** Cinética de secagem e ajuste aos modelos: a) secagem a 30 °C; b) secagem a 40 °C; c) secagem a 50 °C; d) secagem a 60 °C.

#### 4.3.2 Características das partículas encapsuladas com e sem recobrimento de quitosana, secas na temperatura de 40 °C

A microencapsulação da cepa de *S. boulardii* por gelificação iônica foi realizada utilizando-se alginato de sódio e recobertas ou não com quitosana. Os resultados comparativos entre as diferentes partículas formadas são apresentados na Tabela 10.

A concentração de *S. boulardii* na partícula seca e eficiência de encapsulação foi considerada estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ), revelando que não a perda de micro-organismos quando o procedimento de recobrimento da partícula de alginato foi realizado. Resultado similar foi encontrado por Hébrard et al. (2010) na microencapsulação de *S. boulardii* com alginato e recobrimento com isolado proteico do soro de leite.

**Tabela 10:** Valores experimentais para concentração *S. boulardii* na partícula seca (log UFC.g-1), umidade (g.100 g-1), higroscopicidade (g.100 g-1), atividade de água e eficiência de encapsulação e secagem das partículas (%).

Parâmetros	ALG	ALG-QUIT
Concentração partícula seca	9,44±0,16 <sup>a</sup>	9,69±0,09 <sup>a</sup>
Umidade	15,87±0,41 <sup>a</sup>	13,81±0,66 <sup>b</sup>
Higroscopicidade	7,99±0,81 <sup>a</sup>	6,49±0,32 <sup>b</sup>
Atividade de água	0,279±0,002 <sup>a</sup>	0,267±0,005 <sup>b</sup>
Eficiência de encapsulação	95,44±0,59 <sup>a</sup>	95,35±1,09 <sup>a</sup>
Eficiência de secagem	96,47±0,61 <sup>b</sup>	98,07±0,55 <sup>a</sup>

ALG: partículas de alginato e ALG-QUIT: partículas de alginato-quitosana. Resultados expressos em média±desvio padrão. Letras minúsculas iguais nas linhas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

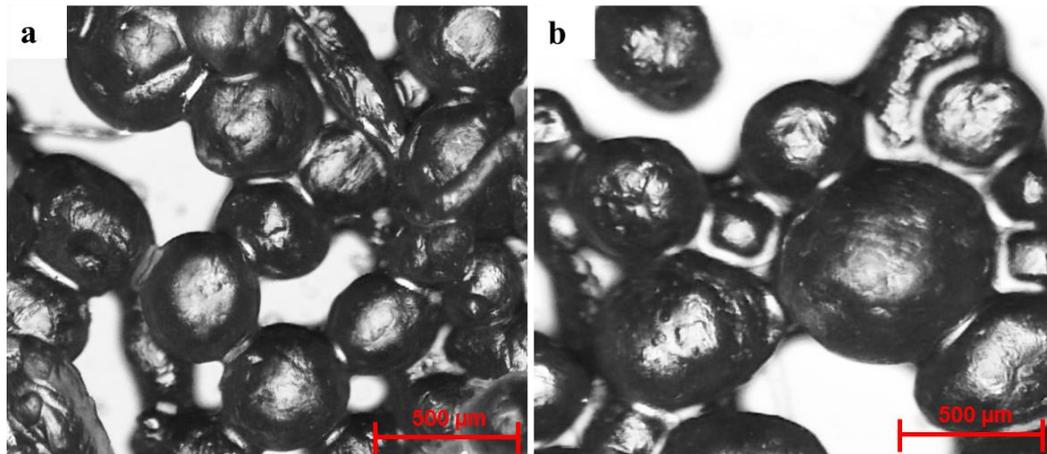
Além disso, as partículas de alginato-quitosana apresentaram valores inferiores de umidade, atividade de água e a absorção de água, evidenciando uma possível maior estabilidade durante o armazenamento, dependendo da umidade relativa do ambiente.

Observa-se uma maior sobrevivência da levedura nas partículas alginato-quitosana quando comparada a eficiência de secagem, indicando uma maior proteção ao processo de secagem a 40 °C. Segundo Ramos et al. (2018) o recobrimento de partículas pode diminuir a quantidade de poros na superfície aumentando a resistência. Além disso, estas partículas apresentaram valores inferiores na absorção de água, evidenciando uma possível maior estabilidade durante o armazenamento, dependendo da umidade relativa do ambiente.

A seguir são abordadas as análises de morfologia, FTIR, viabilidade durante o armazenamento, a construção de isotermas de sorção e a viabilidade durante a simulação gastrointestinal *in vitro* das partículas de alginato e alginato-quitosana.

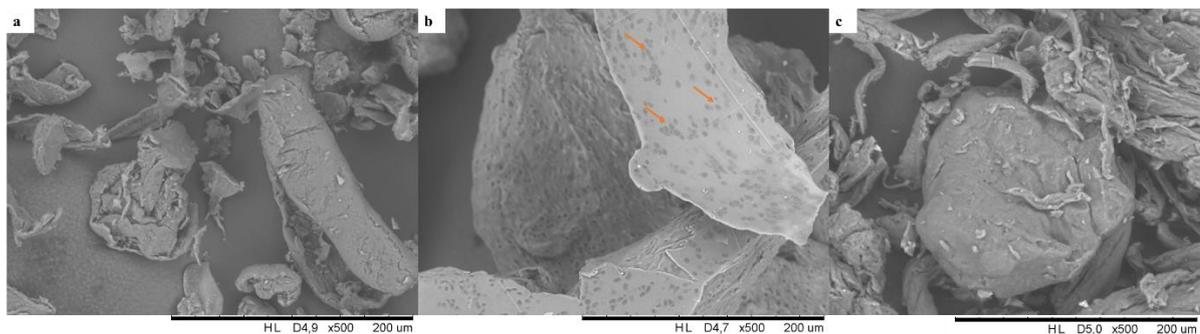
#### a) Morfologia das partículas

A microscopia ótica das partículas úmidas de alginato e alginato-quitosana são mostradas na Figura 16 com um aumento de 30x. De forma geral, observa-se a formação de estruturas com geometria esférica, com notável variação nas dimensões, impossibilitando sua aferição. Além disso, não é possível identificar alterações na superfície das esferas somente de alginato e as que passaram pelo processo de recobrimento. Segundo Burgain et al. (2011) a técnica de microencapsulação por gelificação iônica externa produziu partículas de variados tamanhos, devido ao processo de gotejamento do material sobre a solução de cloreto de cálcio.



**Figura 16:** Microscopia ótica das partículas úmida com aumento de 30x: a) partícula alginato e b) partícula alginato-quitosana.

A microscopia eletrônica de varredura possibilitou a observação da superfície das partículas, alginato e alginato-quitosana, após a operação de secagem, apresentadas na Figura 17. Observa-se que as partículas somente de alginato (17.b) apresentaram pontos escuros em sua superfície, indicando leveduras aderidas a esta, típico de uma estrutura matricial, o que pode comprometer a viabilidade deste micro-organismo frente as alterações ambientais. Após o revestimento com quitosana, não são encontrados estes pontos, pois não há células da levedura sobre a superfície. Halim et al. (2017) também observaram a aderência de bactérias probióticas sobre a superfície das partículas de alginato obtidas por gelificação iônica externa e liofilizadas.



