

UFRRJ
INSTITUTO DE TECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS E
TECNOLOGIA DE ALIMENTOS

DISSERTAÇÃO

MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium* spp PELA TÉCNICA DA
EMULSÃO EM ALGINATO DE SÓDIO: EFEITO DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE MEL.

Luciana Favarin

Sob orientação da Professora

Rosa Helena Luchese

Julho, 2014



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

**MICROENCAPSULAÇÃO DE *Bifidobacterium* spp PELA TÉCNICA DA
EMULSÃO EM ALGINATO DE SÓDIO: EFEITO DE DIFERENTES
CONCENTRAÇÕES DE MEL.**

LUCIANA FAVARIN

Sob a orientação da Professora

Rosa Helena Luchese

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre**, no curso de Pós-graduação em Ciências e Tecnologia de Alimentos apresentado à Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro.

Seropédica, RJ

Julho de 2014

664
F272m
T

Favarin, Luciana, 1975-
Microencapsulação de
Bifidobacterium spp pela técnica da
emulsão em alginato de sódio: efeito
de diferentes concentrações de mel /
Luciana Favarin. - 2014.
xii,57 f.: il.

Orientador: Rosa Helena Luchese.
Dissertação (mestrado) -
Universidade Federal Rural do Rio de
Janeiro, Curso de Pós-Graduação em
Ciência e Tecnologia de Alimentos,
2014.

Bibliografia: f. 42-57.

1. Tecnologia de alimentos -
Teses. 2. Probióticos - Teses. 3.
Microencapsulação - Teses. 4. Mel -
Teses. 5. Bifidobacterium - Teses.
6. Emulsões - Teses. I. Luchese,
Rosa Helena, 1957-. II. Universidade
Federal Rural do Rio de Janeiro.
Curso de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III.
Título.

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

LUCIANA FAVARIN

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

APROVADA EM 29/07/2014

Rosa Helena Luchese (Ph.D.) UFRRJ
(Orientadora)

José Francisco Pereira Martins (Ph.D.) UFRRJ
(Membro interno)

Janine Passos Lima da Silva (D.Sc.) EMBRAPA/CTAA
(Membro externo)

AGRADECIMENTOS

Aos colegas do laboratório de microbiologia de alimentos do DTA: **Rômulo, Dina, André, Cristiane, Edilene, Daniel, Valéria, Ivan** pelos inúmeros socorros e pela amizade. Em especial, a **Roberto Laureano**, pelo auxílio, incentivo e principalmente pela amizade: “sem você, não seria possível e não teria conseguido”;

À **Prof^a. Rosa Helena Luchese**, pela orientação, educação, paciência e ajuda sem os quais este trabalho não seria possível;

À Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro e aos professores do Departamento de Tecnologia de Alimentos pelos ensinamentos;

Ao Professor e pesquisador **Carlos Wanderlei Piler**, EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS - RJ, pela colaboração, apoio e contribuição por parte do desenvolvimento deste trabalho em minha formação profissional;

Ao técnico **Neuri dos Santos Menezes**, EMBRAPA AGROINDÚSTRIA DE ALIMENTOS-RJ, pela contribuição por parte deste trabalho;

Ao **Prof. José Francisco Pereira Martins**, por contribuir no desenvolvimento de ideias;

Aos membros titulares e suplentes da banca examinadora;

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho;

Aos amigos pelo apoio, companheirismo e paciência: Fernanda Justo, Andréia Mouro, Viviane Ribeiro, Claudia Mascarenhas Serra; Cristina e Lino;

À amiga Gislene Bremmer por me incentivar e por ter me ensinado tantas coisas do laboratório;

Aos meus tios, Martha Moreira da Fonseca e Mauro por sempre acreditarem em mim;

Aos meus irmãos Alexandre Favarin, Mônica Favarin, sobrinha Raphaela Favarin, madrastra e amiga Marlete e principalmente ao meu pai, Valdir Favarin, pelo incentivo, carinho, força, compreensão e paciência nos momentos difíceis e esforços realizados para a minha vida profissional;

Em especial à minha mãe, Norma Moreira da Fonseca Favarin (em memória), que mesmo não estando entre nós, tenho certeza que emitiu força e torceu esse tempo todo por mim;

A **CAPES**, pela bolsa concedida.

Muito obrigada.

“Há um tempo em que é preciso abandonar as roupas usadas – que já tem a forma do nosso corpo – e esquecer os nossos caminhos que nos levam sempre aos mesmos lugares... É o tempo da travessia e, se não ousarmos fazê-la, teremos ficado para sempre à margem de nós mesmos.”

Fernando Pessoa

RESUMO

FAVARIN, Luciana. **Microencapsulação de *Bifidobacterium* spp pela Técnica da Emulsão em Alginato de Sódio: Efeito de Diferentes Concentrações de Mel**. 2014. 57p. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Probióticos são microrganismos vivos, que quando consumidos em quantidades adequadas promovem benefícios à saúde do trato gastrointestinal de humanos e animais. Vários microrganismos são reconhecidos como probióticos, entre eles bactérias ácido-láticas e leveduras, sendo os gêneros *Bifidobacterium* spp e *Lactobacillus* spp os mais estudados e empregados por possuírem propriedades nutritivas e terapêuticas, podendo ser incorporados a leites fermentados e combinados ou não com prebióticos, como oligossacarídeos e FOS. Um fator importante para o uso destes probióticos é a perda da viabilidade e a atividade dos mesmos no local de ação, devido a alguns fatores como as barreiras naturais do trato gastrointestinal, a sobrevivência à acidez da bile, baixo pH, a alta temperatura do processamento do leite, intolerância ao O₂ e ao peróxido de H⁺, que reduzem o número de células viáveis e o número recomendável para que o produto possa exercer os benefícios esperados. Estudos têm sido feitos para que o uso de metodologias como a microencapsulação destes probióticos, utilizando um transportador para melhorar a sobrevivência destes microrganismos tanto em produtos, quanto em cápsulas ou em pó, aumentando a proteção destes microrganismos das condições adversas durante o processamento e na transição pelo TGI. As técnicas mais utilizadas para promover o processo de microencapsulação são extrusão, emulsão e spray drying. Este trabalho teve como objetivo geral promover o aumento da viabilidade de células probióticas de *Bifidobacterium* J7 e *Bifidobacterium* Bb-12 através da encapsulação em alginato de sódio 3%, com e sem adição de diferentes concentrações de mel, utilizando a técnica de emulsão para a formação das microcápsulas. Neste estudo podemos observar que houve um aumento da viabilidade das células das duas cepas estudadas, tanto na encapsulação apenas com alginato quanto com a adição do mel como prebiótico, obtendo-se células viáveis entre 10⁶ e 10⁷ ufc/mL. Em contra partida, em células livres sem adição de mel, a viabilidade foi menor em comparação as células encapsuladas, mostrando uma menor resistência das cepas de *Bifidobacterium* J7 em comparação as cepas de *Bifidobacterium* Bb-12. Mas ao adicionar mel na emulsão, podemos notar um efeito protetivo do mesmo, tanto nas células livres quanto nas células encapsuladas, mantendo-se estável a concentração de células viáveis do início ao final do processo de simulação do TGI nas duas cepas estudadas. A análise morfológica das micropartículas liofilizadas mostrou uma superfície enrugada e irregular em todos os tratamentos estudados, devido às células encapsuladas dentro das partículas e à perda de teor de água durante o processo de liofilização. Assim como não houve diferenças em relação às microcápsulas com ou sem adição de diferentes concentrações de mel no seu revestimento.

Palavras-chave: Probióticos, encapsulação por emulsão, adição de mel

ABSTRACT

FAVARIN, Luciana. **Microencapsulation of *Bifidobacterium* spp by Emulsion Technique in Sodium Alginate: Effect of Different Concentrations of Honey**. 2014. 57p. Dissertação (Mestrado em ciência e Tecnologia de Alimentos). Instituto de Tecnologia, Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2014.

Probiotics are live microorganisms, which when consumed in adequate amounts beneficially affect the health of the gastrointestinal tract of humans and animals. Several microorganisms are recognized as probiotics, including lactic acid bacteria and yeasts, and genres *Bifidobacterium* spp and *Lactobacillus* spp the most studied and employees by having nutritional and therapeutic properties and can be incorporated into fermented milks or not combined with prebiotics such as oligosaccharides and FOS. An important use of these probiotics factor is the loss of viability and activity of the same site of action, due to factors such as the natural barriers of the gastrointestinal tract, the survival of bile acidity, low pH, high temperature processing milk intolerance O₂ and H⁺ peroxide, which reduces the number of viable cells and the recommended number for the product to perform the expected benefits. Studies have been made for the use of microencapsulation methods such as probiotics, using a carrier to improve survival of these organisms in both products, as in capsule or powder, increasing the protection of these microorganisms adverse conditions during processing and during the transition by TGI. The technique used to promote the microencapsulation process is extrusion, emulsion and spray drying. This work had as general objective to promote increased viability of probiotic cells *Bifidobacterium* J7 and *Bifidobacterium* Bb -12 by encapsulation in sodium alginate 3%, with and without addition of different concentrations of honey, using the technique of emulsion formation the microcapsules. In this study we observed that there was an increase in the viability of the cells of the two strains studied, both in encapsulation with alginate alone and with the addition of honey as prebiotic obtaining viable cells between 10⁶ and 10⁷ UFC / mL. By contrast, in free cells not containing added honey, viability was lower compared encapsulated cells, showing a lower resistance of strains *Bifidobacterium* J7 compared strains of *Bifidobacterium* Bb -12. But when you add in the honey emulsion, we can notice a protective effect of the same, both in free cells and encapsulated cells, keeping stable the concentration of viable cells from the beginning to the end of the simulation GIT process in both strains studied. Morphological analysis of the lyophilized microparticles showed a wrinkled and uneven surface in all treatments due to encapsulated cells within the particles and loss of water content during the lyophilization process. As there were no differences in relation to the microcapsules with or without addition of different concentrations of honey in his jacket.

Key-words: Probiotic, emulsion encapsulating, honey addition

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Estrutura química do Alginato de sódio.....	22
Figura 2: Jarra de anaerobiose	24
Figura 3: Esquema experimental do processo para formação das microcápsulas de Alginato de sódio 3% através do processo de emulsão o/a.....	26
Figura 4: Plaqueamento de diluições seriadas de células livres e encapsuladas para posterior contagem das colônias para verificação da eficiência da encapsulação	27
Figura 5: Agitação das células livres e encapsuladas em SGA sob leve agitação no saker....	28
Figura 6: Micropipetas (100 e 1.000µm)	29
Figura 7: Esquema experimental da simulação das condições gástrica e intestinal nos diferentes pHs e tempos de permanência das células <i>Bifidobacterium J7</i> e <i>Bifidobacterium Bb12</i> livres e encapsuladas nas condições controle (sem adição de mel) e com adição de diferentes concentrações de mel.....	29
Figura 8: Células de <i>Bifidobacterium J7</i> e <i>Bifidobacterium Bb12</i> livres em suspensão e encapsuladas liofilizadas	30
Figura 9: Avaliação do efeito do tratamento com mel em diferentes concentrações na viabilidade de <i>Bifidobacterium J7</i> e <i>Bifidobacterium Bb12</i> após exposição às condições gastrointestinais simuladas - ⁺⁺⁺⁺ , representa p<0,0001 quando comparados à condição controle, sem mel.....	32

Figura 10: Viabilidade das células livres e encapsuladas de *Bifidobacterium* J7 e *Bifidobacterium* Bb12 submetidas à exposição de SGA por 300 minutos e aos tratamentos controle (sem mel) e com 15% e 50% de mel - ⁺, representa $p < 0,05$, ⁺⁺, representa $p < 0,01$, comparando células livres e encapsuladas36

Figura 11: Micrografias das cápsulas de Alginato de sódio 3% contendo *Bifidobacterium* J7 sem adição de mel no revestimento – condição controle (Figuras A, B), com adição de 2,5% de mel (Figuras C, D) e com adição de 8,3% de mel (Figuras E, F) no revestimento pela técnica da emulsificação.....39

Figura 12: Micrografias das cápsulas de Alginato de sódio 3% contendo *Bifidobacterium* Bb12 sem adição de mel no revestimento – condição controle (Figuras A, B), com adição de 2,5% de mel (Figuras C, D) e com adição de 8,3% de mel (Figuras E, F) no revestimento pela técnica da emulsificação.....40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Valores médios das contagens do número de células livres e encapsuladas em alginato de sódio 3% com diferentes concentrações de mel das cepas de <i>Bifidobacterium</i> J7 e de <i>Bifidobacterium</i> Bb12	34
--	----

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
1.1 JUSTIFICATIVA	2
1.2 RESULTADOS ESPERADOS	2
2 OBJETIVOS	3
2.1 OBJETIVO GERAL	3
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	3
3 REVISÃO DE LITERATURA	4
3.1 PROBIÓTICOS	4
3.1.1 Definição	4
3.1.2 Pré-requisitos de Microrganismo Probiótico	5
3.1.3 Microrganismos Probióticos	5
3.1.3.1 <i>Bifidobacterium</i>	5
3.1.3.2 <i>Lactobacillus</i>	6
3.1.4 Efeitos Fisiológicos	6
3.1.5 Alimentos Funcionais	7
3.2 LEGISLAÇÃO	7
3.2.1 Alegação	7
3.2.2 Requisitos Específicos	8
3.3 PREBIÓTICOS	9
3.3.1 Mel	10
3.4 MICROENCAPSULAÇÃO	11
3.5 MATERIAIS ENCAPSULANTES	14
3.6 MÉTODOS DE MICROENCAPSULAÇÃO	15
3.6.1 Técnica da Extrusão	16
3.6.2 Técnica da Emulsão	16
3.6.3 Fase Contínua	17
3.6.4 Leito Fluidizado	17
3.6.5 Coacervação	18
3.6.6 Liofilização	19
3.6.7 Spray Dryer	19
3.6.8 Gelificação Iônica	20
3.7 ENCAPSULAÇÃO EM HIDROCOLÓIDES	20
3.7.1 Alginato de Sódio	21
3.8 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	22

4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 BACTÉRIAS PROBIÓTICAS	24
4.2 PREPARO DAS SOLUÇÕES DE MEL	25
4.3 MICROENCAPSULAÇÃO PELA TÉCNICA DE EMULSÃO EM ALGINATO DE SÓDIO	25
4.3.1 Microencapsulação em alginato de sódio usando Tween 80 como emulsificante – condição controle	25
4.3.2 Microencapsulação em alginato de sódio usando Tween 80 como emulsificante e 8,3% ou 2,5% de mel no revestimento	25
4.3.3 Esquema experimental de emulsão o/a	26
4.4 ENUMERAÇÃO DAS BACTÉRIAS MICROENCAPSULADAS	26
4.5 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO.....	27
4.6 RESISTÊNCIA ÀS CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS.....	27
4.6.1 Sobrevivência das células livres e encapsuladas frente às condições gástricas.....	27
4.6.2 Sobrevivência das células livres e encapsuladas frente às condições do intestino....	28
4.6.3 Esquema experimental da simulação das condições gastrointestinais	29
4.7 LIOFILIZAÇÃO	30
4.8 CARACTERIZAÇÃO DAS MICROPARTÍCULAS	30
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA	30
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	31
5.1 VIABILIDADE DAS CÉLULAS LIVRES DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEL SUBMETIDAS À EXPOSIÇÃO DE SGA POR 300 MINUTOS.....	31
5.2 EFICIÊNCIA DA ENCAPSULAÇÃO COM ALGINATO DE SÓDIO 3% E COM ADIÇÃO DE DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEL	33
5.3 VIABILIDADE DAS CÉLULAS MICROENCAPSULADAS DE <i>BIFIDOBACTERIUM</i> DE ORIGEM HUMANA E ANIMAL COM DIFERENTES CONCENTRAÇÕES DE MEL SUBMETIDAS À EXPOSIÇÃO DE SGA POR 300 MINUTOS	34
5.3.1 Controles, sem mel	34
5.3.2 Com 15 e 50% de mel no revestimento	35

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA	38
5.4.1 <i>Bifidobacterium</i> J7.....	39
5.4.2 <i>Bifidobacterium</i> Bb12.....	40
6 CONCLUSÕES	41
7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	42

1 INTRODUÇÃO

O mercado de produtos dito saudáveis vem aumentando a cada ano, onde novos ingredientes e novos produtos estão sendo desenvolvidos pelas indústrias com a intenção de reduzir problemas de saúde e proporcionar uma vida mais saudável. Visto que os consumidores procuram uma alimentação adequada, buscando uma vida saudável e está adquirindo conhecimentos referentes às ciências da nutrição, visando alimentos que associem saúde ao bem estar.

Os alimentos funcionais microbianos são aqueles ricos em bactérias ditas probióticas, que são microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro, promovendo o balanço na microbiota intestinal e outras funções do organismo, quando administrados em quantidades adequadas, sendo indicados para prevenir e tratar doenças, tais como diarreia, câncer e doenças cardiovasculares.

O termo probiótico significa "para a vida" e é utilizado para designar a presença de bactérias associadas a efeitos benéficos em alimentos para o organismo humano.

Vários microrganismos são reconhecidos como probióticos, entre eles bactérias ácido-lácticas e leveduras. Os gêneros de bactérias mais empregados por exercerem essas funções no organismo são *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*.

O consumo de culturas probióticas, em quantidades adequadas, afeta positivamente a composição da microbiota intestinal, beneficiando o hospedeiro, tanto, pela exclusão e antagonismo a patógenos; como através de estímulo na atividade de imunoestimulação e imunodifusão; efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos; alívio dos sintomas da intolerância à lactose, devido ao aumento de uma enzima que facilita a digestão da mesma.

Os probióticos podem ser componentes de: 1) Alimentos industrializados presentes no mercado, como leites fermentados e iogurtes; 2) Alimentos fermentados de forma caseira como as coalhadas e o kefir; 3) Podem ser encontrados na forma de pó ou cápsulas, como suplemento alimentar.

A legislação brasileira tem como requisito específico a quantidade mínima viável para os probióticos na faixa de 10^8 - 10^9 UFC na recomendação diária do produto, em uma porção de 100 gramas e estes microrganismos deverão permanecer viáveis e em número elevado acima desta concentração durante o processamento, armazenamento do alimento e resistir a passagem pelo trato gastrointestinal para que os efeitos benéficos sejam obtidos sendo que, para quantidades menores a aceitação depende da comprovação da eficiência do fabricante.

Deve-se levar em consideração a viabilidade e a atividade dos probióticos no local de ação, devendo estes, ter resistência no hospedeiro às barreiras naturais do trato gastrointestinal (TGI), como a sobrevivência à alta acidez da bile encontrada no TGI e a alta temperatura de processamento do leite.

No entanto, a estabilização de probióticos utilizando um transportador, como a microencapsulação, pode melhorar a sobrevivência destes microrganismos em produtos, tanto durante o processamento quanto na transição pelo TGI.

O principal objetivo da encapsulação é proteger o material do núcleo de condições adversas, tais como os efeitos indesejáveis da luz, umidade e oxigênio, contribuindo assim para um aumento da sobrevivência dos microrganismos tanto no produto quanto pela passagem pelas condições adversas pelo trato gastrointestinal, podendo também promover uma liberação controlada do núcleo no organismo e proteger o material do núcleo de agentes externos, retardando alterações que possam resultar em sua perda

Para que as técnicas de microencapsulação tenham um efeito positivo, temos que levar em consideração alguns fatores, como, o tipo de núcleo, a escolha do agente encapsulante ou material de parede, tecnologia de encapsulação adotada, o alimento onde essa microcápsula será aplicada, as propriedades físicas e químicas do núcleo (porosidade e solubilidade) e da parede (viscosidade, propriedades mecânicas, transição vítrea e capacidade de formação de filme), compatibilidade do núcleo com a parede, e fatores econômicos.

A encapsulação de microrganismos probióticos com alginato de sódio tem sido utilizada para aumentar a sobrevivência das bactérias no alimento e durante a passagem pelo trato gastrointestinal (TGI). Por outro lado os procedimentos de microencapsulação não devem causar alterações nas características sensoriais do produto.

1.1 JUSTIFICATIVA

A encapsulação de microrganismos probióticos é utilizada para aumentar a sobrevivência das bactérias no produto alimentício, melhorando a sua estabilidade no armazenamento e durante a passagem pelo TGI, servindo como uma proteção, mantendo uma maior viabilidade e atividade dos probióticos no local de ação, tendo uma grande importância em relação à saúde e bem estar do consumidor, que buscam uma alimentação mais adequada e saudável, propiciando efeitos benéficos.

Inicialmente foi testada a técnica da emulsão com alginato de sódio 3% e a adição de mel em diferentes concentrações, tendo em vista a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção de partículas e pela não utilização de temperaturas elevadas, como no caso do spray-dryer, o que poderia causar injúria às células microbianas.

1.2 RESULTADOS ESPERADOS

Foi esperado a manutenção da viabilidade de bactérias probióticas, assim como um efeito protetivo da encapsulação sem e com a adição de mel em diferentes concentrações, das bactérias frente às condições do TGI, como pH, temperatura e concentrações de sais biliares em comparação a resposta obtida com estes microrganismos na sua forma livre.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Aprimorar técnica de encapsulação em hidrocolóides com adição de diferentes concentrações de mel na sobrevida de bifidobactérias probióticas em condições simuladas do trato gastrointestinal.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a concentração de alginato de sódio 3% sobre a sobrevivência dos microrganismos;
- Comparar a sobrevivência de linhagens probióticas de bifidobactérias encapsuladas ou não, sem e com a adição de diferentes concentrações de mel (8,3% e 2,5% de mel na suspensão do polímero de alginato contendo bifidobactérias);
- Comparar a sobrevivência de linhagens probióticas de bifidobactérias encapsuladas ou não frente às condições de baixo pH e concentrações de bile e enzimas simuladas do trato gastrointestinal humano;
- Avaliar as propriedades físicas das microcápsulas (tamanho, morfologia), que afetam a estabilidade do recheio.

