

**UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ -
UNIOESTE CENTRO DE ENGENHARIAS E CIÊNCIAS EXATAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO “STRICTO SENSU” EM
ENGENHARIA QUÍMICA – NÍVEL MESTRADO**

**Microencapsulação de *Saccharomyces boulardii*
por *spray-drying* com diferentes proteínas
combinadas com maltodextrina**

Tárcio Enrico Savoldi

**Toledo – PR
2017**

Tárcio Enrico Savoldi

**Microencapsulação de *Saccharomyces boulardii*
por *spray-drying* com diferentes proteínas
combinadas com maltodextrina**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Engenharia Química, área de concentração em Processos Químicos e Bioquímicos.

Orientadora: Prof^a. Dra. Mônica Lady Fiorese

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Deisy Alessadra Drunkler

**TOLEDO – PR
Fevereiro de 2017**

AGRADECIMENTOS

A Deus pela graça e oportunidade de realizar este trabalho.

À Professora Dr^a Mônica Lady Fiorese pela orientação e por nunca medir esforços para ajudar o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus pais Antônio e Neide pelo suporte e motivação que sempre me dispuseram. E ainda aos meus irmãos Thiago e Tomás e a minha irmã Thaís.

À professora Dr^a Deisi Drunkler, pela coorientação.

Aos professores Dr. Edson, Dr. Fabiano e Prof^a Dr^a Luciana por todo o conhecimento e correções agregados a este trabalho.

Aos colegas e amigos do LPS pelo companheirismo, apoio, cucas e coxinhas compartilhados.

Aos caros amigos Alexssander e Felipe que se fizeram presentes em todos os momentos.

Ao Huíllian e ao Cassandro da Candon aditivos.

À Sooro LTDA pelas amostras fornecidas.

E por fim a todos aqueles que de uma forma ou de outra colaboraram com o êxito deste trabalho, meus sinceros agradecimentos.

“vini, vidi, vici”.

Sumário

1. INTRODUÇÃO	12
1.1. Contextualização	12
1.2. OBJETIVOS	13
1.2.1. Objetivo Geral:	13
1.2.2 Objetivos específicos:	13
2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
2.1. Probióticos	14
2.3. <i>Sacharomyces boulardii</i>	16
2.4. Microencapsulação	18
2.4.1. Microencapsulação por <i>Spray-Drying</i>	19
2.4.2. Materiais utilizados como encapsulantes	21
2.7. Justificativas da Pesquisa	23
3. MATERIAIS E MÉTODOS	24
3.1. Microrganismo	24
3.2. Meios de cultura	24
3.2.1. Ativação e Manutenção do Microrganismo	24
3.2.2. Preparo do inóculo	24
3.2.3. Cultivos de <i>S. boulardii</i>	25
3.2.4. Ensaio com Aeração	25
3.3. Métodos analíticos utilizados nos cultivos	26
3.3.1. Determinação da Densidade óptica (absorbância)	26
3.3.2. Determinação do pH	26
3.3.3. Determinação da concentração da biomassa	27
3.3.4. Determinação do consumo de açúcares redutores	27
3.3.5. Enumeração de <i>S. boulardii</i>	28
3.4. Microencapsulação	28
3.4.1. Agentes encapsulantes	28
3.4.2. Obtenção das Células para encapsulação	29
3.4.3. Preparo dos agentes microencapsulantes e solução de alimentação	29
3.4.5. Avaliação dos parâmetros de microencapsulação de <i>S. boulardii</i> com o melhor agente encapsulante	31
3.5 Métodos analíticos para os ensaios de microencapsulação	32
3.5.1. Determinação do Rendimento do Processo de Microencapsulação por <i>Spray-drying</i>	32

3.5.2. Análise Termogravimétrica	32
3.5.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC)	33
3.5.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	33
3.5.5. Microscopia Ótica.....	33
3.5.6. Umidade	33
3.5.7. Sobrevivência em solução gástrica simulada	34
3.5.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	34
4. RESULTADOS E DISCUSSÕES.....	35
4.1 Crescimento Celular.....	35
4.2. Microencapsulação por <i>Spray-dryer</i>	38
4.2.1. Ensaios preliminares de Microencapsulação com diferentes agentes carreadores.....	38
4.2.1.1. Rendimento das microencapsulações e umidade dos ensaios preliminares.....	38
4.2.1.2. Morfologia	40
4.2.1.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	42
4.2.1.4. Análise Termogravimétrica	46
4.2.2. Análise dos fatores que influenciam a microencapsulação por <i>Spray-drying</i>	48
4.2.2.1. Influência dos parâmetros de secagem no processo de microencapsulação.....	48
4.2.2.4 Umidade	54
4.2.2.4. Caracterização Química por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)	54
4.2.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise de Calorimetria diferencial exploratória (DSC).....	55
4.2.2.6. Sobrevivência em solução gástrica simulada.	58
4.2.2.7. Viabilidade das microcápsulas de <i>S. boulardii</i> durante armazenamento.....	59
4.2.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	60
5. CONCLUSÃO	63
5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Descrição das condições de Cultivos realizados com <i>S.boulardii</i> ...	25
Tabela 2 - Composição de sólidos de materiais de paredes utilizados nas microencapsulação de <i>S.boulardii</i>	29
Tabela 3 - Especificação das variáveis admitidas no planejamento experimental 2 ³	31
Tabela 4 - Condições utilizadas para verificar a influência das variáveis no processo de secagem.	31
Tabela 5 – Parâmetros determinados para os ensaios sem e com aeração....	37
Tabela 6 - Rendimento da microencapsulação (%), teor de umidade, unidades formadoras de colônia inicial e após secagem (log (ufc)(mL ⁻¹)) para os 9 ensaios preliminares avaliados.....	38
Tabela 7 - Principais correlações espectroscópicas de infravermelho obtidas.	45
Tabela 8 – Resultados para eficiência da microencapsulação de acordo com planejamento fatorial completo.....	49
Tabela 9 - Estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis utilizadas no planejamento experimental.	49
Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento.....	51
Tabela 11 – Umidade das microcapsulas obtidas pelo planejamento experimental fatorial completo 2 ³	54
Tabela 12 - Perda de massa pontual para os ensaios 2 (75PA/25M); Ensaio 5 (50PA/ 50M) e ensaio 9 (75M/25PA).....	57
Tabela 1A - Absorbância obtida para curva padrão das análises de DNS.....	75
Tabela 2A - Análise de DNS obtida para o cultivo SA20G	77
Tabela 3A - Análise de DNS obtida para o cultivo SA40G	77
Tabela 4A Análise de DNS obtida para o cultivo SA60G	78
Tabela 5A - Análise de DNS obtida para o cultivo AE20G	78
Tabela 6A Análise de DNS obtida para o cultivo AE40G	79
Tabela 7A Análise de DNS obtida para o cultivo AE60G	79

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Esquema simplificado de funcionamento do <i>spray-dryer</i>	20
Figura 2 - Reator e sistema de aeração utilizado nos cultivos de <i>S. boulardii</i> com aeração.	26
Figura 3 – <i>Spray-Dryer</i> utilizado para realização da microencapsulação de <i>S. boulardii</i>	30
Figura 4 - Cinética do Crescimento celular, consumo de substrato ($g.L^{-1}$), ao longo de 24 horas de cultivo para as diferentes condições testadas, (a) SA20G, (b) SA40G, (c) SA60G, (d) AE20G, (e) AE40G e (f) AE60G.	37
Figura 5- Micrografias das microcápsulas de <i>S. boulardii</i> obtidas após a secagem em equipamento <i>spray-dryer</i> , (a) PEP, (b) PEM, (c) CPP, (d) CPM, (e) WPP, (f) WPM, (g) PA, (h) PAM e (i) MAL.	42
Figura 6 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: CPP e CPM, células livres de <i>S. boulardii</i> , e dos agentes carreadores.	43
Figura 7 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: WPP e WPM, células livres de <i>S. boulardii</i> , e dos agentes carreadores.	44
Figura 8 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: PAP e PAM, células livres de <i>S. boulardii</i> , e dos agentes carreadores.	44
Figura 9 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: MAL, células livres de <i>S. boulardii</i> , e dos agentes carreadores.	45
Figura 10 - Análises termogravimétricas das microcápsulas obtidas (a) CPP e CPM, (b) WPP e WPM, (c) PAP e PAM, células livres de <i>S. boulardii</i> , e dos agentes carreadores.	47
Figura 11 - Diagrama de Pareto com efeito das variáveis e interações estudadas no planejamento fatorial completo para um nível de 5% de significância.	50
Figura 12 – (a) Diagrama de dispersão e (b) Valores preditos x resíduos obtidos no planejamento experimental fatorial 2^3	51
Figura 13 – Superfícies de respostas de EY(%) em função de (a) vazão e temperatura, (b) vazão e porcentagem de maltodextrina e (c) temperatura e porcentagem de maltodextrina.	52

Figura 14 -Espectros FTIR para Ensaio 2 (75PA/25M), Ensaio 9 (50PA/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), células livres de <i>S. boulardii</i>	55
Figura 15 – Curva termogravimétrica para Ensaio 2 (75P/25M), Ensaio 9 (50P/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), células livres de <i>S. boulardii</i>	56
Figura 16- Curvas de DSC das microcápsulas obtidas para os ensaios (1) (75%P/25%M), Ensaio (5) (25%P/75%M), Ensaio (9) (50%P/50%M), dos agentes encapsulantes e células livres.	57
Figura 17 –.Estabilidade das microcapsulas contendo <i>S. boulardii</i> em pH 1,5 e pH 3,0.....	58
Figura 18 - Viabilidade de nas microcápsulas contendo <i>S. boulardii</i> após armazenamento.	59
Figura 19 – Micrografias adquiridas por MEV para os materiais encapsulantes (a) Proteína de Arroz e (b) Maltodextrina.	61
Figura 20 - Micrografias adquiridas por MEV para os ensaios (a) Ensaio 1 (75PA/25MA) e (b) Ensaio 5 (25PA/75MA) e (c) Ensaio 9 (50PA/50MA).....	62
Figura 21A - Gráfico obtido para curva padrão de DNS.....	76

MICROENCAPSULAÇÃO DE *SACCHAROMYCES BOULARDII* POR SPRAY DRYER COM DIFERENTES PROTEÍNAS COMBINADAS COM MALTODEXTRINA

AUTOR: TÁRCIO ENRICO SAVOLDI

ORIENTADORA: PROF^a DR^a MÔNICA LADY FIORESE

CO-ORIENTADORA: PROF^a DR^a DEISY ALESSANDA DRUNKLER

Programa de Pós-Graduação em Engenharia Química; Universidade Estadual do Oeste do Paraná; Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brasil. 80 p.

RESUMO

Microrganismos probióticos são uma classe de microrganismos que podem prover benefícios a quem consumi-los. Nesse meio a levedura *Saccharomyces boulardii* tem seu destaque por ter capacidade de combater infecções gastrointestinais de diversos tipos. Objetivando viabilizar o aumento da resistência desses microrganismos várias técnicas de microencapsulação vem sendo otimizadas ao longo dos anos. Esta técnica consiste, basicamente, no revestimento de partículas por um material que lhe fornecerá proteção. A técnica de *spray-drying* é um dos métodos que pode ser empregado na microencapsulação. O objetivo deste estudo foi desenvolver microcápsulas com a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* utilizando como agentes carreadores diferentes proteínas e suas combinações com maltodextrina como materiais de parede. Primeiramente foram avaliados diferentes concentrações iniciais de glicose e a aeração nos meios de cultivos de *S. boulardii* afim de selecionar aquele que fornecesse maior quantidade de células viáveis. Posteriormente as células foram microencapsuladas em 4 tipos diferentes de proteínas assim como as suas combinações com maltodextrina. Este processo demonstrou que, dentre as proteínas utilizadas, a proteína de arroz foi a que propiciou o maior índice de sobrevivência de *S. boulardii* de 68,88%. Na posse desses dados, a influência da Temperatura de secagem, porcentagem de maltodextrina e vazão de alimentação na sobrevivência da *S. boulardii* foi investigada a partir de um planejamento experimental fatorial 2³. Os testes realizados após a microencapsulação mostram que as microcápsulas permanecem estáveis por pelo menos 15 dias após a microencapsulação, as análises de FTIR, mostram que há pouca alteração encapsulantes após a secagem e a análise termogravimétrica mostrou que as microcápsulas são bastante resistentes ao calor. Evidenciando assim a aplicabilidade deste método na microencapsulação da levedura *S. boulardii* com diferentes proteínas e maltodextrina.

Palavras-chave: *Probióticos; materiais de parede; proteína vegetal.*

MICROENCAPSULATION OF *SACCHAROMYCES BOULARDII* BY SPRAY-DRYING WITH DIFFERENT PROTEINS COMBINED WITH MALTODEXTRIN

AUTHOR: TÁRCIO ENRICO SAVOLDI

SUPERVISOR: Prof^a Dr^a MÔNICA LADY FIORESE

CO- SUPERVISOR: Prof. Dr^a. DEISY ALESSANDRA DUNKLER

Master Thesis; Chemical Engineering Graduate Program; Western Paraná State University; Rua da Faculdade, 645, CEP: 85903-000 – Toledo – PR, Brazil, 80 p.

ABSTRACT

Probiotics are a class of microorganisms that can provide benefits to those who consume them. The yeast *Saccharomyces boulardii* has its highlight to the ability to fight gastrointestinal infections of various kinds. In order to increase the resistance of these microorganisms various microencapsulation techniques have been optimized over the years. This techniques basically consists in coating particles with a material which will provide him protection. The *spray-drying* technique is one methods that can be employed in microencapsulation. The aim of this study was to develop microcapsules with the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* using different proteins and their combination with maltodextrin as wall materials. First, they were studied 3 different broths for *S. boulardii* in order to select the one that provides greater amount of viable cells. Subsequently the cells were microencapsulated in 4 different types of proteins, as well the maltodextrin combinations. This process demonstrated that, among the proteins used, rice protein was the one that provided the highest survival rate of *S. boulardii* of 98%. The influence of drying temperature, percentage of maltodextrin and feed rate on the survival of *S. boulardii* were investigated from a factorial 2³ experimental design. Tests performed after microencapsulation showed that microcapsules remained stable by At least 15 days after microencapsulation, FTIR analyzes show that there is little interaction between yeast cells and encapsulating agents and thermogravimetric analysis showed that microcapsules are quite resistant to heat. Showing that microencapsulation by spray drying of *S. boulardii* with different kinds of proteins mixed with maltodextrin is a good method.

Keywords: *Saccharomyces boulardii*, microencapsulation, *spray-dryer*.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Contextualização

Microrganismos probióticos são classificados como aqueles que possuem capacidade de propiciar efeitos benéficos ao organismo, quando ingerido em quantidades significativas e diárias, e que promovem melhorias na saúde intestinal, proteção contra infecções.

Dentre os microrganismos probióticos, vários estudos tem observado o papel desempenhado por bactérias, em especial as dos gêneros *Lactobacillus* e *bifidobacterium*. No entanto, leveduras vem encontrando destaque, em especial a levedura *Sacharomyces boulardii* que é considerada um probiótico atuando contra diversos tipos de diarreia causada por infecções de microrganismos patógenos ou por intolerâncias a outras substâncias.

Para que o microrganismo seja considerado probiótico, faz-se necessário que o mesmo esteja presente em quantidade suficiente e que seja capaz de resistir a sua passagem pelo trato digestivo do consumidor. A ideia de propiciar novas formulações de produtos probióticos tem alavancado pesquisas nessa área nos últimos anos, impulsando a busca por técnicas que visam estender a sua viabilidade durante a vida útil destes produtos.

Uma dessas técnicas é a microencapsulação por *spray-drying*. Na microencapsulação são obtidas pequenas esferas do microrganismo revestidas de um material que fornece proteção sem que haja diminuição na quantidade de microrganismos.

Motivados pela possibilidade de tornar possível o emprego de probióticos em uma ampla faixa de produtos alimentares, primeiramente foi estudada a microencapsulação da levedura probiótica com quatro diferentes proteínas e suas combinações maltodextrina. Com conhecimento da melhor combinação de proteína e maltodextrina foram realizados testes variando os parâmetros composição do material de parede, temperatura de secagem e da vazão de alimentação no *spray-dryer*.

1.2. OBJETIVOS

1.2.1. Objetivo Geral:

Obter microencapsulas contendo a levedura *Sacharomyces boulardii* por secagem em *spray-dryer* utilizando diferentes fontes de proteína e maltodextrina como material encapsulante.

1.2.2 Objetivos específicos:

- Avaliar o crescimento de *Sacharomyces boulardii* em diferentes meios de cultura com e sem aeração;
- Prover microencapsulação de *Sacharomyces boulardii* com diferentes materiais de parede;
- Avaliar a influência dos parâmetros de secagem (composição do material de parede, temperatura de secagem e vazão de alimentação no secador) no processo de microencapsulação por *spray-drying* de *Sacharomyces boulardii*.
- Caracterizar as microcápsulas quanto à umidade, morfologia, e propriedades térmicas e químicas.

2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1. Probióticos

Microrganismos probióticos são aqueles que, quando consumidos, afetam benéficamente a fisiologia do organismo hospedeiro, tanto pela regulação da imunidade quanto pelo balanço nutricional e de microrganismos no trato digestivo. Para ter a característica probiótica, os microrganismos devem sobreviver à passagem pelo trato digestório mantendo sua viabilidade e atividade no intestino do hospedeiro (SAAD, 2006; COOK *et al.*, 2012).

Dentre os benefícios que os probióticos propiciam encontra-se uma barreira intestinal que atua de forma a promover um aumento da imunidade, a redução patógenos, melhorias no trânsito intestinal e auxílio contra alergias (SHAH, 2007). Outros próbióticos ainda produzem substâncias com efeito antibiótico, como bacteriocinas, além de classes capazes de reduzir o tempo de trânsito intestinal (HOLZAPFEL *et al.*, 2001).

Para que um produto possa ser comercializado com o título de probiótico, ele deve atender pré-requisitos quanto a um número suficientemente elevado de células viáveis em todas as etapas do processo desde a produção e estocagem até à passagem pelo trato digestório superior do possível hospedeiro (ANNAN *et al.*, 2008; KAILASAPATHY, 2002; MARTONI *et al.*, 2008).

Outro fato que deve ser levado em consideração na escolha do microrganismo probiótico é a sua eficácia. Esta deve ser comprovada por estudos científicos, levando em consideração a ausência de patogenicidade em seu histórico e de genes que possam determinar resistência a antibióticos (HOLZAPFEL, SCHILLINGER, 2002; MAKRAS *et al.*, 2006). Características particulares a cada grupo de microrganismos probióticos vão definir sua capacidade de sobreviver ao sistema digestivo e colonizar o intestino do hospedeiro. Diversas cepas têm sido estudadas e na maioria dos casos não foi observada produção de toxinas, mostrando assim que essas cepas são próprias para o consumo humano (MARSHALL, 1984).

Ademais, para garantir um bom efeito no hospedeiro, o microrganismo probiótico deve ser capaz de interagir positivamente com a microflora original do hospedeiro e ter uma relação competitiva com microrganismos patogênicos, sejam eles bactérias, vírus ou fungos (GORBACH, 2002).

O órgão regulatório no Brasil, a ANVISA, não estabelece quantidade mínima de microrganismo em preparações probióticas desde que a eficácia seja devidamente comprovada (BRASIL, 2016).

Ou seja, o desenvolvimento e elaboração de alimentos probióticos não tem sido apenas uma questão de “marketing”, mas também um grande foco para desenvolvimento tecnológico para diversas indústrias, uma vez que diversos parâmetros como tratamentos térmicos e tipos de embalagens, podem influenciar diretamente na quantidade e na qualidade dos microrganismos presentes nos produtos considerados probióticos (MATTILA-SANDHOLM, SALMIEN, 2002).

Microrganismos probióticos podem ser encontrados em frutas, verduras, produtos fermentados, mas normalmente são oriundos do próprio trato digestório humano e animal (SCHEREZENMEIR; DE VRESE, 2001). Processos fermentativos envolvendo vários tipos de culturas mistas de diferentes microrganismos são utilizados há séculos no intuito de melhorar a qualidade, e preservar por mais tempo alimentos como vegetais, carnes e leite (BLANDINO *et al.*, 2003). Alimentos fermentados são uma grande fonte de microrganismos. E, em alguns casos, são constituídos espécies probióticas (RIVERA-ESPINOZA, 2008)

Segundo Kelesidis (2012) as leveduras da classe *Saccharomyces*, e as bactérias *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* representam os microrganismos mais utilizados como probióticos.

As bactérias dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são microrganismos gram-positivos, não flagelados, imóveis, não formadores de esporos e intolerantes a altas concentrações de sal (MARSHALL, 1984). A preferência por estes microrganismos se dá, pois essas culturas podem ser isoladas de praticamente todo trato digestório do ser humano que possui saúde estável (BIELECKA *et al.*, 2002).