**Figura 17:** Microscopia eletrônica de varredura das partículas secas com aumento de 500x: a) partícula alginato sem a levedura (controle), b) partícula alginato com levedura encapsulada e c) partícula alginato-quitosana com levedura encapsulada.

#### b) Espectroscopia na região do infravermelho com transformada de Fourier (FTIR)

A análise de FTIR nos permite identificar as interações das ligações presentes em cada uma das moléculas, e ainda, observar de forma qualitativa a presença de componentes em estruturas formadas a partir de misturas, portanto, pode-se identificar a presença ou não do revestimento de quitosana na partícula de alginato. Observa-se na Figura 18 os espectros de transmissão na região do infravermelho dos materiais de parede, alginato de sódio e quitosana, e também das partículas de alginato e alginato-quitosana.

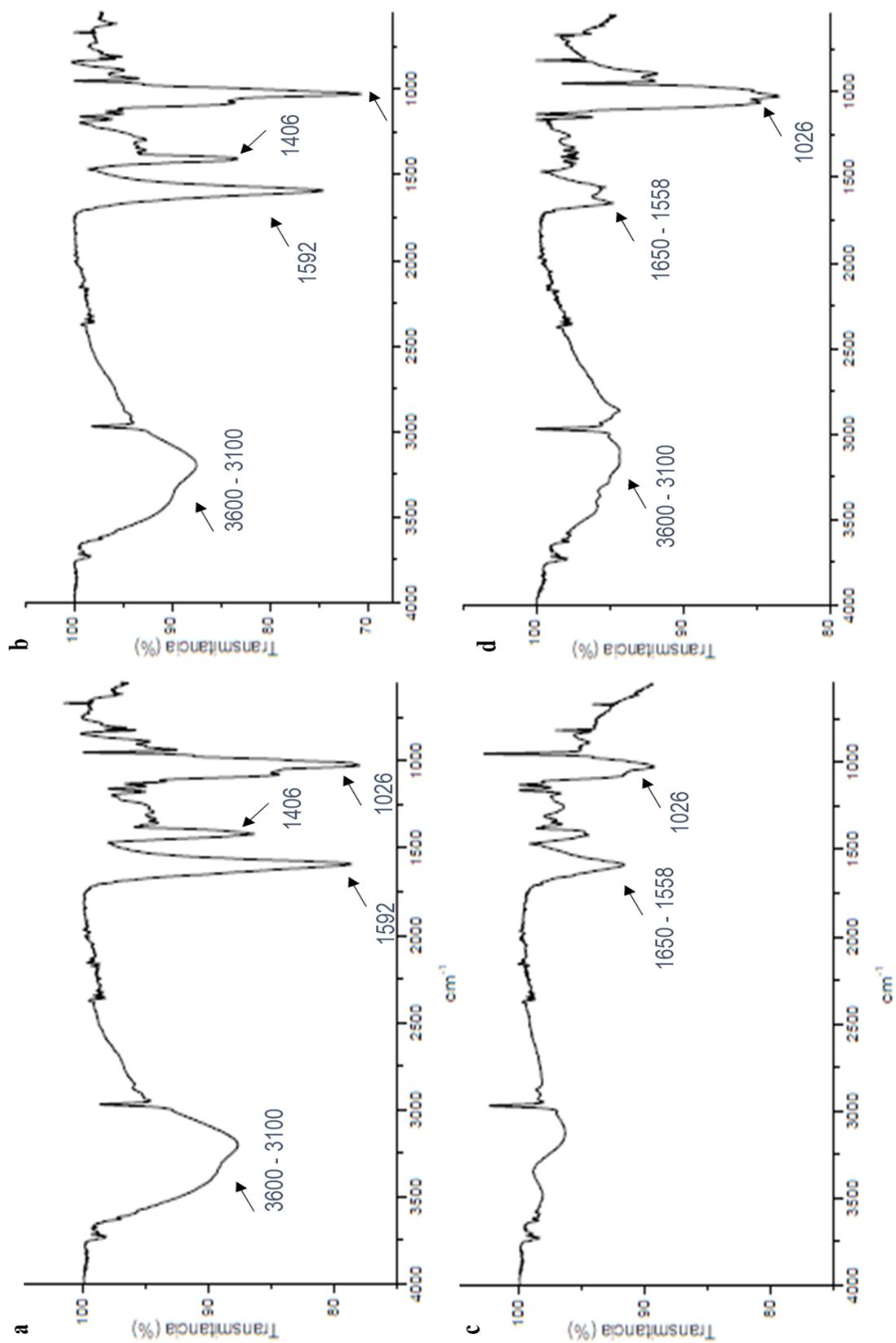
No espectro de alginato de sódio, Figura 18-a, é possível identificar bandas características deste material, como os picos localizados em  $1592\text{ cm}^{-1}$  associado a deformação simétrica do grupo carboxilato ( $\text{COO}^-$ ) e assimétrica em  $1406\text{ cm}^{-1}$ , e ainda, a banda em  $1026\text{ cm}^{-1}$  que indicam um alongamento assimétrico de C-O-C (LIM e AHMAD, 2017). As bandas

entre 3100 e 3600  $\text{cm}^{-1}$  são típicas de ligações hidrogênio (OH). Não houve identificação de bandas em 1747  $\text{cm}^{-1}$ , que representariam a presença de ácido algínico (VAZIRI et al., 2018).

O espectro de infravermelho da Figura 18-b apresenta as bandas referentes a quitosana. Observa-se, principalmente as bandas 1026  $\text{cm}^{-1}$  correspondentes ao estiramento da ligação N-H, e ainda as bandas 1650 e 1558  $\text{cm}^{-1}$  associadas a amida primária e secundária, respectivamente. Outras ligações são identificadas em 2878  $\text{cm}^{-1}$  como  $\nu\text{C-H}$  simétrico e em 3600 e 3100  $\text{cm}^{-1}$  bandas de ligação hidrogênio (OH) (LIM e AHMAD, 2017).

Na Figura 18-c, espectro da partícula de alginato, observa-se a presença das mesmas bandas encontradas para o alginato de sódio puro, mas com menores percentuais de transmitância. Segundo Vaziri et al. (2018) o efeito da ligação cruzada entre os íons  $\text{Ca}^{2+}$  com o alginato de sódio provoca um aumento na absorção das bandas em 1596-1592  $\text{cm}^{-1}$  e também das bandas entre 3100 e 3600  $\text{cm}^{-1}$ . Estes autores ainda relatam a existência de uma diminuição no estiramento C-O-C, na banda 1026  $\text{cm}^{-1}$ .