3 REVISÃO DE LITERATURA

3.1 PROBIÓTICOS

3.1.1 Definição

Os probióticos são suplementos alimentares à base de microrganismos vivos, que afetam benéficamente o animal hospedeiro. Promovendo, melhora na fisiologia do hospedeiro pela regulação da imunidade local e sistêmica e pela melhora do balanço nutricional e microbiano no trato intestinal (FULLER, 1989). Os probióticos são microrganismos vivos que conferem benefícios à saúde do hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS, WORLD HEALTH ORGANIZATION – FAO/WHO, 2001).

Um microrganismo é considerado probiótico se for habitante natural do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e manter a viabilidade e atividade no intestino (SAAD, 2006; COOK et al., 2012). A influência benéfica dos probióticos sobre a microbiota intestinal humana inclui fatores como efeitos antagônicos, competição e efeitos imunológicos, resultando em um aumento da resistência contra microrganismos patogênicos. Assim, a utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento da proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (COOK et al., 2012). Essas culturas estão localizadas em diferentes regiões do trato intestinal, presentes em grupos específicos de microrganismos, como bactérias lácticas e bífidas, que modulam a microbiota nesses espaços, principalmente devido aos seus produtos de metabolismo (MENEZES e DURRANT, 2008; FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Essa microbiota desejável protege o hospedeiro, dificultando o crescimento de microrganismos patogênicos. Além disso, pode auxiliar na manutenção de sua saúde, impedindo a reabsorção de compostos indesejáveis, decompondo ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio, ferro e outros nutrientes, diminuindo a incidência de doenças coronárias e ajudando a digestão. Cabe destacar, ainda, que essa microbiota estimula o sistema imunológico e atividades antitumorogênica e antimutagênica (BUJALANCE et al., 2007; COOK et al., 2012), além de favorecer o metabolismo de algumas substâncias, como a lactose, em indivíduos lactase não persistentes por meio de suas enzimas (OUWEHAND e SALMINEN, 1998).

A maioria dos probióticos e os mais estudados pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (O'FLAHERTY E KLAENHAMMER, 2010; ROSS et al., 2005). Os lactobacilos são, há muito tempo, associados à produção de produtos de alimentos fermentados, especialmente de produtos lácteos, mas a adição de bifidobactérias a alimentos é mais recente. Esses microrganismos são geralmente resistentes à bile e a ácidos porque muitas das espécies são encontradas no trato gastrointestinal (TGI) como parte da microbiota normal (O'FLAHERTY e KLAENHAMMER, 2010).

Para que os efeitos sejam verificados, um número suficiente de microrganismos viáveis deve estar presente durante toda a vida de prateleira do produto, além de possuírem a capacidade de colonizar transitoriamente o trato gastrointestinal, possuindo resistência à acidez gástrica e à toxicidade da bile (SÁNCHEZ et al., 2009).

A legislação brasileira tem como requisito específico a quantidade mínima viável para os probióticos na faixa de 10^8 - 10^9 UFC na recomendação diária do produto, em uma porção

de 100 gramas, sendo que, para quantidades menores a aceitação depende da comprovação da eficiência do fabricante (BRASIL, 2008).

3.1.2 Pré-requisitos de microrganismo probiótico

Para que sejam considerados probióticos, as bactérias devem atender a alguns requisitos como: possuir identificação taxonômica; ser de origem humana; ter capacidade de sobreviver, proliferar e estimular a atividade metabólica no trato gastrointestinal; possuir características de aderência e colonização; apresentar viabilidade populacional elevada apresentando em torno de $10^6 - 10^8$ células por 100 gramas ou mL de produto; produzir substâncias antimicrobianas, incluindo bacteriocinas, peróxidos de hidrogênio e ácidos orgânicos; exercer atividade antagonista a patógenos; apresentar propriedade imunoestimulatória; ser adequada ao processo de produção (crescimento, recuperação e concentração adequada, sobrevivência ao congelamento, desidratação, estocagem e distribuição); fornecer qualidades sensoriais desejáveis; não ser patogênica; tolerar sais e ácidos biliares; permanecer viável após o processamento e apresentar evidência de que sejam benéficas à saúde (SHORTT, 1999).

A utilização de culturas bacterianas probióticas estimula a multiplicação de bactérias benéficas, em detrimento da proliferação de bactérias potencialmente prejudiciais, reforçando os mecanismos naturais de defesa do hospedeiro (COOK et al., 2012). Essas culturas estão localizadas em diferentes regiões do trato intestinal, presentes em grupos específicos de microrganismos, como bactérias lácticas e bífidas, que modulam a microbiota nesses espaços, principalmente devido aos seus produtos de metabolismo (MENEZES e DURRANT, 2008; FRITZEN-FREIRE et al., 2013). Essa microbiota desejável protege o hospedeiro, dificultando o crescimento de microrganismos patogênicos. Além disso, pode auxiliar na manutenção de sua saúde, impedindo a reabsorção de compostos aminados indesejáveis, decompondo ácidos biliares, biodisponibilizando minerais como cálcio, ferro e outros nutrientes, diminuindo a incidência de doenças coronárias e ajudando a digestão. Cabe destacar, ainda, que essa microbiota estimula o sistema imunológico e atividades antitumorogênica e antimutagênica (BUJALANCE et al., 2007; COOK et al., 2012), além de favorecer o metabolismo de algumas substâncias, como a lactose, em indivíduos lactase não persistentes por meio de suas enzimas (OUWEHAND e SALMINEN, 1998).

3.1.3 Microrganismos probióticos

Os gêneros de bactérias probióticas mais estudadas são: *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*.

3.1.3.1 *Bifidobacterium*

É um gênero de bactéria anaeróbica, mas o grau de tolerância ao oxigênio depende do meio de cultura e da espécie; Gram-positivos, imóveis, não esporulados e com morfologia celular variável (SUN, GRIFFITHS, 2000) e atua como um probiótico benéfico para a saúde humana. As bifidobactérias são uns dos maiores grupos de bactéria que compõe a microbiota intestinal; estas residem no cólon e promovem benefícios para a saúde de seus hospedeiros.

São bactérias que fazem parte da microbiota do trato gastrointestinal inferior do ser humano e não apresentam nenhuma patogenicidade. As bifidobactérias mais estudadas e

utilizadas como probióticos são das espécies *Bifidobacterium bifidum*, *B. breve*, *B. lactis* e *B. longum*.

O gênero *Bifidobacterium*, pertence ao grupo *Actinomycetaceae*, onde 24 espécies são agrupadas de acordo com sua origem ecológica, onde 15 são isoladas somente de animais e 9 colonizam as cavidades naturais do homem (SALMINEN e WRIGHT, 1993).

O efeito probiótico deste gênero ocorre somente se o microrganismo sobreviver ao trânsito através do estômago, mantendo um balanço favorável entre a população benéfica e os microrganismos potencialmente prejudiciais no trato gastrointestinal (SUN, GRIFFITHS, 2000). As bifidobactérias possuem função de defesa contra bactérias patogênicas (SALMINEN e WRIGHT, 1993); supressão da intolerância a lactose; efeito hipocolesterolêmico, que reduz o colesterol do plasma.

3.1.3.2 *Lactobacillus*

São bactérias anaeróbicas facultativas gram-positivas, que convertem lactose e outros açúcares simples em ácido láctico. A produção de ácido láctico faz com que o ambiente fique ácido, o que inibe o crescimento de outras bactérias nocivas; eles colonizam o intestino e reduzem a diarreia (KAILA *et al.*, 1992); recuperação infantil de gastroenterites causadas por rotavírus (SUGITA e TOGAWA, 1994); efeitos antitumores e antimetástase (MATSUZAKI, 1998); redução das infecções e o restabelecimento da micromicrobiota vaginal (REID *et al.*, 2000).

Dentre as espécies mais encontradas de bactérias probióticas, destacam-se:

- *Lactobacillus acidophilus*
- *Lactobacillus casei*
- *Lactobacillus rhamnosus*
- *Lactobacillus reuterii*
- *Enterococcus faecium*
- *Bifidobacterium adolescentis*
- *Bifidobacterium breve*
- *Bifidobacterium bifidum*
- *Bifidobacterium infantis*
- *Bifidobacterium longum*

3.1.4 Efeitos fisiológicos

Os microrganismos probióticos afetam positivamente a composição da micromicrobiota, beneficiando o hospedeiro (SANDERS, 1998), como, pela exclusão e antagonismo a patógenos (MACK, 2003), ou seja, atividade antimicrobiana, onde os probióticos podem controlar o pH intestinal, limitando o desenvolvimento de patógenos e a produção de metabólitos tóxicos, bem como aminas vasoconstritoras como histamina, cadaverina, tiramina e agmatina; imunoestimulação e imunodifusão (SCHIFFRIN *et al.*, 1995); atividades anticarcinogênicas e antimutagênicas; melhora na função digestora, promovendo a síntese de enzimas digestivas, principalmente da lactase, proteases e peptidases, regulando o trânsito intestinal e a absorção de nutrientes, aliviando os sintomas da intolerância à lactose, devido ao aumento da enzima que facilita a digestão da lactose (SANDERS, 1993); cardiovascular, promovendo a redução e a normalização do colesterol e

triglicerídeos plasmáticos; redução da pressão sanguínea; diminuição da incidência e da duração de diarreias, melhorando a consistência das fezes e a frequência de defecação; prevenção de vaginites; preservação da integridade da mucosa; aumentam a absorção e fixação de cálcio e ferro, além de outros minerais; fortalecem o sistema imunológico através de maior produção de células protetoras, promovendo o desenvolvimento e a maturação do sistema imune entérico e sistêmico e produzindo substâncias que agem sobre os microrganismos patogênicos, por tornarem o ambiente desfavorável ao seu crescimento e desenvolvimento; portanto na redução do risco de câncer e doenças infecciosas de repetição; possuem efeito funcional benéfico no organismo, equilibrando a microbiota intestinal, atuando na capacidade do organismo se desintoxicar de excessos e venenos; nutricional, estimulando a síntese de vitaminas do complexo B (B1, B2, B3, B5, B6, ácido fólico, B12) e vitamina K participando de forma importante para o pool desta vitamina no organismo.

3.1.5 Alimentos funcionais:

Os alimentos funcionais abrangem um mercado global em amplo crescimento e dentro da classe dos alimentos ditos funcionais, destacam-se os alimentos contendo culturas vivas de microrganismos probióticos (STANTON et al., 2005).

Estudos demonstram que a maioria dos consumidores acredita que certos alimentos apresentam efeitos benéficos à saúde e podem reduzir os riscos de doenças (CLYDESDALE, 2005). Por isto, houve uma demanda por produtos funcionais, ou seja, alimentos que afetam benéficamente uma ou mais funções do organismo, ou seja, os consumidores optam por prevenir, ao invés de curar doenças, buscando alimentos que garantam efeitos nutricionais adequados, levando à melhora do estado de saúde e bem estar, reduzindo o risco de doenças, tais como diarreia, câncer e doenças cardiovasculares (EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE, 1999).

Sob o ponto de vista da ciência dos alimentos, o interesse em relação à alimentação para melhorar a saúde do ser humano, vem aumentando no decorrer dos anos (GIBSON, 2004), porque os consumidores estão cada vez mais interessados em uma vida mais saudável e estão adquirindo mais conhecimento em relação à nutrição. Com isso, diversos alimentos funcionais já foram introduzidos no mercado (KWAK E JUKES, 2001), levando ao incentivo, pela indústria de alimentos, de novas pesquisas e o desenvolvimento de novos produtos em todo o mundo (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

Alguns critérios básicos de alimentos probióticos são: manter a estabilidade durante a vida de prateleira pretendida do produto; conter uma população adequada de células viáveis para conferir benefício à saúde; serem compatíveis com a formulação do produto para manter desejadas propriedades sensoriais; serem rotulados de uma forma informativa verdadeira para o consumidor (COUNCIL FOR AGRICULTURAL SCIENCE AND TECHNOLOGY, 2007).

3.2 LEGISLAÇÃO ACERCA DE PRODUTOS CONTENDO PROBIÓTICOS

3.2.1 Alegação

O Ministério de Agricultura, Pecuária e Abastecimento estabelece Padrões de Qualidade e Identidade (PIQ) para leites fermentados, e quando é mencionado no rótulo de um produto o uso de bifidobactérias, a população mínima desta cultura deverá ser de 10^6 UFC por grama ou mililitro do produto (ANTUNES et al., 2007). Já a Resolução de Diretoria

Colegiada da ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária – a RDC nº 2 de 07 de janeiro de 2002, aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde. Esta norma tem como objetivo padronizar os procedimentos a serem adotados para a avaliação de segurança, registro e comercialização de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com alegação de propriedades funcional e ou de saúde (BRASIL, 2002).

Esta Resolução define como Probiótico os microrganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo, e que a substância bioativa deve estar presente em fontes alimentares de origem natural ou sintética, desde que comprovada a segurança para o consumo humano. Pode ainda ser direcionado a grupos populacionais específicos; não pode ter finalidade medicamentosa ou terapêutica, qualquer que seja a forma de apresentação ou o modo como é ministrado, e deve ser seguro para o consumo humano, sem necessidade de orientação e ou acompanhamento médico, a não ser que seja dirigido a grupos populacionais específicos (BRASIL, 2002).

Quanto à avaliação de risco e segurança do produto deve atender ao disposto no Regulamento Técnico que estabelece as Diretrizes Básicas para Avaliação de Risco e Segurança dos Alimentos; demonstrar que o produto é seguro para o consumo nas condições de uso recomendadas; considerar o uso da substância bioativa isolada, dentro do hábito alimentar da população brasileira; ser avaliada, caso a caso (BRASIL, 2002).

“O (indicar a espécie do microrganismo) (probiótico) contribui para o equilíbrio da microbiota intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis”.

3.2.2 Requisitos específicos

A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 Unidades Formadoras de Colônias (UFC) na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. Valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia.

A documentação referente à comprovação de eficácia, deve incluir:

- Laudo de análise do produto que comprove a quantidade mínima viável do microrganismo até o final do prazo de validade.
- Teste de resistência da cultura utilizada no produto à acidez gástrica e aos sais biliares.

A quantidade do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.

Os microrganismos *Lactobacillus delbrueckii* (subespécie *bulgaricus*) e *Streptococcus salivarius* (subespécie *thermophilus*) foram retirados da lista tendo em vista que além de serem espécies necessárias para produção de iogurte, não possuem efeito probiótico cientificamente comprovado.

Um dos pré-requisitos necessários para o uso comercial dos microrganismos probióticos é a sua sobrevivência em número suficientemente elevado, durante a produção e a estocagem dos produtos e até que alcancem o intestino humano (ALLAN et al., 2008; KAILASAPATHY; CHIN, 2000; MARTONI et al., 2008). Segundo Huang e Adams (2004) e Ross et al. (2005) condições extremamente ácidas como as encontradas no estômago podem diminuir significativamente o número de células probióticas viáveis que chegam ao intestino. Para tentar solucionar este problema técnicas de microencapsulação podem ser utilizadas.

Diferentes Técnicas para aumentar a resistência desses microrganismos contra condições adversas têm sido propostas, incluindo a seleção adequada em presença do ácido estomacal e de cepas resistentes à bile, uso de duas fases fermentativas, adaptação ao estresse, incorporação de micronutrientes, como peptídeos e aminoácidos, e a microencapsulação (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008; BRINQUES e AYUB, 2011; CHAMPAGNE et al., 2011).

3.3 Prebióticos

Prebióticos são carboidratos complexos, não digeríveis pelas enzimas salivares e intestinais (ANJO, 2004; SAAD, 2006). Atuam principalmente no intestino grosso estimulando a proliferação e a atividade da microbiota intestinal, inibindo a multiplicação de microrganismos patogênicos, favorecendo a defesa imunológica (FORSYTE, 2002; FRANCO; OLIVEIRA; CARVALHO, 2006). Suas principais características são a capacidade de não sofrer hidrólise ou absorção no intestino delgado e promoção da alteração da micromicrobiota intestinal por uma saudável. Dentre os prebióticos, destacam-se a galactooligosacarídeos (GOS), a inulina e os frutooligosacarídeos (FOS) (SAAD, 2006).

Os oligossacarídeos são açúcares encontrados como componentes naturais em muitos alimentos como frutas, vegetais, leite e mel. (LEITE et al., 2000; NAKANO, 1998).

Alimentos como alcachofra, alho, aspargo, banana, beterraba, cebola, centeio, cerveja, cevada, chicória, mel, tomate e trigo, são importantes fontes de prebióticos. Recomendam-se doses de 4 a 5 gramas de prebióticos na alimentação diária, para que sejam desencadeadas suas funções no organismo (ANJO, 2004; PASSOS; PARK, 2003; SAAD, 2006).

Dentre as funções dos prebióticos destacam-se a alteração do trânsito intestinal contribuindo para o aumento da concentração de bifidobactérias no cólon, interferem em funções fisiológicas, como absorção de cálcio, metabolismo lipídico, modulação da composição da microbiota intestinal e diminuição do risco de câncer de cólon (ROBERFROID, 2002; GIBSON, 2004).

Os prebióticos estimulam o crescimento de bactérias benéficas no intestino grosso, favorecendo a composição da microbiota intestinal, aumentando a atividade metabólica destas bactérias. Atuam também reduzindo metabólitos tóxicos, prevenindo a diarreia e a obstipação (SAAD, 2006).

Segundo Roberfroid (2006), a combinação de prebióticos e probióticos tem sido sugerida em função dos efeitos sinérgicos, onde o crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal é dependente da presença de carboidratos complexos, como os oligossacarídeos (SHAN, 2001).

Segundo Thamer e Penna (2005), o aumento na concentração de prebióticos não provoca aumento do número de bifidobactérias nos testes de simulação do trato gastrointestinal. Com o decréscimo do pH ocorre uma redução nas contagens de células viáveis de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium*.

Os produtos finais da fermentação de substâncias prebióticas são o ácido lático e os ácidos graxos de cadeia curta, como o acetato, propionato e butirico, que são responsáveis pela redução do pH no intestino grosso e esta redução promove o aumento de bactérias benéficas, por serem resistentes em meio ácido e as bactérias patogênicas são sensíveis à acidez, tendo então, o seu número reduzido. As bactérias benéficas produzem e secretam bacteriocinas, substâncias antibacterianas que exercem efeito sobre a microbiota patogênica (MELO, 2004).

Dentre os benefícios atribuídos ao consumo de prebióticos incluem-se: modulação do metabolismo lipídico reduzindo os riscos de aterosclerose e os níveis de triglicérides e de colesterol plasmático (ANJO, 2004; PASSOS; PARK, 2003; SAAD, 2006); redução dos riscos de osteoporose; modulação da micromicrobiota intestinal (ARABBI, 1993; PASSOS e PARK, 2003; SAAD, 2006); redução do risco de câncer de cólon e de doenças cardiovasculares (SAAD, 2006); prevenção à obesidade e ao Diabetes Mellitus tipo II (ANJO, 2004); estímulo ao sistema imunológico (ARABBI, 2001; SAAD, 2006); alívio à constipação (ANJO, 2004); controle da pressão arterial (ANJO, 2004; PASSOS e PARK, 2003).

3.3.1 Mel

O mel é um produto natural de abelhas obtido a partir do néctar das flores (mel microbital), de secreções de partes vivas das plantas ou de excreções de insetos sugadores de partes vivas das plantas (mel de melato) (CAMPOS e MODESTA, 2000), sendo uma matriz muito complexa, havendo, interferências não controladas pelo homem, como clima, microbiotação, presença de insetos sugadores e outros fatores durante a sua elaboração. As abelhas, por sua vez, utilizam os recursos disponíveis como fonte de açúcar para elaborá-lo. (CAMPOS e MODESTA, 2000).

O mel é um xarope natural contendo principalmente frutose (38,5%) e glucose (31,3%). Outros açúcares incluem a maltose (7,2%), sacarose (1,5%), uma variedade de oligossacarídeos (4,2%) (NHB, 1996) e substâncias como ácidos orgânicos, enzimas, e partículas sólidas coletadas pelas abelhas. Os oligossacarídeos do mel variam em composição, bem com o grau de polimerização, que resultam da ação de abelhas, da D-glicosidase, que catalisa a transferência de grupos da sacarose para um receptor de hidrato de carbono, o que resulta em fruto-oligossacarídeos e uma variedade de outros oligossacarídeos em quantidades variáveis. A composição e o conteúdo do mel são variáveis e dependentes de fonte da microbiota do mel (SWALLOW e LOW, 1990; WESTON e BROCKLEBANK, 1999). Sua aparência varia de quase incolor a marrom escuro. Pode ser fluido, viscoso, ou até mesmo sólido. Seu sabor e aroma variam de acordo com a origem da planta. Variedades de mel podem ser identificadas por sua cor, gosto, sabor, e maneira de cristalização (RYBAK-CHMIELEWSKA e TOMASIK, 2004).

O mel contém uma variedade de ácidos orgânicos tais como acético, butírico, cítrico, fórmico, láctico, glucônico, málico que contribuem para o baixo pH do mel (3,9). Segundo Molan (1992); Somal, Coley, Molan e Hancogk (1994) o mel pode atuar de forma benéfica para as bactérias que estão presentes na micromicrobiota do trato gastrointestinal.