Por sua vez, as leveduras vem ganhando destaque, já que na maioria dos casos não são patogênicas, dificilmente são tóxicas e possuem uma boa aceitação pelo consumidor (BOZE *et al.*, 1995). Além de todo caráter probiótico, as leveduras ainda contém quantidades consideráveis de vitaminas importantes

para o metabolismo humano, como: tiamina, riboflavina, biotina e niacina (ANUPAMA; RAVINDRA, 2000).

Segundo Cook *et al.*, (2012), a passagem pelo trato digestório, devido a alta acidez e concentração de sais biliares, é um dos fatores que mais gera queda na eficácia destes produtos, em sua forma oral, sendo necessária a incorporação de uma barreira física que proteja-os destas condições adversas de passagem pelo meio (KAILASAPATHY, 2009).

Até o fim da década de 90 era comum que probióticos fossem comercializados apenas adicionados a leites fermentados (RIVERA-ESPINOZA, GALLARDO-NAVARRO, 2008); contudo, a demanda por tais produtos vem aumentando consideravelmente, surgindo assim, a necessidade de novas formas de inserção dos probióticos em outros tipos de alimentos (BERNICANANI *et al.*, 2007).

2.2. *Sacharomyces boulardii*

As leveduras do gênero *Saccharomyces* são microrganismos aeróbicos facultativos, fator este, determinante nos produtos finais resultantes do metabolismo do açúcar pela célula. Quando em meio acrescido de oxigênio, (meio aeróbico) a maior parte do açúcar é transformada em biomassa, gás carbônico e água. Quando em meio anaeróbio (sem adição de oxigênio) o açúcar tende a ser metabolizado pela célula em etanol e gás carbônico (LIMA *et al.*, 2001). Segundo Marques e Serra (2004), o gênero *Saccharomyces* tem expressão social e econômica na sociedade tanto na indústria alimentícia quanto na produção de combustível verde.

Mesmo sendo muito próxima da levedura mais utilizada pela indústria alimentícia *Saccharomyces cerevisiae*, a *Saccharomyces boulardii* possui características metabólicas e fisiológicas bastante particulares, como uma temperatura ótima de desenvolvimento de 37°C e maior tolerância a pH baixos, o que lhe agrega potencial para ser utilizada como bioterapêutico (FIETTO *et al.*, 2004).

Isolada em meados de 1920, na Indochina, por Henri Boulard, microbiologista francês, que enfrentou uma epidemia de cólera enquanto buscava uma linhagem de levedura que suportasse altas temperaturas para

produção de vinho, a levedura *Saccharomyces boulardii* teve sua comercialização medicamentosa iniciada somente na década de 60 pelo “*Laboratoires Biocodex*” na sua forma liofilizada. E desde então é utilizada no tratamento e prevenção de doenças gastrointestinais, sob a forma de medicamento (MCFARLAND & BERNASCONI, 1993; LOURENS-HATTINGH & VILJOEN, 2001; SAZAWAL *et al.*, 2006; CZERUCKA *et al.*, 2007).

A alta aplicabilidade de *S. boulardii* em pacientes humanos justifica-se, pois seu metabolismo gera benefícios contra doenças causadas por *Clostridium difficile*, *Vibrio cholerae*, *Salmonella*, *Shigella* e *Escherichia coli* (CZERUCKA e RAMPAL, 2002), diarreia associada a antibióticos (MCFARLAND *et al.*, 1993) e doença de Crohn (GUSLANDI *et al.*, 2000). E ainda, segundo Czerucka *et al.*, (2007) esta levedura possui as características necessárias para ser considerada um microrganismo probiótico, com ênfase à resistência a antibióticos, multiplicar-se rapidamente e ser facilmente eliminada pelo hospedeiro.

Dentro da classe dos probióticos, a *S. boulardii* é um dos poucos utilizados que não tem como “habitat” natural o organismo humano (MARTINS *et al.*, 2005). Possui ainda algumas das propriedades probióticas, devido ao seu metabolismo celular secretar para o meio as enzimas proteases e fosfatases, capazes de inativar toxinas secretadas por *Clostridium difficile* e lipopolissacarídeos produzida por *E. coli*. A presença de *S. boulardii* ainda pode contribuir para a produção de enzimas capazes de agir contra dissacarídeos como lactase, sacarase e maltase, permitindo a degradação de carboidratos favorecendo a absorção destes nos indivíduos com diarreia, auxiliando assim, na restauração dos níveis normais de ácidos graxos que são necessários para a absorção de água e eletrólitos (MARCIA, 2009).

Além da atividade probiótica, o potencial da levedura probiótica *S. boulardii* vem sido investigada para produção de *single cell protein* (proteína proveniente de microrganismos). Müller (2005) obteve 3,97 g L⁻¹ utilizando biorreator do tipo *Air-lift*, com aeração de 1,5 vvm e concentração inicial de 10 g L⁻¹ de glicose como substrato. Já Assunção (2014) obteve biomassa final de *S. boulardii* de 22,58 g L⁻¹ nos cultivos sem aeração com 150 g L⁻¹ de permeado de soro leite hidrolisado a 30°C, e 30,58 g L⁻¹ para os cultivos nas mesmas condições com aeração.

Duongthingoc *et al.* (2013) utilizando o meio YNB (*yeast nutrient broth*) com 10 g L⁻¹ de glicose como substrato, obtiveram que o pH ótimo para a produção de Unidades Formadoras de Colônias de *S. boulardii* encontra-se entre 4 e 6, e que o final da fase exponencial de crescimento é onde há maior produção de células para este meio, ou seja, após 12 horas de cultivo.

2.3. Microencapsulação

A microencapsulação é uma técnica bastante eficaz que permite recobrir materiais sensíveis com uma camada de material polimérico que atua como barreira física que protege o material do núcleo de agressões externas mas podendo se desfazer em condições controladas (NESTERENKO *et al.*, 2013). Efeitos como o aumento da estabilidade e o possível reaproveitamento de material biológico são tidos como umas das principais vantagens deste processo (CARVALHO *et al.*, 2006; VITOLLO, 1988).

No processamento e estocagem de alimentos probióticos, geralmente há exposição do produto a mudanças de pH, de temperatura e agentes oxidantes, todas essas condições adversas podem comprometer sua viabilidade celular. (FARNWORTH; CHAMPAGNE, 2007; TRIPATHI; GIRI, 2014), tornando necessária a sua microencapsulação no intuito de promover a sua proteção tanto no processo de produção e armazenamento do alimento, quanto na passagem deste pelo sistema digestivo do hospedeiro (DING; SHAH, 2009).

Existem várias técnicas disponíveis para a encapsulação, cada uma delas leva em consideração a origem dos materiais a serem encapsulados, dos encapsulantes além das características desejadas do material a ser obtido. Dentre as técnicas mais conhecidas e difundidas estão: *spray-drying*, *spray-cooling/chilling*, extrusão, leitos fluidizados, coacervação simples e complexa (GOUIN, 2004), e tem se mostrado eficiente desde microencapsulações com diferentes tipos de probióticos (MENEZES, 2015; COGHETTO, 2001; FRITZEN-FREIRE *et al.*, 2012) até extratos vegetais com propriedades antioxidantes (NORI, 2011; KRISHNAIAH, 2012).

Segundo Gouin (2004) a técnica de *spray-cooling*, *spray-freezing*, ou *spray chilling* acontece de forma muito semelhante da encapsulação por *spray-*

dryer, entretanto há uma corrente de ar frio que resfria a solução atomizada e forma as microcápsulas, além disso, essa é uma forma de microencapsulação em matrizes, já que o material encapsulado fica atrelado em toda extensão da cápsula e não é somente revestido por ele. É um método que faz uso de materiais lipídicos como agentes carreadores. Mas, de certa forma é visto como uma técnica problemática, pois além das gorduras possuírem baixo poder encapsulante, elas tendem a expelir os encapsulados depois de algum tempo de armazenamento (SATO; UENO, 2005)

Pedroso *et al.* (2012) estudaram a encapsulação de *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* com gordura de palma pelo método de *spray-chilling* e concluíram que este método pode promover a proteção adequada aos encapsulados na passagem deste pelo trato intestinal do hospedeiro quando as microcápsulas são armazenadas a baixas temperaturas.

Sathyabama *et al.* (2014) estudaram a microencapsulação de *Staphylococcus succinus* e *Enterococcus fecium* por coacervação em alginato na presença de pó de chicória como pré-biótico. E observaram que após 35 dias de armazenamento as microcápsulas contendo *S. succinus* possuíam 95% de células sobreviventes, enquanto células sem proteção possuíam menos que 80% de sobrevivência.

De acordo com Vitolo (1988), o tipo de suporte e método de imobilização devem ser determinados empiricamente, já que a escolha dependerá fortemente de características particulares aos materiais utilizados e das condições acessíveis. Desta forma, não há um método ou suporte que possa atender eficientemente todos os materiais a serem encapsulados.

2.3.1 Microencapsulação por *Spray-Drying*

Normalmente é utilizado na indústria alimentícia e farmacêutica, a encapsulação por *spray-drying*, esta técnica apresenta uma alta taxa de transferência de massa e energia entre o ar de secagem e a solução que é atomizada dentro do secador (RIVEROS *et al.*, 2009), havendo a troca de calor entre o ar e a solução fazendo com o que o solvente evapore, e o pó resultante siga para um ciclone de separação onde é recolhido (SOUZA, 2003).

O princípio de funcionamento do *spray-dryer* pode ser observado na Figura 1. A solução a ser seca é movida através de uma bomba até a entrada (A), onde passa pelo bico atomizador e na forma de gotículas é inserido na câmara de secagem. O ar seco e quente entra em (B). A solução contendo o ar úmido com o material seco em suspensão é direcionado para o ciclone na saída (C) onde é separado. Do ciclone, o ar úmido segue para a saída (D) e o material encapsulado é recolhido em (E).

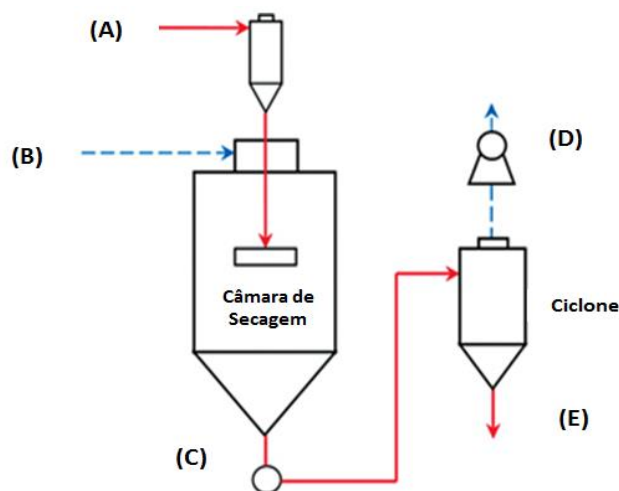


Figura 1 – Esquema simplificado de funcionamento do *spray-dryer*.
Adaptado de SADRIPOUR *et al.* (2013).

A alta eficiência neste tipo de secagem é justificada pela atomização. Este processo é capaz de gerar inúmeras pequenas gotas da solução a ser seca, o que resulta em um aumento significativo na área de troca térmica entre a solução e o ar, faz com que a água ou o solvente sejam removidos de forma instantânea (LEFEBVRE, 1989). Como o tempo de exposição entre a gotícula e o ar é muito pequeno, não há tempo suficiente para que o interior da gotícula seja aquecido; dessa forma, o interior das microcápsulas não é afetado pela temperatura do ar (OAKLEY, 1997; DZIEZAK, 1988).

Este tipo de secagem tem como vantagem possuir apenas uma operação unitária para a formação das microcápsulas e secagem, além de ter custo de operação baixo, é também de fácil ampliação de escala (GHANDI, *et al.*, 2012; JANTZEN *et al.*, 2013; PISPAN *et al.*, 2013).

Segundo Chávez & Ledebøer (2007), o processo de secagem em *spray-dryer*, gera um produto probiótico introduzido em uma matriz que geralmente é uma proteína, um polissacarídeo, ou ainda uma mistura de ambos. Ainda que a

escolha de uma cepa resistente seja determinante para um produto de alto desempenho, fatores como as condições de secagem e os agentes encapsulantes também influenciam consideravelmente (DESMONDE *et al.*, 2002).

Fritzen-Freire *et al.*, (2012), estudaram a microencapsulação de *bifidobacteria* por *spray-dryer* utilizando como agentes encapsulantes leite desnatado em pó combinado com os prébióticos inulina e oligofrutose. Obtiveram como viabilidade de células após a encapsulação, resultados entre 10 e 11 log (ufc g⁻¹), e ainda observaram que esta viabilidade se manteve estável por 180 dias quando as microcápsulas foram armazenadas em 4 ou -18°C.

Santos (2013) utilizou maltodextrina para a encapsulação de *Lactobacillus casei* em *spray-dryer* alcançando a concentração de $1,12 \cdot 10^{10}$ ufc g⁻¹, utilizando uma solução de 25% (m v⁻¹) de maltodextrina como agente encapsulante.

2.4.2. Materiais utilizados como encapsulantes

No geral, para a microencapsulação são utilizados materiais de parede como carboidratos, tais como amidos, maltodextrinas, alginato, quitosana, e algumas gomas (GOUIN, 2004). Para Cook *et al.*, (2012), as proteínas como caseína e proteína de soja também tem se mostrado muito eficientes na proteção de agentes bioativos sensíveis.

Paramera *et al.*, (2011), citam que o material de parede, independente de sua origem, deve apenas respeitar o princípio único a que se destina; que é formar uma fina camada que possa promover uma proteção adicional ao produto que se deseja. Podendo ser denominado como material de parede, de revestimento, de matriz, encapsulante ou agente carreador.

Entretanto, a escolha do material que irá envolver o núcleo deve levar em conta a característica da microcápsula desejada (BRAZEL, 1999; TURCHIULI *et al.*, 2005; GHARSALLAOUI *et al.*, 2007). Desta forma devem ser observadas a procedência e a resistência do material do núcleo bem como uma série de fatores do agente encapsulante, entre eles: a capacidade de formar um filme coeso, não interagir quimicamente com o material do núcleo e fornecer propriedades como resistência, estabilidade, solubilidade e impermeabilidade.

Proteínas de origem animal (*whey protein*, gelatina e caseína) e de origem vegetal (proteína de soja, arroz, ervilha) são comumente utilizadas na microencapsulação de microrganismos, pois tendem a fornecer características desejáveis de proteção, e de inferir compatibilidade, digestibilidade e agregar valor nutricional ao produto final (NESTERENKO, 2013; DOUGITIENGOC, 2012). Contudo, há a preferência por proteínas de origem vegetal, já que estas tendem causar menos alergias seguindo o atual caminho que a indústria de alimentos vem trilhando (JENKINS *et al.*, 2007; LI *et al.*, 2012).

O arroz é tido como um alimento base na cadeia alimentar de mais da metade da população mundial, fazendo que seja considerado um dos cereais mais importantes na indústria alimentícia (HAMADA, 2000), e possui em sua composição um teor de proteína que varia, de acordo com a espécie, entre 6 e 15% (BIENVENIDO, 1994). As propriedades físico químicas semelhantes à caseína e os teores de aminoácidos presentes na proteína de arroz se assemelham ao encontrados na proteína de soja, uma possível justificativa para a boa associação com polissacarídeos na formação de complexos de interesse da indústria de alimentos (FABIAN *et al.*, 2010; CHANDI e SOGI, 2007), inclusive em processos de microencapsulação de compostos (NESTERENKO, 2012).

Para Chávez e Ledebøer (2007) a maltodextrina, pó branco solúvel em água obtido a partir da hidrólise parcial de amido, pode ser adicionado a matrizes proteicas para encapsulação de microrganismos, pois atuam na fortalecimento do material de parede e prevenindo a oxidação de lipídios.

Menezes (2015) estudou a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando a mistura de maltodextrina e proteína isolada de soja como agente encapsulante. Foram obtidas microcápsulas condizentes com o processo realizado em *spray-dryer*, e o melhor resultado para sobrevivência do microrganismo foi na razão de 2 partes de maltodextrina para uma parte proteína de soja, temperatura de secagem de 94°C na vazão de alimentação de 0,49 L h⁻¹.

Para avaliar como as moléculas do material encapsulante influenciam o processo de encapsulação por *spray-drying*, Duongthingoc *et al.* (2012), estudaram a encapsulação de *S. boulardii* com *Whey Protein* em diferentes valores de pH e diferentes temperaturas de secagem. Os autores obtiveram

como seus melhores resultados (mais de 35% de sobrevivência da levedura), quando a mistura contendo 20% de teor de sólidos foi seca a 90°C e pH 4. A menor taxa de sobrevivência foi observada em pH 7 para as temperaturas 70, 80 e 90 °C. E concluíram ainda que, o pH isoelétrico da proteína utilizada como material encapsulante pode influenciar diretamente o processo de microencapsulação.

Luna-Solano *et al.* (2000) concluíram em seu estudo de microencapsulação de *S. cerevisiae* que a adição de amido de milho ou maltodextrina também podem influenciar positivamente a sobrevivência de microrganismos depois da microencapsulação por *spray-drying*.

Estudos realizados por Arslan *et al.* (2015) utilizando como materiais de parede gelatina, *whey protein* concentrado, amido modificado, proteína de ervilha e goma arábica e a levedura *S. boulardii* mostraram que estes materiais não afetam significativamente a taxa de sobrevivência da levedura ao processo de microencapsulação, entretanto, nos estudos de digestibilidade *in vitro*, os testes realizados com goma arábica se mostraram mais resistentes em pH 1,5 e 2,0 e proteína de ervilha em pH 1,0 com uma taxa de sobrevivência que varia 60 a 70% para as células encapsuladas comparadas a 45 - 25% das células livres.

2.7. Justificativas da Pesquisa

Em virtude da crescente demanda por alimentos funcionais, este trabalho buscou investigar e otimizar parâmetros e materiais de parede, na microencapsulação por *spray-drying* da levedura probiótica *Saccharomyces boulardii*, visando garantir a sua permanência estável e viável das células durante sua incorporação, armazenamento e vida útil do produto, e assim, possibilitando o desenvolvimento de produtos alimentícios que promovam a saúde, melhorando o aproveitamento dos alimentos e reduzindo a excreção de nutrientes, mantendo desta forma o equilíbrio da microbiota intestinal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Microrganismo

A levedura empregada no presente estudo foi a *Saccharomyces boulardii* CCT 4308 referência UFPEDA 1176 da Coleção de Culturas Tropicais (Fundação André Tosello. Campinas, SP).

3.2. Meios de cultura

3.2.1. Ativação e Manutenção do Microrganismo

A ativação de *S. boulardii* foi realizada acrescentando à massa de levedura liofilizada, após o rompimento da ampola previamente esterilizada com solução de álcool 70%, 100 mL do meio de cultura *Yeast Extract Peptone and Dextrose* (YEPD), que contém: 5 g L⁻¹ de extrato de levedura, 10 g L⁻¹ de peptona de carne e 20 g L⁻¹ de glicose, conforme Casal *et al.* (2004), previamente esterilizado em autoclave a 121°C por 15 minutos. O meio colocado em uma incubadora *shaker* (SL 222/CFR, Solab Científica) com agitação de 100 rpm e temperatura controlada em 30±2°C pelo período de 24 horas.

Posteriormente, uma alíquota de 10 mL do caldo foi transferido para 90 mL de um tubo contendo uma nova solução YEPD que foi novamente levado à incubadora *shaker*. Este processo foi repetido mais uma vez, e o caldo foi transferido para tubos inclinados com meio ágar YEDP. Os tubos foram incubados em estufa bacteriológica a 30±2°C por 48 horas. E então armazenados em refrigerador a temperatura de 4°C.

3.2.2. Preparo do inóculo

Os inóculos foram obtidos transferindo-se duas alçadas da cepa de *S. boulardii* resfriada para 250 mL de meio YEPD previamente esterilizado e levado a incubadora *shaker* (SL 222/CFR, Solab Científica) com agitação de 100 rpm e temperatura controlada em 30±2°C por 24 horas ou até atingir fixado o valor entre 0,500 e 0,600 para a absorbância em 600 nm (ASSUNÇÃO, 2014).

3.2.3. Cultivos de *S. boulardii*

Para avaliar o desenvolvimento de *S. boulardii* foram realizados cultivos em caldo YEPD (*yeast extract peptone and dextrose*) com três diferentes concentrações iniciais de glicose: 20, 40 e 60 g L⁻¹, bem como foi avaliada a influência da aeração no meio.