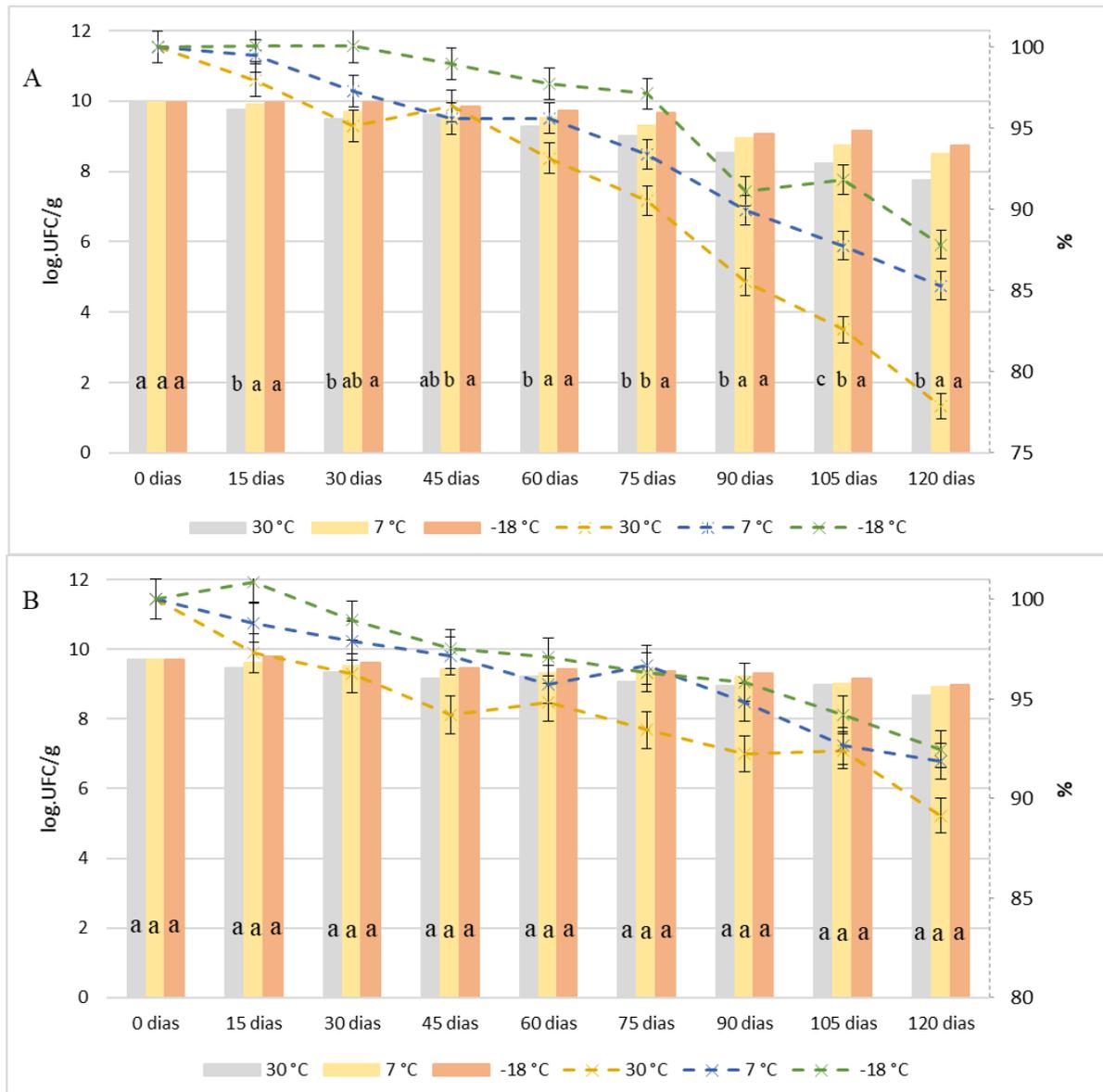
Para a partícula de alginato-quitosana, espectro da Figura 18-d, percebe-se uma diminuição do estiramento C-O-C em 1026  $\text{cm}^{-1}$ , além disso, as bandas fortemente relacionadas às ligações amidas da quitosana a 1650  $\text{cm}^{-1}$  e 1558  $\text{cm}^{-1}$  revelam uma interação iônica efetiva entre o grupo amino da quitosana e grupo carboxilato do alginato de sódio (VAZIRI et al., 2018). Portanto, através desta análise qualitativa, pode-se inferir que existe uma interação entre os materiais de parede nas partículas formadas a partir da gelificação iônica externa.



**Figura 18:** Espectro de absorção na região do infravermelho: a) alginato de sódio, b) quitosana, c) partícula de alginato e d) partícula alginato-quitosana.

c) Viabilidade durante a estocagem

A avaliação da estabilidade dos micro-organismos encapsulados durante o armazenamento torna-se importante devido à necessidade em identificar a viabilidade dos mesmos em relação ao tempo e temperatura. Sendo assim, a Figura 19 apresenta os dados referentes a sobrevivência da cepa *S. boulardii* durante o período de 120 dias em três diferentes temperaturas de armazenamento.



**Figura 19:** Viabilidade da *S. boulardii* durante o armazenamento: a) partículas de alginato de sódio; b) partículas de alginato-quitosana.

As barras representam a concentração de leveduras na partícula e as linhas o decréscimo desta contagem (em porcentagem) em relação ao primeiro dia de análise. Letras minúsculas iguais nas colunas não diferem estatisticamente entre si, pelo Teste de Tukey a 5% de significância.

De forma geral, observa-se uma maior sobrevivência da cepa *S. boulardii* nas partículas formadas de alginato-quitosana, em todas as temperaturas de armazenamento, evidenciando uma maior proteção. Segundo Ramos et al. (2018) o revestimento interage com a superfície da partícula aumentando a estabilidade em relação ao ambiente.

As partículas de alginato, com concentração inicial de  $9,96 \pm 0,34 \log \text{ UFC.g}^{-1}$ , após o período de 120 dias apresentou  $7,75 \pm 0,17$ ,  $8,49 \pm 0,20$  e  $8,75 \pm 0,05 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  nas temperaturas de 30, 7 e  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$  respectivamente (Figura 10-a). O maior declínio foi observado no armazenamento a  $30 \text{ }^\circ\text{C}$  de aproximadamente 2,21 ciclos logarítmicos. Neste período de tempo observa-se que houve diferença significativa entre as temperaturas de estocagem, considerando o mesmo intervalo de tempo, indicando uma melhor manutenção da viabilidade quando as partículas são armazenadas em temperaturas reduzidas.

A contagem de células das partículas de alginato-quitosana apresentaram uma concentração inicial de  $9,71 \pm 0,20 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  reduzindo para  $8,66 \pm 0,17$ ,  $8,92 \pm 0,09$  e  $8,98 \pm 0,17 \log \text{ UFC.g}^{-1}$  nas temperaturas de 30, 7 e  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ , respectivamente, após 120 dias de armazenamento (Figura 10-b). Portanto, a maior redução logarítmica, cerca de 1,05 log, foi encontrado quando estocadas a temperatura de  $30 \text{ }^\circ\text{C}$ , embora não tenha apresentando diferença significativa ( $p < 0,05$ ) comparadas ao armazenamento de 7 e  $-18 \text{ }^\circ\text{C}$ .