O mel é um alimento muito rico e de elevado valor energético e de extrema importância para a saúde do organismo humano quando puro, por apresentar diversas propriedades: antimicrobiana, curativa, calmante, regenerativa de tecidos, estimulante, dentre outras (BIZZARIA e FILGUEIRAS, 2003).

Segundo Anjo (2004), o mel é um alimento funcional que exerce a atividade prebiótica e tem como efeito, a regulação do trânsito intestinal, regulação da pressão arterial, redução do risco de câncer e dos níveis de colesterol.

Segundo Molan, 2000 o mel, por ser uma solução supersaturada de açúcares possui uma baixa atividade de água, assim, não oferece condições favoráveis para o crescimento de bactérias. Além disso, a acidificação natural do meio pode inibir o desenvolvimento de muitos patógenos.

O mel favorece o crescimento, atividade e viabilidade de cepas comerciais de bifidobactérias tipicamente utilizadas na fabricação de produtos lácteos fermentados. Existe um efeito sinérgico entre os carboidratos do mel e a promoção do crescimento e atividade de bifidobactérias, semelhante aos que os oligossacarídeos (FOS, GOS e inulina) promovem (CHERBULIEZ, 2001).

Segundo Macedo et al (2008) indicam que, no geral o mel deve fornecer muitos efeitos benéficos de saúde fornecidos pelos agentes prebióticos por apoiar seletivamente o crescimento das Bifidobactérias no TGI e reduzindo o pH como um resultado da produção de ácido láctico e ácido acético, inibindo assim o crescimento de bactérias prejudiciais como *C. perfringens* e *E. aerofaciens*, prevendo assim um bom desenvolvimento da micromicrobiota GI, mas por outro lado, o mel também pode ser uma fonte de esporos de *Clostridium botulinum* e deve ser evitado por crianças com menos de um ano de idade. (MACEDO et al., 2008).

3.4 Microencapsulação

O conceito de microcápsula surgiu da idealização do modelo celular; neste, a membrana que envolve e protege o citoplasma e os demais componentes exercem ao mesmo tempo outras funções, como controlar a entrada e saída de material na célula. De modo semelhante, uma microcápsula consiste, em geral, em uma camada de polímero que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição inadequada (SUAVE *et al.*, 2006).

Microencapsulação (TODD, 1970), é uma tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando pequenas partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas.

A microencapsulação é definida, do ponto de vista microbiológico, como o processo

pelo qual as células microbianas são retidas em uma matriz polimérica, formando microesferas semi permeáveis (YOW; ROUTH, 2006). Essas microesferas podem liberar seu conteúdo sob condições específicas (FAVARO-TRINDADE et al., 2008) e protegê-lo contra ambientes agressivos como as baixas temperaturas de congelamento, a presença de oxigênio e durante o trânsito gastrointestinal (KRASAEKOOPT et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2007).

Por sua vez, Arshady (1993) descreveu as microcápsulas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo. Esse autor afirmou que enquanto as embalagens convencionais normalmente são empregadas para facilitar transporte, armazenagem, manipulação e apresentação dos alimentos, as microcápsulas são geralmente empregadas para melhorar a performance do material ou criar novas aplicações.

Gouin (2004) e Desai e Park (2005) afirmaram que, através de propriedades de liberação controlada finamente ajustadas, a microencapsulação deixa de ser somente um método de agregação de substâncias a uma formulação alimentícia, e se torna uma fonte de ingredientes totalmente novos com propriedades únicas.

Pode-se “empacotar” diversas partículas, como: pigmentos, compostos de sabor, nutrientes, enzimas, conservantes, acidulantes, microrganismos, entre outras, em cápsulas comestíveis (KAREL e LANGER, 1998).

O material a ser encapsulado, é chamado de recheio ou núcleo, e o material que forma a cápsula, encapsulante, cobertura ou parede (GIBBS *al.*, 1999).

Segundo Ré (2000), a microcápsula consiste em uma camada de um agente encapsulante, geralmente um material polimérico que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa (gotículas líquidas, partículas sólidas ou material gasoso) e evitando o efeito de sua exposição inadequada. Essa membrana se desfaz sob estímulo específico, liberando a substância no local ou momento ideal.

O principal objetivo da encapsulação é proteger o material do núcleo de condições ambientais adversas, tais como efeitos indesejáveis da luz, umidade e oxigênio, contribuindo assim para um aumento da vida útil do produto podendo promover, além disto, uma liberação controlada do núcleo no organismo (SHAHIDI e HAN, 1993).

De acordo com o seu tamanho, as cápsulas são classificadas como nanopartículas ou micropartículas, variando de 0,01 a 0,2 μm e de 1 a 100 μm (MARTIN, 1993). Acima de 100 μm elas são denominadas de macropartículas (SANTOS *et al.*, 2000).

As micropartículas podem ser classificadas como microcápsulas ou microesferas segundo a sua estrutura (KING, 1995; RÉ, 1998). São denominadas microesferas, as partículas compactadas, constituídas por uma rede polimérica, na qual, a substância ativa se encontra distribuída no seu estado sólido ou molecular, ou seja, o agente ativo está distribuído em uma matriz polimérica. Já as microcápsulas são as partículas constituídas por um núcleo interno contendo o agente ativo recoberto por uma camada de polímero (agente encapsulante) de espessura variável (BATYCKY *al.*, 1997; LINHARD, 1988).

Os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulação datam dos anos de 1930, mas o primeiro produto com material microencapsulado só surgiu em 1954. A empresa norte-americana National Cash Register (NCR) foi a pioneira, ao comercializar um papel de cópia sem carbono, que revolucionaria a indústria de formulários. Este papel recebeu uma fina camada de microcápsulas de tinta, contendo solução de 2 a 6% de um pigmento adequado disperso em partículas com diâmetro de 1 até 10 μm . A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando o pigmento, que, por contato direto com o revestimento ácido aplicado na superfície frontal da segunda via, mudava de cor em função do pH, propiciando a obtenção da cópia (Ré, 2000).

As primeiras pesquisas na área farmacêutica também aconteceram na década de 50. Nesse campo houve uma contribuição importante, pois a microencapsulação permitiu o desenvolvimento de fórmulas de liberação controlada, ou seja, aquelas com capacidade de liberar os agentes ativos apenas nos órgãos onde devem agir ou onde serão absorvidos. Em tais produtos, o princípio ativo protegido é liberado gradativamente por meio de estímulos adequados, tais como mudança de pH, rompimento físico, intumescimento, dissolução, entre outros.

A microencapsulação pode ser utilizada como forma de proteger microrganismos probióticos em cápsulas de hidrocolóides, utilizando técnicas de extrusão e emulsão aumentando a viabilidade da célula em produtos e no TGI acima de 80-95% (KRASAEKOOPT *et al*, 2003), prolongando seu efeito no organismo (Ré, 2000).

Uma perda de células vivas microencapsuladas durante o armazenamento não pode ser evitada, mas a sua extensão é fortemente dependente das condições de armazenamento e da cepa probiótica utilizada. Sob as condições otimizadas (4^oC/11% UR) depois de 3 meses de armazenamento, cerca de 1 ciclo log. de *Bifidobacterium* encapsuladas foi perdido. Para *Lactobacillus* a redução foi quase 2 ciclos log.(CHAMPAGNE *et al.*, 2005).

A microencapsulação é uma tecnologia de revestimento de partículas sólidas, líquidas ou gasosas muito pequenas, formando cápsulas fechadas que podem liberar seu conteúdo em velocidade controlada sob influência de condições específicas (ANAL; STEVENS, 2005; ANAL *et al.*, 2006; KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005). Esta tecnologia vem sendo avaliada na obtenção de alimentos probióticos como uma forma de proteção das células viáveis aos extremos de calor e umidade (O'RIORDAN *et al.*, 2001). Industrialmente, bactérias probióticas microencapsuladas são aplicadas em produtos lácteos fermentados, como por exemplo, iogurte, queijo, sobremesas lácteas geladas, além da produção de biomassa. A microencapsulação facilita a manufatura dos produtos lácteos fermentados nos quais as bactérias devem possuir características consistentes e alta estabilidade durante a armazenagem, além de maior produtividade (ANAL; SINGH, 2007). Nesses produtos as microcápsulas podem ser gradualmente rompidas liberando os ingredientes ativos. Uma microcápsula pode ser aberta por diferentes meios, incluindo fratura por calor, solvatação, difusão e pressão (BRANNON-PEPPAS, 1997). Contudo, as microcápsulas de bactérias probióticas também podem ser designadas para a ruptura em áreas específicas do corpo, como por exemplo, o intestino. Desta forma, um revestimento capaz de resistir às condições ácidas pode ser usado, permitindo que os ingredientes ativos consigam passar pelo estômago (ANAL; STEVENS, 2005).

As microcápsulas são constituídas por uma membrana semipermeável, esférica, fina e resistente que envolve um centro sólido/líquido, com diâmetro variando desde o tamanho de

1µm a 1 mm (ANAL; SINGH, 2007). Em um amplo sentido, a microencapsulação pode ser usada em muitas aplicações na indústria de alimentos, incluindo a estabilização do material central; controlando reações oxidativas; fornecendo prolongada ou controlada liberação (ambas temporárias e liberação com tempo-controlado); melhorando sabores, cores e odores; aumentando a vida-útil; e protegendo componentes contra perdas nutricionais (CUI et al., 2000; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; OLIVEIRA, 2006; O'RIORDAN et al. 2001; SULTANA et al., 2000). Entretanto, alguns aspectos básicos devem ser considerados no desenvolvimento de sistemas microencapsulados, tais como a natureza e a estabilidade do material a ser encapsulado; as características do polímero encapsulador; o processo de microencapsulação; e as características do produto a ser obtido (OLIVEIRA, 2006).

3.5 Materiais encapsulantes

A seleção do agente encapsulante depende do método utilizado para formar as microcápsulas, do tipo de aplicação do produto e ainda da forma como ele agirá. Além disso, junto com a escolha do polímero deve-se levar em conta o tipo de solvente compatível com o processo. Muitos polímeros requerem a utilização de solventes orgânicos, o que impede o seu uso na encapsulação de organismos vivos. Este inconveniente tem despertado o interesse no desenvolvimento e utilização de polímeros passíveis de serem utilizados em meio aquoso, especialmente para a encapsulação de microrganismos (FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002).

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade de compostos encapsulados é a natureza do material encapsulante (ROSENBERG; KOPELMAN; TALMON, 1990).

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo (núcleo), da aplicação pretendida, do método utilizado para formar as micropartículas e da parede. Segundo Santos et al. (2000), o encapsulante ideal deve apresentar baixa viscosidade em concentrações elevadas e ser de fácil manipulação durante o processo; possuir baixa higroscopicidade, para facilitar a manipulação e evitar aglomeração; não ser reativo com o material a ser encapsulado, ou seja, o material de parede não pode ser reativo com o núcleo (JACKSON e LEE, 1991); ter habilidade de selar e segurar o material ativo dentro da estrutura da cápsula; liberar completamente o solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; proporcionar máxima proteção ao material ativo contra condições adversas, tais como luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos; ser solúvel em solventes comumente usados; possuir as propriedades desejadas de liberação do material ativo; capacidade de formação de filme; compatibilidade do núcleo com a parede; mecanismos de controle; não apresentar sabor desagradável e ser econômico (BRAZEL, 1999).

A possibilidade de controle na taxa de liberação do material encapsulado é uma das funções mais exploradas da tecnologia de microencapsulação e está diretamente relacionada ao material de parede (cobertura), estrutura química, espessura, porosidade e solubilidade. O comportamento e as características das microcápsulas produzidas dependem do material de parede escolhido, das características do material a ser encapsulado, do método de produção empregado e do meio de liberação (ALVIM, 2005).

Diversos materiais de origem natural, semissintética ou biodegradável podem ser utilizados como matéria-prima na microencapsulação. Dentre os materiais que podem ser

utilizados como agentes encapsulantes destacam-se: Os hidrocolóides como a goma arábica, ágar, pectina, polipectato, alginato e carragena; os carboidratos, amidos modificados, dextrinas e sacaroses; os derivados de celulose tais como metil e etil-celulose, carboximetilcelulose (CMC), hidroxipropilmetilcelulose (HPMC), acetilcelulose e nitrocelulose; os lipídios parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras, ácido láurico, cáprico, ácido palmítico e esteárico, e seus sais; os materiais inorgânicos sulfato de cálcio e silicatos; as proteínas do glúten, caseína, gelatina, proteína de soja e albumina; e as ceras hidrofílicas ou lipofílicas como a goma laca, cera de PEG (polietileno glicol), carnaúba ou de abelha (SHAHIDI e HAN, 1993; GIBBS *et al.*, 1999; FANG e BHANDARI, 2010).

É importante considerar a estabilidade das emulsões para encapsulação, uma vez que estes são geralmente insolúveis em água. Para atuar como emulsificante, um composto deve conter grupamentos hidrofílicos e hidrofóbicos; quanto maior a capacidade emulsificante do encapsulante, melhor a retenção de compostos (DZIEZAK, 1988).

3.6 Métodos de microencapsulação

Vários métodos são utilizados para a encapsulação. Em geral, três etapas são envolvidas na encapsulação: preparação de uma dispersão a fim de formar uma parede em torno do material a ser encapsulado; homogeneização para certificação de que não ocorrerão vazamentos indesejados do composto; secagem para assegurar que os materiais indesejados são mantidos fora da cápsula (GIBBS *et al.*, 1999; MADENE *et al.*, 2006; MOZAFARI *et al.*, 2008).

A escolha do método mais adequado depende do tipo de material ativo, da aplicação e do mecanismo de liberação desejado para a sua ação. A diferença básica entre os métodos existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do material ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre o material e o agente ativo pode ser de natureza física, química ou físico-química.

Existem diversos meios de se encapsular substâncias (SHAHIDI e HAN, 1993; DESAI e PARK, 2005; MADENE *et al.*, 2006): **Físicos** (atomização, extrusão estacionária, bocal submerso, extrusão centrífuga, bocal vibrante, spray drying, disco rotativo, suspensão por ar, leito fluidizado, liofilização, pulverização em banho térmico); **químicos** (polimerização interfacial, inclusão molecular e polimerização *in situ*); **físico-químico** (coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação de solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico (SANTOS *et al.*, 2000). Entre os materiais que podem ser encapsulados, para aplicação na indústria alimentícia, incluem-se ácidos, bases, óleos essenciais, corantes, enzimas e microrganismos (DESSAI e PARK, 2005).

Os microrganismos têm sido microencapsulados ou imobilizados para possibilitar a reutilização dos mesmos na produção de ácido láctico e produtos lácteos fermentados (TIPAYANG e KOZAKI, 1982; HYNDMAN *et al.*, 1993; GROBOILLOT *et al.*, 1993), para aumentar a concentração de células em reatores, aumentando a produtividade (YOO *et al.*, 1996), para protegê-los contra a presença de oxigênio, contra as baixas temperaturas de congelamento (SHEU e MASHALL, 1993; SHEU *et al.*, 1993), contra o efeito bactericida do suco gástrico e outros meios ácidos (RAO *et al.*, 1989; MODLER e VILLA-GARCIA, 2008; DINAKAR e MISTRY, 1994; KHALIL e MANSOUR, 1998; CUI *et al.*, 2000; FAVARO-TRINDADE e GROSSO, 2002; HANSEN *et al.*, 2002; DESMOND *et al.*, 2002; PICOT e

LACROIX, 2004; IYER e KAILASAPATHY, 2005; MUTHUKUMARASAMY *et al.*, 2006; CHEN *et al.*, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2007b), para retirá-los do produto, interrompendo a acidificação (CHAMPAGNE *et al.*, 2000), para aumentar a estabilidade e manter a viabilidade da cultura durante a estocagem do produto (KIM *et al.*, 2005; CHAMPAGNE *et al.*, 1994; HANSEN *et al.*, 2002; KAILASAPATHY, 2006; CAPELA *et al.*, 2006; MUTHUKUMARASAMY e HOLLEY, 2006) e para aumentar a vida dos microrganismos (AMIET-CHARPENTIER *et al.*, 1998).

Microencapsulação de várias culturas bacterianas incluindo as probióticas tem sido uma prática comum para extensão da sua vida útil e para convertê-las à forma de pó, facilitando o seu uso. Existem várias técnicas de encapsulação das culturas e sua conversão em forma de pó, como por exemplo, spray dryer, liofilização, secagem em leito fluidizado. Entretanto as bactérias não encapsuladas por estas técnicas não estarão protegidas no produto, estando susceptíveis as condições ambientais dos produtos onde são veiculadas ou durante a passagem através do estômago ou pelo trato gastrointestinal (KRASAEKOOPT *et al.*, 2003).

3.6.1 Técnica da extrusão

A encapsulação por extrusão envolve a dispersão do material do núcleo em uma massa fundida de um carboidrato. A mistura é forçada, através de moldes, em direção a um desidratante que endurece a cobertura (ex.isopropanol). Quando o material entra em contato com o líquido desidratante e a parede se endurece, qualquer porção oleosa é removida da superfície. Os filamentos do material extrusado são quebrados em fragmentos menores, separados e secos. O método produz partículas relativamente grandes que podem ser usadas quando se desejam fragmentos visíveis. A ausência de material de núcleo na superfície e a completa encapsulação conferem ao produto excelente estabilidade (AZEREDO, 2005).

Este método é o mais antigo e mais comum para microencapsulação em hidrocolóides (KING, 1995). Ele envolve simplesmente preparar uma solução de hidrocolóide, adicionando uma solução celular de microrganismos a ele, através de uma seringa com agulha sob a forma de gotas em queda livre. O tamanho e a forma das gotas dependem do diâmetro da agulha e da distância de queda livre, respectivamente. Este método é o mais popular devido a sua facilidade, simplicidade, baixo custo, e condições de formulação e retenção de células viáveis.

Os hidrocolóides aniônicos, especialmente os alginatos, podem ser usados para a encapsulação por extrusão, graças a sua capacidade de formar géis em contato com soluções salinas.

3.6.2 Técnica da emulsão

Entre as técnicas de microencapsulação mais antigas está a emulsificação. Na emulsificação as cápsulas são formadas pela dispersão de uma fase aquosa (contendo as células probióticas e um polímero em suspensão) em uma fase orgânica (como um óleo vegetal), resultando numa emulsão de água em óleo (CAPELA *et al.*, 2007). As cápsulas são solidificadas pela adição lenta de um agente gelificante, produzindo microcápsulas de pequenos diâmetros (25 µm – 1 mm) (MORTAZAVIAN *et al.*, 2007). Anal e Singh (2007) e Muthukumarasamy *et al.* (2006) reportaram estudos mostrando o aumento da estabilidade das bactérias ácido lácticas quando encapsuladas pelo método de emulsificação, utilizando como material de revestimento alginato de sódio.

A emulsificação tem sido aplicada com sucesso na microencapsulação de bactérias ácido lácticas (LACROIX et al., 1990). Neste método as cápsulas são formadas a partir de duas etapas: a dispersão de uma fase aquosa, contendo as células bacterianas e uma suspensão polimérica, dentro de uma fase orgânica, como óleo, resultando em uma emulsão de água em óleo; e a solidificação das cápsulas por um agente geleificante. A emulsificação resulta em cápsulas de pequenos diâmetros, além de ser facilmente aplicada em grande escala (KAILASAPATHY, 2002; MORTAZAVIAN et al. 2007).

Nesta técnica, um pequeno volume de célula de polímero em suspensão (fase descontínua) é adicionado a um grande volume de um óleo vegetal (fase contínua), tais como óleo de soja, óleo de girassol, óleo de canola ou óleo de milho. A mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo. Uma vez que a emulsão de água em óleo é formada, a água que é o polímero solúvel deve ser insolubilizado (cross-linked) para formar partículas de gel minúsculos dentro da fase de óleo. Quanto menor for o tamanho da partícula da fase interna da emulsão, menor serão as micropartículas finais.

O método da escolha depende do tipo de material utilizado. As gotas são colhidas depois por filtração. O tamanho dos grânulos é controlado pela velocidade de agitação, e pode variar entre 25mm e 2 milímetros. Esta técnica tem sido utilizada com sucesso para encapsular bactérias lácticas (LACROIX, PAQUIN E ARNAUD,1990) e fermentação contínua (AUDET, LACROIX E PAQUIN,1992).

Essa técnica tem sido frequentemente empregada, tendo em vista a simplicidade dos procedimentos envolvidos na obtenção de partículas e as possibilidades de modulação das características físicas e físico-químicas das partículas por meio da escolha dos componentes da formulação e das condições de preparação (BHARDWAJ *et al.*, 1995; KHIDR *et al.*, 1998; ZANETTI, 2001).

3.6.3 Fase contínua

Para aplicações em alimentos, os óleos vegetais são utilizados como a fase contínua. Alguns estudos têm utilizado óleo de parafina branco leve (RAO *et al.*, 1989) e óleo mineral (GROBOILLOT *et al.*, 1993). Normalmente são adicionados emulsificantes para formar uma emulsão melhor, pois estes diminuem a tensão superficial resultando em esferas menores (ADAMSON, 1982). A maioria do emulsificante utilizado é o Tween 80 a 0,2% (SHEU e MARSHALL, 1993). Sheu *et et al.* (1993) utilizou em conjunto com Tween 80 a 0,5% lauril sulfato de sódio, que produziu um tamanho do grânulo de 25-35mm.

3.6.4 Leito fluidizado

A fluidização ocorre quando um fluxo ascendente de um fluido através de um leito de partículas atinge velocidade suficiente para suspendê-las sem expulsá-las da corrente do fluido. O leito de partículas torna-se assim semelhante a um líquido em ebulição, daí o termo fluidização.