Os cultivos de *S. boulardii* foram realizados em reatores de vidro com volume útil de 500 mL; os mesmos possuíam aberturas na parte superior que possibilitavam a retirada de amostra, introdução de ar, se necessário, e o alívio de gases gerados. O volume final de meio utilizado nos reatores foi de 300 mL. A Tabela 1 mostra os ensaios realizados, os mesmos, foram mantidos em incubadora do tipo *shaker* a 100 rpm e 30±2°C por 24 horas.

Tabela 1- Descrição das condições de Cultivos realizados com *S.boulardii* .

Ensaio	Concentração inicial de Glicose (g L ⁻¹)	Aeração
SA20G	20	Não
SA40G	40	
SA60G	60	
AE20G	20	Sim
AE40G	40	
AE60G	60	

Amostras de 3 mL foram retiradas a cada 2 horas, as quais foram utilizadas para medidas de crescimento microbiano indireto por meio da leitura da absorbância (densidade ótica) em espectrofotômetro, açúcares redutores e enumeração da quantidade de colônias.

3.2.4 Ensaios com Aeração

Os ensaios com aeração foram conduzidos utilizando um compressor de ar (H-9800, MARURI), em potência máxima. A vazão de ar medida por um rotâmetro acoplado na saída da bomba foi de 2 L min⁻¹, fornecendo a aeração de 100 vvm aos reatores. Os reatores aerados foram mantidos em incubadora do tipo *shaker*) a 100 rpm e 30°C por 24 horas.



Figura 2 - Reator e sistema de aeração utilizado nos cultivos de *S. boulardii* com aeração.

3.3. Métodos analíticos utilizados nos cultivos

3.3.1. Determinação da Densidade óptica (absorbância)

A densidade óptica dos cultivos de *S. boulardii* foi determinada em espectrofotômetro UV-Vis (UV-1800, Shimadzu) a 600 nm. Para que a linearidade da absorção fosse respeitada abaixo de 0,800 unidades (segundo as determinações da Lei de Lambert-Beer), quando necessário, diluições das amostras foram realizadas. A absorbância foi expressa na forma logarítmica $\ln(\text{Abs}/\text{Abs}_0)$, em que Abs_0 é a absorbância no tempo zero e Abs é a absorbância no tempo t (NADAI, 2015).

3.3.2. Determinação do pH

Os valores de pH foram determinados por um pHmetro Digital Portátil pH/mV (AK 103, AKSO) com eletrodo de vidro, adequadamente calibrado seguindo a metodologia fornecida pelo fabricante, e também conforme metodologia proposta por Lutz (2008).

3.3.3. Determinação da concentração da biomassa

Ao término de cada fermentação determinou-se a concentração de massa seca a partir de um volume conhecido de amostra (25 mL de meio fermentado). Essa alíquota foi então filtrada, em triplicata, em membrana de acetato de celulose (0,45 µm de tamanho de poro e 45 mm de diâmetro), previamente secas em estufa a 90° C até atingir massa constante (m_m). Após a filtragem, as membranas foram secas em estufa a 90°C até peso constante (m_f), conforme a Equação 1.

$$X = \frac{m_f - m_m}{V} \quad \text{Equação (1)}$$

Em que:

- X é concentração celular (g L^{-1});
- m_m é massa da membrana (g);
- m_f é massa de levedura após secagem (g);
- V é Volume de amostra filtrada (L).

3.3.4. Determinação do consumo de açúcares redutores

O consumo de açúcares redutores foi determinado pelo método colorimétrico do ácido 3-5 dinitrosalicílico (DNS) descrito por Miller (1959). Para tanto, em um tubo de ensaio foi adicionado 0,4 mL de amostra previamente centrifugada em centrífuga (KASVI) à 5400 rpm por 3 minutos, a qual foram adicionados a 0,4 mL de solução de DNS. Os tubos foram colocados em banho-termostático a 100 °C por 5 minutos. Depois disso, foram depositados em banho de gelo onde permaneceram por 10 minutos. Posteriormente, para que a reação fosse interrompida, 4 mL de água destilada foram adicionados aos tubos. A leitura das amostras foi então obtida em espectrômetro (SHIMADZU) em comprimento de onda de 575 nm.

Uma curva padrão de glicose com concentração entre 0 e 3 g L^{-1} foi realizada nas mesmas condições das amostras, gerando um modelo de regressão linear para a concentração de açúcar em função da absorbância de cada amostra. Todas as análises foram realizadas em triplicata. A curva padrão encontra-se no Anexo 1.

3.3.5. Enumeração de *S. boulardii*

Para todos os ensaios realizados, fez-se a contagem no início do cultivo de *S. Boulardii*, e ao final da fase exponencial de crescimento.

A técnica utilizada foi a de inoculação em superfície. Para tanto, foram realizadas diluições seriadas a partir de 1 mL de amostra retirada do cultivo de *S. boulardii* em 9 mL de água peptonada 0,1%. Foram realizadas diluições até 10^{-7} . Após as diluições alíquotas de 0,1 mL foram inoculadas em placas de petri contendo meio *Potato Dextrose Ágar* (PDA) acidificado, conforme metodologia proposta por Silva (1997).

3.4. Microencapsulação

3.4.1. Agentes encapsulantes

Primeiramente foram realizados testes para determinar qual proteína combinada com maltodextrina forneceria um melhor rendimento na microencapsulação de *S. boulardii* por *spray-drying*.

As proteínas utilizadas neste trabalho foram: proteínas vegetais de arroz e ervilha (Herbalsave Produtos Naturais e Importação Ltda – ME); *Whey protein* (3W); Concentrado proteico de soro de leite (*Whey Protein Concentrate* - WPC) fornecido pela empresa SOORO Ltda., e maltodextrina (BodyAction, Rainha Laboratório Nutracêutico Ltda). A Tabela 2 mostra a composição material de revestimento na microencapsulação de *S. boulardii*.

Tabela 2 - Composição de sólidos de materiais de paredes utilizados nas microencapsulação de *S.boulardii*.

Ensaio	Composição
PEP	100% Proteína de Ervilha
PEM	50% Proteína de Ervilha 50% Maltodextrina
CPP	100% Concentrado Proteico
CPM	50% Concentrado Proteico 50% Maltodextrina
WPP	100% Whey protein
WPM	50% Whey protein 50% Maltodextrina
PAP	100% Proteína de Arroz
PAM	50% Proteína de Arroz 50% Maltodextrina
MAL	100% Maltodextrina

3.4.2 Obtenção das Células para encapsulação

Para cada ensaio de microencapsulação, foram utilizados 250 mL do cultivo de *S. boulardii* retirados no tempo correspondente ao final da fase exponencial de crescimento do microrganismo. Este volume foi centrifugado a 5000 rpm a 4°C por 5 minutos em centrífuga refrigerada (CT-5000R, Cientec), o sobrenadante foi descartado e o precipitado contendo a biomassa celular foi armazenado em geladeira (4°C), para posterior adição desta nas suspensões contendo os agentes microencapsulantes.

3.4.3. Preparo dos agentes microencapsulantes e solução de alimentação

Inicialmente pesou-se os agentes encapsulantes, e em seguida estes foram diluídos em água destilada estéril (121°C por 15 minutos), até a obtenção de suspensões com 200 g.L⁻¹ de sólidos totais, essas suspensões foram então homogeneizadas em agitador magnético por 10 minutos. Após, foi adicionado a estas suspensões a massa de células obtida na etapa anterior. As suspensões contendo os agentes encapsulantes e a biomassa celular foram novamente

homogeneizadas em agitador magnético por mais 10 minutos, sendo esta considerada a solução de alimentação a ser utilizada posteriormente na etapa de secagem em equipamento *spray-dryer*, esta metodologia adotada foi adaptada dos trabalhos de Duongthingcoc *et al.*, (2013) e Menezes (2015).

Além disso, uma alíquota de 2 mL de cada solução de alimentação preparada foi coletada antes de dar-se início ao processo de secagem, sendo esta submetida a determinação do número de UFC mL⁻¹ (SILVA *et al.*, 1997), conforme metodologia descrita na seção 3.3.5. e para fins de cálculo considerada como N₀ (número de células viáveis na suspensão de *spray-drying* expresso em log UFC g⁻¹).

3.4.4. Secagem em *spray dryer*

A secagem das suspensões foram realizadas em *spray-dryer* de escala laboratorial (MSDi 1.0, Labmaq do Brasil, São José do Rio Preto, Brasil) (Figura 3), no laboratório de Operações Unitárias e Fenômenos de Transporte da Universidade Tecnológica Federal do Paraná situado no *câmpus* Medianeira – PR. A operação de secagem foi conduzida sob condições constantes de pressão do compressor do ar de secagem (2-4 kgf cm⁻²), vazão de ar comprimido de 35 L min⁻¹, temperatura de entrada do ar de 90 °C, vazão de alimentação de 0,55 L h⁻¹ mantido por uma bomba peristáltica. A solução de alimentação foi mantida sob agitação em condições ambientes. O diâmetro de saída do ar no sistema foi de 1mm em bico duplo fluido. As microcápsulas foram recolhidas no final do ciclone em recipientes de vidro hermeticamente fechados e armazenados a 4°C.



Figura 3 – *Spray-Dryer* utilizado para realização da microencapsulação de *S. boulardii*.

3.4.5. Avaliação dos parâmetros de microencapsulação de *S. boulardii*

Depois de definido o melhor agente encapsulante com base melhor eficiência de encapsulação, realizaram-se ensaios, objetivando avaliar a influência dos parâmetros do processo de secagem por *spray-drying*, e também proporções do agente encapsulante maltodextrina na microencapsulação e sobrevivência de *S. boulardii*.

A estratégia escolhida para avaliar os parâmetros foi o planejamento fatorial completo 2³, em duplicata no ponto central, os ensaios foram realizados segundo as condições descritas na Tabela 3. As variáveis testadas foram: proporções de maltodextrina (25 e 75%), vazão de alimentação entre 0,35 e 0,75 L min⁻¹ e temperatura de secagem entre 80 e 100 °C.

Tabela 3 - Especificação das variáveis admitidas no planejamento experimental 2³.

Variáveis (q)	Unidades	Níveis		
		-1	0	1
Proteína de Arroz/Maltodextrina	%	25	50	75
Temperatura de secagem	(°C)	80	90	100
Vazão de alimentação	(L h ⁻¹)	0,35	0,55	0,75

Tabela 4 - Condições utilizadas para verificar a influência das variáveis no processo de secagem.

Ensaio	% Proteína de Arroz/Maltodextrina	Temperatura de secagem (°C)	Vazão de alimentação (L h ⁻¹)
1	-1	-1	-1
2	-1	-1	1
3	-1	1	-1
4	-1	1	1
5	1	-1	-1
6	1	-1	1
7	1	1	-1
8	1	1	1
9	0	0	0
10	0	0	0

O mesmo procedimento de preparo, análise e quantificação apresentados nos itens 3.3.2 a 3.3.4 também foram utilizados nesta etapa.

Após a microencapsulação as amostras obtidas foram armazenadas em frascos de vidro devidamente fechados em refrigerador a 4°C. Amostras foram retiradas a cada 5 dias para acompanhamento da sobrevivência de *S. boulardii* durante o armazenamento.

3.5 Métodos analíticos para os ensaios de microencapsulação

3.5.1. Determinação do Rendimento do Processo de Microencapsulação por *Spray-drying*

Para determinar a viabilidade celular após a microencapsulação 1 g dos produtos secos foram adicionados a 9 mL de água peptonada (0,1%) e homogeneizado em agitador magnético por 30 minutos. Posteriormente, foi realizada a diluição seriada e o plaqueamento em superfície em PDA acidificado 10%, conforme metodologia de Silva *et al.* (1997).

O rendimento obtido nos processos de microencapsulação (*Encapsulation Yield* – EY %) foram calculados pela da Equação 2 (PICOT; LACROIX, 2004):

$$EY = \left(\frac{N}{N_0} \right) \cdot 100 \quad \text{Equação (2)}$$

Em que:

N é número de células viáveis no pó após secagem;

N₀ é número de células viáveis na suspensão alimentada no *spray drying*, ambos expressos em log (ufc g⁻¹).

3.5.2. Análise Térmogravimétrica.

As microcápsulas, materiais de parede e células livres foram submetidos às análises de TG seguindo a metodologia de descrita por Fritzen-Freire *et al.* (2012), com algumas modificações. Amostras de aproximadamente 4,00 mg foram colocadas em cadinhos de porcelana e aquecidos de 30°C a 300°C, com rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e mantidos sob fluxo constante de N₂ (20 mL min⁻¹). As análises de TGA foram realizadas no equipamento STA 6000 (*Simultaneous Thermal Analyser*, Perkinelmer Frontier).

3.5.3. Calorimetria diferencial de varredura (DSC).

As análises de calorimetria diferencial de varredura das microcápsulas, materiais de parede e células livres foram submetidos às análises seguindo a metodologia de descrita por Fritzen-Freire *et al.* (2012), com algumas modificações. Amostras de aproximadamente 2,00 mg foram acondicionadas em cadinhos de alumínio fechados. O aquecidos de 30°C a 300°C aconteceu com rampa de aquecimento de 10°C min⁻¹ e mantido sob fluxo constante de N₂ (20 mL min⁻¹). As análises de DSC foram realizadas em equipamento DSC 60 da marca SHIMADZU.

3.5.4. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR).

Para as análises das amostras na região do infravermelho, foi realizada a varredura no intervalo comprimento de onda de 4000 a 650 cm⁻¹ utilizando o modulo de refletância total atenuada (ATR) em um equipamento FTIR *Perkinelmer Frontier Spectrum 100* (PerkinElmer Frontier). Os dados obtidos foram analisados pelo software *OriginPro 8.0*, a fim de verificar a interação entre as células encapsuladas e os materiais encapsulantes (MENEZES, 2015).

3.5.5. Microscopia Ótica.

As micrografias de todos os ensaios foram realizadas a fim de determinar o formato aproximado das microcápsulas obtidas. Estas foram realizadas em microscópio óptico Olympus modelo CX31 equipado com câmera Olympus modelo SC30. A aquisição das imagens foi realizada pelo software *cellSens Standard*® (TORTORA, 2010).

3.5.6. Umidade.

Para a determinação da umidade, 2,0 g das microcápsulas foram colocadas em placas de petri previamente secas, e levados à estufa a 105°C até peso constante, de acordo com metodologia adaptada da Lutz (2008). Foram realiza triplicatas para este procedimento.

3.5.7. Sobrevivência em solução gástrica simulada.

As soluções que simulam o suco gástrico utilizadas na determinação da sobrevivência de *S. boulardii* foram obtidas através de uma solução inicial contendo 2 g L⁻¹ de cloreto de sódio (NaCl) sem enzimas. As faixas de pH testadas foram de 1,0 e 2,0, ajustadas com uma solução 0,1 mol L⁻¹ de ácido clorídrico (HCl).

Para a digestão, 1 g das microcápsulas contendo *S. boulardii*, foram dissolvidas em 9,0 mL das soluções gástricas com diferentes níveis de pH e incubados em estufa microbiológica à 37 °C por 3 horas. Amostras de 1,5 mL foram retiradas a cada hora, colocadas em micro-tubos e centrifugados à 6000 rpm por 3 minutos, lavados com água destilada esterilizada e seguiram para contagem 3.3.5. Essa metodologia foi adaptada de Sabikhi *et al.* (2010).

3.5.8. Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As análises de morfologia pela microscopia eletrônica de varredura (MEV) foram realizadas em equipamento Tescan Vega 3 nas dependências da Universidade Federal do Paraná – Setor Palotina-Pr. Para tanto, amostras dos materiais encapsulantes e dos ensaios 2, 5 e 9 foram dispostos em um papel adesivo e recobertos com sob vácuo sob uma camada de ouro, seguindo metodologia adaptada de Fritzen-Freire *et al.*, (2012).

RESULTADOS E DISCUSSÕES

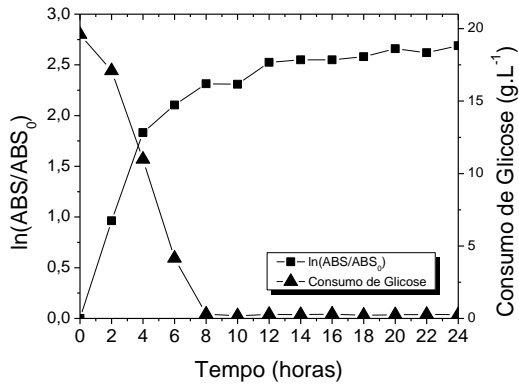
Nesta seção serão apresentados e discutidos os resultados obtidos todas os dados obtidos a partir do desenvolvimento das metodologias descritas que buscaram obter um cultivo rico em células da levedura probiótica *S. boulardii*, realizar a sua microencapsulação com diferentes materiais de parede e ainda caracterizar as microcápsulas obtidas e avaliar sua estabilidade ao longo do tempo.

4.1 Crescimento Celular

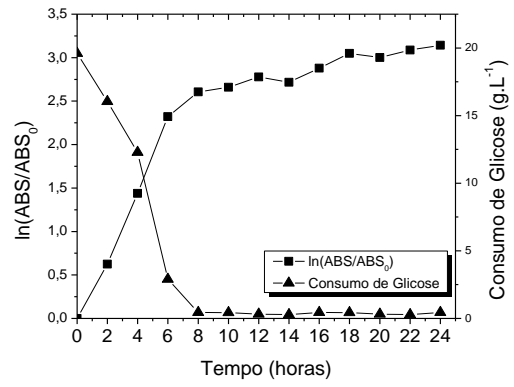
Para que a microencapsulação possa ser mais eficiente e propiciar um produto com alta atividade probiótica é desejável que a solução contendo os microrganismos de interesse possuam a maior quantidade de células viáveis possível para que possam se desenvolver de forma eficiente.

Desta forma, neste trabalho foram realizados cultivos de *S. boulardii* em meio YEPD com diferentes concentrações de glicose como fonte de carbono (substrato), (20, 40 e 60 g L⁻¹), e também com e sem aeração ao meio, objetivando uma condição de cultivo que alcançasse os valores exigidos pela legislação. As Figuras 5 (A, B, C, D, E, F e G), e Tabela 5 apresentam os resultados de crescimento celular ($\ln(ABS/ABS_0)$) e consumo de substrato (g L⁻¹), ao longo de 24 horas, para as 6 condições avaliadas.

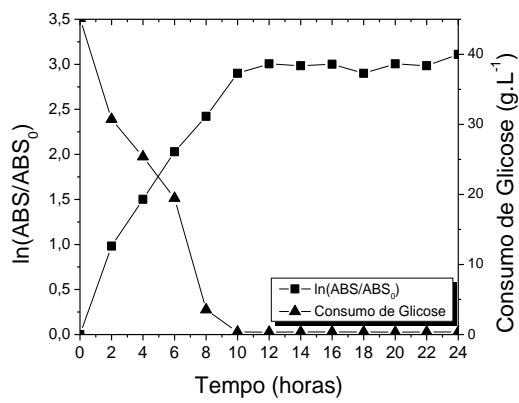
Observa-se Figura 4 (a, b, c, d, e e f) e na Tabela 5, que o experimento AE60 (6,708 g L⁻¹) foi o que obteve maior formação de biomassa celular, o que comprova que os dois fatores estudados, concentração inicial de açúcar e adição de oxigênio no meio de cultivo favorecem a produção de biomassa. Um comportamento próximo ao deste estudo, já verificado por Müller (2005) que observou um incremento de 4,20 g L⁻¹ sem aeração para 4,85 g L⁻¹ nos cultivos com aeração na concentração inicial de 10 g L⁻¹ de glicose após 12 horas de cultivo, e Assunção (2013) que obteve biomassa final de *S. boulardii* de 22,58 g L⁻¹ nos cultivos sem aeração e 30,58 g L⁻¹ para os cultivos com aeração com concentração inicial de 150 g L⁻¹ de permeado de soro leite hidrolisado a 30°C.



