

Carolinne Odebrecht Dias

**MICROCÁPSULAS DE SUCO DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis*
f. flavicarpa Deg.) PROBIÓTICO PRODUZIDAS PELO MÉTODO
DE *SPRAY DRYING***

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Doutor em Ciência dos Alimentos.

**Orientadora: Prof^a. Dr^a. Renata
Dias de Mello Castanho Amboni**

Florianópolis
2019

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Dias, Carolinne Odebrecht
Microcápsulas de suco de maracujá (*Passiflora
edulis* f. *flavicarpa* Deg.) probiótico produzidas
pelo método de spray drying / Carolinne Odebrecht
Dias ; orientadora, Renata Dias de Mello Castanho
Amboni, 2019.
157 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de
Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, Florianópolis,
2019.

Inclui referências.

1. Ciência dos Alimentos. 2. Micropencapsulação.
3. Probiótico. 4. Suco de fruta. I. Amboni, Renata
Dias de Mello Castanho. II. Universidade Federal de
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência
dos Alimentos. III. Título.

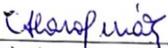
MICROCÁPSULAS DE SUCO DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis f. flavicarpa* Deg.) PROBIÓTICO PRODUZIDAS PELO MÉTODO DE *spray drying*

Por

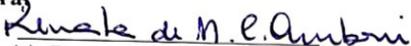
Carolinne Odebrecht Dias

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutora em Ciência dos Alimentos”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 11 de março de 2019


Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina de Oliveira Costa
Coordenador

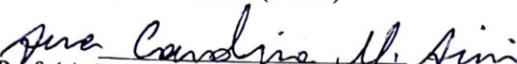
Banca Examinadora:


Prof. (a). Dr. (a). Renata Dias de Mello Castanho Amboni,
Orientador (UFSC)


Prof. (a). Dr. (a). Neila Silva Pereira dos Santos Richrds,
Membro (UFSC)


Prof. (a). Dr. (a). Edna Regina Amante,
Membro (UFSC)


Prof. (a). Dr. (a). Carmen Maria Olivera Müller,
Membro (UFSC)


Prof. (a). Dr. (a). Ana Carolina Maisonnave Arisi,
Membro (UFSC)

*Dedico este trabalho ao meus pais,
Christiane e Paulo, minha base e maior
exemplo.*

AGRADECIMENTOS

Deixo aqui registrados meus sinceros agradecimentos a todos que de algum modo me apoiaram no decorrer deste caminho e contribuíram para que esse trabalho fosse realizado:

À Deus, pela proteção e força necessária para superar as dificuldades, e por colocar pessoas especiais em meu caminho.

À minha família, em especial aos meus pais Christiane e Paulo, que permitiram, através do incentivo, apoio irrestrito e amor, que eu chegasse até aqui. Às minhas irmãs, Johanna e Anna Luiza e meus cunhados Humberto e Lucas, por todo o apoio, carinho e momentos divertidos que passamos em família. Ao meu sobrinho Lucca, por ser a luz das nossas vidas! Ao Vinícius, por estar ao meu lado em todos os momentos e por sempre acreditar em mim. Obrigada por todo o amor e parceria! Amo vocês com todo meu coração!

À minha querida orientadora, Prof. Renata Amboni, gostaria de expressar a minha imensa gratidão por todos esses quase 8 anos de convivência desde a graduação, pela confiança sólida que construímos, pela amizade e carinho, por todos os conhecimentos e ensinamentos, incentivo, paciência e apoio. Obrigada por toda a dedicação e por me guiar por este caminho!

À Profa. Edna Amante, pessoa de grande importância no meu crescimento pessoal e profissional, minha gratidão por todos os ensinamentos, pelo exemplo e por ter sido a primeira pessoa que abriu as portas e me apresentou ao mundo da Ciência dos Alimentos.