Segundo Dianawati et al. (2016) diversos estudos mostraram que a sobrevivência de micro-organismos é maior quando armazenados em temperaturas mais baixas, porém a mortalidade das células aumenta com o aumento do tempo. Este resultado foi observado neste estudo e também por Song et al. (2014) que encapsularam *S. cerevisiae* por gelificação iônica interna e encontraram uma sobrevivência de 4 meses sob a temperatura de  $-20 \text{ }^\circ\text{C}$  das células encapsuladas e liofilizadas. O mesmo foi observado em um recente estudo, Suvarna et al. (2018) realizaram a microencapsulação de leveduras probióticas, por gelificação iônica interna. No estudo da sobrevivência dos micro-organismos no armazenamento a  $4 \text{ }^\circ\text{C}$ , encontraram uma taxa de sobrevivência no tempo final de 91 %.

#### d) Isotermas de sorção

Um estudo mais detalhado da higroscopicidade pode ser feito através das isotermas de sorção, que possibilitam avaliar as alterações na umidade do produto durante a estocagem, sendo muito importante no caso de produtos secos.

Os dados experimentais foram ajustados aos modelos de BET, GAB e Oswin, comumente utilizados para a construção de isotermas de sorção. A Tabela 11 apresenta estes valores, assim como os parâmetros calculados pela estimativa dos respectivos modelos acompanhados dos coeficientes de determinação ( $R^2$ ) e a raiz quadrada do erro médio (RQEM).

**Tabela 11:** Definição de parâmetros para os modelos de isotermas de sorção a 30 ° C .

Modelo	Parâmetros	Partículas	
		Alginato	Alginato-Quitossana
<b>BET</b>	$X_m$	1696,820	3,647
	$C_{BET}$	0,001	7,446
	N	0,279	0,020
	$R^2$	0,873	0,962
	RQEM (%)	3,073	1,061
<b>GAB</b>	$X_m$	0,132	0,155
	$C_{GAB}$	56,453	37,857
	$K_{GAB}$	0,731	0,460
	$R^2$	0,994	0,993
	RQEM (%)	1,218	0,464
<b>Oswin</b>	C	0,209	0,177
	D	0,292	0,210
	$R^2$	0,975	0,976
	RQEM (%)	1,365	0,840

O modelo de GAB apresentou os melhores ajustes dos dados experimentais, para ambas as partículas, alginato e alginato-quitossana, visto que apresentaram os maiores valores de  $R^2$ , próximos a 1, e os menores valores de RQEM. De acordo com Lewicki (1997), os valores de  $C_{GAB}$  podem variar de 5,67 a infinito, o que está de acordo com os resultados obtidos neste estudo. E ainda, os autores Santos et al. (2015) e Verruck et al. (2018) associam o aumento de  $C_{GAB}$  com a diminuição de temperatura, assumindo que a forte interação entre adsorvente e adsorvido é exotérmica. Em relação aos valores de  $K_{GAB}$ , que variaram entre 0,731 e 0,460, esperados para produtos alimentícios, estes valores devem variar entre 0,240 e 1,00 (LEWICKI, 1997).

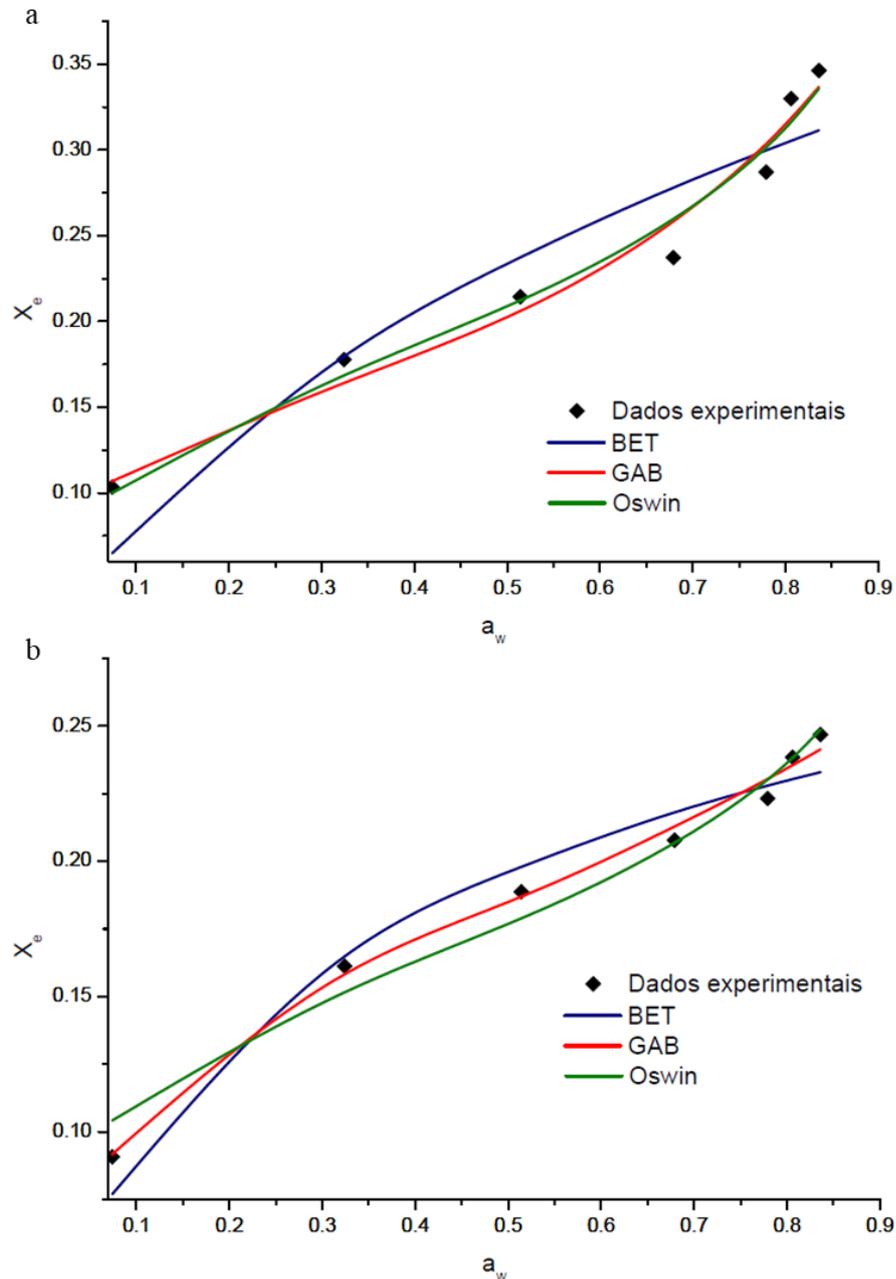
O teor de umidade da monocamada ( $X_m$ ), correspondente à estabilidade física e química em alimentos secos, representando a quantidade de água que está fortemente ligada à superfície do material ou alimento (AL-MUHTASEB et al., 2002). No ajuste a GAB,  $X_m$  variou de 13 a 15 % nas partículas de alginato e alginato-quitossana.

A Figura 20 apresenta, graficamente, os ajustes dos dados experimentais aos modelos para isotermas de sorção, construídas a partir dos valores da umidade de equilíbrio ( $X_{eq}$ ), que correlacionam com a umidade ao final do experimento, e das diferentes atividades de água. Analisando as curvas, observa-se que com o aumento da atividade de água a umidade de equilíbrio aumenta, tendendo a uma forma sigmoideal, que está de acordo com o que foi relatado por Al-Muhtaseb et al. (2002), as isotermas possuem um comportamento sigmoideal, poucos são as de formato linear.