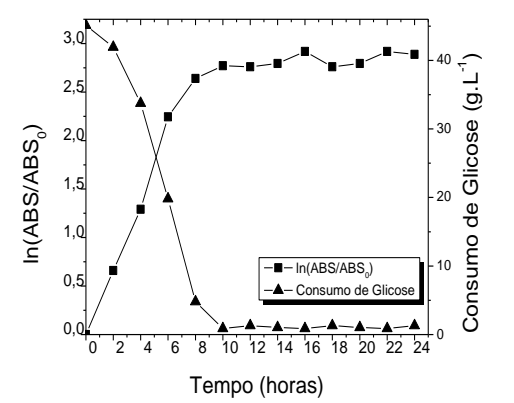
(a)



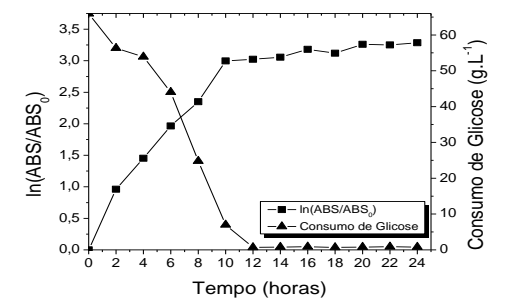
(d)



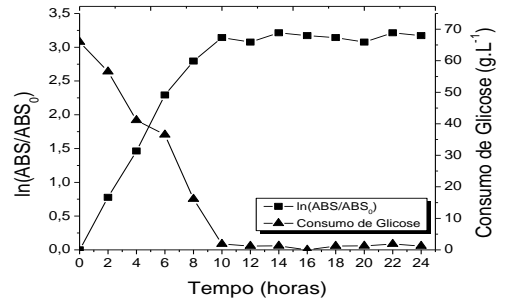
(b)



(e)



(c)



(f)

Figura 4 - Cinética do Crescimento celular, consumo de substrato (g L^{-1}), ao longo de 24 horas de cultivo para as diferentes condições testadas, (a) SA20G, (b) SA40G, (c) SA60G, (d) AE20G, (e) AE40G e (f) AE60G.

Contudo, apesar do ensaio F (Figura 4) ter obtido maior valor de biomassa celular, nota-se, que não houve elevação no número de unidades formadoras de colônias. Esse efeito pode ser justificado, devido o metabolismo fermentativo da levedura, o qual possibilita a produção e liberação metabólitos secundários para o meio, como é o caso, do etanol e outros ácidos orgânicos, sendo que estes, com o passar do tempo de cultivo, acumulam-se e tonam-se inibitórios para o crescimento.

Tabela 5 – Parâmetros determinados para os ensaios sem e com aeração.

Ensaio	Concentração inicial de fonte de carbono (glicose) (g L^{-1})	Biomassa (g L^{-1})	Enumeração inicial $\log(\text{ufc mL}^{-1})$	Enumeração Final $\log(\text{ufc mL}^{-1})$
SA20G	20	2,464±0,036	6,447	8,954±0,006
SA40G	40	3,578±0,012	6,50	7,812±0,011
SA60G	60	4,426±0,046	6,414	7,792±0,015
AE20G	20	5,164±0,042	7,041	8,278±0,011
AE40G	40	5,988±0,046	7,041	8,311±0,009
AE60G	60	6,708±0,046	7,041	8,255±0,014

Arslan *et al.*, (2016) e Doughtigoc *et al.*, (2013) obtiveram em seus cultivos com a levedura *S. boulardii* em meio YNB (*yeast nutriente broth*) com concentração de glicose inicial no meio de 10 g L^{-1} , uma quantidade final de células viáveis de $8,45 \log(\text{ufc mL}^{-1})$.

Silva (2013) constatou que a concentração de glicose no cultivo do *L. casei* em meio a base de soro de leite não teve influência significativa na formação de unidades formadoras de colônias quando a concentração de glicose foi superior a 20 g L^{-1} em 20 horas de cultivo.

Assim, por possuir menor concentração inicial de glicose, não necessitar aeração, e fornecer o maior número de UFC, determinou-se como meio de cultivo padrão para os demais testes a serem realizados nesta pesquisa, o meio SA20G.

4.2. Microencapsulação por *Spray-dryer*

4.2.1. Ensaios preliminares de Microencapsulação com diferentes agentes carreadores

4.2.1.1. Rendimento das microencapsulações e umidade dos ensaios preliminares

Para avaliar a sobrevivência de *S. boulardii* durante a secagem por *spray-drying*, foram realizados 9 ensaios com quatro diferentes materiais de parede de origem proteica, e suas combinações com maltodextrina. A Tabela 6 apresenta os resultados de rendimento (%) em termos de sobrevivência celular (EY) de *S. boulardii*, umidade (%) para diferentes condições avaliadas, em condições fixas de secagem, temperatura de 90°C e vazão de alimentação de 0,55 L mim⁻¹.

Tabela 6 - Rendimento da microencapsulação (%), teor de umidade, unidades formadoras de colônia inicial e após secagem (log (ufc)(mL⁻¹)) para os 9 ensaios preliminares avaliados.

Ensaio	Composição de Sólidos*	Inicial log(ufc.mL ⁻¹)	Final log(UFC.g ⁻¹)	EY (%)	Umidade média (%)
1	PEP	-	-	-	-
2	PEM	-	-	-	-
3	CPP	6,15	5,91	96,22	4,56±0,04
4	CPM	5,78	5,40	93,41	2,72±0,02
5	WPP	6,23	5,88	94,29	3,96±0,03
6	WPM	6,76	6,26	92,48	3,66±0,02
7	PAP	6,43	6,18	96,03	4,99±0,01
8	PAM	6,27	6,15	98,03	4,15±0,03
9	MAL	6,26	5,73	91,64	3,65±0,02

*PEP: proteína de ervilha Pura; PEM: proteína de ervilha + maltodextrina; CPP: concentrado proteico puro; CPM: concentrado proteico + maltodextrina; WPP: *whey protein* puro; WPM: *whey protein* + maltodextrina; PAP: proteína de arroz pura; PAM: proteína de arroz + maltodextrina; MAL: maltodextrina pura.

Referindo-se aos resultados (Tabela 6) do processo de microencapsulação por *spray-drying*, os ensaios com a proteína de ervilha (PEP e PEM), não ocorreram de forma satisfatória, possivelmente, porque às propriedades físicas desta proteína nas condições testadas (temperatura de 90°C e vazão de alimentação de 0,55 L mim⁻¹), favoreceram para a geração de uma alta aglomeração das partículas nas paredes do secador, e assim, impossibilitando a obtenção de um pó fino ao final do processo de secagem. Este comportamento também foi observado por Arslan *et al.* (2015).

Nos ensaios realizados com as demais proteínas e suas combinações com maltodextrina (Tabela 6), tem-se que, o ensaio PAM com 50% de proteína de arroz e 50% maltodextrina, foi o que obteve os melhores resultados em termos de rendimento, tendo atingindo um valor de 98,03%, seguido pelos ensaios CPP e PAP, atingindo a faixa de 96% na eficiência da encapsulação.

Já os piores rendimentos da microencapsulação foram observados nos ensaios WPM (50% *whey protein* e 50% maltodextrina) e o realizado apenas com maltodextrina (MAL), sendo os valores obtidos entre 91 e 92,5%.

Na literatura em geral encontram-se rendimentos de microencapsulação de probióticos que variam desde 10% a 98%. Ghandi *et al.* (2012), onde os autores investigaram a resistência de *Lactococcus lactis* na microencapsulação por *spray-drying* utilizando lactose e caseinato de sódio como agentes carreadores, em temperatura de secagem de 130°C, obtiveram valores de rendimento baixos, em torno de 14%. Já Golowczyc *et al.* (2011) estudando a microencapsulação de diferentes linhagens de *Lactobacillus* com leite em pó como agente carreador, e temperatura de secagem de 160°C, obteve um rendimento de 94%.

Na microencapsulação realizada por Doungtigoc *et al.* (2013) com a levedura probiótica *S. boulardii*, os autores obtiveram 38% de sobrevivência com agente carreador *whey protein*, em temperatura de secagem de 90°C, sendo este valor, ligeiramente inferior ao obtido na presente pesquisa com as mesmas condições (WPP, EY = 94,29%).

Já autores, como Arslan *et al.* (2015) microencapsulando de *S. boulardii* com os agente carreadores concentrado proteico de leite e proteína de ervilha isolada, em temperatura de secagem de 80°C, obtiveram rendimentos de sobrevivência de 91,80 e 86,52%, respectivamente. Valores estes que corroboram com os obtidos neste trabalho em temperatura de 90°C (Tabela 6 - ensaios PEP e PEM = 0%; ensaio CPP = 96,22%) levando em conta as diferenças nos métodos e na operação do aparelho que fez a microencapsulação.

De modo geral, ao analisarmos os resultados expostos na Tabela 6, nota-se que a presença de maltodextrina nas condições testadas influenciou de forma negativa na sobrevivência de *S. boulardii* durante a microencapsulação, este

fator pode estar relacionado à quantidade de maltodextrina ser igual a de proteína, uma vez que, no processo de microencapsulação as proteínas de origem animal são desnaturadas formando uma barreira rígida para a proteção do microrganismo (WANG *et al.*, 2004),

Menezes (2015) em sua pesquisa, também observou maior redução na viabilidade de *L. acidophilus* nos tratamentos onde a quantidade de maltodextrina era maior que a quantidade de proteína isolada de soja.

A proteína de arroz (PAP) foi o agente encapsulante que mostrou melhor resultado em termos de rendimento na microencapsulação de *S. boulardii*, este resultado pode ser explicado segundo Wang *et al.* (1999), pelo fato de neste tipo de proteína haver considerável teor de aminoácidos, sendo este, muito próximo do encontrado na proteína isolada de soja, a qual, tem como características já bem definidas, como alto poder de emulsificação, formação de filme e de gelificação, sendo estas, considerações importantes para a escolha de um bom agente microencapsulante (GU, CAMPBELL, EUSTON, 2009; TANG e LI, 2013).

Outro quesito que deve ser observado para obter bons rendimentos na microencapsulação, é a umidade, pois esta, favorece a estabilidade das microcápsulas obtidas, a literatura cita valores de umidade entre 4 e 5% (CHAVÉZ; LEDEBOER, 2007, GHANDI, *et. al.*, 2012).

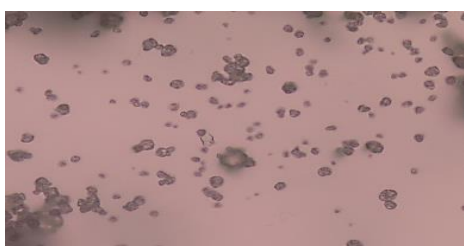
Os resultados deste parâmetro apresentados na Tabela 6, faz-se observar que a umidade variou entre 2,72% (Ensaio CPP) e 4,99% (Ensaio PAP), sendo os menores valores encontrados nos ensaios adicionados de maltodextrina (CPP, WPM e PAM) ou ensaio (MAL) contendo apenas ela como carreador, nestes, todos os resultados ficaram abaixo de 4%. Já os realizados com adição de proteína em sua constituição (CPP, WPP e PAP), obtiveram valores dentro ou muito próximos, dos relatados na literatura (4%). Arslan *et al.* (2015) cita que os valores de umidade são dependentes do tipo de material utilizado como encapsulante, e assim como da sua proporção de mistura com maltodextrina.

4.2.1.2. Morfologia

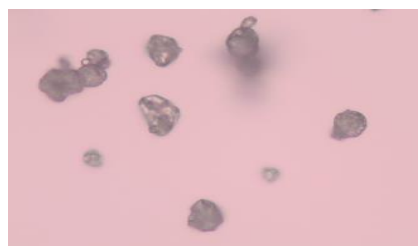
Com o intuito de analisar a esfericidade e estimar a conformidade no tamanho das microcápsulas formadas, micrografias com zoom de 40x das

microcápsulas de *S. boulardii* obtidas após a secagem em equipamento *spray-dryer* foram analisadas, e as imagens estão apresentadas na Figura 5.

De modo geral, observa-se (Figura 5) que para todas as proteínas e combinações com maltodextrina testadas, há formação de partículas esféricas de superfície irregular e com a presença de achatamentos. Tal fenômeno é descrito por também por Saavedra *et al.* (2015) na secagem de isolado proteico de soja e maltodextrina em *spray-dryer* na temperatura de 150°C.



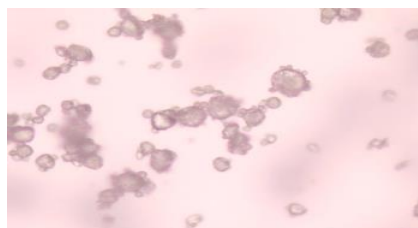
(a)



(b)



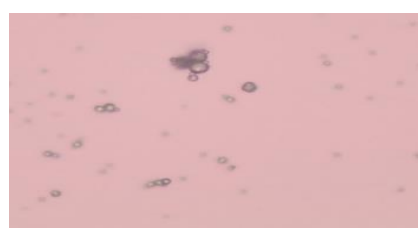
(c)



(d)



(e)



(f)

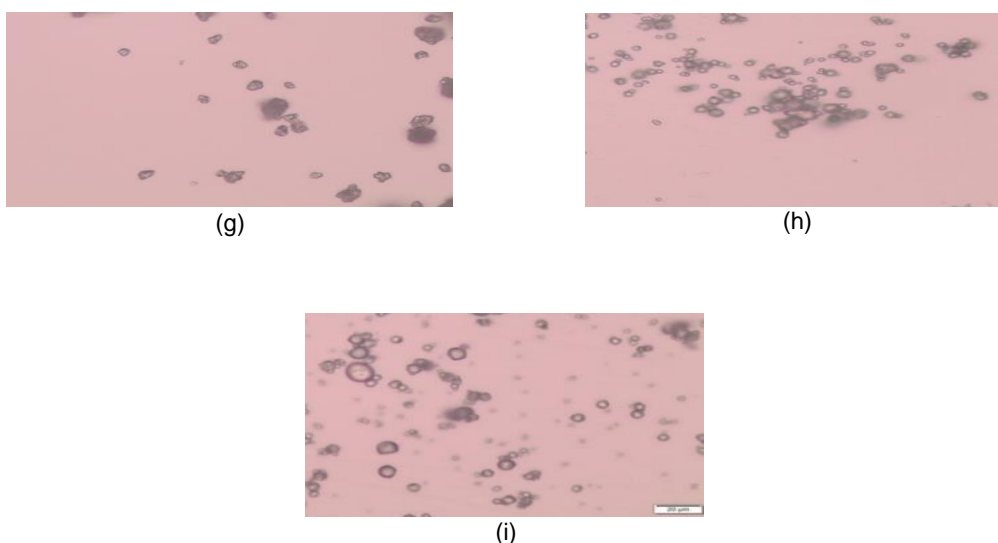


Figura 5- Micrografias das microcápsulas de *S. boulardii* obtidas após a secagem em equipamento *spray-dryer*, (a) PEP, (b) PEM, (c) CPP, (d) CPM, (e) WPP, (f) WPM, (g) PA, (h) PAM e (i) MAL.

De acordo com O’Riordan *et al.* (2001), essas inconformidades são características resultantes das altas temperaturas e da alta velocidade de secagem, utilizadas em *spray-dryer*. Tais concavidades podem ser denominadas, como “efeito bola vazia”, sendo este, influenciado diretamente pelo tipo de agente carreador empregado no processo (LIAN *et al.*, 2002).

4.2.1.3. Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

O uso de análises de espectroscopia na região do infravermelho para microencapsulações possibilita fazer um escaneamento da superfície das microcápsulas e identificar interações ou mudanças nas ligações entre as moléculas presentes. Deste modo, as microcápsulas obtidas nos ensaios com diferentes proteínas combinadas com maltodextrina, assim como cada agente encapsulante de forma individual, e também as células *in natura* e livres de *S. boulardii*, foram analisadas por FT-IR.

Na Figura 6, 7, 8 e 9 são exibidos os espectros obtidos para as microcápsulas dos Ensaios CPP, CPM, WPP, WPM, PAP, PAM e PAM, agentes carreadores e células livres. E na Tabela 7 são apresentadas sob a forma de um resumo as correlações espectroscópicas de infravermelho, obtidas para estes ensaios.

No espectro dos ensaios CPP, CPM, WPP, WPM, PAP e PAM, com concentrado proteico de leite, *Whey protein* e proteína de arroz, observam-se as bandas de absorção características de proteína, correspondentes à amida I e amida II, sendo que as bandas encontradas na região de 1700-1600 cm^{-1} ocorrem devido ao estiramento das ligações C=O e C=N, característicos de amida I, enquanto as bandas entre 1600-1500 cm^{-1} são decorrentes de deformação N-H e estiramento C-N, os quais caracterizam amida II. Na região do infravermelho, as frequências de bandas devido às vibrações amida I e II são sensíveis às alterações na estrutura secundária das proteínas (PIETRZAK; MILLER, 2005; CAIRES *et al.*, 2008; JENALIB, 2014). De acordo com Liu *et al.* (2008), a banda relacionada à amida I é a mais sensível às alterações na estrutura secundária das proteínas.

As bandas na região de 1000 cm^{-1} , que são correspondentes ao estiramento da ligação C – O e à deformação angular das ligações duplas dos grupamentos CH e CH₂ (KRISHNAIAH, *et al.*, 2012) são visíveis em todos os espectros obtidos, tanto para as microcápsulas, quanto para os agentes carreadores e para as células livres.

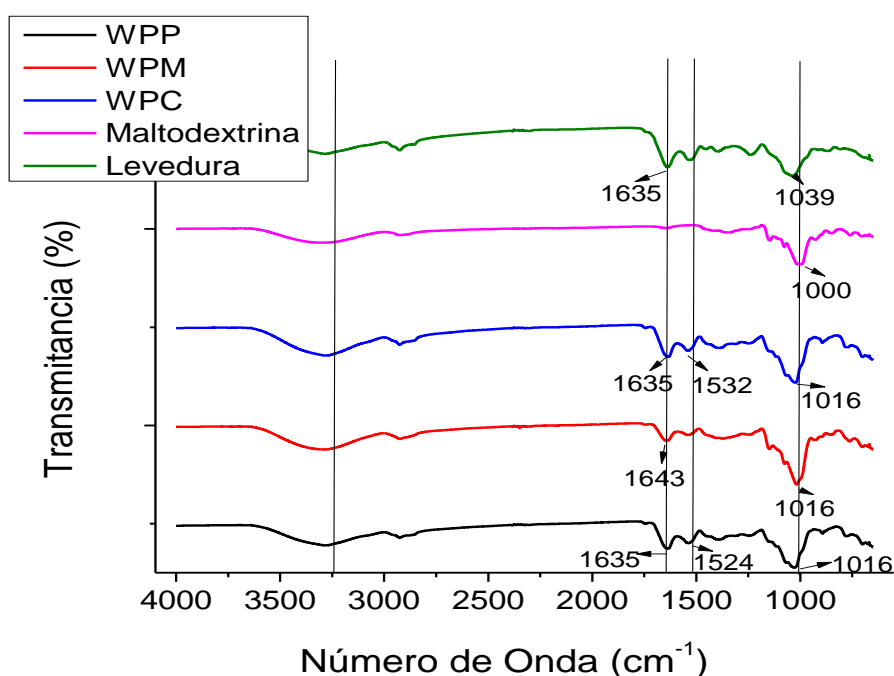


Figura 6 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: CPP e CPM, células livres de *S. boulardii*, e dos agentes carreadores.

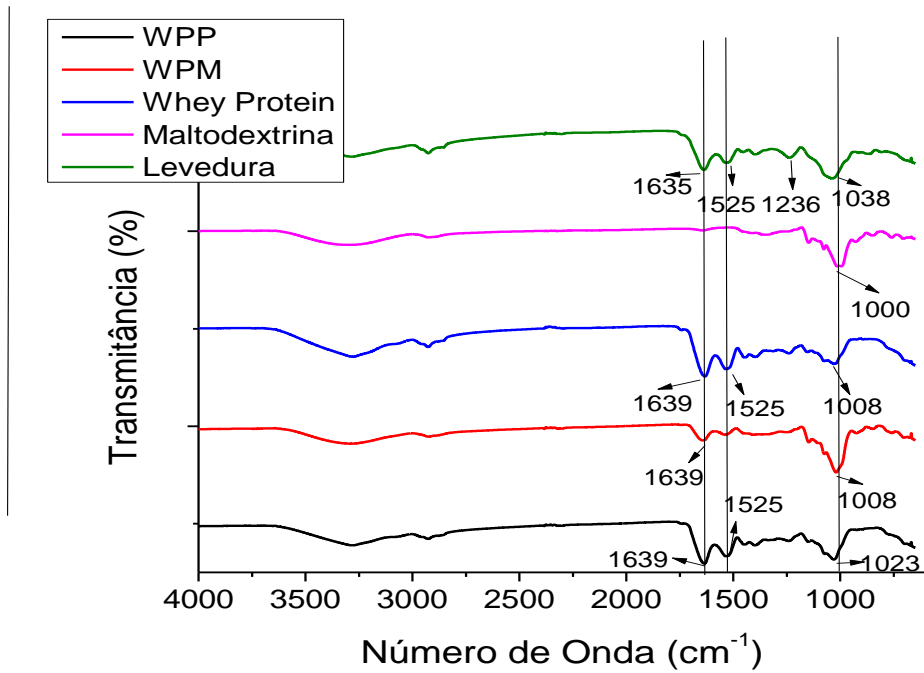


Figura 7 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: WPP e WPM, células livres de *S. boulardii*, e dos agentes carreadores.