Na encapsulação em leito fluidizado, enquanto as partículas do núcleo são suspensas, o material da parede é atomizado para dentro da câmara, depositando-se sobre as partículas do núcleo. Quando as partículas atingem o topo da coluna ascendente, são lançadas em uma coluna descendente de ar, que as lança novamente no leito fluidizado, onde são novamente revestidas, secas e endurecidas. As sucessivas passagens das partículas com orientação

aleatória por esse ciclo de revestimento asseguram maior uniformidade da parede. A turbulência da coluna de ar é suficiente para manter a suspensão das partículas cobertas, permitindo sua rotação, o que torna o revestimento uniforme.

A encapsulação em leito fluidizado é uma das poucas tecnologias que possibilitam que as partículas sejam revestidas com praticamente qualquer tipo de material de cobertura (polissacarídeos, proteínas, emulsificantes, gorduras etc.), o que permite o uso de uma ampla gama de formas de liberação controlada. O uso de gorduras, ceras ou emulsificantes como material de cobertura é relativamente novo, mas muito promissor. Uma vantagem do uso desse tipo de material reside no fato de que não há necessidade de solvente para formular o material de cobertura, como no caso de materiais de base aquosa, o que reduz o tempo de processo. Além disso, o consumo de energia é menor, devido a não necessidade de evaporação.

Se a cobertura for à base de gorduras, a liberação ocorre por aumento de temperatura ou por fratura física, ao passo que partículas cobertas com materiais hidrossolúveis têm seus núcleos liberados geralmente por adição de água. Este método tem sido usado, por exemplo, para isolar ferro do ácido ascórbico em formulações multi-vitaminas, ou para encapsular sal ou acidulantes, evitando a interação desses ingredientes com outros componentes de formulações.

3.6.5 Coacervação

Esta técnica de microencapsulação envolve a separação de fases por coacervação. O termo coacervação foi introduzido pela primeira vez na química por Bungenberg de Jong e Kruyt em 1935 para descrever o fenômeno de agregação macromolecular formando um sistema coloidal em que existem duas fases líquidas: uma rica em um colóide (coacervado) e outra pobre em colóides (sobrenadantes) (VILA JATO, 1999). Essa técnica consiste na deposição do polímero ao redor do agente ativo a ser coberto pela alteração das características físico-químicas do meio, tais como a temperatura, a força iônica, o pH ou a polaridade (WATTS *et al.*, 1990).

A coacervação envolve as seguintes etapas: Dispersão do agente ativo a ser encapsulado em uma solução do polímero; indução da coacervação formando gotículas de coacervado; deposição das gotículas de coacervado em torno dos núcleos contendo o princípio ativo; coalescência das gotículas de coacervado para formar uma camada polimérica; endurecimento da camada polimérica por meio da difusão do solvente, adição de um agente reticulante, mudança de temperatura, etc. As microcápsulas ou microesferas obtidas são separadas do sistema por centrifugação ou filtração.

O método produz, portanto, um sistema do tipo reservatório. Um exemplo típico de encapsulação por coacervação ocorre em sistemas com dois colóides hidrofílicos de cargas elétricas opostas. O sistema gelatina-goma arábica é o mais estudado, e o processo é conduzido da seguinte forma, sob contínua agitação: o material do núcleo é emulsificado ou suspenso em uma das duas soluções (gelatina ou goma arábica), e a outra solução é então adicionada, formando-se assim um sistema com três fases. O pH inicial deve ser maior que 5,0 (ponto isoelétrico da gelatina); assim, ambos têm cargas negativas e se repelem, sendo portanto miscíveis. Com a diminuição gradual do pH até 3,8-4,3, a gelatina adquire carga positiva, que interage com as cargas negativas da goma arábica, formando-se microcápsulas que se depositam em torno das gotículas do núcleo. Posteriormente, deve-

se promover a formação de ligações cruzadas do material com um aldeído, para assegurar maior integridade da cobertura.

Apesar de muito eficiente, a coacervação é um processo caro, e por isso não muito utilizada na indústria de alimentos.

3.6.6 Liofilização

De acordo com Gava (2008), a liofilização é um processo de desidratação de produtos em condições de pressão e temperaturas tais que a água, previamente congelada, passa do estado sólido diretamente para o estado gasoso.

A liofilização é um método baseado na desidratação por sublimação de um produto congelado. Consiste em duas etapas, a saber: congelamento rápido do produto e sublimação do gelo sob vácuo.

A liofilização aparece como uma técnica promissora, pois não envolve altas temperaturas e tende a apresentar uma menor degradação dos nutrientes.

As principais vantagens oferecidas por este método são: manutenção da forma original, manutenção do valor nutritivo, manutenção das características sensoriais e redução de processos indesejáveis tais como desnaturação proteica, perda de compostos voláteis, formação de camadas duras e impermeáveis, migração de sólidos solúveis para a superfície durante a secagem e dificuldade de reidratação (MARTINS, 2000).

Um processo de encapsulação pode ser realizado por meio de liofilização de uma emulsão do material do núcleo com um encapsulante. O método gera produtos de excelente qualidade, uma vez que minimiza as alterações associadas a altas temperaturas. De fato, Desobry *et al.* (1997), observaram que a encapsulação por liofilização resultou em menor degradação de caroteno durante o processo (8%), quando comparada à atomização (11%) e à secagem em tambor (14%). Por outro lado, seu alto custo e longo tempo de processo prejudicam sua aplicação no comércio.

3.6.7 Spray dryer

O processo para microencapsulação com spray dryer é bastante usado. Nele, o material ativo a ser encapsulado é misturado a uma solução do composto que constitui o material encapsulante, formando uma emulsão. A ser atomizado dentro do secador, ocorre a evaporação do líquido da solução do agente encapsulante com a formação da membrana ao redor das gotas do material ativo (VILA JATO, 1999).

Atualmente o spray drying vem sendo substituído por novas tecnologias de microencapsulação como, por exemplo, a emulsificação. A microencapsulação por spray drying envolve a dispersão das células em uma solução polimérica que é atomizada na câmara de secagem (GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Isso leva a evaporação do solvente e, conseqüentemente, a formação das microcápsulas (KAILASAPATHY, 2002). Segundo Zhao *et al.* (2008) pesquisas tem mostrado que a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por spray drying pode resultar numa elevada sobrevivência e estabilidade da bactéria encapsulada. Além disso, o uso do spray dryer possibilita com maior facilidade a

microencapsulação em escala industrial, produzindo grande quantidade de microcápsulas de forma econômica e eficaz (ANAL E SINGH, 2007).

Segundo Santos *et al.* (2000), esse processo apresenta algumas vantagens sobre os outros métodos: as propriedades e a qualidade do produto são mais eficientemente controladas, podem ser usados produtos sensíveis ao calor, há possibilidade de grandes produções em operações contínuas com equipamentos simples, produção de partículas relativamente uniformes e esféricas, boa eficiência e baixo custo do processo.

3.6.8 Gelificação iônica

Este método é simples e de baixo custo. Ocorre quando uma solução polimérica contendo o material de núcleo é gotejada sobre uma solução iônica em concentrações adequadas, podendo-se obter razoáveis níveis de recheio e cápsulas de diferentes fórmulas e tamanhos (CORREA *et al.*, 2005).

Esta técnica envolve uma solução polimérica aquosa, com íons de baixa massa molecular, em que polieletrólitos de cargas opostas interagem formando um complexo. Cápsulas de alginato ou pectina de baixo teor de metoxilação são muito utilizadas como material de cobertura, sendo os íons cálcio o agente de reticulação mais utilizado (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

A concentração de polissacarídeo e cátions, a força iônica e o pH determinam a cinética de formação de gel, bem como o volume, estabilidade e porosidade das cápsulas, podendo influenciar na difusão de solutos para dentro e para fora da matriz polimérica (MESTDAGH e AXELOS, 1998).

3.7 Encapsulação em hidrocolóides

Os hidrocolóides são polissacarídeos de alta massa molecular, geralmente com traços de proteínas, de ocorrência natural, solúveis em água e com propriedades espessantes e/ou gelificantes em condições específicas (STAUFER, 1985).

Na indústria de alimentos, as gomas mais utilizadas são: Goma guar (não gelifica; possui alta viscosidade em baixas concentrações); goma locusta (não gelifica e possui sinergismo com carragenas); goma arábica (bastante solúvel em água. Devido ao seu baixo peso molecular e estrutura ramificada, forma soluções pouco viscosas), ágar (insolúvel em água fria e solúvel em água em ebulição. Gelifica formando géis bastante firmes à temperatura ambiente. Seus géis são termorreversíveis); carragena (solúvel em água ao redor de 80 graus. Gelifica com K⁺, formando géis termorreversíveis); alginato (insolúvel em água fria, solúvel em soluções alcalinas, forma géis com cálcio e alumínio); goma xantana (solúvel em água fria ou quente; solução pouco afetada pelo pH e pela temperatura; não gelifica; comportamento pseudoplástico); entre outras.

Os hidrocolóides são utilizados para aumentar a viscosidade de um sistema aquoso, mas, além disso, melhoram a textura e o corpo do alimento, evitando a separação do material disperso. Em outras palavras, eles estabilizam suspensões (sólidos dispersos em água), emulsões (óleo disperso em água) e espumas (gás disperso em água). A capacidade dos hidrocolóides de se ligar com água aumenta a estabilidade dos produtos que os contêm

durante ciclos de congelamento e descongelamento e diminui a sinerese (liberação da água durante o armazenamento) (SANDERSON, 1996).

Encapsulação em hidrocolóides ou imobilização de células em uma matriz permite a proteção das células das condições ambientais, como mudanças de pH, oxigênio, sais biliares, aumentando o tempo de viabilidade.

3.7.1 Alginato de sódio (material encapsulante)

O alginato de sódio é um biopolímero extraído de diferentes espécies de macro algas, principalmente algas marrons, tais como, *Laminaria hyperborea*, *Ascophyllum nodosum* e *Macrocystid pyrifera* (GOMBOTZ; WEE, 1998). Em 1883, o químico inglês E.C.C. Standford descobriu uma nova substância obtida da maceração de algas pardas, a qual nomeou “algin” (STANDFORD, 1883). No princípio, este termo foi utilizado para designar a substância *in situ* na planta, posteriormente, este termo foi diferenciado em ácido algínico, alginatos solúveis e compostos algínicos em geral.

O método convencional de encapsulação com o alginato de sódio em cloreto de cálcio (CaCl₂) tem sido utilizado para encapsular *L. acidophilus* para proteger esse microrganismo das condições ácidas do fluido gástrico. Estudos têm demonstrado que o sistema cálcio-alginato encapsulando culturas celulares protege de maneira mais efetiva, demonstrado pelo aumento da sobrevivência de bactérias em diferentes condições, do que as culturas não encapsuladas.

O alginato de sódio é o polímero mais utilizado na microencapsulação de células bacterianas (RAMAKRISHNA; PRAKASHAM, 1999). Como a formação do gel ocorre rapidamente na presença de íons cálcio, sem alterações drásticas de temperatura, pH e pressão osmótica, a atividade e a viabilidade dos microrganismos microencapsulados são conservadas quando empregado o alginato (CARVALHO et al., 2006). O alginato apresenta vantagens como, por exemplo, não ser tóxico; não interagir com o microrganismo; ser compatível com o cloreto de cálcio, componente indispensável à rigidez das microcápsulas; não afetar a viabilidade das bactérias encapsuladas durante sua vida-útil; e possibilitar a liberação das células imobilizadas, através da solubilização e sequestro dos íons cálcio presentes nas cápsulas do gel. Além disso, apresenta também baixo custo, grande disponibilidade no mercado, possibilidade de emprego em escala industrial e aceitação da substância como aditivos na produção de alimentos (CHAMPAGNE et al., 2000; SHAH, 2000; SHEU; MARSHALL, 1991).

Testes de resistência do gel com diversos agentes geleificantes como pectato, κ-carragena, goma gelana e ágar demonstraram que alginatos formam um gel mais firme, com boa estabilidade mecânica e fácil liberação da bactéria encapsulada quando suspensa em tampão alcalino (NICETIC et al., 1999). Do mesmo modo, pesquisas referentes à microencapsulação de bactérias probióticas indicaram que a encapsulação das células com gel de alginato resulta em um aumento de 80 a 95 % na sobrevivência dos probióticos utilizados (JANKOWSKI et al., 1997; KRASAEKOOPT et al., 2003; SHEU; MARSHALL, 1991; SHEU et al., 1993).

Em termos moleculares, o alginato é um polímero linear composto de dois blocos principais formados por unidades de ácido manurônico (M) e ácido gulurônico (G) unidos por

ligações glicosídicas (1,4) podendo variar em composição e sequência, dependendo da alga de origem (Figura 1) (ZHANG; CHENG; YING, 2006).

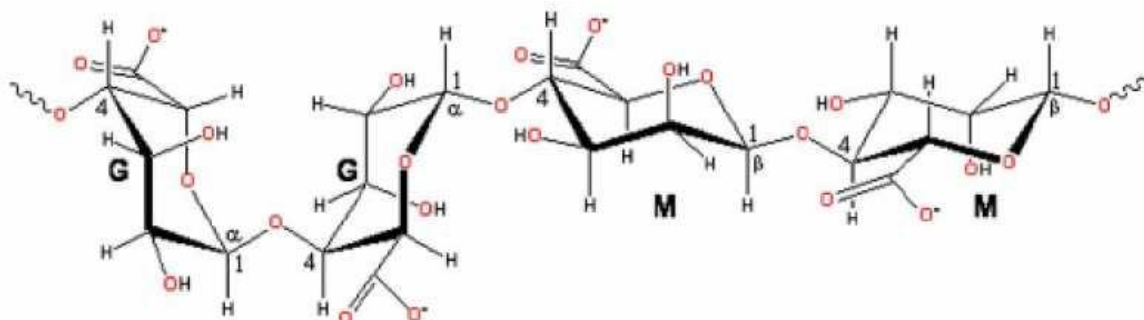


Figura 1. Estrutura química do alginato (G é o grupo ácido gulurônico, M é o grupo ácido manurônico).
Fonte: Souza Junior (2006).

3.8 Caracterização das Micropartículas

Inúmeras técnicas de microscopia podem ser utilizadas na análise de microestrutura para a otimização das propriedades das micropartículas para o desenvolvimento de produtos. Porém, uma das mais rotineiramente empregadas no estudo da microencapsulação é a Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (NIELSEN *et al.*, 2007). Em geral, as principais técnicas de caracterização utilizadas para este propósito são: avaliação morfológica via microscopia ótica e eletrônica, para avaliar a estrutura geral, externa e interna; análise térmica de calorimetria exploratória diferencial (DSC), para avaliar a estrutura fina e a interação da casca com o núcleo; análise do tamanho das partículas, para avaliar o tamanho e distribuição das partículas; testes de dissolução em água, permeabilidade, bem como a estabilidade mecânica, incluindo a elasticidade e compressão (ROSISKI *et al.*, 2002; SANTOS *et al.*, 2005; FAVARO-TRINDADE *et al.*, 2008).

A morfologia das microcápsulas, distribuição de tamanho, retenção de núcleo, dissolução, cor e foto estabilidade são parâmetros fundamentais que devem ser investigados quando sistemas microparticulados são desenvolvidos. Diferentes estudos que abordam o desenvolvimento e caracterização de microcápsulas demonstraram que os parâmetros citados acima interferem diretamente com o perfil de estabilidade e liberação do material encapsulado (YAMAMOTO *et al.*, 2002).

As microscopias eletrônicas de varredura (MEV) ou de transmissão (MET) têm sido muito empregadas na obtenção de informações relativas à estrutura interna e externa das micropartículas, a forma e ao tamanho das micropartículas (HORISAWA *et al.*, 2002). Muitas das propriedades de um sistema microparticulado é resultado de sua estrutura. A retenção e a proteção destes materiais em um produto microparticulado estão, relacionados, com a porosidade e o grau de integridade das micropartículas (ROSENBERG *et al.*, 1985). A MET pode permitir também a diferenciação entre micropartículas e microesferas, possibilitando, inclusive, a determinação da espessura da parede das partículas (MOSQUEIRA *et al.*, 2000).

A microscopia é um instrumento útil para monitorar o desenvolvimento e a produção de microcápsulas (ALLAN-WOJTAS *et al.*, 2008), sendo vital para caracterizar externamente a estrutura e o arranjo molecular da amostra (JOBIN *et al.*, 2005). Rosenberg *et al.* (1985) indicaram que a importância da microscopia eletrônica nos estudos de microencapsulação,

seria a verificação da atuação dos revestimentos empregados, da sua funcionalidade, da massa das microcápsulas, além de outras imperfeições na matriz polimérica.

Kim et al. (2005) verificaram através da MEV que microcápsulas liofilizadas de *Lactobacillus acidophilus* apresentavam tamanho 75 nm, forma esférica e superfície rugosa.

A interpretação da MEV é, porém, intrinsecamente subjetiva e exige um trabalho extensivo. No entanto, esta complexibilidade é necessária para a obtenção de um método quantitativo veloz e confiável (NIELSEN et al., 2007).

A distribuição do tamanho da partícula, normalmente é determinada por difratometria laser após dispersão com água. De forma geral, as micropartículas obtidas através de diferentes métodos, após a preparação apresentam uma distribuição uni modal, com um baixo índice de polidispersão (AVGOUSTAKIS *et al.*, 2002). A composição quali-quantitativa e o método de preparação das micropartículas são fatores determinantes do diâmetro médio e da polidispersão das partículas.

Segundo Ravi Kumar (2000), micropartículas podem ser definidas como partículas esféricas com tamanho entre 50 nm e 2 nm contendo uma substância como núcleo.

Ainda, é importante mencionar que a tendência à agregação e sedimentação das micropartículas, em função do tempo, pode ser monitorada pela determinação de mudanças na distribuição de tamanho de partículas (GUTERRES *et al.*, 1995).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Bactérias probióticas

Foram empregadas a cultura comercial, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB12 (Christian Hansen, Dinamarca) e um isolado do intestino de lactente de até duas semanas de idade, *Bifidobacterium J7*, que faz parte da coleção de culturas do Laboratório de Microbiologia do Departamento de Tecnologia de Alimentos da UFRRJ.

Neste estudo foi avaliada a viabilidade de cepas de bifidobactéria de origem humana e animal respectivamente *Bifidobacterium J7* e *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb12 livres e encapsuladas em alginato de sódio 3%, em condição controle (sem a adição de diferentes concentrações de mel) para avaliar a diferença entre os dois tratamentos (células livres X células encapsuladas), exposição ao SGA por 300 minutos das células livres e encapsuladas em condição controle e adição de mel a 15% e 50%.

As culturas estoque foram mantidas congeladas a -20°C em caldo MRS contendo glicerol como crioprotetor. No momento da sua utilização, as culturas após descongelamento, foram centrifugados a 6.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante descartado, sendo o *pellet* resuspenso em caldo MRS adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec®), e incubadas a $36^{\circ}\text{C}/24$ horas em jarra de anaerobiose utilizando sistema de geração de atmosfera anaeróbica por consumo do oxigênio por combustão, e adição de 5mL de ácido clorídrico (10%) (Vetec®) à 10g de carbonato de cálcio (Vetec®) para geração de CO_2 . As culturas de trabalho foram preparadas por ativação das culturas estoque através de três transferências sucessivas em caldo MRS adicionado de 0,05% de cisteína (Vetec®). Por ocasião da última transferência, 1,0mL da suspensão de células do crescimento anterior foi inoculado em tubo contendo 9,0 mL de caldo MRS, e incubado em anaerobiose por 24 horas em estufa a 37°C , estando a suspensão pronta para sua utilização.



Figura 2: Jarra de anaerobiose

4.2. Preparo das soluções de mel

Foi utilizado mel microbiotada *Silvestre* (Apiário Velodin, St. Abre Semente, Lima Duarte – MG). Preparou-se uma solução aquosa 50% p/v e posteriormente pasteurizada à 78°C por 6 minutos em banho maria utilizando frasco testemunho, conforme recomendado por Gonnet, Lavie e Louveaux, (1964). Esta solução foi posteriormente diluída com água destilada estéril para a concentração de 15% de mel.

4.3 Microencapsulação pela técnica de emulsão em alginato de sódio.

As culturas de trabalho foram preparadas conforme descrito em 4.1, e a suspensão celular da terceira repicagem foi transferida para tubos de Polipropileno do tipo Falcon® de 40 mL previamente autoclavados a 121°C por 15 minutos e a seguir centrifugados a 3.000 rpm por 10 minutos.

O sobrenadante foi descartado e feito a lavagem da biomassa celular duas vezes com solução salina peptonada 0,1% p/v, com posterior descarte do sobrenadante e centrifugação. A seguir a biomassa celular foi resuspensa em 10 mL de solução salina peptonada 0,1% e homogeneizado sobre agitação em vórtex, e microencapsulado como descrito a seguir:

4.3.1 Microencapsulação em alginato de sódio usando Tween 80 como emulsificante - condição controle.

O volume de 4 mL da biomassa celular de cada uma das bactérias foi transferido para tubo Falcon® de 40 mL. Foram adicionados 20 mL de alginato de sódio 3%, previamente esterilizado. Após homogeneização esta suspensão celular com alginato foi vertida, gota a gota, utilizando-se uma seringa de 20 mL, sobre Becker de 250 mL contendo mistura de 100 mL de óleo de girassol e 0,2 mL de Tween 80 (emulsificante), sob agitação magnética de 200 rpm.