Segundo Brunauer et al. (1938) as isotermas podem ser divididas em cinco tipos, dependendo do formato da curva, sendo os tipos II e III de maiores interesses para alimentos.

As curvas de ajuste ao modelo de GAB, em ambas formulações de partículas, aproximam-se do tipo II, observado também por Verruck et al. (2018) no estudo da microencapsulação de *Bifidobacterium* BB-12 por *Spray Drying*.

Concordando com o que foi observado na Tabela 8, a partícula de alginato-quitosana foi a que apresentou a menor higrosopicidade, indicando novamente uma tendência de maior estabilidade no armazenamento.



**Figura 20:** Dados experimentais e ajustados as modelos para isotermas de sorção: a) partículas de alginato e b) partículas de alginato-quitosana.

e) Simulação gastrointestinal *in vitro*

Um dos objetivos da utilização das técnicas de microencapsulação de micro-organismos probióticos são a de aumentar a sua proteção em detrimento das condições adversas encontradas

nos fluidos estomacais e biliares, que possuem grande variação de pH e, ainda, sais e enzimas (GARTI e MCCLEMENTS, 2012; RATHORE et al., 2013; GAONKAR et al., 2014). A Figura 21 apresenta os dados obtidos em relação a sobrevivência da *S. boulardii*, livre e encapsulada, frente aos fluidos gastrointestinais simulados *in vitro*.

As células livres da levedura apresentaram uma redução na concentração de aproximadamente 1,91 ciclos logarítmicos, de  $9,86 \pm 0,07$  para  $7,95 \pm 0,05$  log UFC.g<sup>-1</sup>, após o período de 2 horas correspondentes a simulação da fase gástrica. Enquanto isso, os micro-organismos encapsulados apresentaram uma maior resistência neste mesmo intervalo de tempo. Foi observado um ligeiro decréscimo da concentração da levedura nas partículas de alginato, de  $9,15 \pm 0,06$  para  $8,63 \pm 0,25$  log UFC.g<sup>-1</sup>, não havendo variação nas partículas de alginato-quitosana, que mantiveram a concentração de  $9,25 \pm 0,36$  log UFC.g<sup>-1</sup>.

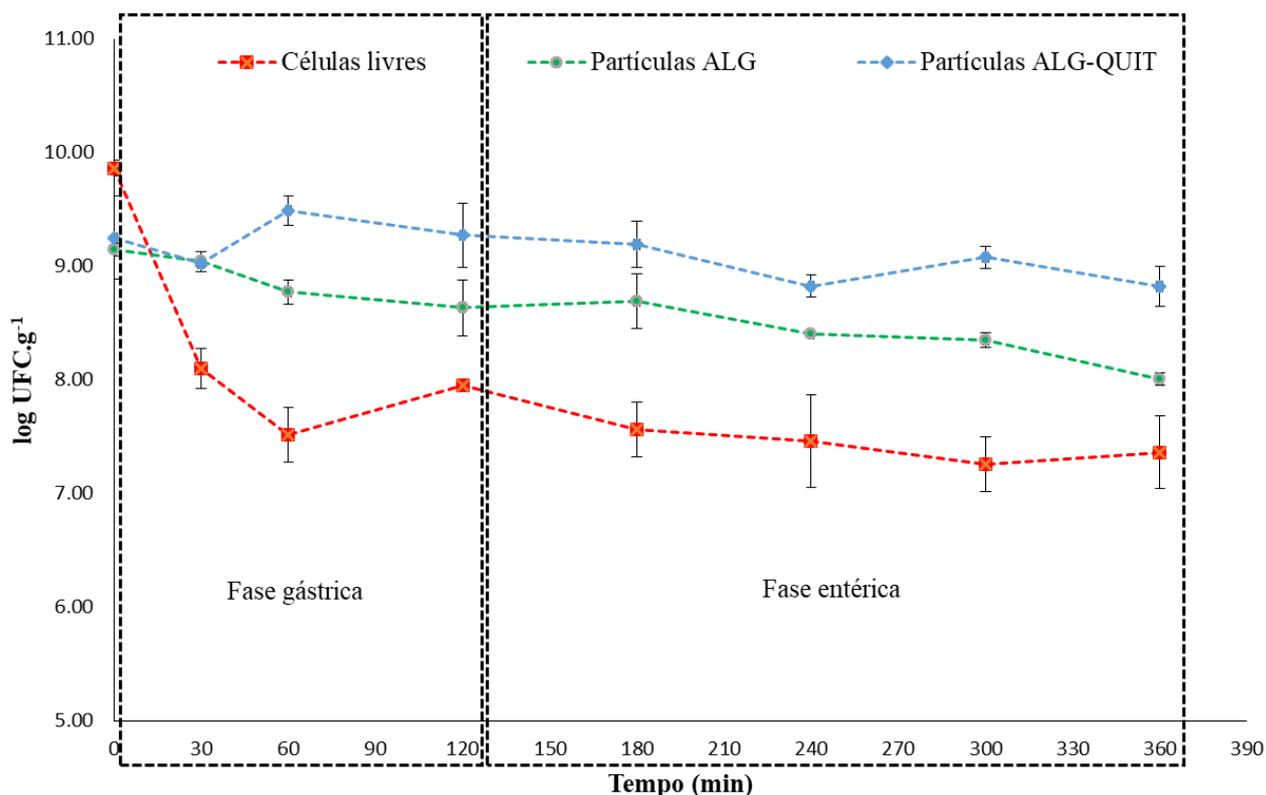
A utilização somente de alginato para a formação das partículas não foi o suficiente para manter a concentração do micro-organismo. Embora apresente ótimas propriedades de formação de gel e aprisionamento do probiótico, na presença de cátions como o sódio e magnésio, o gel perde a estabilidade, assim como na ação de agentes quelantes como o fosfato (LEONG et al., 2016). Além disso, existe sensibilidade a meios mais ácidos, que poderiam causar a liberação das células encapsuladas ainda na fase gástrica (BURGAIN et al., 2011).

O revestimento das partículas de alginato com quitosana mostrou aumentar a sobrevivência da *S. boulardii*, tanto quando comparada às células livres ou somente às encapsuladas pelo alginato. Segundo Ramos et al. (2018) a quitosana apresenta um comportamento catiônico e capacidade de resistir a meios ácidos. Thomas et al. (2014) associaram a resistência ao fluido gástrico, das microcápsulas obtidas pela técnica de microencapsulação em camadas, a presença de quitosana como material de parede.

Ao analisar a sobrevivência da levedura no fluido intestinal observa-se uma maior estabilidade da concentração de células, tanto livre quanto encapsuladas. As células livres apresentaram uma variação de  $7,95 \pm 0,05$  para  $7,36 \pm 0,32$  log UFC.g<sup>-1</sup>, as partículas de alginato de  $8,63 \pm 0,25$  para  $8,01 \pm 0,06$  log UFC.g<sup>-1</sup> e partículas de alginato-quitosana de  $9,27 \pm 0,36$  para  $8,82 \pm 0,18$  log UFC.g<sup>-1</sup>.