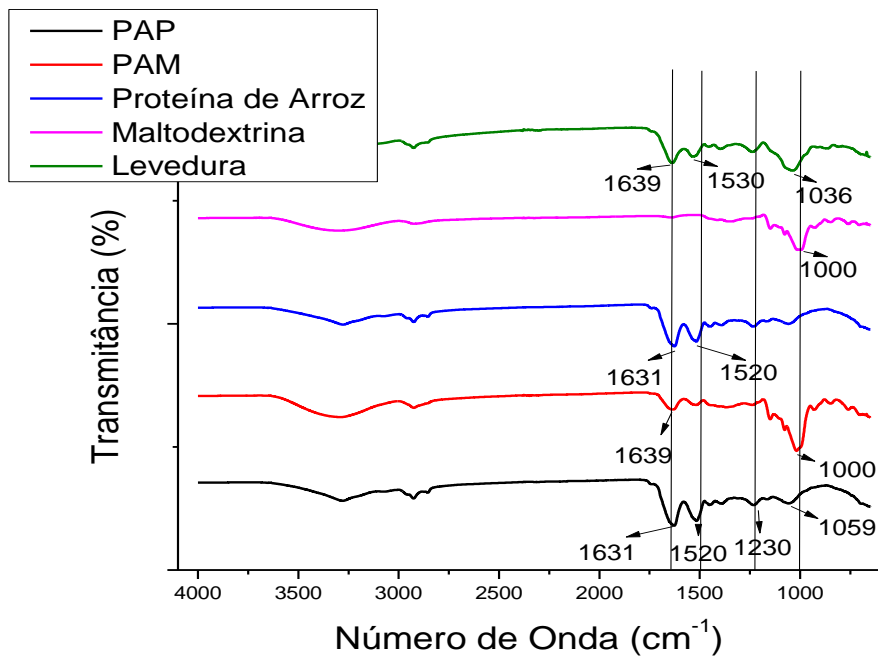


Figura 8 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: PAP e PAM, células livres de *S. boulardii*, e dos agentes carreadores.

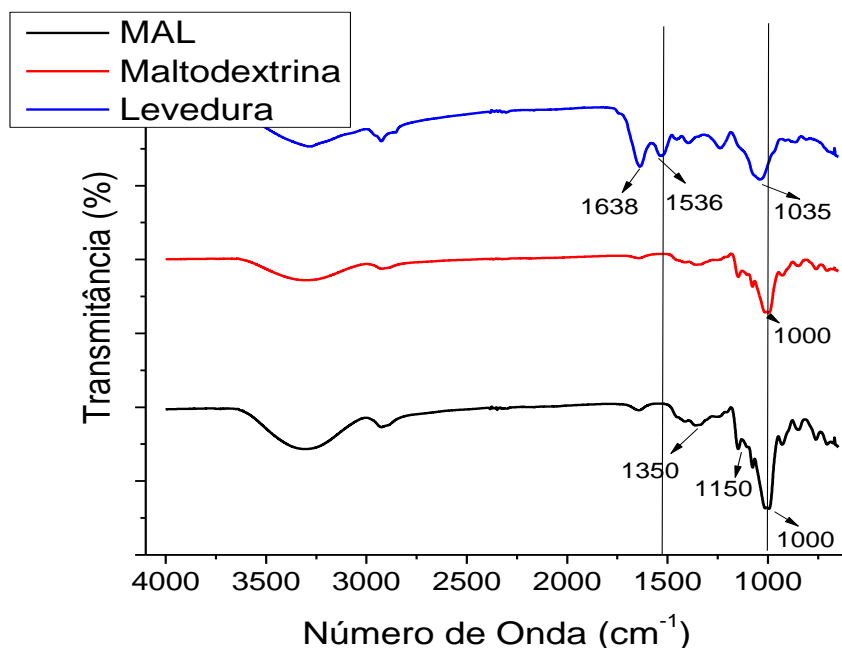


Figura 9 - Espectros FTIR das microcápsulas obtidas para: MAL, células livres de *S. boulardii*, e dos agentes carreadores.

É possível observar nos ensaios CPP, CPM, WPP, e WPM uma diminuição das bandas na região entre 1500 e 1750 cm^{-1} , indicando que o processo pode ter afetado as estruturas das moléculas dos materiais encapsulantes.

Tabela 7 - Principais correlações espectroscópicas de infravermelho obtidas.

Comprimento de onda (cm^{-1})	Tipo de Absorção
1635	Amida Primária
1643	
1532	Alongamento ligação C=C e C=N
1525	
1236	Amida terciária
1230	
1150	Alongamento C-O
1059	Ligações C-OH de oligosacarídeos
1039	Alongamento ligações C-O de ribose
1000	Alongamento ligações C-O carboidratos.

Em todos os ensaios na região correspondente entre 900 cm^{-1} e 1100 cm^{-1} , os espectros apresentaram picos, os quais podem ser relacionados há vibrações da ligação C – O e vibrações de estiramento da ligação C – O – C de carboidratos como a glicose (FRAGOSO *et al.*, 2011). Essa característica é bem evidenciada nos ensaios contendo maltodextrina pura, e também nos ensaios em que há os agentes encapsulantes provenientes do leite (CP e WPC), possivelmente devido à lactose, que mesmo em concentrações bem reduzidas, está presente nos mesmos. Além disso, a banda ampla presente em todos os ensaios na região de 3600 a 3000 cm^{-1} podem ser associados a carboidratos, ácidos carboxílicos e água devido ao estiramento de ligações O – H presentes nestes compostos (HE *et al.*, 2007).

No Ensaio PAP, realizado com proteína de arroz, nota-se que não há manifestação no espectro correspondente nesta faixa, indicando que o agente utilizado é composto unicamente de proteína, não havendo resquícios de derivados de carboidratos.

Além disso, para todos os espectros obtidos (ensaios, agentes e células livres, Figura 6), é possível observar a presença de uma banda próxima a região de 3000 cm^{-1} . Tais picos são devidos ao estiramento simétrico e assimétrico da ligação C – H do grupo metil (HE, *et al.*, 2007).

E por fim, ao observarmos o espectro obtido para o Ensaio MAL, verifica-se que as microcápsulas não apresentaram as principais bandas características do espectro das células de *S. boulardii*, região entre 1500 e 1750 cm^{-1} , o que pode indicar um recobrimento total das células de *S. boulardii* pelo agente encapsulante durante o processo de microencapsulação. Este fenômeno também foi observado por Menezes (2015) na microencapsulação de *L. acidophilus* com proteína isolada de soja e maltodextrina.

4.2.1.4. Análise Termogravimétrica

As análises termogravimétricas indicam a resistência dos materiais ao calor, no caso de microcápsulas, podem sinalizar possibilidades de aplicação em processos industriais que envolvam calor, como por exemplos pães, biscoitos, queijos, entre outros. Na figura 7 (a, b, c, d) são apresentados os resultados desta análise, para as condições de microencapsulação obtidas nos ensaios

CPP, CPM, WPP, WPM, PAP, PAM e MAL, agentes carreadores e células *in natura* livres de *S. boulardii*.

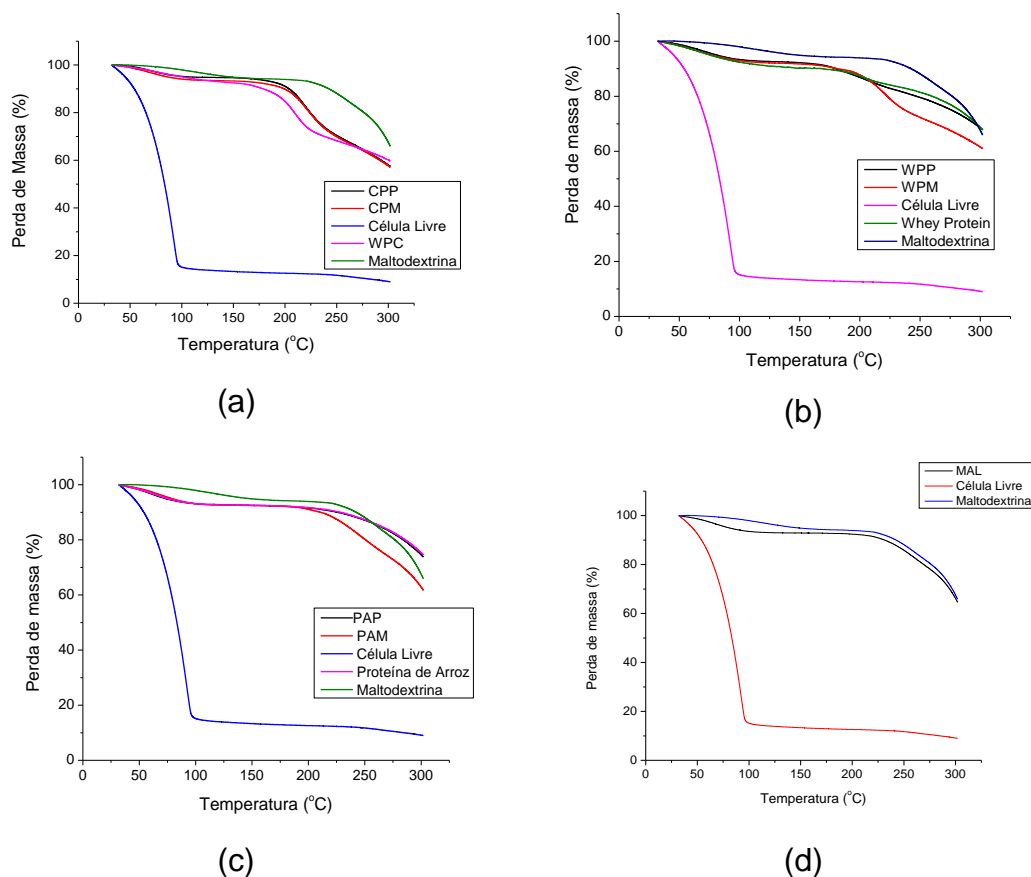


Figura 10 - Análises termogravimétricas das microcápsulas obtidas (a) CPP e CPM, (b) WPP e WPM, (c) PAP e PAM, células livres de *S. boulardii*, e dos agentes carreadores.

Na Figura 10 para todos os ensaios observa-se presença de dois estágios de perda de massa. O primeiro, correspondente à faixa de temperatura situada entre 30°C e 100°C, o que pode ser justificado conforme já relatado por Fritzen-Freire *et al.*, (2012) e Menezes (2015) como sendo a perda de umidade presente na amostra. O segundo estágio de perda de massa que inicia em torno de temperatura de 200°C para a maioria das amostras analisadas, com exceção, o WPC, que tem seu início próximo dos 150°C, é em decorrência das reações de degradação de matérias como carboidratos e proteínas, comportamento este já verificado em estudo realizado por Bohm *et al.* (2005).

Ao compararmos as curvas de perda de massa em função da temperatura para células livres e células microencapsuladas nos ensaios com todas as

proteínas utilizadas, observa-se que as células livres, apresentam temperatura de degradação muito inferior a todas as condições testadas, indicando assim, que a microencapsulação fornece proteção térmica às células, desta forma, possibilitando a sua aplicação em alimentos que sofram tratamentos térmicos. Cabe ressaltar, que deve-se sempre respeitar os limites máximos de temperatura obtidos para cada ensaios de microencapsulação, no caso desta pesquisa devendo ser inferior a 200°C.

4.2.2. Análise dos fatores que influenciam a microencapsulação por *Spray-drying*

A maior eficiência na microencapsulação de *S. boulardii* obtida nos ensaios preliminares aponta que a proteína de arroz e sua combinação com maltodextrina possui potencial uso para a microencapsulação por *spray drying*. Diante disso, ensaios foram realizados para verificar a influência dos parâmetros de secagem (temperatura de secagem e vazão de alimentação), e também a interação desta proteína, com diferentes concentrações de maltodextrina.

4.2.2.1. Influência dos parâmetros de secagem no processo de microencapsulação

Para avaliar os efeitos dos parâmetros de secagem no rendimento da microencapsulação de *S. boulardii* por *spray-drying* os resultados obtidos a partir dos experimentos realizados seguindo o planejamento experimental fatorial 2³ são mostrados na Tabela 8.

Verifica-se (Tabela 8) que o ensaio 2, com 25% de maltodextrina, 80°C e vazão de 0,75 L h⁻¹ foi o tratamento que gerou maior sobrevivência após microencapsulação (79,88%). E o ensaio 7, 75% de maltodextrina, 100°C e vazão de 0,35 L h⁻¹ propiciou o pior dos resultados (44,44%).

Tabela 8 – Resultados para eficiência da microencapsulação de acordo com planejamento fatorial completo.

Ensaio	% Maltodextrina/ Proteína de Arroz (q ₁)	Temperatura de secagem (°C) (q ₂)	Vazão de alimentação (L h ⁻¹) (q ₃)	EY(%)
1	-1(25%)	-1(80°C)	-1 (0,35)	65,25
2	-1(25%)	-1 (80°C)	1 (0,75)	79,88
3	-1(25%)	1 (100°C)	-1 (0,35)	53,00
4	-1(25%)	1 (100°C)	1 (0,75)	71,22
5	1(75%)	-1 (80°C)	-1 (0,35)	49,21
6	1(75%)	-1 (80°C)	1 (0,75)	63,28
7	1(75%)	1 (100°C)	-1 (0,35)	44,44
8	1(75%)	1 (100°C)	1 (0,75)	55,32
9	0(50%)	0 (90°C)	0 (0,55)	69,46
10	0(50%)	0 (90°C)	0 (0,55)	68,56

A análise estatística dos resultados obtidos, realizada pelo *Software* Statistica® 8.0, é apresentada pela estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis (Tabela 9), o diagrama de Pareto (Figura 11), a análise de variância (Tabela 10), e o modelo de regressão (Equação (3)).

Tabela 9 - Estimativa dos efeitos principais e de interação das variáveis utilizadas no planejamento experimental.

Variáveis	Efeito	t	p-valor	Coefficient e	Erro-padrão do coeficiente
Intercepto	61,9620	308,00	0,0020	61,96	0,201
% Maltodextrina	-14,2750	-31,85	0,0200	-7,13	0,225
Temperatura	-8,4100	-18,56	0,034	-4,20	0,225
Vazão	14,4500	31,98	0,019	7,22	0,225
1 e 2	1,9875	4,41	0,141	0,99	0,225
1 e 3	-1,9175	-4,26	0,146	-0,95	0,225
2 e 3	0,0425	0,09	0,940	0,02	0,225

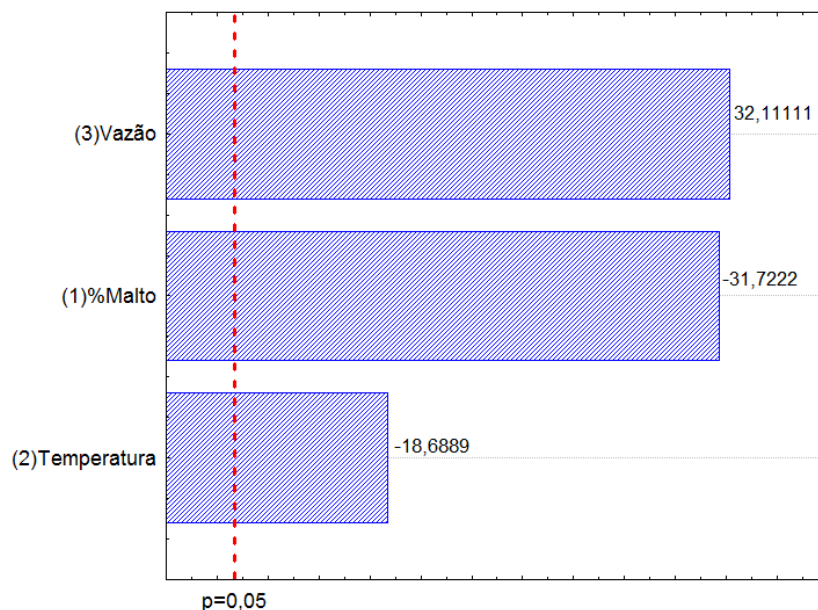


Figura 11 - Diagrama de Pareto com efeito das variáveis e interações estudadas no planejamento fatorial completo para um nível de 5% de significância.

Analisando a Tabela (9) e diagrama de Pareto (Figura 8), é possível inferir que dentre os limites analisados os três parâmetros analisados possuem efeito sobre sobrevivência de *S. bouladii* ($p_{\text{valor}} < 0,05$). Sendo que a porcentagem de maltodextrina como agente encapsulante e a temperatura de secagem apresentam efeitos negativos enquanto a vazão de alimentação possui efeito positivo. A interação entre as variáveis estudadas não possuem efeito significativo sobre a eficiência da encapsulação *EY* da levedura ($p_{\text{valor}} > 0,05$), o diagrama de Pareto, apresentado na Figura (8), representa visualmente essa influência.

A Equação 3 representa a dependência da Eficiência da microencapsulação em função dos parâmetros que a influenciam.

$$EY(\%) = 61,96 - 14,27.\% \text{ malto} - 8,41.Temperatura + 14,45.Vazão \text{ de alimentação} \quad \text{Equação (3)}$$

Pela análise dos valores F, Tabela 10, conclui-se que para o modelo, pelo fato do $F_{\text{calc}} > F_{\text{tab}}$ é possível afirmar que o modelo se ajusta adequadamente aos dados experimentais nas condições experimentais estudadas. BARROS *et al.*,(2010).

Tabela 10 - Análise de variância (ANOVA) dos ensaios do planejamento.

	Soma Quadrática (SQ)	Graus de Liberdade (GL)	Média Quadrática (MQ)	F(calc)	F(tab)
Modelo	966.62	3	322,20	1006.29	6,59
Erro	0,405	1	0,405		
Total	1113,13	9			

$$R^2=88,35\%$$

A Figura 12, (a) representa os pontos aleatórios observados no gráfico dos resíduos pelos valores preditos indicam que os experimentos foram realizados de forma satisfatória e não possuem resultados tendenciosos. Em (b), é possível visualizar o comportamento da distribuição dos valores preditos em função dos valores observados, a tendência dos pontos em se distribuírem aleatoriamente ao longo da reta e a falta de *outliers* indica um alto grau de correlação entre o modelo e os dados (BARROS *et al.*,2010).

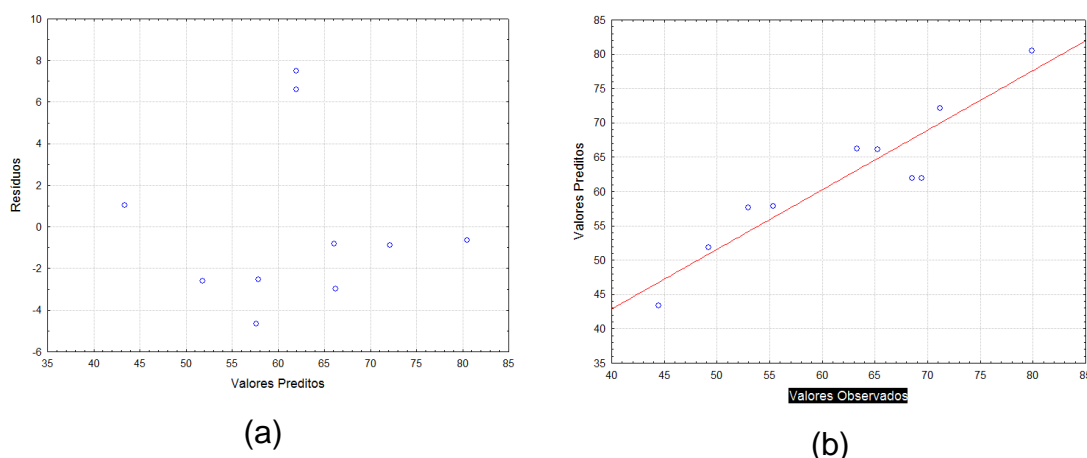


Figura 12 – (a) Diagrama de dispersão e (b) Valores preditos x resíduos obtidos no planejamento experimental fatorial 2^3

A Figura 13 (a, b e c) mostra a dependência do rendimento da microencapsulação em função dos parâmetros estudados, assim observa-se em (a) que EY pode ser otimizado em condições em que a vazão de alimentação e a temperatura sejam menores, em (b) o mesmo fenômeno é observado e EY é incrementado pela redução simultânea da vazão de alimentação e da porcentagem de maltodextrina presente, em (c) a combinação da diminuição da temperatura de secagem e da porcentagem de maltodextrina também favorecem o incremento da EY.