Após agitação por 5 minutos, formou-se uma emulsão turva, a qual foi adicionada de 100 mL de solução 0,1M de cloreto de cálcio (Vetec®) resfriada a 4°C para o endurecimento das microcápsulas e quebra da emulsão. Esperou-se 20-30 minutos e depois esta emulsão contendo as microcápsulas foram transferidas para tubos Falcon® de 40 mL para serem lavadas 2 vezes com água destilada estéril, passando pelo processo de centrifugação a 3.000 rpm/10min.e posterior filtração em papel filtro do tipo Whatman nº1 e as microcápsulas foram colocadas em placas Petri estéreis e mantidas a 4°C por 10 horas para permitir completo endurecimento.

4.3.2 Microencapsulação em alginato de sódio usando Tween 80 como emulsificante e 8,3% ou 2,5% de Mel no revestimento

Foram feitos todos os procedimentos descritos no item 4.3.1, mas a suspensão celular foi preparada em solução aquosa 50% p/v de mel ou 15% p/v de mel, ao invés de solução salina peptonada 0,1 % p/v., sendo 4 mL desta suspensão celular adicionada a 20 mL de alginato de sódio 3%, (respectivamente 8,3% e 2,5% de mel na suspensão do polímero de alginato).

4.3.3: Esquema experimental do processo de emulsão o/a:

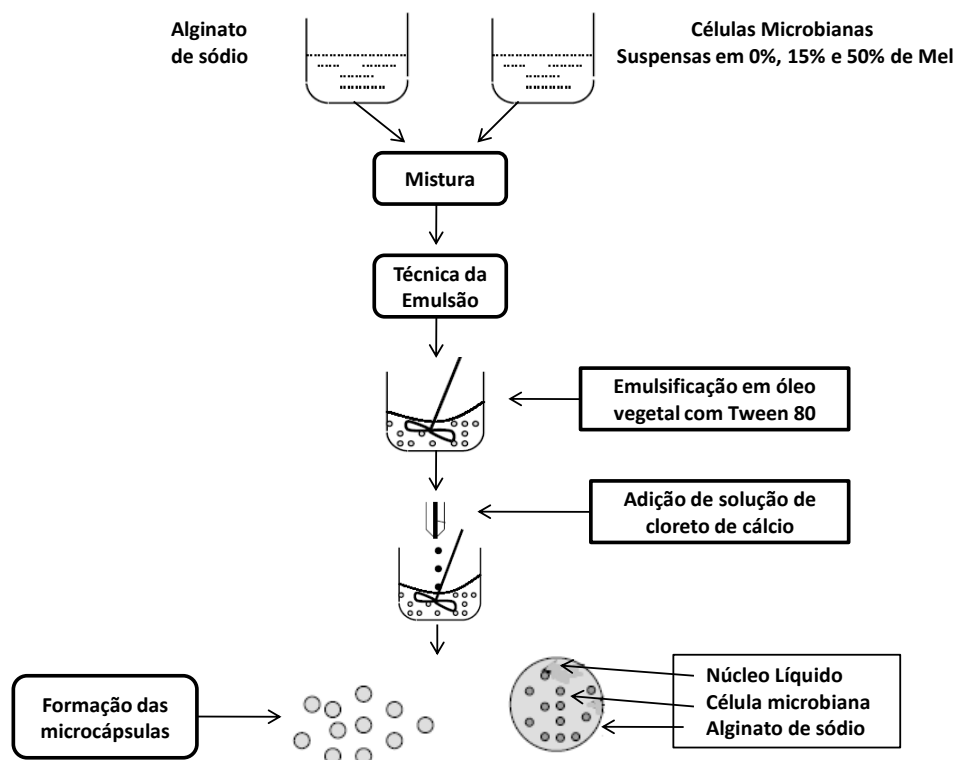


Figura 3: Esquema experimental do processo para a formação da microcápsulas de Alginato de sódio 3% utilizando o processo de emulsão o/a.

4.4 Enumeração das bactérias microencapsuladas.

Inicialmente as bactérias foram liberadas das microcápsulas através do sequestro dos íons cálcio com tampão fosfato ou solução de despolimerização. Um grama das microcápsulas encapsuladas foram transferidas para tubos contendo 9,0 mL da solução de despolimerização (28 mL de 0,2 M solução NaH_2PO_4 (Vetec®) e 72 mL de sol. 0,2 M Na_2HPO_4 (Vetec®) estéreis ajustadas a volume 200 mL de água destilada estéril, pH $7,1 \pm 0,1$) como sugerida por Sheu e Marshall (1993). Assim como a contagem das células livres, foi realizada transferindo-se de 1,0 mL das células em suspensão para 9,0 mL de água peptonada, para calcular a eficiência da microencapsulação.

Foi feito o plaqueamento de diluições sucessivas pela técnica da microgota que consiste em semear microgotas de 25 μL em duplicata em placas de Petri contendo Agar MRS (Himedia®) com 0,05% de cisteína (Vetec®). As placas foram incubadas sob anaerobiose a 36°C por 48 horas e as colônias de cada gota contadas com auxílio de lupa de um contador de colônias (Quebec®).

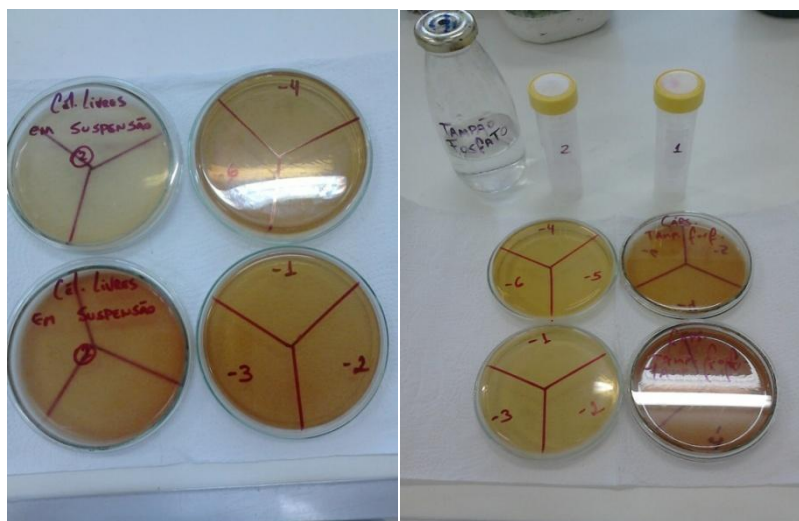


Figura 4: Plaqueamento de diluições seriadas de células livres e encapsuladas pelo método da microgota.

4.5 Eficiência da Encapsulação

Após a contagem foi calculado a eficiência ou o rendimento da encapsulação (RÉ, 1998), que mensura a taxa de sobrevivência do processo de imobilização, de acordo com Picot and Lacroix (2004) da seguinte forma:

$$\text{Eficiência da encapsulação (\%)} = \frac{\text{N}^\circ \text{ bactérias nas microesferas (UFC/g)}}{\text{N}^\circ \text{ bactérias adicionadas à suspensão (UFC/mL)}} \times 100$$

4.6 Resistência às Condições Gastrointestinais simuladas

A simulação das condições gastrointestinais foi realizada utilizando-se suco gástrico ácido e suco intestinal artificiais, que foram preparados segundo Picot e Lacroix (2004) e Mozzi et al. (2009) com modificações. O suco gastrointestinal base (SB) foi formulado com a seguinte composição por Litro: cloreto de cálcio (Vetec®), 0,11 g; cloreto de potássio (Vetec®), 1,12 g, cloreto de sódio (Vetec®), 2,0 g e hidrogenofosfato de potássio (Vetec®), 0,4 g. A seguir foi esterilizado a 121°C/15 min.

4.6.1 Sobrevivência das células livres e encapsuladas frente às condições gástricas

Para obtenção do suco gástrico artificial, imediatamente antes da utilização o suco gastrointestinal base (SB) foi adicionado de mucina (Sigma®) (3,5 g/L) e pepsina (Sigma®) (0,26g/L) de origem suína e o pH ajustado para 2,0 com HCl (0,5 mL) 1N.

Tubos de ensaio contendo 20 mL de solução de suco gástrico artificial foram adicionados de 2 g de cada tipo de microcápsulas (sem mel, com 8,3% e 2,5% de mel no revestimento) ou 2 mL de células livres em suspensão (*ca* 10¹⁰ cél./ mL). Seguiu-se incubação sob leve agitação (200 rpm) em shaker (Certomat^R BS-1, Speed-120, B. Braun Biotech, International, Sartorius Group) à 37 °C. A contagem das células livres e encapsuladas foi feita inicialmente (tempo zero) e após 60 minutos. A viabilidade das células livres e as células nas microcápsulas foram realizadas por plaqueamento de diluições seriadas (até 10⁻⁷), conforme descrito em 4.3.



Figura 5: Agitação das células livres e encapsuladas em SGA em leve agitação no shaker

4.6.2 Sobrevivência das células livres e encapsuladas frente às condições no intestino

Após avaliação da viabilidade dos probióticos durante a exposição às condições gástricas, adicionou-se a cada tubo contendo 20 mL do suco gástrico artificial, 3g/L de solução aquosa estéril de sais biliares (Oxgall, Oxoid, Basingstoke, GB) e 1,95 g/L de solução de pancreatina (Sigma-Aldrich®), obtida de pâncreas suíno, preparada usando suco intestinal base (SB) e o pH ajustado para 7,0 com solução de bicarbonato de sódio 1N – 1 mL (Vetec®).

O conteúdo dos tubos foi misturado suavemente e incubados em shaker a 37 °C, sob leve agitação a 200rpm por até 300 minutos. As contagens das células livres e encapsuladas foi feita decorridas 180 e 300 minutos, coletando-se alíquotas de 1 mL seguida de diluições seriadas (até 10^{-7}) e plaqueamento, conforme descrito em 4.3. As células microencapsuladas sofreram tratamento de despolimerização adicionando-se inicialmente 9 mL de solução de despolimerização, para posterior diluição e plaqueamento.

- **Solução de pancreatina:** 5 mL solução de pancreatina a 78g/L, pesando 0,39 g de pancreatina em 5 mL do suco gastrointestinal base (SB). Foi utilizado tubos com rosca previamente esterilizados. Utilizou-se 0,5 mL desta solução para 20 mL SB.
- **Solução de bile:** 10 mL solução 150g/L de sais biliares, pesando 1,5 g de sal biliar em água destilada e esterilizar por filtração. Foi utilizado tubos com rosca previamente esterilizados. Utilizou-se 0,4 mL desta solução para 20 mL SB.



Figura 6: Micropipetas (1.000 e 100 µl)

4.6.3 Esquema experimental da simulação das condições gastrointestinal

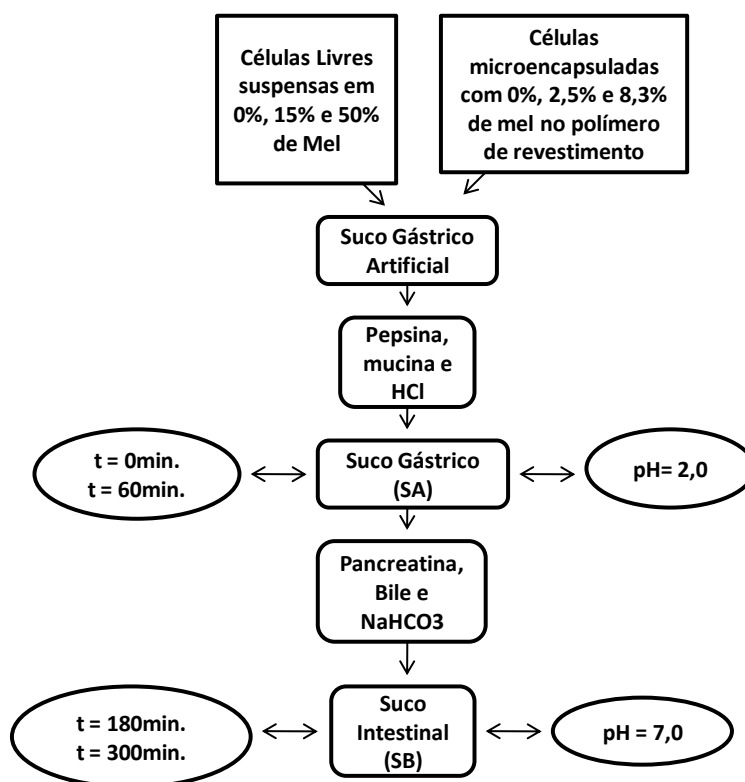


Figura 7: Simulação das condições gástrica e intestinal nos diferentes pHs e tempos de permanência das células livres e encapsuladas nas condições controle (sem adição de mel) e com adição de diferentes concentrações de mel.

4.7 Liofilização

As cápsulas de Alginato de sódio, nas formas de controle, sem adição de mel e as cápsulas com adição de diferentes concentrações de mel passaram pelo processo de liofilização (Liobras, modelo L101, São Carlos-Sp, Brasil), as quais foram congeladas em nitrogênio líquido para um congelamento rápido, não havendo assim a formação de cristais de gelo, os quais poderiam causar o rompimento da parede celular dos microrganismos, levando a perda da sobrevivência dos mesmos, para posterior caracterização das micropartículas pelo processo de Microscopia Eletrônica de Varredura.



Figura 8: Células livres em suspensão e encapsulada liofilizadas

4.7 Caracterização das Micropartículas:

A caracterização da morfologia, tamanho, permeabilidade, determinação da espessura da parede das partículas e estabilidade das micropartículas foram feitos através de microscopias eletrônica de varredura (MEV, TM 3.000, Hitachi, Japão) usando a fita autoadesiva de carbono.

O diâmetro das micropartículas foi analisado com Software Image J (National Institutes of Health, Bethesda, MD).

4.8 Análise Estatística

Todos os resultados obtidos foram apresentados em valores de média \pm erro padrão. Para comparações com um único fator de variação, utilizou-se o teste ANOVA de uma via. Já para grupos submetidos à interferência simultânea de dois fatores de variação, os dados foram analisados por ANOVA de duas vias. Para detectar diferenças significativas entre os grupos, as análises estatísticas foram submetidas ao teste Tukey. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando os valores de $p < 0,05$. Vale destacar que o software GraphPad Prism 6 (La Jolla, CA, EUA) foi utilizado para todas as análises estatísticas.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Um microrganismo para ser considerado probiótico deve atender a uma série de requisitos, sendo a viabilidade um dos principais. As células viáveis do(s) probiótico(s) devem estar presentes em concentrações mínimas exigidas até o momento do consumo. Lankaputhra, Shah e Britz (1996a) e Samona e Robinson (1991) sugerem que os alimentos ou suplementos contendo probióticos devem conter acima de 10^6 UFC/g durante todo o período de validade do produto. Outros autores sugerem que os produtos fermentados, no momento do consumo, devem conter no mínimo 10^6 UFC/mL células probióticas viáveis, devido à dose mínima terapêutica diária ser de 10^8 - 10^9 células viáveis em 100 g do produto fermentado. (GOMES; MALCATA, 1999).

5.1. Viabilidade das células livres de *Bifidobacterium* de origem humana e animal com diferentes concentrações de mel submetidas à exposição de SGA por 300 minutos.

O efeito do tratamento com mel em diferentes concentrações na viabilidade de células da cepa de *Bf. J7* (Figura 9A) e de *Bf. Bb12* (Figura 9B) livres em suspensão após exposição às condições gastrointestinais. Teve como resultado um aumento significativo ($P < 0,0001$) da viabilidade das células de ambas as cepas de *Bifidobacterium* submetidas às condições gastrointestinais quando em presença de mel.

Nos tratamentos controle, sem mel, a viabilidade de células de *Bf. J7* (Figura 9A) e de *Bf. Bb12* (Figura 9B) foi reduzida, em seis e cinco log UFC/mL, respectivamente após 300 minutos de exposição simulada da digestão gastrointestinal. O efeito protetor de 15% e 50% de mel foi equivalente e resultou em apenas duas reduções decimais (RD) para ambas as cepas após 300 minutos de exposição às condições gástricas, portanto ainda em número recomendado para que desempenhe efeito probiótico, *ca* 10^6 mL⁻¹. Os resultados obtidos nesta pesquisa corroboram com o encontrado por Chick, Shin e Ustunol (2001), Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002) e Ustunol e Gadhi (2001) que verificaram aumento do crescimento e atividade de bifidobactérias comerciais em leite, assim como capacidade de tolerar as condições do trato gastrointestinal simulado *in vitro* e sugeriu que estes efeitos tenham sido devidos à composição de hidratos de carbono e da mistura de oligossacarídeos presentes no mel.

De acordo com Macedo et al. (2008), considerando o período de estocagem de até 46 dias, o mel exerceu efeito positivo significativo ($P < 0,05$), sobre as culturas de *Bifidobacterium Bb-12*, diferentemente do que ocorreu com *Lactobacillus* ssp. A média geral do crescimento e da viabilidade das linhagens de *Bifidobacterium* foi significativamente maior ($P < 0,05$) comparada aos seus respectivos controles (sem mel), que passou de 8,12 log₁₀ UFC/mL no tempo zero para 7,63 após 46 dias de armazenamento nos cultivos com mel e de 6,71 a 6,11 log₁₀ UFC/mL nos cultivos sem mel. Resultados semelhantes foram também obtidos por Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002) que verificaram estímulo do crescimento de bifidobactérias em meio de cultura suplementado com 5% de mel por 48 horas de incubação a 37 graus sob anaerobiose. Esses autores relataram que houve aumento do crescimento das culturas suplementadas com mel.

Da mesma forma, Ustunol (2001), observou que a adição de 3% e 5% de mel em leites fermentados por *Bifidobacterium Bf-1* e *Bifidobacterium Bf-6* *Bifidobacterium infantis* (Rhone Poulenc Inc.) *Bifidobacterium bifidum*, aumentaram a taxa de crescimento durante a

Figura 9A

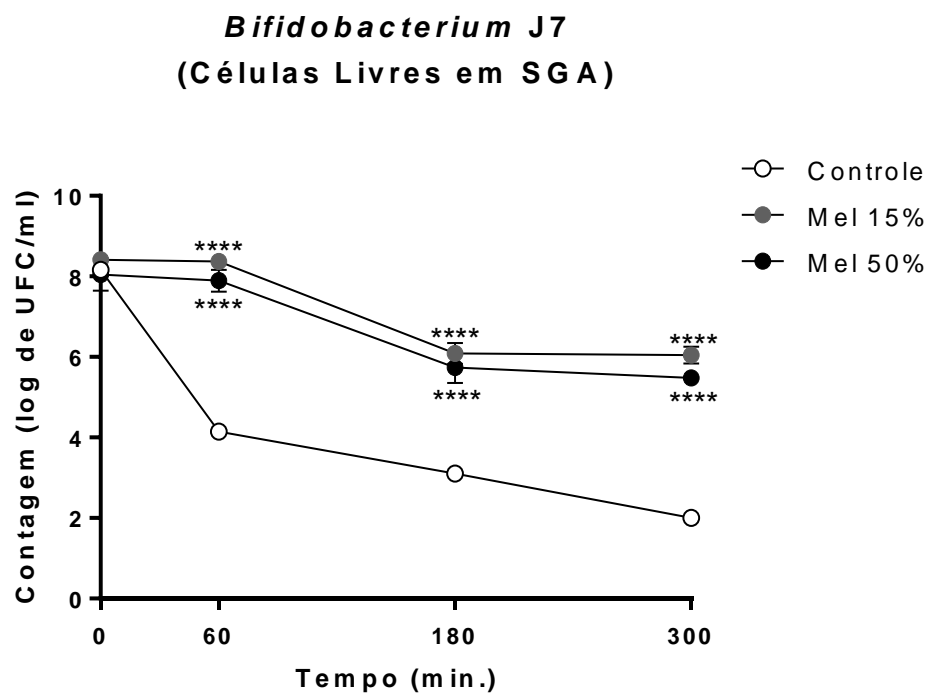


Figura 9B

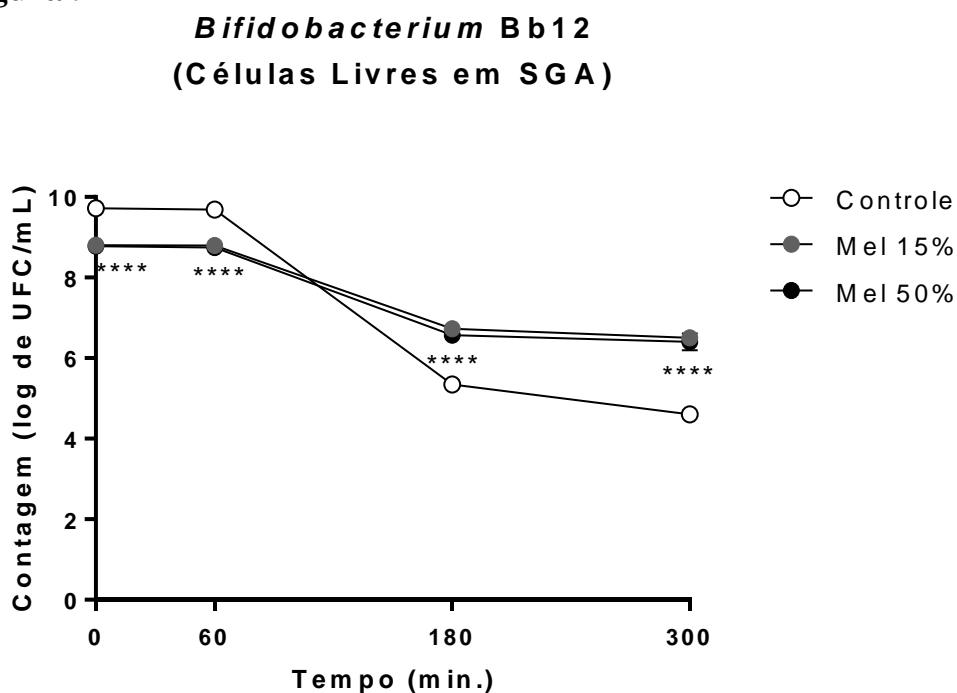


Figura 9: Avaliação do efeito do tratamento com mel em diferentes concentrações na viabilidade de *Bifidobacterium J7* e Bb12 após exposição às condições gastrointestinais simuladas por 60 min. a pH 2,0 e 180 e 300 min. a pH 7,0. ****, representa $P < 0,0001$ quando comparados à condição controle, sem mel.

fermentação e a viabilidade quando comparados com o produto sem mel ou adição de outros açúcares.