Song et al. (2014) relataram a deterioração do material de parede das partículas formadas de alginato ao final de 3 horas de simulação gastrointestinal. Sultana et al. (2000), apesar de não ser um estudo relacionado a levedura, encontrou o mesmo comportamento na microencapsulação de bactérias probióticas, utilizando alginato e amido como materiais de parede, quando expostos a sais de bile.

De forma geral, a técnica de encapsulação por gelificação iônica externa, com recobrimento da partícula com quitosana apresentou melhores resultados em relação a sobrevivência da *S. boulardii* nos fluidos gastrointestinais, a concentração inicial de  $9,25 \pm 0,36$  log UFC.g<sup>-1</sup> reduziu para  $8,82 \pm 0,18$  log UFC.g<sup>-1</sup>, ou 0,53 em termo de ciclo logaritmos.



**Figura 21:** Dados experimentais obtidos na simulação gastrointestinal *in vitro*. Os dados são apresentados como média±desvio padrão. ALG – Alginato e ALG-QUIT – Alginato-Quitosana.

#### 4.4 CONCLUSÃO

O estudo da secagem das partículas produzidas pela técnica de encapsulação, permitiu estabelecer a temperatura de 40 °C como a ideal para manter a sobrevivência das células da levedura no menor tempo possível, de acordo com a alta eficiência de secagem encontrada. Além disso, a utilização da gelificação iônica externa e posterior secagem por um método de baixo custo, torna-se promissora na encapsulação da cepa de *S. boulardii*, principalmente quando combinada com o recobrimento da partícula de alginato por quitosana, conferindo uma maior resistência a levedura quando armazenada em diferentes condições de temperatura, -18, 7 e 30 °C, assim como uma maior proteção quando exposta a simulação de fluidos gástricos e intestinais. O aumento da integridade da partícula alginato-quitosana deve-se ao fato da possível diminuição de poros na superfície do material de encapsulamento, e maior agregação do micro-organismo, como pode ser observado na microscopia eletrônica de varredura. A construção das isotermas de sorção permitiu identificar o perfil de estabilidade das partículas em relação a diferentes umidades relativas, contribuindo para a determinação de uma melhor forma de estocagem.

#### 4.5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKPINAR, E.; MIDILLI, A.; BICER, Y. Single layer drying behaviour of potato slices in a convective cyclone dryer and mathematical modeling. **Energy Conversion and Management**, v. 44, n. 10, p. 1689-1705, 2003. ISSN 0196-8904.

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

AL-MUHTASEB, A.; MCMINN, W.; MAGEE, T. Moisture sorption isotherm characteristics of food products: a review. **Food and Bioproducts Processing**, v. 80, n. 2, p. 118-128, 2002. ISSN 0960-3085.

ANSARI, F.; POURJAFAR, H.; JODAT, V.; SAHEBI, J.; ATAELI, A. Effect of Eudragit S100 nanoparticles and alginate chitosan encapsulation on the viability of *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **AMB Express**, v. 7, n. 1, p. 144, 2017. ISSN 2191-0855.

AOAC. Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists. **Official methods of analysis of the Association of Official Analytical Chemists.**, 1970.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160-169, 2017. ISSN 0023-6438.

BEGOT, C.; DESNIER, I.; DAUDIN, J. D.; LABADIE, J. C.; LEBERT, A. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. **Journal of Microbiological Methods**, v. 25, n. 3, p. 225-232, 1996. ISSN 0167-7012.

BHANDARI, B. R.; BANSAL, N.; ZHANG, M.; SCHUCK, P. **Handbook of Food Powders: Processes and Properties**. Elsevier, 2013. ISBN 0857098675.

BROOKER, D. B.; BAKKER-ARKEMA, F. W.; HALL, C. W. **Drying and Storage of Grains and Oilseeds**. Springer Science & Business Media, 1992. ISBN 0442205155.

BRUNAUER, S.; EMMETT, P. H.; TELLER, E. Adsorption of gases in multimolecular layers. **Journal of the American Chemical Society**, v. 60, n. 2, p. 309-319, 1938. ISSN 0002-7863.

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, n. 4, p. 467-483, 2011. ISSN 0260-8774.

CAI, Y.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried *Amaranthus Betacyanin* Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 7, p. 1248-1252, 2000. ISSN 1750-3841.

CARLESSO, V. D. O.; BERBERT, P. A.; SILVA, R. F. D.; DETMANN, E. Avaliação de modelos de secagem em camada fina de sementes de maracujá amarelo. **Revista Brasileira de Sementes**, 2007. ISSN 0101-3122.

CHAMPAGNE, C. P.; MONDOU, F.; RAYMOND, Y.; ROY, D. Effect of polymers and storage temperature on the stability of freeze-dried lactic acid bacteria. **Food Research International**, v. 29, n. 5-6, p. 555-562, 1996. ISSN 0963-9969.

DE FARIA, R. Q.; TEIXEIRA, I. R.; DEVILLA, I. A.; ASCHERI, D. P.; RESENDE, O. Cinética de secagem de sementes de crambe. **Revista Brasileira de Engenharia Agrícola e Ambiental**, v. 16, n. 5, p. 573-584, 2012. ISSN 1415-4366.

DE LA CRUZ-GAVIA, A.; PÉREZ-ALONSO, C.; BARRERA-DÍAZ, C. E.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; CARRILLO-NAVAS, H.; GUADARRAMA-LEZAMA, A. Y. Survival of *Saccharomyces cerevisiae* microencapsulated with complex coacervate after freezing process. **Food Hydrocolloids**, v. 82, p. 45-52, 2018. ISSN 0268-005X.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1685-1716, 2016.

ERATTE, D., DOWLING, K., BARROW, C. J., ADHIKARI, B. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 71, p. 121-131, 2018.

FAVARIN, L.; LAUREANO-MELO, R.; LUCHESE, R. H. Survival of free and microencapsulated Bifidobacterium: effect of honey addition. **Journal of Microencapsulation**, v. 32, n. 4, p. 329-335, 2015. ISSN 0265-2048.

FRATIANNI, F.; CARDINALE, F.; RUSSO, I.; IULIANO, C.; TREMONTE, P.; COPPOLA, R.; NAZZARO, F. Ability of synbiotic encapsulated *Saccharomyces cerevisiae* boulardii to grow in berry juice and to survive under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 3, p. 299-305, 2014. ISSN 0265-2048.

GALLO, M.; BEVILACQUA, A.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M.; CORBO, M. R. Alginate beads and apple pieces as carriers for *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, as representative of yeast functional starter cultures. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 49, n. 9, p. 2092-2100, 2014.

GAONKAR, A. G.; VASISHT, N.; KHARE, A. R.; SOBEL, R. **Microencapsulation in the Food Industry: a Practical Implementation Guide**. USA: Elsevier, 2014. ISBN 0124047351.

GARTI, N.; MCCLEMENTS, D. J. **Encapsulation Technologies and Delivery Systems for Food Ingredients and Nutraceuticals**. Cambridge: Elsevier, 2012. ISBN 0857095900.