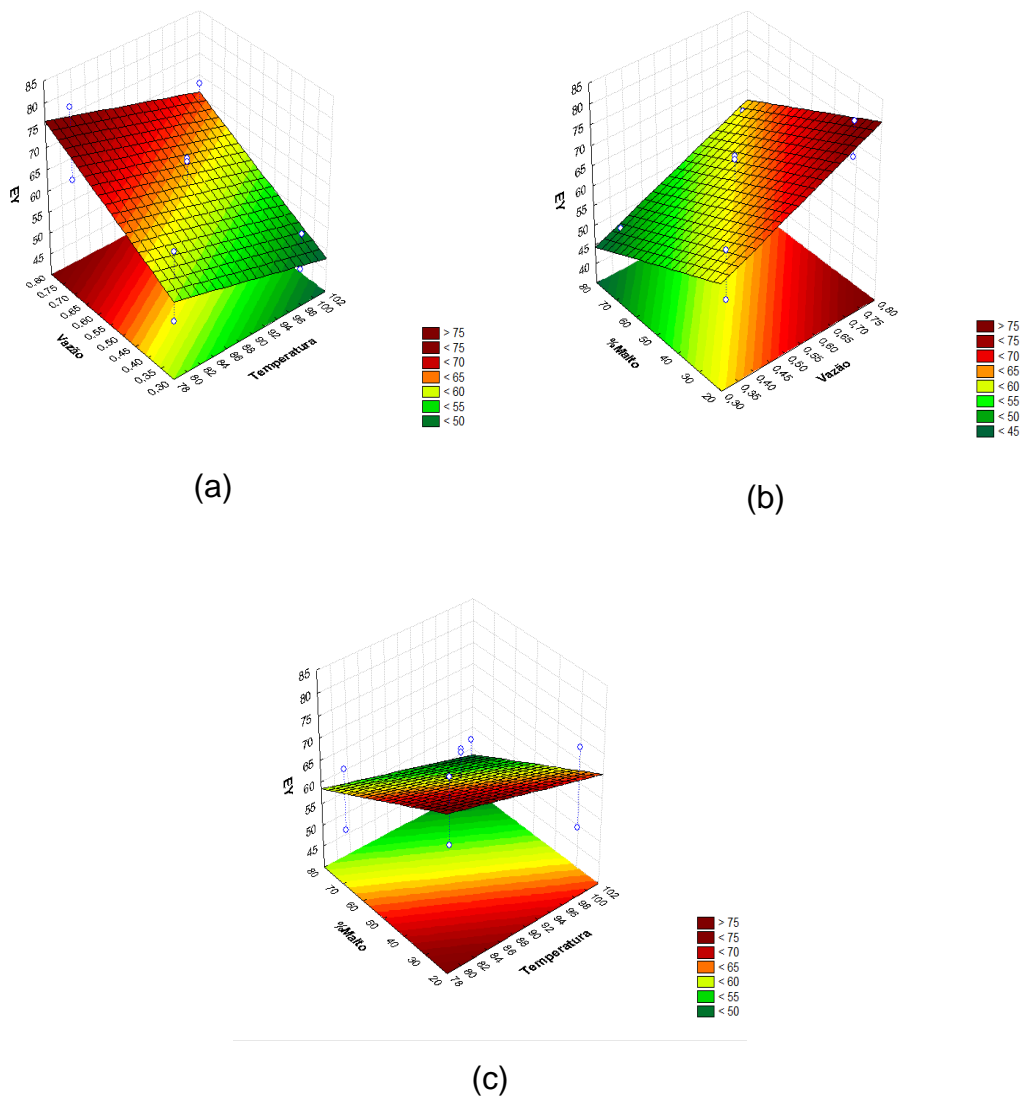


Figura 13 – Superfícies de respostas de EY(%) em função de (a) vazão e temperatura, (b) vazão e porcentagem de maltodextrina e (c) temperatura e porcentagem de maltodextrina.

Segundo Anekella *et al.*, 2013, a redução na viabilidade celular causada pelo aumento da temperatura, assim como observado pela Equação (3) e Figura 10, é associada a alterações físicas nas membranas das células causadas pela alta taxa de desidratação do processo, bem como efeitos nas estruturas das proteínas e mudanças em processos metabólicos das células, sendo estes, os principais efeitos relacionados e relatados na literatura quanto à temperatura de secagem (CORCORAN *et al.*, 2008; FU; CHEN, 2011).

O efeito negativo do aumento da temperatura de secagem foi observado também por Avila-Reyes *et al.*, (2014) na microencapsulação de *L. rhamnosus* com amido de arroz ou inulina como materiais de parede e Lian *et al.*, (2002) que

estudou a microencapsulação de várias estirpes de *Bifidobacteria* com goma arábica ou amido solúvel.

Gandhi *et al.* (2012) observaram que não há sobrevivência de células de *Lactobacillus lactis* na microencapsulação com proteína isolada de soja e lactose em temperaturas de secagem acima de 170°C. O efeito da diminuição da viabilidade celular com o aumento da temperatura também foi observado na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* por Menezes (2015), e na microencapsulação de *S. boulardii* por Arslan *et al.* (2015).

Pode-se observar, Tabela 8, que os ensaios que possuíam maior teor de maltodextrina na composição do material de parede (ensaios 5, 6, 7 e 8) apresentaram os menores rendimentos nas condições avaliadas. Segundo Chávez e Ledebøer (2007), a presença de maltodextrina como material de parede pode influenciar positiva ou negativamente, dependendo da concentração e dos materiais de parede utilizados no processo de microencapsulação.

Na literatura consultada não foram encontrados relatos de autores que observaram a influência da vazão de alimentação no rendimento da microencapsulação. Como exemplo, Menezes (2015) que não identificou influência deste parâmetro sobre a sobrevivência de *L. acidophilus* na microencapsulação por *spray-drying* utilizando temperaturas entre 70 e 100°C. O efeito negativo deste parâmetro nos ensaios realizados pode estar ligado ao fato de que grande parte da amostra obtida ficou aglomerada nas paredes do ciclone. Como nas menores vazões era necessário mais tempo para que toda a solução passasse pelo secador, as amostras aglomeradas ficavam mais tempo expostas a altas temperaturas o que ocasionou a perda de viabilidade.

Behboudi-Jobbehdar *et al.* (2013), observaram a microencapsulação de *L. acidophilus* NCIMB 701748 em temperatura de 160°C em alta vazão (9 mL.min⁻¹), proporcionou maior sobrevivência 8,19 log(ufc g⁻¹) frente a vazões, como 6 mL.min⁻¹ (7,37 log(ufc g⁻¹)). Segundo os autores, isso pode ocorrer, devido a mudanças na cinética de transferência de calor e massa do sistema os quais podem ser modificadas, e assim, reduzindo a deterioração das membranas celulares.

4.2.2.4 Umidade

Os parâmetros de secagem e a composição dos materiais de parede podem influenciar significativamente a umidade do pó obtido após a secagem. A Tabela 11 mostra o valor da umidade resultante para os ensaios realizados segundo planejamento experimental fatorial 2^3 .

Tabela 11 – Umidade das microcapsulas obtidas pelo planejamento experimental fatorial completo 2^3 .

Ensaio	% Maltodextrina/ Proteína de Arroz (q_1)	Temperatura de secagem ($^{\circ}\text{C}$) (q_2)	Vazão de alimentação (L h^{-1}) (q_3)	Umidade (%)
1	-1(25%)	-1(80 $^{\circ}\text{C}$)	-1 (0,35)	2,52
2	-1(25%)	-1 (80 $^{\circ}\text{C}$)	1 (0,75)	4,33
3	-1(25%)	1 (100 $^{\circ}\text{C}$)	-1 (0,35)	3,59
4	-1(25%)	1 (100 $^{\circ}\text{C}$)	1 (0,75)	6,35
5	1(75%)	-1 (80 $^{\circ}\text{C}$)	-1 (0,35)	2,44
6	1(75%)	-1 (80 $^{\circ}\text{C}$)	1 (0,75)	3,95
7	1(75%)	1 (100 $^{\circ}\text{C}$)	-1 (0,35)	1,51
8	1(75%)	1 (100 $^{\circ}\text{C}$)	1 (0,75)	2,35
9	0(50%)	0 (90 $^{\circ}\text{C}$)	0 (0,55)	6,32
10	0(50%)	0 (90 $^{\circ}\text{C}$)	0 (0,55)	7,60

Observa-se (Tabela 11) valores entre 1,51%(Ensaio 7) e 7,5 %(Ensaio 10) resultados que corroboram com os de Chávez; Ledebøer (2007) que em seu estudo obtiveram valores de umidade 5,07% e 7,51% utilizando a temperatura de secagem de 80 $^{\circ}\text{C}$ em microcápsulas produzidas com proteína e maltodextrina. Comparando os valores de umidade obtidos na Tabela 11 e na tabela 6 pode-se inferir novamente que a umidade obtida no pó após a microencapsulação depende fortemente tanto das condições de secagem quanto do tipo do material utilizado como agente encapsulante.

4.2.2.4. Caracterização Química por Espectroscopia no Infravermelho por Transformada de Fourier (FT-IR)

Na Figura 14 tem-se os resultados para os espectros analisados por FT-IR, referente a um ensaio de cada proporção de proteína de arroz e maltodextrina estudados: Ensaio 2 (75P/25M), Ensaio 9 (50P/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), assim como das células livres de *S. boulardii*.

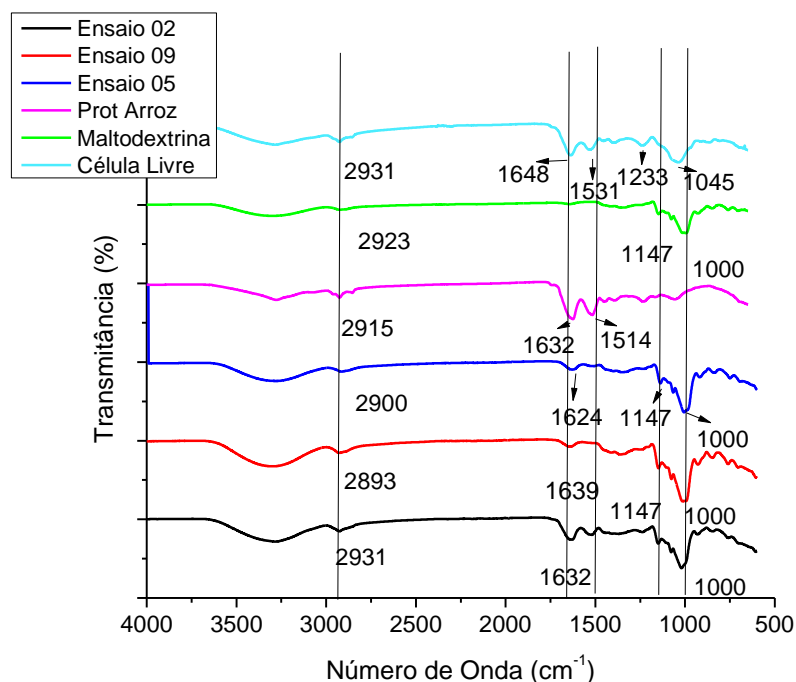


Figura 14 -Espectros FTIR para Ensaio 2 (75PA/25M), Ensaio 9 (50PA/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), células livres de *S. boulardii*.

Nota-se, pela Figura 14, diminuição nas bandas características de proteínas (região de 1500 e 1750 cm^{-1}) quando se compara os ensaios com maior e menor teor de maltodextrina, ensaios 5 e 9. Além do mais, observa-se que a banda característica observada em 1233 cm^{-1} no espectro das células livres não está presente em nenhum dos ensaios mostrados, indicando cobertura total das células de levedura pelos agentes encapsulantes.

4.2.2.5. Análise Termogravimétrica (TGA) e Análise de Calorimetria diferencial exploratória (DSC).

O intuito de verificar, qual efeito o real efeito da adição de maltodextrina na formação das capsulas, e assim, poder concluir em termos de influência deste carreador no proposito final, adição das microcápsulas de *S. boulardii* em alimentos, avaliou-se as curvas de perda de massa por TGA e DSC para o Ensaio 1 (75PA/25M), Ensaio 9 (50PA/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), assim como das células livres de *S. boulardii*. Estes estão apresentados nas figuras 12 e 13.

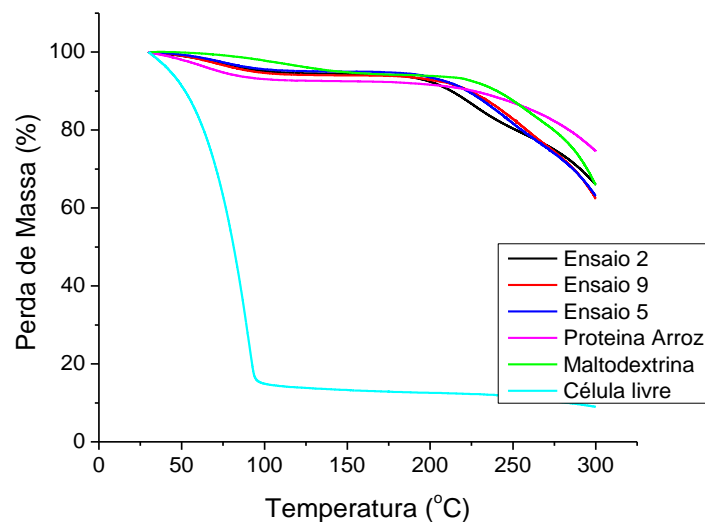


Figura 15 – Curva termogravimétrica para Ensaio 2 (75P/25M), Ensaio 9 (50P/50M), Ensaio 5 (25PA/75M), agentes encapsulantes individuais (maltodextrina e proteína de arroz), células livres de *S. boulardii*.

Verifica-se (Figura 15), que o comportamento observado na análise térmica TGA, para as diferentes proporções de maltodextrina adicionadas para formação das microcápsulas contendo *S. boulardii*, possuem curva de degradação semelhantes. Todos os comportamentos térmicos apresentam o fenômeno perda de umidade que ocorre até 100°C, e o fenômeno onde ocorre a degradação da cápsula de forma acelerada e contínua, após os 200°C. Inferindo assim, que independente da composição do material de parede com maltodextrina (25, 50 ou 75%) não ocorrem alterações significativas na estabilidade e existe efeito de proteção pretendido com a microencapsulação de *S. boulardii*.

Na Tabela 12 os valores obtidos para a perda de massa pontual nas temperaturas de secagem estudadas mostram que a perda de massa no intervalo de temperatura é constante e se encontram na primeira faixa de perda de massa, característica da perda de umidade da amostra.

Tabela 12 - Perda de massa pontual para os ensaios 2 (75PA/25M); Ensaio 5 (50PA/50M) e ensaio 9 (75M/25PA)

Ensaio	Temperatura (°C)	Perda de massa pontual
2	80	96,63±0,028
	90	95,81±0,02
	100	95,22±0,017
5	80	96,89±0,038
	90	96,14±0,010
	100	95,62±0,010
9	80	96,85±0,022
	90	96,08±0,014
	100	95,68±0,007

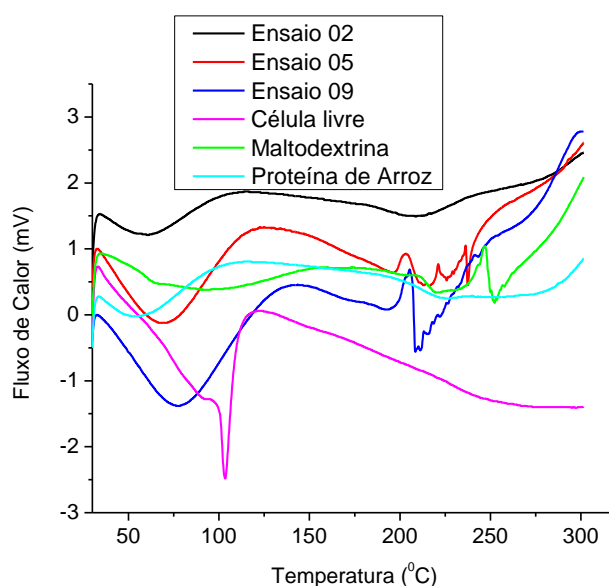


Figura 16- Curvas de DSC das microcápsulas obtidas para os ensaios 1 (75P/25M), Ensaio 5 (25P/75M), Ensaio 9 (50P/50M), dos agentes encapsulantes e células livres.

Para as curvas de DSC obtidas (Figura 16) é possível observar um comportamento semelhante entre a proteína de arroz e as microcápsulas geradas com 25% de maltodextrina (Ensaio 1). Nas curvas dos Ensaios 5 e 9, 75% e 50% de maltodextrina, respectivamente, existem eventos térmicos observados entre 200 e 250°C, diferentemente dos agentes encapsulantes puros. Este fato pode indicar que a interação entre as moléculas dos agentes encapsulantes ou a secagem por *spray-drying* pode gerar materiais com comportamentos térmicos diferentes (MENEZES, 2015).

Do ponto de vista econômico, a possibilidade da adição de maltodextrina é bastante vantajosa, pois devido aos diferentes processos de obtenção necessários a proteína de arroz pode chegar a custar dez vezes mais que a maltodextrina.

4.2.2.6. Sobrevivência em solução gástrica simulada.

A Figura 14 mostra a estabilidade das microcápsulas obtidas na melhor condição de microencapsulação (Ensaio 2, $EY= 79,80\%$), quando submetidas à condições baixas de pH. Em pH 3, observou-se a sobrevivência de *S. boulardii*, que a quantidade de microrganismos se manteve em torno de $5,40 \log(\text{ufc g}^{-1})$ depois de 3 horas na solução de pH 3,0. Entretanto, nos ensaios realizados com pH 1,5 observou-se a total inviabilidade das células após 2 horas da digestão *in vitro*. Arslan *et al.*, (2016) obteve a sobrevivência de $4,67 \log(\text{ufc g}^{-1})$ para as microcápsulas contendo *S. boulardii* obtidas com amido modificado e $6,64 \log(\text{ufc g}^{-1})$ utilizando gelatina como agente encapsulante após três 3 horas de digestão em pH 2,0. Essa análise indica que mesmo depois de ingeridas, as capsulas obtidas neste trabalho com proteína de arroz e maltodextrina fornecem uma quantidade de microrganismos elevada após passar pelo sistema digestivo do consumidor.

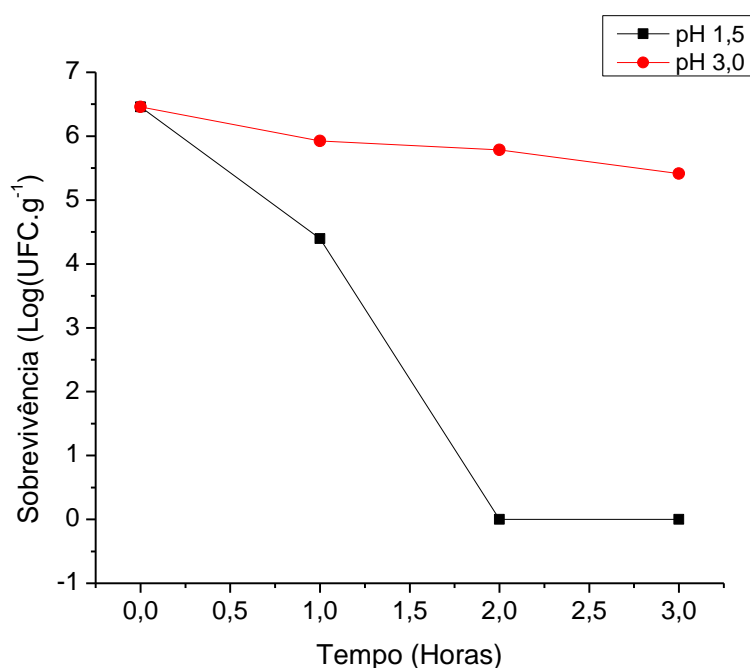


Figura 17 – Estabilidade das microcapsulas contendo *S. boulardii* em pH 1,5 e pH 3,0.

A resistência às condições adversas está diretamente ligada à composição do material de parede, como as proteínas possuem menos grupos polares (hidroxilas) do que os polissacarídeos, proteínas tendem a manter os efeitos ácidos do pH por mais tempo na superfície das microcápsulas do que no interior (ARSLAN *et al.*, 2016). Desta forma, os resultados apresentados pela Figura 14 quando comparados à literatura, mostra que a maltodextrina presente no material de parede pode fazer com a resistência ao pH das microcápsulas diminua.

4.2.2.7. Viabilidade das microcápsulas de *S. boulardii* durante armazenamento.

Para avaliar a estabilidade das microcápsulas de proteína de arroz e maltodextrina contendo *S. boulardii* armazenadas sob refrigeração a cada 5 dias foram realizados rompimentos das microcápsulas para análise da enumeração de *S. boulardii*. A Figura 18 mostra o resultado para este acompanhamento ao longo de 20 dias.