À Prof. Carmen Müller, agradeço muitíssimo por todos os ensinamentos, pela importante colaboração neste trabalho, auxílio na discussão de resultados, apoio e pela paciência e disposição em me ajudar. Agradeço ao Prof. Alfredo Pires por permitir a utilização do laboratório POLIMAT/QMC para a realização das análises termogravimétricas. Especialmente, agradeço à querida colega Fabiani Santana, por todo o auxílio na realização destas análises.

À Prof. Ana Carolina Arisi, agradeço imensamente pela disponibilidade, contribuições e por possibilitar a realização das análises referentes ao último capítulo desta tese, através de uma parceria extremamente valiosa e enriquecedora. Agradeço também à toda a equipe do Laboratório de Biologia Molecular e Alimentos, por toda colaboração e auxílio. Em especial agradeço à querida Mirella Scariot, pela amizade, parceria, acolhida e por todos os ensinamentos valiosos!

À Prof. Deise Baggio e equipe Laboratório de Microbiologia de Alimentos 2, agradeço pela amizade, disponibilidade, confiança e por sempre prontamente permitir o uso do laboratório para realização de análises microbiológicas.

Ao Prof. Pedro Barreto e toda equipe do Laboratório de Reologia, em especial à Bianca, agradeço muitíssimo pela disponibilidade e suporte no uso do *spray dryer* e de outros equipamentos.

À Prof. Elane Prudêncio, agradeço pelas sugestões e colaboração durante a primeira etapa deste trabalho. Agradeço também à equipe do Laboratório de Leite e Derivados, onde realizei parte das análises, pela colaboração e anos de convívio.

A todos os professores, funcionários, técnicos e colegas do Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos. Em especial ao Sérgio, pela disponibilidade, bom humor e ajuda durante todos os anos de convivência.

Aos membros da banca examinadora, pelo aceite e pelas valiosas contribuições ao trabalho.

À Universidade Federal de Santa Catarina e ao Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, pela oportunidade de realização do doutorado, e aos professores do programa pelos conhecimentos adquiridos em todos esses anos.

À CAPES e CNPq, pela concessão da bolsa de estudos e apoio financeiro para a concretização desta pesquisa.

Ao Laboratório Central de Microscopia Eletrônica (LCME) da UFSC, pela disponibilidade para realização das análises de microscopia.

À empresa SweetMix, representante Orafti, pela doação de amostras do prebiótico inulina.

A todo o grupo do Laboratório de Frutas e Hortaliças, agradeço pelo convívio, parceria e amizade! Agradeço ainda por todas as oportunidades de troca de conhecimentos, onde ensinei um pouco e sempre aprendi muito mais.

Às minhas amigas e colegas de pós-graduação, que desde a graduação estão presentes em minha vida, Isabella e Maria Helena, agradeço por todos esses anos de amizade tão especial! Às minhas amigas Júlia e Nathalia...não tenho palavras pra descrever o quanto vocês são importantes na minha vida. O apoio, incentivo, nossas longas conversas e momentos de diversão foram indispensáveis para que eu chegasse até aqui!

Às minhas queridas amigas Sílvia e Graciele, que mesmo com toda a distância nos separando fisicamente, estão sempre no coração!

À Gabriela Feijó, pessoa muitíssimo especial em minha vida, agradeço imensamente por me guiar na minha jornada de autoconhecimento. Muito obrigada por todo o incentivo, apoio e por me ajudar a (re)encontrar meu caminho! Você é luz!

A todos que de forma direta ou indiretamente contribuíram para a concretização deste trabalho.

Muito Obrigada!