GUIMARÃES, R. R.; VENDRAMINI, A. L. D. A.; SANTOS, A. C. D.; LEITE, S. G. F.; MIGUEL, M. A. L. Development of probiotic beads similar to fish eggs. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 2, p. 968-973, 2013. ISSN 1756-4646.

HALIM, M., MUSTAFA, N. A. M., OTHMAN, M., WASOH, H., KAPRI, M. R., & ARIFF, A. B. Effect of encapsulant and cryoprotectant on the viability of probiotic *Pediococcus acidilactici* ATCC 8042 during freeze-drying and exposure to high acidity, bile salts and heat. **LWT-Food Science and Technology**, v. 81, p. 210-216, 2017.

HÉBRARD, G.; HOFFART, V.; BEYSSAC, E.; CARDOT, J.-M.; ALRIC, M.; SUBIRADE, M. Coated whey protein/alginate microparticles as oral controlled delivery systems for probiotic yeast. **Journal of Microencapsulation**, v. 27, n. 4, p. 292-302, 2010. ISSN 0265-2048.

HOLKEM, A. T.; RADDATZ, G. C.; BARIN, J. S.; FLORES, É. M. M.; MULLER, E. I.; CODEVILLA, C. F.; JACOB-LOPES, E.; GROSSO, C. R. F.; DE MENEZES, C. R. Production of microcapsules containing Bifidobacterium BB-12 by emulsification/internal gelation. **LWT-Food Science and Technology**, v. 76, p. 216-221, 2017. ISSN 0023-6438.

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, n. 8, p. 737-743, 2004. ISSN 0958-6946.

LABUZA, T. P.; SCHMIDL, M. K. Accelerated shelf-life testing of foods. **Food Technology (USA)**, 1985. ISSN 0015-6639.

LEONG, J.-Y.; LAM, W.-H.; HO, K.-W.; VOO, W.-P.; LEE, M. F.-X.; LIM, H.-P.; LIM, S.-L.; TEY, B.-T.; PONCELET, D.; CHAN, E.-S. Advances in fabricating spherical alginate hydrogels with controlled particle designs by ionotropic gelation as encapsulation systems. **Particuology**, v. 24, p. 44-60, 2016. ISSN 1674-2001.

LEWICKI, P. P. The applicability of the GAB model to food water sorption isotherms. **International Journal of Food Science e Technology**, v. 32, n. 6, p. 553-557, 1997. ISSN 0950-5423.

LIM, G.-P.; AHMAD, M. S. Development of Ca-alginate-chitosan microcapsules for encapsulation and controlled release of imidacloprid to control dengue outbreaks. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 56, p. 382-393, 2017. ISSN 1226-086X.

MCFARLAND, L. V. Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients. **World Journal of Gastroenterology: WJG**, v. 16, n. 18, p. 2202, 2010.

MCFARLAND, L. V.; BERNASCONI, P. *Saccharomyces boulardii*!. A Review of an Innovative Biotherapeutic Agent. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 6, n. 4, p. 157-171, 1993.

MØRCH, Ý. A.; DONATI, I.; STRAND, B. L.; SKJÅK-BRÆK, G. Effect of Ca<sup>2+</sup>, Ba<sup>2+</sup>, and Sr<sup>2+</sup> on alginate microbeads. **Biomacromolecules**, v. 7, n. 5, p. 1471-1480, 2006. ISSN 1525-7797.

MORENO, JORGE ALBERTO S. ET AL. MORENO, J. A. S., MENDES, A. C., STEPHANSEN, K., ENGWER, C., GOYCOOLEA, F. M., BOISEN, A., CHRONAKIS, I. S. Development of electrosprayed mucoadhesive chitosan microparticles. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, p. 240-247, 2018.

PAGE, G. E. Factors Influencing the Maximum Rates of Air Drying Shelled Corn in Thin layers. 1949.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, n. 6, p. 505-515, 2004. ISSN 0958-6946.

RAMOS, P. E.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 58, n. 11, p. 1864-1877, 2018. ISSN 1040-8398.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369-381, 2013. ISSN 0260-8774.

ROSENBERG, M.; YOUNG, S. Whey proteins as microencapsulating agents. Microencapsulation of anhydrous milkfat-structure evaluation. **Food Structure**, v. 12, n. 1, p. 4, 1993.

SANTOS, M. G.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32-39, 2015. ISSN 0308-8146.

SHEU, T.; MARSHALL, R. Microentrapment of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 58, n. 3, p. 557-561, 1993. ISSN 1750-3841.

SKJÅK-BRÆK, G.; GRASDALEN, H.; SMIDSRØD, O. Inhomogeneous polysaccharide ionic gels. **Carbohydrate Polymers**, v. 10, n. 1, p. 31-54, 1989. ISSN 0144-8617.

SONG, H.; YU, W.; LIU, X.; MA, X. Improved probiotic viability in stress environments with post-culture of alginate-chitosan microencapsulated low density cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 108, p. 10-16, 2014. ISSN 0144-8617.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, 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, n. 1, p. 47-55, 2000. ISSN 0168-1605.

SUVARNA, S.; DSOUZA, J.; RAGAVAN, M. L.; DAS, N. Potential probiotic characterization and effect of encapsulation of probiotic yeast strains on survival in simulated gastrointestinal tract condition. **Food Science and Biotechnology**, v. 27, n. 3, p. 745-753, 2018. ISSN 1226-7708.

THOMAS, M. B.; VAIDYANATHAN, M.; RADHAKRISHNAN, K.; RAICHUR, A. M. Enhanced viability of probiotic *Saccharomyces boulardii* encapsulated by layer-by-layer approach in pH responsive chitosan-dextran sulfate polyelectrolytes. **Journal of Food Engineering**, v. 136, p. 1-8, 2014. ISSN 0260-8774.

VAZIRI, A. S.; ALEMZADEH, I.; VOSSOUGH, M. Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. **LWT**, v. 97, p. 440-447, 2018. ISSN 0023-6438.

VERRUCK, S.; SANTANA, F.; DE OLIVERA MÜLLER, C.; PRUDENCIO, E. S. Thermal and water sorption properties of Bifidobacterium BB-12 microcapsules obtained from goat's milk and prebiotics. **LWT**, v. 98, p. 314-321, 2018. ISSN 0023-6438.

YAO, M., WU, J., LI, B., XIAO, H., MCCLEMENTS, D. J., & LI, L. Microencapsulation of Lactobacillus salivarius Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 228-236, 2017.

## CONCLUSÃO GERAL

De forma geral, o desenvolvimento de partículas carreadoras de leveduras a partir da utilização de técnicas de microencapsulação, por gelificação iônica externa e interna, propicia o aumento da viabilidade deste micro-organismo.