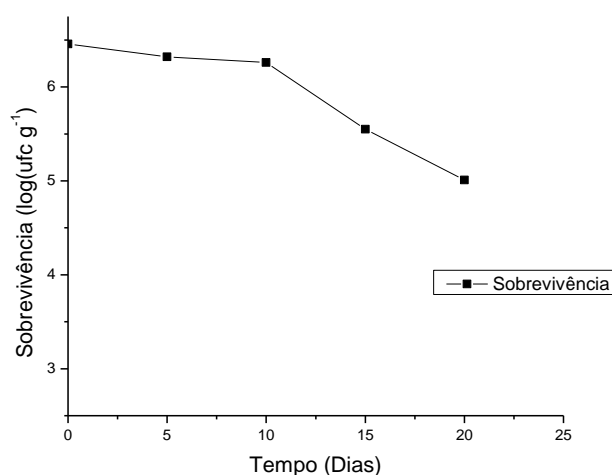


Figura 18 - Viabilidade de nas microcápsulas contendo *S. boulardii* após armazenamento.

Verifica-se, pela Figura 15, que a contagem de microrganismos se manteve estável nos 10 primeiros dias de armazenamento 6,45 log(ufc g⁻¹), com

posterior declínio na viabilidade das células, passando para $5,01 \log(\text{ufc g}^{-1})$ no vigésimo dia após a encapsulação. Lu-e *et al.*,(2013), observaram que as microcápsulas da mistura de alginato e leite contendo *L. bulgaricus* obtidos pelo método de extrusão ficam estável sob refrigeração por pelo menos 30 dias. Coghetto *et al.*, (2016) também observaram que as microcápsulas de alginato de sódio contendo *L. planarum* obtidas por *eletrosprayng* permanecem com atividades microbiológica acima de $10 \log (\text{ufc g}^{-1})$ após 20 dias de armazenamento.

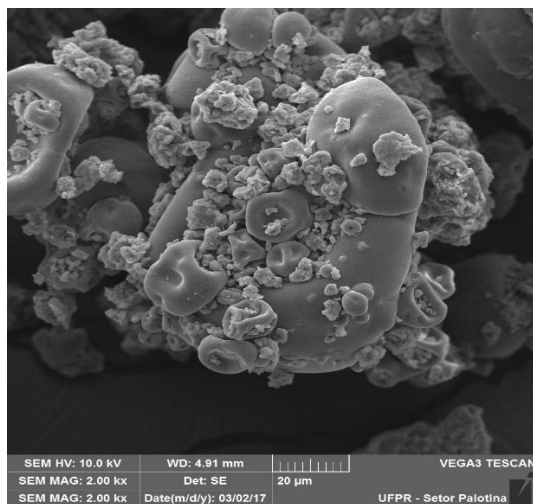
Mesmo obtendo 10 dias de estabilidade no número de unidades formadoras de colônias, as microcápsulas obtidas neste trabalho atendem ao exigência do órgão regulamentador brasileiro (ANVISA, BRASIL 2016) que não preconiza a contagem mínima unidades formadoras de colônias a cada 100g de produtos que sejam intitulados probióticos desde que a atividade probiótica seja comprovada pelo fabricante.

Além do mais, outro fato que deve ser levado em consideração quando se observa menor rendimento na microencapsulação de *S. boulardii* em *spray dryer*, é que leveduras são microrganismos mais sensíveis, muito mais dependentes do meio de cultivo utilizado e mais suscetíveis a agressões do meio externo do que as bactérias ácido lácticas, que são o foco da maioria dos trabalhos envolvendo microencapsulação de probióticos.

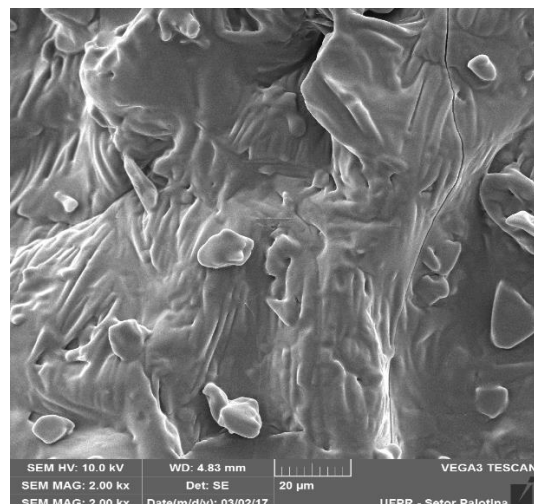
4.2.2.8 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

As Figuras 19 (a e b) e 20 (a, b e c) são resultantes da microscopia eletrônica de varredura para a Proteína de Arroz e Maltodextrina utilizados como materiais encapsulantes (Figura 19 a e b) e dos ensaios 1, 5 e 9 (Figura 20 a, b e c).

Na Figura 19 podem ser observados várias pequenas aglomerações caracterizando microcápsulas corroborando com os resultados obtidos por Fritzen-Freire *et al.*, (2012) e Saavedra *et al.*,(2015) e fica evidenciado o fenômeno conhecido como “efeito bola vazia”.



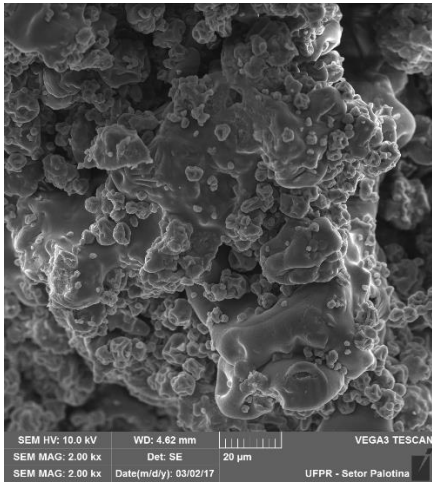
(a)



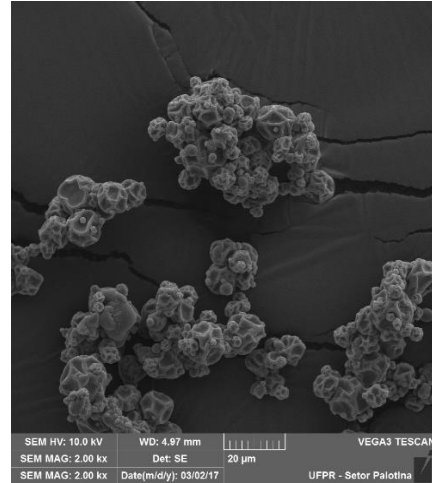
(b)

Figura 19 – Micrografias adquiridas por MEV para os materiais encapsulantes (a) Proteína de Arroz e (b) Maltodextrina.

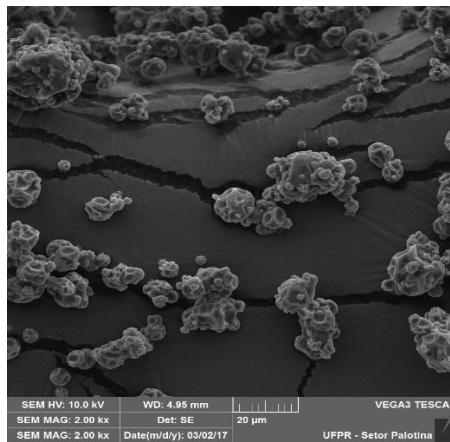
Na Figura 20 (a), do Ensaio 2 (75PA/25M) apesar de apresentarem microcápsulas aparentemente menores apresentam uma grande aglomeração de material o que pode estar relacionado com a menor solubilidade da proteína de arroz que se encontra em maior quantidade neste ensaio. Nas Figuras b e c são observadas estruturas visualmente menores, com maior uniformidade na morfologia e com menos aglomerações.



(a)



(b)



(c)

Figura 20 - Micrografias adquiridas por MEV para os ensaios (a) Ensaio 1 (75PA/25MA) e (b) Ensaio 5 (25PA/75MA) e (c) Ensaio 9 (50PA/50MA).

Mesmo o Ensaio 2 apresentando a morfologia das microcápsulas desuniforme, observar-se que o efeito protetor da proteína possui mais eficácia quando a maltodextrina está presente em menor quantidade, uma vez que foi observado maior índice de sobrevivência nos ensaios onde a proporção Proteína de Arroz/Maltodextrina é maior

4. CONCLUSÃO

Dado o apresentado neste trabalho, conclui-se além de ser possível a microencapsulação de *S. boulardii* com diferentes proteínas combinadas com maltodextrina, que:

- Apesar de a aeração do meio de cultivo propiciar a formação de maior concentração de biomassa no meio a maior formação de unidades formadoras de colônias foi observado no caldo com menor concentração inicial de substrato (20 g L^{-1}) e sem a aeração.
- É possível realizar a microencapsulação de *Sacharomyces boulardii* com diferentes proteínas combinadas com maltodextrina como materiais de parede por *spray-drying*. Sendo que, dentre as estudadas neste trabalho, a proteína de arroz foi a que demonstrou melhor rendimento no processo;
- A partir do planejamento experimental foi possível concluir que a temperatura, a composição do material de parede e a vazão de alimentação são parâmetros do processo que afetam a sobrevivência das células de *S. boulardii* sob a microencapsulação.
- Em relação a morfologia das microcápsulas, tem-se que as mesmas possuem aspecto esférico e condizente com o processo de *spray-drying*; Possuem morfologia esférica com achatamentos.
- As análises de FT-IR mostram que há um confinamento das células de leveduras pelos materiais de parede sem que haja grandes alterações químicas entre os materiais;
- Pela análise de TGA e de DSC é possível inferir que as microcápsulas possuem estabilidade térmica até aproximadamente 200°C ;
- As microcápsulas de proteína de arroz combinada com maltodextrina contendo *S. boulardii* possuem estabilidade de 10 dias durante o

armazenamento sob refrigeração, e resistem por pelo menos 3 horas em condições gástricas simuladas.

Desta maneira, conclui-se que a microencapsulação de *S. boulardii* por *spray drying* é uma tecnologia

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

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

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. **Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying.** *LWT - Food Science and Technology*, v. 50, n. 2, p. 17-24, 2013.

ANUPAMA; RAVINDRA, P. **Value-added food: Single cell protein.** *Biotechnology Advances*. v. 18, p. 459–479, 2000.

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

ASSUNÇÃO, G.M. **Cultivo de biomassa de leveduras utilizando permeado de soro de queijo.** 130f. Dissertação (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE). Toledo, PR, (2014).

Avila-Reyes, S. V., Garcia-Suarez, F. J., Jimenez, M. T., San Martín-Gonzalez, M. F., & Bello-Perez, L. A. **Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability.** *Carbohydrate Polymers*, 102, 423- 430. 2014

BARROS NETO, B.; BRUNS, R. E.; SCARMINIO, I. S. **Como fazer experimentos -Aplicações na ciência e na indústria.** 4.ed. Editora Bookman, 2010.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; SOUKOULIS, C.; YONEKURA, L.; FISK, I. **Optimization of *Spray-Drying* Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748.** *Drying Technology: An International Journal*, v. 31, n.11, p. 1274-1283, 2013.

BERNI-CANANI, R., CIRILLO, P., TERRIN, G., CESARANO, L., SPAGNUOLO, M.I., DE VICENIO, A., ALBANO, F., PASSARIELLO, A., DE MARCO, G., MANGUSO, F., GUARINO, A. **Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: randomized clinical trail of five different preparations.** *BMJ*, 335–340. 2007.

BIELECKA, M.; BIEDRZYCKA, E.; MAJKOWSKA, A. **Selection of probiotics and prebiotics for synbiotics and confirmation of their in vivo effectiveness.** *Food Research. International*, v.35, p.125-131, 2002.

BIENVENIDO, O.J.,. **Le riz dans la nutrition humaine.** Organisation des nations unies pour l'alimentation et l'agriculture, Rome. 1994.

BLANDINO, A., AL-ASEERI, M. E., PANDIELLA, S. S., CANTERO, D., WEBB, C. **Cereal-based fermented foods and beverages.** *Food Research International*. v. 36, p. 527-543, 2002.

BOHM, A.; KAISER, I.; TREBSTEI, A.; HENLE, T. **Heat-induced degradation of inulin.** *European Food Research and Technology*, v. 220, n. 5 p. 466–471, mai. 2005.

BOZE, H., MOULIN, G., GALZY, P. **Production of microbial biomass.** In: Rehm HJ, Reed G, eds. *Biotechnology*. Weinheim, Germany: VCH Verlagsgesellschaft mbH, n. 9, p. 167–220. 1995.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Diretoria Colegiada. Resolução nº 02, de 07 de janeiro de 2002, atualizada em março de 2016. Disponível em: . Acesso em: 12 março 2017.

BRAZEL, C.S. **Microencapsulation: offering solutions for the food industry.** *Cereal Foods World*, v.44, n.6, .p.388-393, 1999.

CAIRES, A. R. L.; TEIXEIRA, M. R. O.; SUAREZ, Y. R.; ANDRADE, L. H. C.; LIMA, S. M. **Discrimination of Transgenic and Conventional Soybean Seeds by Fourier Transform Infrared Photoacoustic Spectroscopy.** *Applied Spectroscopy*, v. 62, n. 9, p. 1044-1047, 2008.

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.

CASAL, M.; SCHULLER, D.; RODRIGUES, G. M. M.; PAIS, C. **Métodos convencionais em microbiologia.** In: *Microbiologia e genética molecular microbiana: manual de laboratório*. Margarida Casal (coord.), 2004.

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

CHANDI, G.K., SOGI, D.S., **Functional properties of rice bran protein concentrates.** *Journal of Food Engineering*. v, 79, p. 592–597. 2007

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. **Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival.** *Drying Technology*, v. 25, n. 7-8, p. 1193-1201, jul. 2007.

COGHETTO, C. C., BRINQUES, G. B., SIQUEIRA, N. M., PLETSCH, J., SOARES, R. M. D., AYUB, M. A. Z. **Electro spraying microencapsulation of Lactobacillus plantarum enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids.** *Journal of Functional Foods*. v. 24, p. 316-326, 2016.

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

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.; ROSS, R. P. **Life under stress: The probiotic stress response and how it may be manipulated.** *Current Pharmaceutical Design*, v. 14, n.14, p. 1382–1399, jan. 2008.

CZERUCKA, D.; RAMPAL P. **Experimental effects of *Saccharomyces boulardii* on diarrheal pathogens.** *Microbes and Infection*. v.4, p.733-739, 2002.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. **Review article: yeast as probiotics – *Saccharomyces boulardii*.** *Alimentary Pharmacology & Therapeutics*, n. 26, p. 767–778, 2007.

DESMOND, C., ROSS, R. P., O'CALLAGHAN, E., FITZGERALD, G., STANTON, C. **Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 93, p. 1003–1011, 2002.

DING, W.K.; SHAH, N.P.; **Acid, bile, and heat tolerance of free and microencapsulated probiotic bacteria.** *Journal of Food Science*, v. 72, n. 9, 2007.

DUONGTHINGOC, D., GEORGE, P., KATOPO, L.; GORCZYCA, E., KASAPIS, S. **Studies on the viability of *Saccharomyces boulardii* within microcapsules in relation to the thermomechanical properties of whey protein.** *Food Hydrocolloids*, v. 42, n. 2, p.232-238, dez. 2013.

DZIEZAK, J.D. **Microencapsulation and Encapsulated Ingredients.** *Food Technology*, p. 136-151, 1988.

FABIAN, C.B., HUYNH, L.H., JU, Y.H. **Precipitation of rice bran protein using carrageenan and alginate.** *Food Science and Technology*. v. 43, p. 375–379. 2010.

FAO/WHO – “Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food - Report of a Joint FAO/WHO Working Group on Drafting Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food” - Ontario, Canada. April 30, May 1, 2002.

FAO/WHO. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. Report of a Joint FAO/WHO Expert. Córdoba, Argentina, 2001.

FARNWORTH, E.R., CHAMPAGNE, C. **Production of probiotic cultures and their incorporation into foods.** In: Watson ER, Preedy VR (eds) *Bioactive foods in promoting health*. Academic, London, p. 3–17, 2010.

FIETTO, J. L.R; ARAÚJO, R. S.; VALADÃO, F. N.; FIETTO, F.G.; BRANDÃO, R. L., NEVES, M. J.; GOMES, C.; NICOLI, J.R.; CASTRO, I. M. **Molecular and**

physiological comparisons between *Saccharomyces cerevisiae* and *Saccharomyces boulardii*. *Canadian Journal of Microbiology*, v. 50, p. 615-621, 2004.

FRAGOSO, S.; ACEÑA, L.; GUASCH, J.; BUSTO, O.; MESTRES, M. **Application of FT-MIR spectroscopy for fast control of red grape phenolic ripening.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 59, n. 6, p. 2175-2183, mar. 2011.

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

FU, N.; CHEN, X. D. **Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes.** *Food Research International*, v.4 4, n. 7, p. 1127–1149, 2011.

GHANDI, A., POWELL, I. B., CHEN, X. D., ADHIKARI, B. **The effect of dryer inlet and outlet air temperatures and protectant solids on the survival of *Lactococcus lactis* during spray drying.** *Drying Technology*, v. 30 n. 14, p. 1649-1657, 2012.

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.

GOLOWCZYC, M. A., SILVA, J., TEIXEIRA, P., DE ANTONI, G. L., ABRAHAM, A. G. **Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus spp.* isolated from kefir and their impact on probiotic properties.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 144, n. 3, p. 556- 560, 2011.

GORBACH, S. L.; **Probiotics in the third millennium.** *Digestive and Liver Disease*. v. 34, n. 2, p. 2-7. 2002.

GOUIN, S. **Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends.** *Food Science & Technology*. v.15, p. 330-347, 2004.

GU, X., CAMPBELL, L. J., EUSTON, S. R. **Effects of different oils on the properties of soy protein isolate emulsions and gels.** *Food Research International*, v. 42, n. 8, p. 925–932. 2009.

GUSLANDI, M.; MEZZI, G.; SORGHİ, M.; TESTONI, P.A. ***Saccharomyces boulardii* in maintenance treatment of Crohn's disease.** *Digestive Diseases and Sciences*, 1462-1464, 2000.

HAMADA, J.S. **Characterization and functional properties of rice bran proteins modified by commercial exoproteases and endoproteases.** *Journal of Food Science*. v. 65, p. 305–310. 2000.

HE, J.; RODRIGUEZ-SAONA, L. E.; GIUSTI, M. M. **Midinfrared spectroscopy for juice authentication-rapid differentiation of commercial juices.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 55, n.11, p. 4443-4452, mai. 2007.

HOLZAPFEL, W. H., HABERER, P., GEISEN, R., BJÖRKROTH, J., SCHILLINGER, U. **Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition.** *The American Journal of Clinical Nutrition*, v. 73, n. 2, p. 365-373, 2001.

HOLZAPFEL, W.H., SCHILLINGER, U. **Introduction to pre and probiotics.** *Food Research International*, v. 35, p. 109-116, 2002.

HUQ, T., KHAN, A., KHAN, R. A., RIEDL, B., LACROIX, M. **Encapsulation of probiotic bacteria in biopolymeric system.** *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 53, n. 9, p. 909-916, 2013.

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

JANTZEN, M., GOPEL, A., BEERMANN, C. **Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey.** *Journal of Applied Microbiology*, v.115, n. 4, p. 1029-1036, 2013.

JENALIB. Image Library of Biological Macromolecules. **Determination of Secondary Structure in Proteins by Fourier Transform Infrared Spectroscopy (FTIR).** Disponível em: <http://jenalib.fli-leibniz.de/ImgLibDoc/ftir/IMAGE_FTIR.html.html> . Acesso em: 14 ago. 2016.

JENKINS, J.A.; BREITENEDER, H.; MILLS, E.N. **Evolutionary distance from human homologs reflects allergenicity of animal food proteins.** *Journal of Allergy and Clinical Immunology*. v.120, p. 1399–1405. 2007.

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

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

KAILASAPATHY, K. **Encapsulation Technologies for functional foods and nutraceutical product development.** *Nutrition and Natural Resources*, v. 4, n. 6, 2009.

KELESIDIS, T., POTHOUKAKIS, C. **Efficacy and safety of the probiotic *Saccharomyces boulardii* for the prevention and therapy of gastrointestinal disorders.** *Therap. Adv. Gastroenterol.* v.5, n. 2, p. 111-125, 2012.

KRISHNAIAH, D.; SARBATLY, R.; NITHYANANDAM, R. **Microencapsulation of *Morinda citrifolia* L. extract by spray-drying.** *Chemical Engineering Research and Design*, v. 90, n. 5, p. 662-632, mai. 2012.

LEFEBVRE, A.H., **Atomization and Sprays.** CRC Press, New York, 1989.

LIAN, W.C., HSIAO, H.C., CHOU, C.C. **Survival of *bifidobacteria* after spray drying.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 74, p. 79–86, 2002.

LIMA, U.A.; AQUARONE, E; BORZANI, W.; SCHMIDELL, W. **Processos fermentativos e enzimáticos.** In: *Biotecnologia Industrial*. Willibaldo Schmidell (coord.). Edgard Blucher, 1ª ed., v. 3, 2001.