Conforme pode ser observado na Figura 9A, a cepa de *Bf. J7* foi mais afetada pela exposição ao SGA na condição controle (sem mel) comparada à *Bf. Bb12* (Figura 9B). Já em presença de mel a sobrevivência das duas cepas foi similar, não sendo observada diferença significativa entre ambas em nenhum dos tempos de exposição ao SGA ($P > 0,0001$).

5.2. Eficiência da encapsulação com alginato de sódio 3% e com adição de diferentes concentrações de mel

A microencapsulação pode ser utilizada como forma de proteger microrganismos probióticos em cápsulas de hidrocolóides, utilizando técnicas de extrusão e emulsão aumentando a viabilidade da célula em produtos e no TGI de 80-95% (KRASAEKOOPT et al, 2003), prolongando seu efeito no organismo (RÉ, 2000).

O resultado das contagens do número de células das duas cepas de *Bifidobacterium* livres e logo após a encapsulação com alginato de sódio a 3%, assim como a taxa de eficiência da encapsulação está demonstrado na Tabela 1. A adição de mel teve efeito diferente para as duas linhagens de *Bifidobacterium*. Enquanto a eficiência da encapsulação melhorou significativamente ($P < 0,05$) com a linhagem *Bf. J7* efeito contrario ocorreu com *Bf. Bb12* como consequência da adição de mel.

De acordo com os resultados obtidos, o número de células de *Bifidobacterium J7* encapsuladas obtidas a partir de uma suspensão contendo 8,7 log ufc/mL de células livres foi de 6,8 log ufc/mL, significativamente menor ($P < 0,0001$) pelo teste T Student. Foi verificado que o tratamento com diferentes concentrações de mel não alterou o número de células livres como mostrado na Tabela 1. No entanto, com células encapsuladas, foi observado que o mesmo tratamento resultou no aumento significativo da eficiência da encapsulação ($P < 0,0001$) que em presença de mel foi maior que 90%. Não foi detectada diferença significativa entre os tratamentos com 15 ou 50% de mel no revestimento.

De maneira similar ao que ocorreu com a cepa *Bf J7*, o tratamento com diferentes concentrações de mel não alterou as contagens de células livres de *Bf Bb12*. Diferentemente ao que ocorreu com a cepa de origem humana, *Bf. J7*, a eficiência da encapsulação de *Bf. Bb12* diminuiu significativamente ($P < 0,0001$) na presença de 15 e 50% de mel, passando de 99,5 para menos de 90% (Tabela 1).

O procedimento de microencapsulação obtido nesta pesquisa resultou em eficiência elevada quando comparado ao encontrado por outros autores. Lacroix et al. (2008) verificou um máximo de 73% na eficiência da microencapsulação com alginato de sódio 3% (p/v), celulose nano cristalina e lecitina no lugar de tween 80, sendo que a eficiência reportada para os controles com alginato de sódio sem adições foi de apenas 44%

Tabela 1: Valores médios das contagens do número de células livres e encapsuladas em alginato de sódio 3% com diferentes concentrações de mel das cepas de *Bifidobacterium J7* e de *Bifidobacterium BB12*.

<i>Bifidobacterium J7</i>			
Tratamento	Células Livres (log UFC/mL)	Células Encapsuladas (log UFC/g)	Eficiência do encapsulamento (%)
Controle (sem mel)	8,72 ± 0,08 ^a	6,77 ± 0,01 ^{a*}	77,7%
Mel 15%	9,07 ± 0,21 ^a	8,50 ± 0,13 ^b	93,7%
Mel 50%	8,67 ± 0,15 ^a	8,47 ± 0,10 ^b	97,7%
<i>Bifidobacterium Bb12</i>			
Controle (sem mel)	9,78 ± 0,02 ^a	9,73 ± 0,02 ^{a*}	99,5%
Mel 15%	9,75 ± 0,03 ^a	8,53 ± 0,10 ^b	87,5%
Mel 50%	9,77 ± 0,01 ^a	8,69 ± 0,02 ^b	88,9%

Médias de três repetições realizadas em ocasiões diferentes.

*Letras diferentes na mesma coluna são significativamente diferentes ($p < 0,05$) quando comparada com seu respectivo controle no teste Tukey.

A microencapsulação de microrganismos probióticos, confere proteção frente a baixos valores de pH, altas concentrações de sais biliares, além de serem empregados para aumentar a estabilidade física do microrganismo durante o processamento, assim como, componentes protetores podem ser incorporados na microcápsula, aumentando assim a sobrevivência das células durante o processamento e armazenamento (SUNNY-ROBERTS E KNORR, 2009; COOK et al., 2012).

Segundo Rosemberg; Kopelman; Talmon (1990), a natureza do material encapsulante é um dos principais fatores que influenciam a estabilidade dos compostos encapsulados.

5.3. Viabilidade das células microencapsuladas de *Bifidobacterium* de origem humana e animal com diferentes concentrações de mel submetidas à exposição de SGA por 300 minutos.

O número de células viáveis de *Bf. J7* e *Bf. Bb12* livres e encapsuladas sem adição de mel e com adição de 15 e 50% de mel foi avaliado inicialmente e após 60, 180 e 300 min. de exposição ao SGA (Figura 10).

5.3.1 Controles, sem mel

Segundo Hamilto-Miller, et al. (1999) e Kailasapathy (1997), as culturas probióticas podem não sobreviver em número suficientemente alto quando submetidas a determinadas condições, como por exemplo, o armazenamento em baixas temperaturas e a passagem pelo trato gastrointestinal humano. Para tentar minimizar este tipo de problema pode-se empregar o uso de probióticos liofilizados e/ou microencapsulados (SANDHOLM et al.. 2002; SHAH et al., 1995).

Na condição controle, sem mel (Figura 10A) houve diferença significativa ($P < 0,0001$) entre as contagens de células livres e microencapsuladas em todos os tempos de exposição ao SGA com as duas cepas avaliadas.

Após 180 e 300 min. de exposição o número de células livres foi significativamente inferior comparada às células encapsuladas. A redução da viabilidade celular ocorrida no tempo zero e após 300 min. de exposição ao SGA em relação às células livres foi mais acentuada com *Bf. J7*, de 6,2 reduções decimais (RD) contra 5,0 para Bb12. Diferentemente, quando as células foram encapsuladas, a redução da viabilidade foi maior para a cepa Bb12. Os valores de RD foram de 1,81 para *Bf. Bb12* contra 0,86 para *Bf. J7* (Figura 10A). Esta redução foi menor que a relatada por outros autores. Lorez (2009) observou reduções de 3,72 ciclos log na viabilidade das células livres de *Lactobacillus acidophilus* após 3h de incubação em pH 2,0. Neste período, as células microencapsuladas por emulsificação com alginato sofreram redução de 2,48 ciclos log. Segundo Lorez (2009) as células livres e microencapsuladas de *Lactocacillus acidophilus* com alginato e sódio foram expostas a diferentes concentrações de sais de bile por seis horas. A viabilidade das células livres foi afetada pela concentração de 1,0% de bile, apresentando redução significativa ($P < 0,05$) de 1,63 ciclos log em 6h de incubação. A microencapsulação protegeu as células probióticas, melhorando a sua sobrevivência, apesar das células microencapsuladas por emulsão apresentarem redução significativa também ($p < 0,05$) de 0,77 ciclos log na viabilidade.

Os resultados de Lorez (2009) mostram que a microencapsulação por emulsificação melhoram a sobrevivência das células de *Lactocacillus acidophilus*, para todos os pHs analisados em relação as células livres. Estudos como o de Ding e Shah (2007) já haviam apontado que a imobilização em gel de alginato, através de diferentes técnicas de microencapsulação, pode ser eficiente no aumento da resistência da bactéria probiótica para baixos pHs.

Resultados semelhantes aos obtidos nesta pesquisa foram encontrados por Mandal et al. (2006) e Sultana et al. (2000) que relataram fraca redução na viabilidade de diferentes bactérias probióticas microencapsuladas por emulsificação em alginato quando expostas a 1,0% e 2,0% de sais de bile. Estudos como o de Ding e Shah (2007) já haviam apontado que a imobilização em gel de alginato, através de diferentes técnicas de microencapsulação, pode ser eficiente no aumento da resistência da bactéria probiótica em baixos pHs.

Segundo Lee e Heo (2000) e Oliveira (2006) o aumento da sobrevivência de bactérias probióticas microencapsuladas depende não só do material usado no revestimento, mas também do tipo de revestimento, da concentração do gel e do tamanho das micropartículas. O encapsulamento com alginato de sódio em cloreto de cálcio (CaCl_2) foi utilizado para encapsular *L. acidophilus* para proteger esse microrganismo das condições ácidas do fluido gástrico (HANSEN et al. (2002).

5.3.2 Com 15 e 50% de mel no revestimento

Diferentemente do observado com os controles sem mel em que houve diferença significativa em todos os tempos (Figura 10A), nos tratamentos com 15% de mel (Figura 10B), não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) nas contagens de células livres e microencapsuladas de ambas as cepas, após exposição ao SGA por 180 e 300 min.. Analisando as diferenças nas contagens entre células livres e encapsuladas nos diferentes

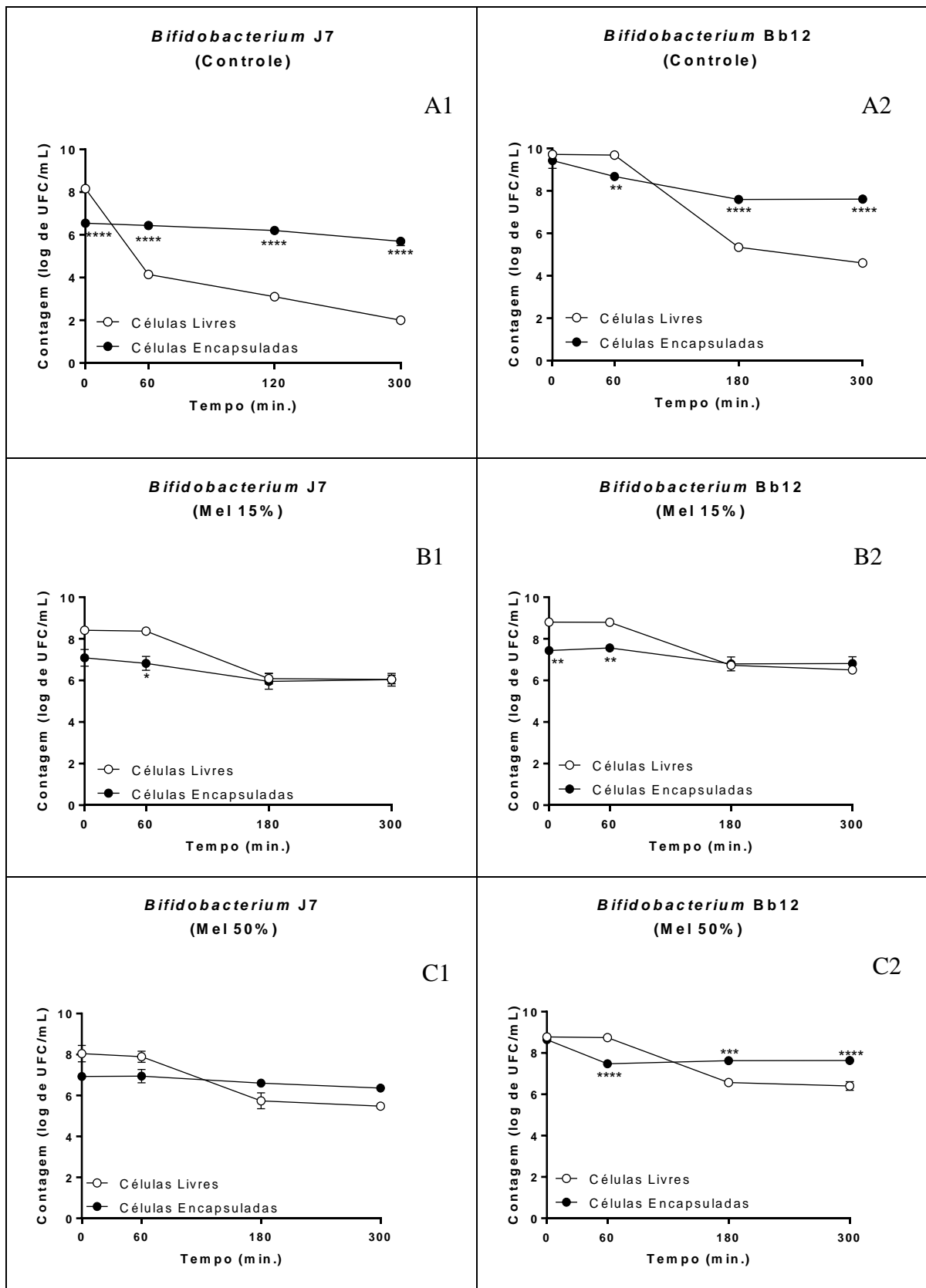


Figura 10: Viabilidade das células livres e encapsuladas de *Bifidobacterium J7* e *Bifidobacterium Bb12* submetidas à exposição de SGA por 60 min. a pH 2,0 e 180 e 300 min. a pH 7,0 e aos tratamentos controle (sem mel) e com 15% e 50% de mel

*, representa $p < 0,05$, **, representa $p < 0,01$, comparando células livres e encapsuladas.

tempos observa-se diferença significativa apenas no tempo de 60 minutos de exposição ao SGA, fase que simula as condições de pH 2,0 do estomago.

Desta maneira, o efeito protetor do mel foi equivalente ao da microencapsulação. Estima-se que além do efeito protetor devido aos sólidos presentes no mel, o seu conteúdo em açúcares redutores e compostos fenólicos antioxidantes, responsáveis pela manutenção do potencial de oxido redução em condições reduzidas, desempenha importante papel na proteção de células de *Bifidobacterium* por serem microrganismos anaeróbios. O efeito protetor do mel também foi reportado por Ustunol (2001).

Quando foram empregados 50% de mel na suspensão de bactérias bífidas (Figura 10C), foi verificado que não houve diferenças significativas ($P>0,05$) entre células livres em suspensão ou encapsuladas de *Bf J7* em nenhum dos tempos de exposição ao SGA e com cepa Bb12 houve diferença a partir de 60 minutos de exposição ao SGA. Entretanto o aumento na concentração de mel não resultou em maior proteção quando comparada com 15% de mel para as duas cepas de *Bifidobacterium*.

A combinação de prebióticos e probióticos tem sido sugerida em função dos efeitos sinérgicos, onde o crescimento de bifidobactérias no trato gastrointestinal é dependente da presença de carboidratos complexos, como os oligossacarídeos (SHAN, 2001). Além do efeito prebiótico também apresentam efeito protetor, como constatado nesta pesquisa.

Macedo et al. (2008) e Kajiwara, Gandhi e Ustunol (2002) reportaram aumento do crescimento das culturas de bifidobactérias em leite suplementado com 5% de mel após 48 horas de incubação a 37 graus sob anaerobiose.

Para Ustunol (2001), existe um efeito sinérgico entre os carboidratos do mel e a promoção do crescimento e atividade de bifidobactérias, semelhante aos que os oligossacarídeos (oligossacarídeos, fruto oligossacarídeos e inulina) promovem. Segundo Anjo (2004), o mel é um alimento funcional que exerce efeito prebiótico, favorecendo a regulação do trânsito intestinal, redução do risco de câncer, o crescimento, atividade e viabilidade de cepas comerciais de bifidobactérias.

O mel de abelha é considerado um produto prebiótico, que modificam o balanço da micromicrobiota intestinal, estimulando o crescimento e/ou atividade dos organismos benéficos, como as bactérias probióticas do cólon (SOUZA et al., 2003). Estes carboidratos não digeríveis, denominados “prebióticos” incluem lactulose, uma variedade de oligossacarídeos e inulina (CRITTENDEN, 1999). Oligossacarídeos não digeríveis ocorrem naturalmente em alimentos como frutas, leite e mel (TANNOCK, 1999).

Segundo Macedo et al. (2008), tanto o cultivo dos *Lactobacillus* spp. quanto de *Bifidobacterium* spp, independente de terem sido adicionados de mel, mantiveram-se viáveis com número mínimo exigidos pela legislação. Embora com crescimento absoluto menor que dos lactobacilos, o metabolismo das duas linhagens de bifidobactérias foi estimulado, mostrando resposta positiva frente ao mel.

Dessa forma, conclui-se que a seleção de linhagens específicas é de suma importância para a utilização em produtos probióticos. Esses dados corroboram aqueles relatados por Gomes, Malcata e Klaver (1998a) e Gomes, Teixeira e Malcata (1998b). Estes autores relataram que algumas espécies de bifidobactérias de origem animal são mais facilmente

cultivadas e podem resistir ao baixo pH como também a baixos níveis de oxigênio. Citam ainda que a *Bf. animalis* subsp. *lactis* é considerada uma das mais promissoras, pois possui boa tolerância ao oxigênio e ao ácido. Entretanto, nesta pesquisa, observou-se que mesmo cepas de origem humana podem apresentar resistência adequada ao baixo pH e a bile quando microencapsuladas ou protegidas por prebióticos como mel. Desta forma, recomenda-se a utilização de mel em alimentos probióticos como forma de proteção especialmente para as linhagens de origem humana.

5.4 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As microcápsulas preparadas com alginato de sódio 3%, sem adição de mel, condição controle e com adição de diferentes concentrações de mel em seu revestimento, após o processo de secagem por liofilização, foram observadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), que permitiu observar diferenças na aparência externa produzida pela técnica de microencapsulação por emulsão, tamanho e forma (Figuras 11 e 12).

Em geral, a análise morfológica das micropartículas liofilizadas mostrou uma superfície enrugada e irregular em todos os tratamentos estudados, devido às células encapsuladas dentro das partículas e à perda de teor de água durante o processo de liofilização. Assim como não houve diferenças em relação às microcápsulas com ou sem adição de diferentes concentrações de mel no seu revestimento.

De acordo com Man et al. (1999) o tipo de secagem influencia na estrutura dos grânulos de pó e quando obtidos por liofilização apresentam irregularidades, porque nas condições de operação do processo, a liofilização utiliza alto vácuo e baixas temperaturas, de modo que pressiona as partículas dos produtos, produzindo assim partículas com menor teor de umidade e maior tamanho (MAN et al., 1999; KAUSHIK e ROOS, 2007).

A parte interna das micropartículas foi construída por uma rede de alginato, e os grupos de bactérias foram distribuídos e sequestrados em espaços vazios, que está de acordo com os resultados de Allan-Wojtas et al. (2008).

Segundo Lorez (2009) as microcápsulas produzidas por emulsificação apresentam em sua maioria, formato elíptico e superfície não porosa contendo algumas bactérias ligadas, o que evidencia um revestimento pouco uniforme.

Segundo Rosenberg et al. (1993), reportado por Mukai-corrêa et al. (2004), a estrutura das microcápsulas pode estar relacionada à capacidade de proteção apresentada por diferentes biopolímeros, em que as indicações dessa capacidade são fornecidas pelo grau de integridade e porosidade das microcápsulas.