Os dados deste trabalho revelam ainda que:

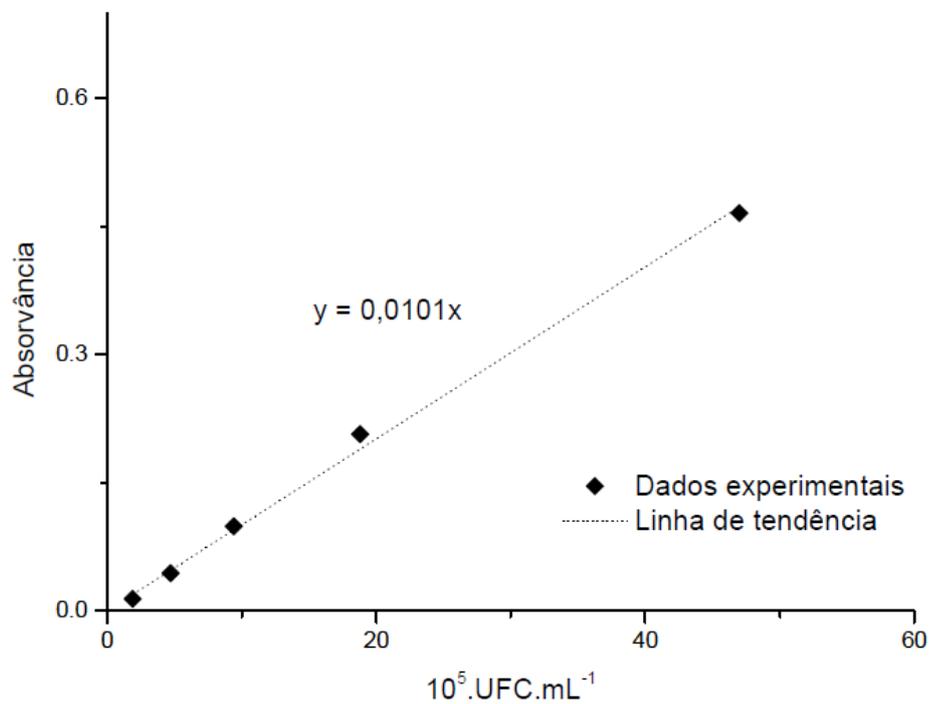
- A gelificação iônica interna possui a desvantagem em apresentar resíduo oleoso nas partículas, podendo prejudicar a sua utilização em matrizes alimentares;
- Não houve uma diferença significativa ( $p < 0,05$ ) na sobrevivência da *S. cerevisiae* entre as técnicas de encapsulação, gelificação iônica externa e interna;
- Foi encontrada uma maior concentração de *S. cerevisiae* nas partículas formadas pela gelificação iônica externa após o processo de secagem a 30 °C;
- Em relação à umidade, atividade de água e higroscopicidade, as partículas (*S. cerevisiae*) secas produzidas pela gelificação iônica externa apresentaram valores superiores às formadas pela gelificação iônica interna;
- O estudo de secagem das partículas obtidas a partir da gelificação iônica externa, permitiu estabelecer a temperatura de 40 °C como ideal para manter a sobrevivência das células de *S. boulardii* e reduzir o tempo de processo;
- Na análise das imagens obtidas a partir da MEV foi possível identificar leveduras aderidas a superfície das partículas somente de alginato;
- A partir dos espectros obtidos pela análise por FTIR observa-se qualitativamente uma interação entre o alginato e a quitosana, utilizada no recobrimento das partículas provenientes da gelificação iônica externa;
- Os dados experimentais de isotermas de sorção se correlacionaram de forma mais efetiva do modelo proposto por GAB;
- O recobrimento com quitosana das partículas de *S. boulardii* propiciaram uma maior resistência na estocagem nas temperaturas de 30, 7 e -18 °C;
- Após a análise de resistência ao trato gastrointestinal, foi possível identificar uma maior proteção das partículas recobertas com quitosana em relação as somente com alginato com material de parede, além disso, ambas obtiveram uma maior viabilidade em relação ao micro-organismo livre.

Para trabalhos futuros, sugere-se estudar a aplicação das partículas de *S. boulardii* formadas com alginato e recobertas com quitosana em diferentes matrizes alimentares.

## APÊNDICE A - Curva de concentração microbiana *S. cerevisiae*

A curva de concentração microbiana apresentada na Figura 22 estabelece uma relação entre a quantidade de leveduras e a absorvância medida no espectrofotômetro. Esta foi construída a partir de diluições seriadas e plaqueamentos.

A partir dos dados experimentais torna-se possível o ajuste a equações lineares, que fornecem uma equação para estimativa da concentração de micro-organismos no inoculo a ser utilizado nos processos de microencapsulação. Ao realizar o ajuste dos dados encontrou-se um valor de  $R^2$  de 0,99807, sendo, portanto, satisfatório a correlação entre os valores experimentais e a equação.

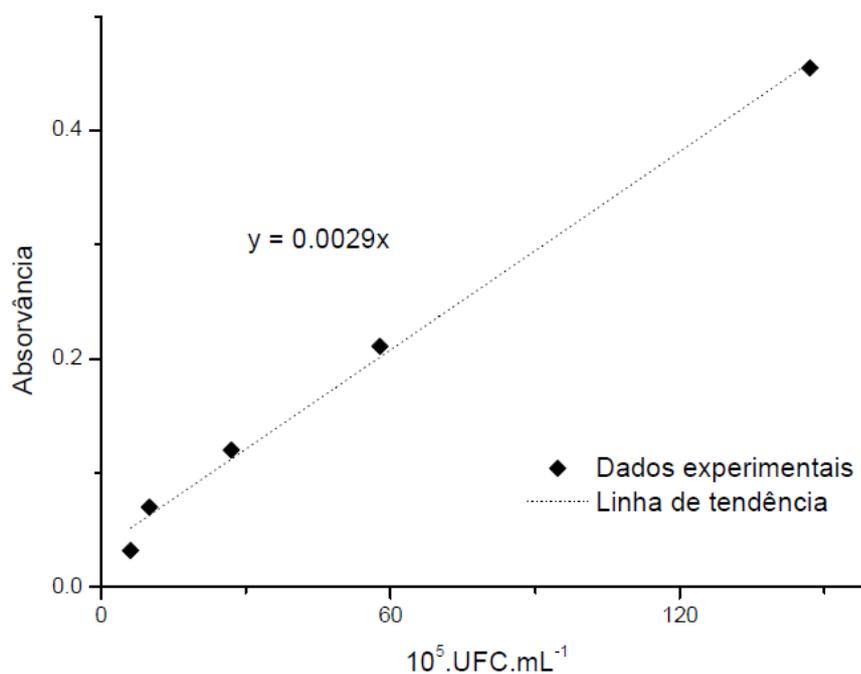


**Figura 22:** Curva de concentração microbiana para a cepa *S. cerevisiae*.

## APÊNDICE B - Curva de concentração microbiana para a cepa *S. boulardii*.

A curva de concentração microbiana apresentada na Figura 23 estabelece uma relação entre a quantidade de levedura e a absorvância medida no espectrofotômetro. Esta foi construída a partir de diluições seriadas e plaqueamentos.

A partir dos dados experimentais torna-se possível o ajuste a equações lineares, que fornecem uma equação para estimativa da concentração de micro-organismos no inoculo a ser utilizado nos processos de microencapsulação. Ao realizar o ajuste dos dados encontrou-se um valor de  $R^2$  de 0,9946, sendo, portanto, satisfatório a correlação entre os valores experimentais e a equação.



**Figura 23:** Curva de concentração microbiana para a cepa *S. boulardii*.