LIU, Y.; YANG, Z.; DU, J.; YAO, X.; LEI, R.; ZHENG, X. **Interaction of curcumin with intravenous immunoglobulin: A fluorescence quenching and Fourier transformation infrared spectroscopy study.** *Immunobiology*, v. 213, n.8, p. 651-661, out. 2008.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B.C. **Growth and survival of a probiotic yeast in dairy products.** *Food Research International*, n. 34, p. 791–796, 2001.

LU-E, S. LI, Z. LI. D. XU.M. CHEN, H. ZHANG, Z. TANG,Z. **Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate-milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions.** *Journal of food engineering*. v. 117, p. 99-104, 2013.

LUNA-SOLANO, G., SALGADO-CERVANTES, M. A., GARCIA-ALVARADO, M. A., RODRIGUEZ-JIMENES, G. **Improved viability of spray dried brewer's yeast by using starch (grits) and maltodextrin as processing aids.** *Journal of Food Process Engineering*. v.23, n. 6, p. 453-462, 2000.

LUTZ, Instituto Adolfo. (2008). Leites e derivados. In: ZENEBOM, O.; PASCUET, N. S.; TIGLEA, P (Eds.), *Métodos físico-químicos para análise de alimentos* (pp.819-877). São Paulo: Instituto Adolfo Lutz.

MAKRAS, L., TRIANTAFYLLOU, V., FAYOL-MESSAOUDI, D., ZOUMPOPOULOU, G., TSAKALIDOU, E., SERVIN, A., DE WUYST, L. **Kinetic analysis of the antibacterial activity of probiotic *lactobacilli* towards *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* reveals a role for lactic acid and other inhibitory compounds.** *Research in Microbiology*, v.157, n. 3, p. 241-247, Abr. 2006.

MARCIA, L. B. ***Saccharomyces boulardii* as a probiotic for children.** *Pediatric Pharmacotherapy*, v. 15, n. 7, p. 1-5, 2009.

MARQUES, T.A.; SERRA, G.E. **Estudo da reciclagem de células na produção biológica de etanol.** *Ciênc. Tecnol. Aliment.*, v. 24, n. 4, p. 532-535, 2004.

MARSHALL, V. M.; COLE, W. M. **Threonine aldolase and alcohol dehydrogenase activities in *Lactobavillus acidophilus* and *Lactobacillus***

bulgaricus and their contribution to flavour production in fermented milks. *Journal of Dairy Research*. v. 50, p. 375-379, 1984.

MARTINS F. S.; BARBOSA F. H. F.; PENNA F. J.; ROSA C. A.; NARDI R. M. D.; NEVES M. J.; NICOLI J. R. **Estudo do potencial probiótico de linhagens de *Saccharomyces cerevisiae* através de testes *in vitro***, *Revista de Biologia e Ciências da Terra*, v. 5, n. 2, 2005.

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., MYLLÄRINEN P., CRITTENDEN R., MOGENSEN G., FONDÉN R., SAARELA M. **Technological challenges for future Probiotic foods**. *International Dairy Journal*. v. 12, p.173-182, 2002.

MCFARLAND, L. V. **Systematic review and meta-analysis of *Saccharomyces boulardii* in adult patients**. *World Journal of Gastroenterology*. v. 16, n. 18, p. 2202-2222. 2010.

MCFARLAND, L. V., BERNASCONI, P. ***Saccharomyces boulardii*: a review of an innovative bio therapeutic agent**. *Microbial Ecology In Health And Disease*, v. 6, p. 157-171. Abr 1993.

MENEZES, L. A. A. **Microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* utilizando extrato de soja e Maltodextrina**. Medianeira, PR, (2015). Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos). Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR).

MILLER, G. L. **Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars**. *Analytical Chemistry*, v. 31, n.3, p.426-8, mar.,1959.

MULLER, J.L. **Cultivo de *Saccharomyces boulardii* em biorreator tipo *air lift* e em frascos agitados mecanicamente**. Itajaí-SC, (2006). 92f.

NADAI, B.L. Efeito da suplementação de nutrientes e da concentração de permeado de soro de leite no crescimento de *Saccharomyces boulardii* em sistema descontínuo. Toledo, PR, 2015. **Dissertação** (Mestrado em Engenharia Química). Universidade Estadual do Oeste do Paraná, UNIOESTE.

NESTERENKO, A.; ALRIC, I.; SILVESTRE, F.; DURRIEU, V. **Vegetable proteins in microencapsulation: A review of recent interventions and their effectiveness**. *Industrial Crops and Products*. v. 42, p. 469–479. 2013.

NORI, M. P., FAVARO-TRINDADE, C. S., ALENCAR, S. M., THOMAZINI, M., BALIEIRO, J. C. C., CASTILLO, C. J. C., **Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation**. *Food Science and Technology*, v. 44, p. 429-435. 2011.

O'RIORDAN, K; ANDREWS, D; BUCKLE, K; CONWAY, P. **Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage.** *Journal of Applied Microbiology*, v. 91, p. 1059–66, 2001.

OAKLEY, D.R. **Produce uniform particles by spray-drying.** *Chemical engineering progress*, p. 48-54, Oct., 1997.

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

PEDROSO, D. L., THOMAZINI, M., HEINEMANN, R. J. B., FAVARO-TRINDADE, C. S. **Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling.** *International Dairy Journal*, v. 26, n. 2, pp. 127-132, 2012.

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

PIETRZAK, L. N.; MILLER, S. S. **Microchemical structure of soybean seeds revealed in situ by ultraspatially resolved synchrotron Fourier transformed infrared microspectroscopy.** *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, v. 53, n. 24, p. 9301-9311, 2005.

PISPAN, S., HEWITT, C. J., STAPLEY, A. G. F.. **Comparison of cell survival rates of *E. coli* K12 and *L. acidophilus* undergoing spray drying.** *Food and Bioproducts Processing*, v. 91 n. C4, p. 362-369, 2013.

RIVERA-ESPINOZA, Y., GALLARDO-NAVARRO, Y. **Non-dairy probiotic products,** *Food Microbiology*. v. 27, p. 1-11. Jul 2008.

RIVEROS, B., FERRER, J., BORQUEZ, R. **Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*.** *Drying Technology*, v. 27, n. 1, p. 123-132, Jan. 2009.

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

SAAVEDRA, J. P.; PALACIOS-GONZÁLEZ, E.; LARTUNDO-ROJAS, L.; GARIBAY-FEBLES, V.; YÁÑEZ-FERNÁNDEZ, J.; HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G.; ALAMILLA-BELTRÁN, L. **Microstructural properties and distribution of componentes in microparticles obtained by spray-drying.** *Journal of Food Engineering*, v. 152, n. 2015, p.105–112, 2015.

SABIKHI, L.; BABU, R.; THOMPSON, D. K.; KAPILA, S. **Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions.** *Food and Bioprocess Technology*, v. 3, n.4, p. 586-593. 2010.

SADRIPOUR, M.; RAHIMI, A.; SADEGH, M.; **CFD Modeling and Experimental Study of a Spray Dryer Performance.** *Chemical Product and Process Modeling.* v.9, n.1, p. 15-24. 2013.

SANTOS, R. C. S. **Microencapsulação de *Lactobacillus casei* por spray drying.** Recife: Universidade Federal de Pernambuco, 2013. 121 p. Dissertação (Mestrado).

SATHYABAMA, S.; RANJITH, M. BRUNTHA, P.; VIJAYABHARATHI, R.; BRINDHAPRIYADHARISINI, V. **Co-encapsulation of probiotics with prebiotics on alginate matrix and its effect on viability in simulated gastric environment.** *Food Science and Technology*, v. 57, p. 419 -425, 2014.

SATO, K.; UENO, S. Polymorphism in fats and oils. Ed F. Shahidi, New York, p. 77-120. 2005.

SAZAWAL, S., HIRMATH, G., DHINGRA, U., MALIK, P., DEB, S., BLACK, R. E. **Efficacy of probiotics in prevention of acute diarrhoea: a meta-analysis of masked, randomised, placebo-controlled trials.** *The Lancet Infectious Diseases.* v. 6, n. 6, p. 374-382, Jun. 2006

SCHREZENMEIR, J., VRESE, M. **Probiotics, prebiotics, and synbiotics-approaching a definition.** *American Society for Clinical Nutrition.* v. 73, p. 361-364. 2001.

SHAH, N. P. **Functional cultures and health benefits.** *International Dairy Journal*, v.17, n. 11, p. 1262–1277, 2007.

SILVA, N., JUNQUEIRA, V. C. A., SILVEIRA, N. F. A., Manual de métodos de análise microbiológica de alimentos. São Paulo. 1997,109p.

SOUZA, C.R.F. Estudo comparativo da produção de extrato seco de *Bauhinia forficata* Link pelos processos *spray-dryer* e leite de jorro. **Dissertação de Mestrado** - Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 208p, 2003.

TANG, C. H., LI, X. R. **Microencapsulating properties of soy protein isolate: influence of preheating and/or blending with lactose.** *Journal of Food Engineering*, v. 117, n. 3,p. 281–290. 2013.

TORTORA, G.J.; FUNKE, B.R.; CASE, CL. Microbiologia. 10. ed., Porto Alegre: Artmed, 2010.

TRIPATHI, M.K., GIRI, S.K. **Probiotic functional foods: survival of probiotics during processing and storage.** *Journal of Functional foods*, v. 9, p. 225-241, Jul. 2014.

TURCHIULI, C., FUCHS, M., BOHIN, M., CUVELIER, M.E., ORDONNAUD, C.,PEYRAT-MAILLARD, M.N., DUMOULIN, E. **Oil encapsulation by spray drying and fluidized bed agglomeration.** *Innovat.Food Sci. Emerg. Technol.* v. 6, p. 29–35. 2005.

VITOLLO, M. Imobilização e células e enzimas. **Biotecnologia**, n. 11, p.2, jan., 1988.

WANG, Y. C.; YU, R. C.; CHOU, C. C. **Viability of lactic acid bacteria and *bifidobacteria* infermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage.** *International Journal of Food Microbiology*, v. 93, n.3, p. 209– 217, ago. 2004.

WANG, M., HETTIARACHCHY, N.S., QI, M., BURKS, W., SIEBENMORGEN, T. Preparation and functional properties of rice bran protein isolate. *J. Agric. Food Chem.* v. 47, p. 411-416. 1999.

ANEXOS

ANEXO I. Resultados das análises de açúcares por DNS.

A Tabela 1A demonstra os valores de absorvância obtidos para a confecção da curva padrão entre 0 e 3 g.L⁻¹ de glicose. A Figura 1A mostra a curva padrão obtida.

Tabela 13A - Absorvância obtida para curva padrão das análises de DNS

Concentração de Glicose (g.L ⁻¹)	ABS 1	ABS 2	ABS 3
0	0	0	0
0,5	0,239	0,26	0,2495
1	0,492	0,487	0,4895
1,5	0,807	0,786	0,7965
2	1,043	1,02	1,0315
2,5	1,279	1,273	1,276
3	1,546	1,543	1,5445

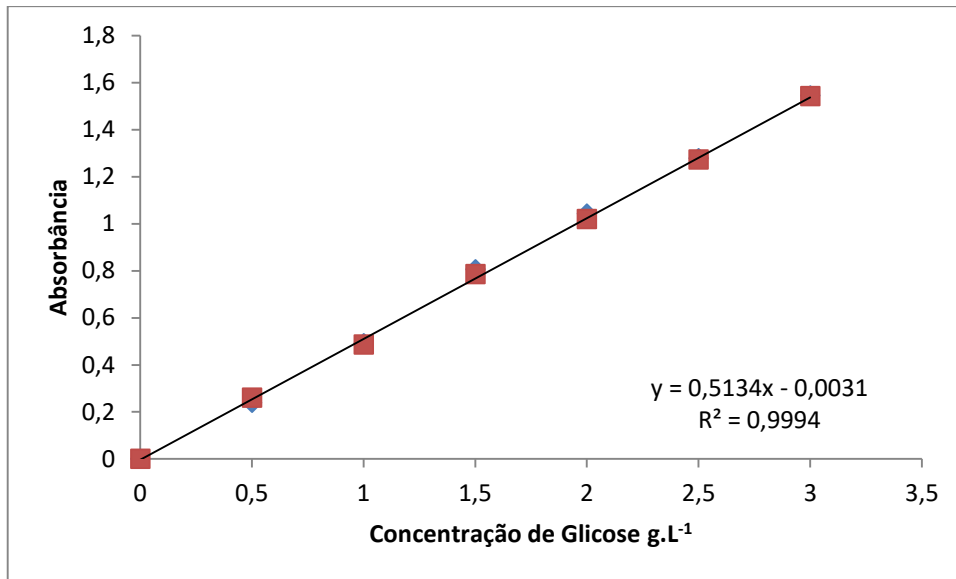


Figura 21A - Gráfico obtido para curva padrão de DNS

Tabela 14A - Análise de DNS obtida para o cultivo SA20G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
0	20,000	0,488	0,512	0,500	19,131	20,066	19,599	19,599	0,382
2	10,000	0,869	0,880	0,875	16,987	17,201	17,094	17,094	0,087
4	10,000	0,554	0,567	0,561	10,851	11,104	10,978	10,978	0,103
6	1,000	2,087	2,170	2,129	4,071	4,233	4,152	4,152	0,066
8	1,000	0,138	0,158	0,148	0,275	0,314	0,294	0,294	0,016
10	1,000	0,087	0,096	0,092	0,175	0,193	0,184	0,184	0,007
12	1,000	0,136	0,141	0,139	0,271	0,281	0,276	0,276	0,004
14	1,000	0,132	0,131	0,132	0,263	0,261	0,262	0,262	0,001
16	1,000	0,125	0,136	0,131	0,250	0,271	0,260	0,260	0,009
18	1,000	0,132	0,103	0,118	0,263	0,207	0,235	0,235	0,023
20	1,000	0,155	0,101	0,128	0,308	0,203	0,255	0,255	0,043
22	1,000	0,101	0,099	0,100	0,203	0,199	0,201	0,201	0,002
24	1,000	0,099	0,015	0,057	0,199	0,035	0,117	0,117	0,067

Tabela 15A - Análise de DNS obtida para o cultivo SA40G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
0	20,000	1,181	1,129	1,155	46,128	44,102	45,115	45,115	0,827
2	20,000	0,742	0,830	0,786	29,026	32,454	30,740	30,740	1,400
4	20,000	0,666	0,630	0,648	26,065	24,663	25,364	25,364	0,573
6	10,000	0,909	1,083	0,996	17,766	21,155	19,460	19,460	1,384
8	10,000	0,174	0,182	0,178	3,450	3,605	3,527	3,527	0,064
10	1,000	0,192	0,172	0,182	0,380	0,341	0,361	0,361	0,016
12	1,000	0,115	0,075	0,095	0,230	0,152	0,191	0,191	0,032
14	1,000	0,197	0,170	0,184	0,390	0,337	0,363	0,363	0,021
16	1,000	0,192	0,192	0,192	0,380	0,380	0,380	0,380	0,000
18	1,000	0,189	0,185	0,187	0,374	0,366	0,370	0,370	0,003
20	1,000	0,159	0,145	0,152	0,316	0,288	0,302	0,302	0,011
22	1,000	0,133	0,165	0,149	0,265	0,327	0,296	0,296	0,025
24	1,000	0,199	0,132	0,166	0,394	0,263	0,328	0,328	0,053

Tabela 16A Análise de DNS obtida para o cultivo SA60G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
0	20,000	1,661	1,718	1,690	64,827	67,047	65,937	65,937	0,907
2	20,000	1,407	1,478	1,443	54,932	57,698	56,315	56,315	1,129
4	20,000	1,410	1,350	1,380	55,049	52,711	53,880	53,880	0,954
6	20,000	1,064	1,190	1,127	41,570	46,478	44,024	44,024	2,004
8	10,000	1,266	1,273	1,270	24,720	24,856	24,788	24,788	0,056
10	10,000	0,356	0,355	0,356	6,995	6,975	6,985	6,985	0,008
12	1,000	0,351	0,364	0,358	0,690	0,715	0,702	0,702	0,010
14	1,000	0,395	0,399	0,397	0,775	0,783	0,779	0,779	0,003
16	1,000	0,402	0,467	0,435	0,789	0,916	0,852	0,852	0,052
18	1,000	0,399	0,388	0,394	0,783	0,762	0,772	0,772	0,009
20	1,000	0,205	0,325	0,265	0,405	0,639	0,522	0,522	0,095
22	1,000	0,359	0,366	0,363	0,705	0,719	0,712	0,712	0,006
24	1,000	0,321	0,408	0,365	0,631	0,801	0,716	0,716	0,069

Tabela 17A - Análise de DNS obtida para o cultivo AE20G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
0,000	20,000	0,488	0,512	0,500	19,131	20,066	19,599	19,599	0,382
0	20,000	0,390	0,427	0,409	15,314	16,755	16,034	16,034	0,588
2	10,000	0,599	0,656	0,628	11,728	12,838	12,283	12,283	0,453
4	10,000	0,138	0,153	0,146	2,748	3,041	2,894	2,894	0,119
6	1,000	0,226	0,221	0,224	0,446	0,437	0,441	0,441	0,004
8	1,000	0,215	0,222	0,219	0,425	0,438	0,432	0,432	0,006
10	1,000	0,158	0,165	0,162	0,314	0,327	0,321	0,321	0,006
12	1,000	0,138	0,142	0,140	0,275	0,283	0,279	0,279	0,003
14	1,000	0,133	0,000	0,067	0,265	0,006	0,136	0,136	0,106
16	1,000	0,156	0,125	0,141	0,310	0,250	0,280	0,280	0,025
18	1,000	0,189	0,123	0,156	0,374	0,246	0,310	0,310	0,052
20	1,000	0,122	0,235	0,179	0,244	0,464	0,354	0,354	0,090
22	1,000	0,123	0,162	0,143	0,246	0,322	0,284	0,284	0,031
24	1,000	0,147	0,198	0,173	0,292	0,392	0,342	0,342	0,041

Tabela 18A Análise de DNS obtida para o cultivo AE40G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
0	20,000	1,181	1,129	1,155	46,128	44,102	45,115	45,115	0,827
2	20,000	1,068	1,079	1,074	41,726	42,154	41,940	41,940	0,175
4	20,000	0,846	0,880	0,863	33,078	34,402	33,740	33,740	0,541
6	6,000	1,623	1,759	1,691	19,004	20,593	19,799	19,799	0,649
8	6,000	0,406	0,408	0,407	4,781	4,804	4,793	4,793	0,010
10	6,000	0,065	0,078	0,072	0,796	0,948	0,872	0,872	0,062
12	1,000	0,682	0,653	0,668	1,334	1,278	1,306	1,306	0,023
14	1,000	0,532	0,514	0,523	1,042	1,007	1,025	1,025	0,014
16	1,000	0,235	0,000	0,118	0,464	0,006	0,235	0,235	0,187
18	1,000	0,189	0,188	0,189	0,374	0,372	0,373	0,373	0,001
20	1,000	0,202	0,212	0,207	0,399	0,419	0,409	0,409	0,008
22	1,000	0,199	0,178	0,189	0,394	0,353	0,373	0,373	0,017
24	1,000	0,159	0,166	0,163	0,316	0,329	0,323	0,323	0,006

Tabela 19A Análise de DNS obtida para o cultivo AE60G

Tempo de Fermentação (horas)	Diluição	ABS 1	ABS 2	ABS 3	CF1 (g.L ⁻¹)	CF2 (g.L ⁻¹)	CF3 (g.L ⁻¹)	Média (g.L ⁻¹)	Erro
	20,000	1,661	1,718	1,690	64,827	67,047	65,937	65,937	0,907
2	20,000	1,428	1,468	1,448	55,750	57,308	56,529	56,529	0,636
4	20,000	1,095	1,009	1,052	42,778	39,427	41,102	41,102	1,368
6	10,000	1,884	1,860	1,872	36,757	36,289	36,523	36,523	0,191
8	10,000	0,860	0,792	0,826	16,811	15,487	16,149	16,149	0,541
10	10,000	0,085	0,100	0,093	1,716	2,008	1,862	1,862	0,119
12	1,000	0,620	0,642	0,631	1,214	1,257	1,235	1,235	0,017
14	1,000	0,665	0,651	0,658	1,301	1,274	1,288	1,288	0,011
16	1,000	0,425	0,000	0,213	0,834	0,006	0,420	0,420	0,338
18	1,000	0,422	0,425	0,424	0,828	0,834	0,831	0,831	0,002
20	1,000	0,452	0,466	0,459	0,886	0,914	0,900	0,900	0,011
22	1,000	0,326	0,355	0,341	0,641	0,698	0,669	0,669	0,023
24	1,000	0,333	0,356	0,345	0,655	0,699	0,677	0,677	0,018