5.4.1 *Bifidobacterium J7*

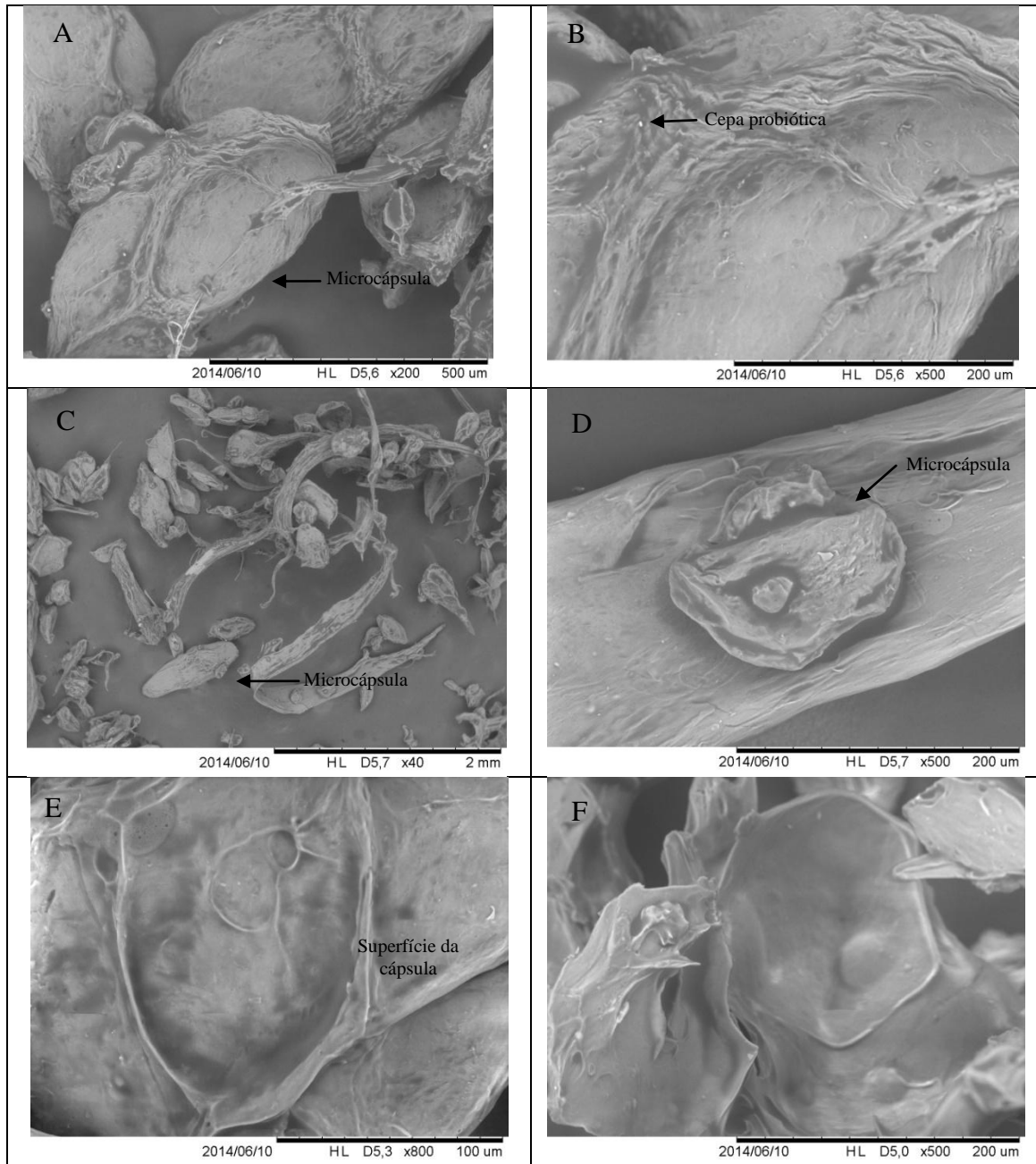


Figura 11: Micrografias das cápsulas de Alginato de sódio 3% contendo *Bifidobacterium J7* sem adição de mel no revestimento – condição controle (Figuras A, B), com adição de 2,5% de mel (Figuras C, D) e com adição de 8,3% de mel (Figuras E, F) no revestimento pela técnica da emulsificação.

5.4.2 *Bifidobacterium* Bb12 (Cristian Hansen)

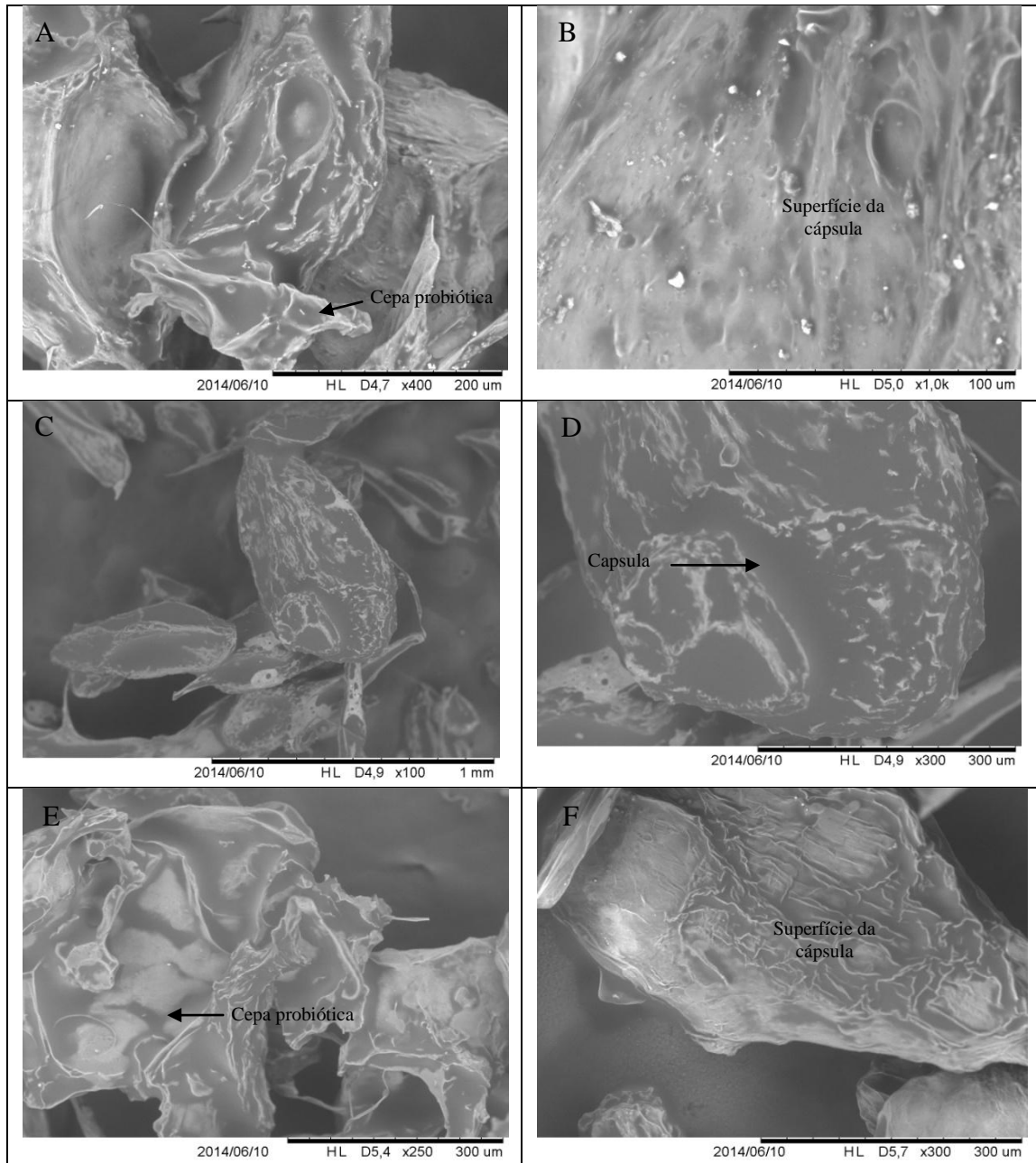


Figura 12: Micrografias das cápsulas de Alginato de sódio 3% contendo *Bifidobacterium* Bb12 sem adição de mel no revestimento – condição controle (Figuras A, B), com adição de 2,5% de mel (Figuras C, D) e com adição de 8,3% de mel (Figuras E, F) no revestimento pela técnica da emulsificação.

6. CONCLUSÕES

O procedimento de microencapsulação pelo método da emulsão com 3% de alginato de sódio permitiu manutenção da viabilidade após exposição a diferentes pHs, na simulação das condições gastrointestinais por 300 minutos de ambas as cepas de *Bifidobacterium* em números recomendados para atividade probiótica.

A eficiência da encapsulação da cepa *Bf J7*, de origem humana aumentou em presença de mel (>90%), mas diminuiu com a de origem animal, *Bf. Bb12* (<90%)

A utilização de 15% de mel para suspensão das culturas de *Bifidobacterium* resultou em efeito protetor equivalente ao da microencapsulação com 3% de alginato de sódio. O aumento da concentração de mel para 50% não resultou em melhoria na proteção as células.

Cepas de *Bifidobacterium* de origem humana podem apresentar resistência adequada ao baixo pH e a concentrações de bile e enzimas simuladas do trato gastrointestinal humano quando microencapsuladas ou protegidas por prebióticos como mel. Desta forma, recomenda-se a utilização de mel em alimentos probióticos como forma de proteção especialmente para as linhagens de origem humana.

A análise morfológica das micropartículas liofilizadas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) mostrou uma superfície enrugada e irregular em todos os tratamentos estudados, devido às células encapsuladas dentro das partículas e à perda de teor de água durante o processo de liofilização. Assim como não houve diferenças em relação às microcápsulas com ou sem adição de diferentes concentrações de mel no seu revestimento.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADAMSON, A. W. Physical chemistry of surfaces. **John Wiley e Sons**, New York. P.649, 1982.
- ALLAN-WOJTAS, P.; TRUELSTRUP HANSEN, L.; PAULSON, A.T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electronmicroscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 101-108, 2008.
- ALVIM, I. D. Produção e caracterização de micropartículas obtidas por Spray-dryind e coacervação complexa e seu uso para alimentação de larvas de peixes. **Tese de Doutorado, Campinas, Universidade Estadual de Campinas**, p. 243, 2005.
- AMIET-CHARPENTIER, C.; GADILLE, P.; DIGATS, B.; BENOIT, J.P. Microencapsulation and survival studies. **Journal of Microencapsulation**, v. 15, p. 639-659, 1998.
- ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45-54, 2005.
- ANAL, A.K.; STEVENS, W.F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 166-173, 2006.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotic for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and technology**. v.18, p. 240-251, 2007.
- ANJO, D. F. C.. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **J.Vasc. Br.**, v.3, n.2, 2004.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I. Desenvolvimento de butter Milk probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83-90, 2007.
- ARABBI, P. R.. Alimentos funcionais – aspectos gerais. **Nutrire Rev. Soc. Bras. Aliment. Nutr.**, v.21, p. 87–102, jun. 2001.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**. London, v. 10, n. 4, p. 413-435, 1993.
- AUDET, P.; LACROIX, C. E PAQUIM. Effect of agitation rate on cell release rate and metabolism during continous fermentations with entrapped growing. **Biotechnology Techniques**. v.6, p.26270, 1992.
- AVGOUSTEKIS, K.; BELETSI, A.; PANAGI, Z.; KLEPETSANIS, P.; KARYDAS, A.G.; ITHAKISSIOS, D.S. PLGA-mPEG nanoparticles of cisplatin: in vitro nanoparticle

degradation, in vitro drug release and in vivo drug residence in blood properties. **Journal of Controlled release**, v. 79, n. 1-3, p. 123-135, 2002.

AZEREDO, H.M.C.D. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v.16, n.1, p. 89-97, 2005.

BAKER, R. Controlled release of biologically active agents. **New York: John Wiley e Sons**, p. 206-214, 1986

BATYCKY, R. P.; HANES, J.; LANGER, R. E.; EDWARDS, D. A. A theoretical model of erosion and macromolecular drug release from biodegrading microspheres. **Journal of Pharmaceutical Science**, v. 86, p.1.464-1.477, 1997.

BHARDWAJ, S. B.; SHUKLA, A. J.; COLLINS, C. C. Effect of varying drug loading particle size distribution and drug release kinetics of verapamil hydrochloride microspheres prepared with cellulose esters. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 1, p. 71-81, 1995.

BIZZARIA, D. K.; FILGUEIRAS, C. T. Análise microbiológica de mel de abelha, consumido no município de Campo Grande-MS. **Hig. Alim.**, v. 17, p. 104-105, 2003.

BRANNON-PEPPAS, L. Polymers in controlled drug delivery. **Biomaterials**, v.11, p. 1-14, 1997.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada – RDC nº. 02, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. **Diário Oficial da União**, 09 jan, 2002.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA). Alimentos com Alegações de propriedades Funcionais e ou de saúde, Novos Alimentos/Ingredientes, Substâncias Bioativas e Probióticos, **IX – Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas**, 2008.

BRAZEL, C.S. Microencapsulation: Offering Solutions in the Food Industry. **Cereal Foods World**, v. 44, p. 388-393, 1999.

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

BUJALANCE, C. et al. Probiotic strain of *Lactobacillus plantarum* stimulates lymphocyte responses in immunologically intact and immune compromised mice. **International Journal of Food Microbiology**, v.113, p.28-34, 2007.

BUNGENBERG, J.; KRUT, H. R. Extension of the Theory of Complex Coacervation to ironical Disperse Systems. **Communicated at the Meeting**, 1935.

CAMPOS, G.; MODESTA, R. C. D. Diferenças sensoriais entre mel microbital e mel de melato. **Rev. Inst. Adolfo Lutz**, v. 59, n. 1-2, p. 7-14, 2000.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of cryoprotectants, prebiotics and microencapsulation on survival of probiotic organisms in yoghurt and freeze-yoghurt. **Food research International**, Amsterdam, v.39, n. 2, p. 203-211, 2006.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1261-1269, 2007.

CARVALHO, W.; CANILHA, L.; SILVA, S.S. Uso de biocatalisadores imobilizados: uma alternativa para a condução de bioprocessos. **Revista Analytica**, n.23, p. 60-70, 2006.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; DUGAL, F. Increasing the stability of immobilized *Lactococcus lactis* cultures stored at 4°C. **Journal of Industrial Microbiology**, Heidelberg, v. 13, n. 6, p. 367-371, 1994.

CHAMPAGNE, C.P.; BLAHUTA, N.; GAGNON, C. A vortex-bowl disk atomizer system for the production of alginate beads in a 1500-liter fermentor. **Biotechnology and Bioengineering**, v.68, p.681-688, 2000.

CHAMPAGNE, C.P.; Gardner, N.J.; Roy, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Crit Rev Food Sci Nutr**. v.45, p.61-84, 2005.

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

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

CHEN, K. N.; CHEN, M. J.; LIN, C. W. Optimal combination of the encapsulating materials for probiotic microcapsules and its experimental verification (R1). **Journal of Food Engineering**, Oxford. v. 76, n. 3, p. 313-320, 2006.

CHERBULIEZ, T. **The medicine from the bees**. CD-ROM, 2001.

CHERBULIEZ, T.; DOMEREGO R.L'apithérapie:médecine des abeilles. Bruxelles : Amyris, p. 255, 2003

CHICK, H.; SHIN, H. S.; USTUNOL, Z. Growth and acid production by lactic acid bacteria and bifidobacteria grown in skim milk containing honey. **Journal of Food Science**, v. 66, n. 3, p. 478-481, 2001.

CLARK, P. A.; MARTIN, J. H. Selection of *Bifidobacteria* for use as dietary adjuncts in cultured dairy foods: III – Tolerance to simulated bile of human stomachs. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 29, p. 18-21.

- CLYDESDALE, F. Functional foods: opportunities and challenges. In: Institute of Food Technologists, Knowledge center. Read IFT Publications. **Science Reports**. Expert Reports, 2005.
- COOK, M.T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v.162, p.56-67, 2012.
- CORREA, N. M.; CAMARGO JÚNIOR, B. C.; IGNÁCIO, R. F.; LEONARDI, G. C. Avaliação do comportamento reológico de diferentes géis hidrofílicos. **Rev. Bras. Cienc. Farm.**, v.41, n.1, p.73-78, 2005.
- COTRELL, I.W.; KOVACS, P. Handbook of water soluble gums and resins. **New York: Mc Graw Hill**, 1980.
- CRITTENDEN, R. Prebiotics. In **J. Tannock (Ed.), Probiotics: A critical review**. Norfolk, England: Horizon Scientific Press, 1999.
- CUI, J. H.; GOH, J. S.; KIM, P. H.; CHOI, S. H.; LEE, B. J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-L-lysine microparticles. **International Journal of pharmaceuticals**, Amsterdam, v. 210, n. 1-2, p. 51-59, 2000.
- CUPRARI, L. **Guia de nutrição clínica no adulto**. São Paulo: Manole, p.490, 2002.
- DEPYPERE, F. et al. Food powder microencapsulation: principles, problems and opportunities. **Applied Biotechnology Food Science Policy**, v. 1, n. 2, p. 75-94, 2003.
- DESAI, K. G., H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Philadelphia, PA, ETATS-UNIS: Taylor e amp; Francis**. p.34, 2005.
- DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERAD, G.; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **Journal of Applied Microbiology**, Oxford, v. 93, n. 6, p. 1003-1011, 2002.
- DESOBRY, S.A.; NETTO, F.M.; LABUZA, T.P. Comparison of Spray-drying, Drum-drying and Freeze-drying for β -carotene Encapsulation and Preservation. **Journal of Food Science**, v. 62, n. 6, p. 1158-1162, 1997.
- DINAKAR, P.; MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 77, n. 10, p. 2854-64, 1994.
- DING, W.K.; SHAH, N.P.; Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsuled probiotic bacteria. **Journal of Food Science**, v.72, n. 9, 2007.
- DZIEZARK, J. D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, Chicago, v. 42, n. 4, p. 136-151, 1988.
- EUROPEAN COMMISSION CONCERTED ACTION ON FUNCTIONAL FOOD SCIENCE IN EUROPE. Scientific concepts of functional foods in Europe: consensus document. **British Journal of Nutrition**, v.81, n.4, suppl.1, p.S1-S27, 1999.

FAO/WHO. Evaluation of health and nutritional properties of powder milk with live lactic bacteria. **FAO/WHO Expert Consultation**, 34p., Córdoba. Disponível em www.fao.org/es/esn/food/prebioreport_en.pdf.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenoles – A review. **Trends in Food Science e Technology**, v. In Press, Accepted Manuscript, 2010.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C.D.; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008, 2008.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 19, n. 4, p. 485-494, 2002.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk live lactic acid bacteria: report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation on Evaluation of Health and Nutritional Properties of Probiotics in Food Including Powder Milk with Live Lactic Acid Bacteria. Córdoba, 2001. Disponível em: <http://www.who.int/foodsafety/publications/fsmanagement/en/probiotics.pdf>.

FORSYTHE, J. S. **Microbiologia da Segurança Alimentar**. p.147-149,2002.

FRANCO, R. M.; OLIVEIRA, L. A. T.; CARVALHO, J. C.A. P.. Probióticos – Revisão. **Revista Higiene Alimentar**, São Paulo, v.20, n.142, julho. 2006.

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

FULLER, R.; Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v.66, p.365-378, 1989.

GAVA, J. A.; SILVA, B. A. C.; GAVA, R. J. **Tecnologia de Alimentos**, 2008.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food sciences and Nutrition**, v.50, n.3, p. 213-224, 1999.

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

- GIBSON, G.R. Prebiotics. **Best Practice e Research, Clinical gastroenterology**, v.18, n.2, p.287-298, 2004.
- GOMBOTZ, W.R.; WEE, S.F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 31, p. 267- 285, 1998.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X.; KLAVER, F. A. M. Growth enhancement of *Bifidobacterium lactis* Bo and *Lactobacillus acidophilus* Ki by milk hydrolyzates. **Journal of Dairy Science**, v. 81, n. 11, p. 2817-2825, 1998a.
- GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. And *Lactobacillus acidophilus*: biological, biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science e Technology**, v. 10, n. 4-5, p. 139-157, 1999.
- GOMES, A. M. P.; TEIXEIRA, M. G.; MALCATA, F. X. Viability of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in milk: sodium chloride concentration and storage temperature. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 22, n. 3, p. 221-240, 1998b.
- GONNET, M.; LAVIE, P.; LOUVEAUX, J. La pasteurization des miel. **Annals of Abeilles**, v. 7, p. 81-102, 1964.
- GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, London, v. 15, n. 7-8, p. 330-347, 2004
- GROBOILOT, A. F.; CHAMPAGNE, C. P.; DARLING, G. D.; PONCELET, D. E NEOFELD, R. J. Membrane formation by interfacial cross-linking of chitosan for microencapsulation of *Lactococcus lactis*. *Biotechnol. Bioeng.* V. 42, p.1157-1163, 1993.
- GUTERRS, S.S.; FESSI, H.; BARRATT, G.; DEVISSAGUET, J.P.; PUISIEUX, F. Poly (D,L-lactide) nanocapsules containing diclofenac: I. Formulation and Stability Study. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 113, n. 1, p. 57-63, 1995.
- HAMILTON--MILLER, J.M.T.; SHAH, S., WINKLER, J.T. Public health issues arising from microbiological and labeling quality of foods and supplements containing probiotic microorganisms. **Public Health Nutrition**, v.2, n.2, p.223-229, 1999.
- HANSEN, L. T.; WONJTAS, A. P. M.; JIW, Y. L.; PAULSON, A. T. Survival of Calcium alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. In: milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, London, v. 19, n. 1, p. 35-45, 2002.
- HEIDEEBACH, T.; FORST, P.; KULOZIK, U. Influence of Casein-based Microencapsulation on Freeze Drying and Storage of Probiotic Cells. **Journal of food engineering**, v. 98, p.309-316, 2010.
- HORISAWA, E.; KUBOTA, K.; TUBOI, I.; SATO, K.; YAMAMOTO, H.; TAKEUCHI, H.; KAWASHIMA, Y. Size-dependency of DL-lactide/glycolide copolymer particulates for intra-articular delivery system on phagocytosis in rat synovium. **Pharm Res**, v. 19, n. 2, p. 132-9, Feb, 2002.

HYNDMAN, C. L.; GROBOILLOT, A. F.; PONCELET, D.; CHAMPAGNE, C.P.; NEUFELD, R. J. Microencapsulation of *Lactococcus lactis* within cross-linked gelatin membranes. **Journal Chemistry Technology Biotechnology**, Sussex, v. 56, n. 3, p. 259-63, 1993.

HUANG, Y.; ADAMS, M.C. In vitro assessment of the upper gastrointestinal tolerance of potential probiotic dairy propionibacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 91, n. 3, p. 253– 260, 2004.

INFORME TÉCNICO FARMACÉUTICO. *Lactobacillus Casei*. **ISO/9001** – 2000

IYER, C. KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 70, n. 1, p. 18-23, 2005.

JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, London, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.

JANKOWSKI, T.; ZIELINSKA, M.; WYSAKOWSKA, A. Encapsulation of lactic acid bacteria with alginate/starch capsules. **Biotechnology Techniques**, v. 11, p. 31-34, 1997.

JOBIN, G.; GRONDIN, G.; COUTURE, G.; BEAULIEU, C. Microscopic Examination of Chitosan–Polyphosphate Beads with Entrapped Spores of the Biocontrol Agent, *Streptomyces melanosporo faciens* EF-76. **Microscopy and Microanalysis**, v.11, p.154-165, 2005.

KAILA, M.; ISOLAURI, E.; SOPPI, E.; VIRTANEN, E.; LAINE, S.; ARVILOMMI, H. Enhancement of the Circulating Antibody Secreting Cell Response in Human Diarrhea by a Human *Lactobacillus Strain*. **Pediatric Research**, U.S.A., v.32, n.2, 1992.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J.C. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunol Cell Biol**, v.78, p.80-88, 2000.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 39-48, 2002.

KAILASAPATHY, K.; MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 252-258, 2005.

KAJIWARA, S.; GANDHI, H.; USTUNOL, Z. Research Note: Effect of Honey on the Growth of and Acid Production by Human Intestinal *Bifidobacterium* spp.: An In Vitro Comparison with Commercial Oligosaccharides and Inulin. **Journal of Food Protection**, v. 65, n. 1, p. 214-218, 2002.

KAREL, M.; LANGER, R. Controlled release of food additives. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Flavor encapsulation. Washington, DC: ACS, p. 29-36, 1988.

- KAUSHIK, V.; ROOS, Y.H. Limonene encapsulation in freeze-drying of gum Arabic-sucrose-gelatin systems. *LWT – Food Science and Technology*, v. 40, n. 8, p. 1381-1391, 2007.
- KECHINSKI, P.C. Estudo de Diferentes Formas de Processamento do Mirtilo Visando à Preservação dos Compostos Antociânicos. **Tese de Doutorado**. Porto Alegre, 2011.
- KHALIL, A. H.; MANSOUR, E. H. Alginate encapsulation bifidobacteria survival in mayonnaise. *Journal of Food Science*, Chicago, v. 63, n. 4, p. 702-705, 1998.
- KHIDR, S. H.; NIAZY, E. M., EL-SAYED, Y. M. Development and in vitro evaluation of sustained-release meclofenamic acid microspheres. *Journal of Microencapsulation*, v. 15, n. 2, p. 153-162, 1998.
- KIM, Y. J.; PARK, H. G.; YANG, Y. L.; YOON, Y.; KIM, S. and OH, E. Multifunctional Drug Delivery System Using Starch-Alginate Beads for Controlled Release. *Biol. Pharm. Bull*, v.28, n.2, P. 394-397, 2005.
- KING, A.H. Encapsulation of food ingredients. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Encapsulation and controlled release of food ingredients. Washington, DC: ACS, p. 26-39, 1995. (ACS Symposium. Series, 590).
- KING, S. C.; OLSON, N. F. Production of methanethiol in milk fat-coated microcapsules containing *Brevibacterium* linens and methionine. *Journal of dairy Research*, New York, v. 56, n. 5, p. 799-811, 1989.
- KOLIDA, S., TUOHY, K., & GIBSON, G. R.. **Prebiotic** effects of inulin and oligofructose. *British Journal of Nutrition*, v.87 (Suppl 2), p.193–S197, 2002.
- KRASAEKOOPT, W.; BRANDARI, B.; DEETH, H. Evolution of Encapsulation Techniques of Probiotics for Yoghurt. *International dairy journal*, v.13, p.3-13, 2003.
- KWAK, N.S.; JUKES, D.J. The development of a regulatory concept. *Food Control. Functional Foods*, v.12, p.99-107, 2001.
- LACROIX, C.; PAQUIN, C.; ARNAUD, J.P. Batch fermentation with entrapped growing cells of *Lactobacillus casei*. Optimisation of the rheological properties of the entrapment gel matrix. *Applied Microbiology and Biotechnology*, v. 32, p. 403-408, 1990.
- LANKAPUTHRA, W.E.V., SHAH, N. P. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. *Cultured Dairy Products Journal*, v. 30, p. 2-7, 1995.
- LANKAPUTHRA, W. E. V.; SHAH, N.; BRITZ, M. Survival of *bifidobacteria* during refrigerated storage in presence of acid and hydrogen peroxide. *Milchwissenschaft*, v. 51, n. 2, p. 65-70, 1996b.

LEE, K. Y.; HEO, T. R. Survival of *Bifidobacterium longum* immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p 869-873, 2000.

LEITE, J. M. C. Determination of oligosaccharides in Brazilian honeys of different botanical origin. **Food Chemistry**, v. 70, n. 1, p. 93-98, 2000.

LINHARD, R. Biodegradable polymers for controlled release of drugs. In: Rosoff M. Controlled release of drugs: Polymers and aggregate systems. **VCH Publisher Inc.**, p. 53-85, 1988.

LOREZ, G.J. Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (LA-5) e aplicação em sorvete. Dissertação (Mestrado em Engenharia de Alimentos) – Curso de Pós-graduação em Engenharia de Alimentos. Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2009.

MADENE, A.; JACQUOT, M.; SCHERR, J.; DESOBRY, S. Flavor encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science e Technology**, v. 41, n. 1, p. 1-21, 2006.

MACEDO, N.L.; LUCHESE, H.R.; GUERRA, F.A.; BARBOSA, G.C. Efeito prebiótico do mel sobre o crescimento e viabilidade de *Bifidobacterium* spp. e *Lactobacillus* spp. em leite. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.28, n.4, p. 935-942, 2008.

MACK, D.R. et al. Extracellular MUC3 mucin secretion follows adherence of *Lactobacillus* strains to intestinal epithelial cells in vitro. **Gut**, v. 52, n.6, p.827-833, 2003.

MAN, Y.B.C.; IRWANDI, J.; ABDULLAH, W.J.W. Effect of different types maltodextrin and drying methods on physic-chemical and sensory properties of encapsulated durian flavor. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v.79, n.8, p.1075-1080, 1999.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus Casei* NCDC-298. **International Dairy Journal**, v.16, p.1190-1195, 2006.

MAPRIC. Probióticos *Lactobacillus Acidophilus*. São Paulo. www.mapric.com.br

MARTIN, A. N. Physical pharmacy: **Physical chemical principles in the pharmaceutical sciences**. Ed. Lea e febiger, USA, 1993.

MARTINS, B.T. Tecnologia de secagem preservam as características dos alimentos. **Revista Engenharia de Alimentos**, v.6, n.30, p 40-42, 2000.

MARTONI, C.; BHATHENA, J.; URBANSKA, A. M.; PRAKASH, S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. **Applied Microbiology Biotechnology**, v. 81, n. 2, p. 225–233, 2008.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p.173-182, 2002.

MATSUZAKI, T.; YAMAZAKI, R.; HASHIMOTO, S.; YOKOKURA, T. The Effect of Oral Feeding of *Lactobacillus Casei Strain Shirota* on Immunoglobulin e Production in Mice. **Journal of Dairy Science**, v.81, p.48-53, 1998.

MELO, E.A. Efeitos benéficos dos alimentos probióticos e prebióticos. **Revista de Nutrição Brasileira**. p.174-179. 2004.

MENEZES, C.R.; DURRANT, L.R. Xilooligossacarídeos: produção, aplicações e efeitos na saúde humana. **Ciência Rural**, v.38, p.587-592, 2008.

MESTDAGH, M. M.; ANEXELOS, M. A. V. Physic-chemical properties of polycarboxylate gel phase and their incidence on the retention/release of solutes. **Biopolymer science: Food and Non-food Applications**, p. 303-314, 1998.

MODLER, H. W.; VILLA-GARCIA, L. The growth of *Bifidobacterium longum* in a whey-based medium and viability of this organism in frozen yogurt with low and high levels of developed acidity. **Cultured Dairy Products Journal**, Washington, v. 28, n. 3, p. 4-8, 1993. *Braz. J. Food Technol.*, v. 11, n. 2, p. 103-112, abr./jun. 2008.

MOLAN, P. C.; BETTS, J. Using honey dressings: the practical considerations. **Nurs. Times**, v. 96, n. 49, p. 36-37, 2000.

MOLAN, P. C.. The antibacterial activity of honey: 2. Variation in the potency of the antibacterial activity. **Beeworld**, v.73(2), p. 59-76, 1992b

MOSQUEIRA, V.C.F.; LEGRAND, P.; PINTO-ALPHANDARY, H.; PUISIEUX, F.; BARRATT, G. Poly (D, L-lactide) Nanocapsules prepared by a solvent displacement process: Influence of the composition on physicochemical and structural properties. **Journal of pharmaceutical sciences**, v. 89, n. 5, p. 614-626, 2000.

MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S. H.; EHSANI, M. R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Journal of Biotechnology**, v. 5, n. 1, p. 1-18, 2007.

MOZAFARI, M.R.; KHOSRAVI-DARANI, K.; BORAZAN, G.G.; CUI, J.; PARDAKHTY, A.; YURDUGUL, S. Encapsulation of Food Ingredients Using Nanoliposome Technology. **International Journal of Food Properties**, v. 11, n. 4, p. 833-844, 2008.

MOZZI, F.; GERBINO, E.; FONT DE VALDEZ, G.; TORINO, M. I. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, n. 1, p. 56-64, 2009.

MUKAI-CORRÊA, R.; PRATA, A. S.; ALVIM, I. D.; GROSSO, C.R.F. Controlled release of protein from hydrocolloid gel microbeads before and after drying. **Current Drug Delivery**, v.1, n.1, p.265-273, 2004.

MUTHUKUMARASAMY, P.; HOLLEY, R. A. Microbiological and sensory quality of dry fermented sausages containing alginate microencapsulated *Lactobacillus reuteri*. **International Journal of Food Microbiology**, Utrecht, v. 111, n. 2, p. 164-169, 2006.

NAKANO, H. Recente Japanese Development in the Enzymatic Production and Application of Oligosaccharides. **Apresentado no seminar on Enzyme and Bacterial technology**. Campinas, Japan International Cooperation Agency, (s.d.), 1998.

NICETIC, M.; KAILASAPATHY, K.; TARASOFF, L.. Mechanical stability of food gum gels for immobilization of probiotic bacteria. The 8th Intl. Workshop on Bioencapsulation: **Recent progress in research and Technology**, Norway, Sept. p.13-15, Abstract,1999

NIELSEN, A.F.; BERTELSEN, P.; KRISTENSEN, H.G.; HOYGAARD, L. Helium pycnometry as a tool for assessment of sealing efficiency in microencapsulation. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, In Press, 2007.

NÓBREGA, L. O. Estudo de Meio de Crescimento e Adaptação da Técnica de Coacervação Complexa para Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis* Bb-12. **Tese (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos)** – Universidade Estadual de Londrina, Londrina-PR, 2005.

O'FLAHERTY, S.; KLAENHAMMER, T.R. The role and potential of probiotic bacteria in the communication between gut micromicrobiota and gut/host. **International Dairy Journal**, v.20, p.262-268, 2010.

OLIVEIRA, A.C. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. Ribeirão Preto,2006.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S.; BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.;FREITAS,O.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated B. lactis (BI 01) and L. acidophilus (LAC4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, London, v. 24, n. 7, p. 685-693, 2007a.

O'RIORDAN, K.O.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a Bifidobacterium strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p.1059-1066, 2001.

OUWEHAND, A.; SALMINEN J. The health effects of culture milk products with viable and non viable bacteria. **International Dairy Journal**, v.8, p.749-758, 1998.

PASSOS, L. M. L.; PARK, Y. K. Frutooligosacarídeos: implicações na saúde humana e utilização em alimentos. **Rev. Ciência Rural**, Santa Maria, v. 33, n. 2, mar./abr. 2003.

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

RAMAKRISHNA, S.V.; PRAKASHAM, R.S. Microbial fermentations with immobilized cells. **Current Science**, v.77, p.87-100, 1999.

RAO, A. V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Institute of Food Science and technology journal**, Ottawa, v. 22, n. 4, p.345-49, 1989.

RAVI KUMAR, M.N. Nano and microparticles as controlled drug delivery devices. **Journal of Pharmacy e Pharmaceutical Sciences**, v. 3, n. 2, p. 234-258, 2000.

REÍ, M.I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technol.**, v.16, p.1195-1236, 1998.

REÍ, M.I. Microencapsulação em busca de produtos “inteligentes”. **Ciência Hoje – Revista de divulgação científica da sociedade brasileira para o congresso a ciência**, São Paulo, v. 27, n. 162, p. 24-29, jul. 2000.

REID, G. Investigation of the properties of *Lactobacillus acidophilus* NCFM as a possible probiotic for the urogenital tract. **Inter. Dairy J.** v. 10, p. 415-419, 2000.

ROBERFROID, M.B. Functional food concept and its application to prebiotics. **Dig Liver Dis.**, v.34, p.105-110,2002.

ROBERFROID, D.M.B. Prebiotics and probiotics: are they foods? **Am. J. Clin. Nutr.**, v.71, supl., p.1682-1687, 2000.

ROSEMBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. A Scanning Electron Microscopy Study of Microencapsulation. **Journal of Food Science**, v. 50, n. 1, p. 139-144, 1985.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J.; TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 38, p. 1288-1294, 1990.

ROSISKI, S.; GRIGORESCU, G.; LEWISKA, D.; RITA; EACUTE; N, L.G.; VIERNSTEIN, H.; TEUNOU, E.; PONCELET, D.; ZHANG, Z.; FAN, X.; SERP, D.; MARISON, I.; HUNKELER, D. Characterization of microcapsules: recommended methods based on round-robin testing. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 641-659, 2002.

ROSS, R. P., DESMOND, C., FITZGERALD, G. F., STANTON, C. Overcoming the technological hurdles in the development of probiotic foods. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, n.6, p. 1410–1417, 2005.

RYBAK-CHMIELEWSKA, H. Honey. In: TOMASIK,P. (Ed.) Chemical and functional properties of foodsaccharides. **Boca Raton: CRC Pres**, p. 440, 2004.

SAAD, S.M.I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.42, p.1-16, 2006.

SALMINEM, S.; VON WRIGHT, A. Lactic Acid Bacteria. **Marcel Dekker, Inc.**, New York, 1993.

SAMONA, A.; ROBINSON, R. K. Enumeration of bifidobacteria in dairy products. **Journal of the Society of Dairy Technology**, v. 44, n. 3, p. 64-66, 1991.

SÁNCHEZ, B.; REYES-GAVILÁN, C.G.; MARGOLLES, A.; GUEIMONDE, M. Probiotic fermented milks: present and future. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, n.4, p.472-483, 2009.

SANDERS, M. E. Overview of functional foods: emphasis on probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 8, n. 5/6, p. 341-347, 1998.

SANDERS, M. E.. Effect of consumption of lactic cultures on human health. **In J. Kinsella (Ed.), Advances in food and nutrition research**. San Diego, CA: Academic Press,1993

SANDERSON, G.R. Gums and their use in food systems. **Food Technol.**, v. 50, n. 3, p. 81-84, 1996.

SANDHOLM, M.T.; MYLLEINEN, P.; CRITTRNDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDO, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, n.12, p.173-182, 2002.

SANTOS, A. B.; FERREIRA, V. P.; GROSSO, C.R. F. Microcápsulas: Uma alternativa viável. Microencapsulação de produtos sensíveis à oxidação óleo-resina de páprica. **Biotecnologia, ciência e Desenvolvimento**, v 16, n.3, p. 26-30, 2000.

SANTOS, A.B.D.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 322-326, 2005.

SCHIFFRIN, E. J.; ROCHAT, F.; LINK-AMSTER, H.; AESCHLIMANN, J. M. e DONNET-HUGHES, A. Immunomodulation of human blood cells following the ingestion of lactic acid bacteria. **Journal of Dairy Science**, v.78, p. 491–497, 1995.

SHAH, N.P.; RAVULA, R.R. Microencapsulation of probiotic bacteria and their survival in frozen fermented dairy desserts. **Australian Journal Dairy Technology**, v.55, p.139-144, 2000.

SHAH, N.P.; LANKAPUTHRA, W.E.V.; BRITZKYLE, M.L.;KYLE, W.S.A. Survival of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium bifidum* in commercial yoghurt during storage. **International Dairy Journal**, v.5, p.515-521, 1995.

SHAH, N. P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival In Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, Champaign, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAN, N.P. Functional foods from probiotics. **Food Technol.**, v.55, n.11, p. 46-56, 2001.

SHARIDI, F. HAN, X.-Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Improving culture viability in frozen dairy desserts by microencapsulation. **Journal Dairy Sci.** v.74, p. 107-111, 1991.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microentrapment of Lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, Chicago, v. 54, n. 3, p. 557-561, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T.; HEYMANN, H. Improving survival of culture bacteria in frozen desserts by microentrapment. **Journal of dairy Science**, Champaign, v. 76, n. 7, p. 1902-1907, 1993.

SHORTT, C. The probiotic century: historical and current perspectives. **Trends of Food Science e Technology**, New York, v. 10, p. 411-417, 1999.

SOMAL, N. A., COLEY, K. E., MOLAN, P. C., & Hancock, B. M.. Susceptibility of *Helicobacter pylori* to the antibacterial activity of manuka honey. **Journal of Royal Society of Medicine**, v.87, p.497-498,1994

SOUZA, P.H.M.; SOUZA NETO, M.A.; MAIA, G.A. Componentes funcionais nos alimentos. *Bol. Soc. Bras. Ciênc. Tecnol. Alim.*, v.37, n.2, p.127-135,2003.

SOUZA, B. A. et al. Características físico-químicas de amostras de mel de *Melipona asilvai* (Hymenoptera: Apidae). **Ciência rural**, v.34, n.5, p.1623-1624, 2004.

STANDFORD, E.C.C. On Algin, a New Substance Obtained from Some of the Commoner Species of Marine Algae. **American Journal of Pharmacy**, v.55, 1883.

STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v.16, p.198-203, 2005.

STAUFER, C. E. **Functional Additives for Bakery Food**. P.164-177, 1985.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E.C.; PEZZIN, A.P.T.; SILVA, D.A.K.; MEIER, M.M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v.7, n.2, p. 12-20, 2006.

SUGITA T, TOGAWA M. Efficacy of *Lactobacillus preparation bioactis* powder in children with rotavirus enteritis. **Japan Journal of Pediatrics**. V.47, p.2755-62, 1994

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N. 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. 1-2, p. 47-55, 2000.

SUN, C.; GRANT, D.J.W. Influence of Crystal Structure on the Tableting Properties of Sulfamerazine Polymorphs. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 3, p. 274-280, 2001.

SUN, W.; GRIFFITHS, M. W. Survival of *Bifidobacteriain* yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xantan beads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 17-25, 2000.

SWALLOW, K. W., & LOW, N. H.. Analysis and quantitation of the carbohydrates in honey using high performance liquid chromatography. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.38, p.1828–1832,1990

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209-214, 2009.

THAMER, K. G.; PENNA, A. L. B. Caracterização de bebidas lácteas funcionais fermentadas por probióticos e acrescidas de prebióticos. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, n.3, p.589-505, 2006.

TANNOCK, G.. Probiotics: A critical review. Norfolk, England: **Horizon Scientific Press**, 1999.

TIPAYANG, P.; KOZAKI, M. Lactic acid production by a new *Lactobacillus* sp., *Lactobacillus vaccinoferus* Kozaki and Okada sp. nov., immobilized in calcium alginate. **Journal of Fermentation Technology**, New York, v. 60, n. 6, p. 595-98, 1982.

TONON, V.R. Microencapsulação de Ingredientes Alimentícios e compostos Bioativos. **Embrapa Agroindústria de Alimentos**, 2012.

TOOD, R.D. Microencapsulation and the flavor industry. **Flavor Industry**, v.1, p.768, 1970.

TRUBIANO, P.C.; LACOURSE, N.L. Emulsion stabilizing starches. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. Flavor encapsulation. Washington, DC: ACS. p.45-54 (ACS Symposium Series, 370),1988.

USTUNOL, Z.; GANDHI, H. Growth and Viability of Commercial *Bifidobacterium* spp. in Honey-Sweetened Skim Milk. **Journal of Food Protection**, v. 64, n. 11, p. 1775–1779, 2001.

USTUNOL, Z. The effect of honey on the growth of *bifidobacteria*. **National Honey Board**. Disponível em: <http://www.nhb.org.htm>.

VILA JATO, J. L. Aspectos fundamentais de los sistemas farmacêuticos y operaciones básicas, **Tecnologia Farmacêutica**., v. 1, Ed. Sistensis Editorial, Madrid, Espanha, 1999.

YOO, I. K.; SEONG, G. H.; CHANG, H. N.; PARK, J. K. Encapsulation of *lactobacillus casei* cells in liquidcore alginates capsules for lactic acid production. **Enzyme and Microbial Technology**, Woburn, v. 19, n. 6, p. 428-33, 1996.

YOW, H. N., ROUTH, A. F. Formation of liquid core–polymer shell microcapsules. **Soft Matter**, v. 2, p. 940–949, 2006.

WEBER, H.F; CHANG,K.Y.; COLLARES, P.F. Interações Físico-Químicas Entre Amidos de Milho e Hidrocolóides (Gomas guar e xantina) e Seus Efeitos nas Propriedades Funcionais.Campinas- SP, 2005.

WESTON, R. J., E BROCKLEBANK, L. K. The oligosaccharide composition of some New Zealand honeys. **Food Chemistry**, v.64, p.33–37, 1999.

ZANETTI, B. G. Desenvolvimento de microesferas de carbamazepina visando ao prolongamento da liberação do fármaco. **Dissertação de mestrado**. Universidade Federal de Santa Catarina, p.100, 2001.

ZHANG, F. J.; CHENG, G. X.; YING, X. G. Emulsion and macromolecules template alginate based polymer microspheres. **Reactive and Functional Polymers**, v. 66, p. 712-719, 2006.

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, p. 1349–1354, 2008.