“Disse a flor para o pequeno príncipe: é preciso que eu suporte duas ou três larvas se quiser conhecer as borboletas”

(O Pequeno Príncipe – Antoine de Saint-Exupéry)

RESUMO

Este trabalho visou primeiramente desenvolver uma nova bebida não láctea funcional em pó, através da microencapsulação por *spray drying* de suco de maracujá adicionado do microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, empregando maltodextrina e inulina como agentes encapsulantes. Foram obtidas três formulações de microcápsulas, as quais foram caracterizadas com relação às suas propriedades morfológicas, físico-químicas e tecnológicas (morfologia, tamanho de partícula, densidade aparente e compactada, propriedades de fluxo, higroscopicidade, grau de aglomeração e propriedades térmicas) após o processo de microencapsulação; e quanto à umidade, atividade de água, solubilidade em água e cor ao longo de 30 dias de armazenamento das microcápsulas a 4 e 25 °C. A eficiência de encapsulação foi avaliada com base nas contagens de células viáveis probióticas antes e após o processo de microencapsulação por *spray drying*. A viabilidade da bactéria probiótica nas microcápsulas também foi avaliada ao longo do período de armazenamento em ambas as temperaturas. Ambos os agentes encapsulantes empregados foram considerados eficientes na proteção das bifidobactérias durante o *spray drying*, entretanto, o uso de inulina promoveu maior recuperação de células viáveis após o processo de secagem, implicando em maior eficiência de encapsulação. O armazenamento das microcápsulas a 4 °C resultou em uma recuperação das células injuriadas de *Bifidobacterium* BB-12 durante o processo de *spray drying*, e a contagem de células viáveis foi mantida acima de 6 log UFC g⁻¹ durante todo período de estocagem. Durante o armazenamento a 25 °C, as microcápsulas elaboradas com maltodextrina apresentaram perdas significativas da viabilidade das bifidobactérias, em contraste com a amostra elaborada somente com inulina, a qual ofereceu melhor proteção à bactéria encapsulada. O uso dos diferentes agentes encapsulantes afetou a morfologia e o tamanho de partícula das microcápsulas. Os índices de Carr e Hausner indicaram que as microcápsulas apresentaram maior compressibilidade e menor capacidade de fluírem. De maneira geral, as microcápsulas produzidas com inulina apresentaram características físico-químicas mais adequadas, tais como menores valores de umidade, atividade de água, e solubilidade em água. Além disso, uma maior estabilidade física das microcápsulas foi alcançada com o uso da inulina, em relação à higroscopicidade e ao grau de aglomeração das partículas,

quando submetidas à condição de alta umidade relativa. Foi observado um aumento da luminosidade e, concomitantemente, uma redução do parâmetro b^* ao longo do armazenamento para todas as microcápsulas em ambas as temperaturas, porém, mais acentuadamente à 25 °C, provavelmente devido à oxidação dos pigmentos carotenoides. Os resultados das análises termogravimétricas sugeriram que ambos os agentes encapsulantes conferiram estabilidade ao suco de maracujá. Em uma segunda etapa, a viabilidade celular do microrganismo probiótico foi monitorada nas três diferentes formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado durante 30 dias de armazenamento a 4 °C, empregando métodos independentes de cultivo. Um ensaio de PCR quantitativa (qPCR) associada a monoazida de propídio (PMA-qPCR) foi desenvolvido para quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nas amostras de suco em pó. As células viáveis foram quantificadas usando os ensaios qPCR e PMA-qPCR, e também através do método tradicional de cultivo em placas com meio seletivo. Os valores obtidos pela contagem em placas foram semelhantes aos valores de UFC/g obtidos por PMA-qPCR para todas as amostras, os quais mantiveram-se estáveis e acima de 8 log UFC g⁻¹ durante o período de armazenamento avaliado. Estes resultados demonstraram que a técnica de PMA-qPCR é uma abordagem promissora, rápida e eficiente para quantificação de células viáveis de *B. lactis* BB-12 em matrizes complexas como as microcápsulas de sucos de maracujá quando comparada com métodos dependentes de cultura.

Palavras-chave: Bebida funcional não láctea. Maracujá. Probiótico. Microencapsulação. Prebiótico. PMA-qPCR.

ABSTRACT

This study primarily aimed to develop a new functional non-dairy powdered beverage, through the microencapsulation by spray drying of passion fruit juice added with the probiotic microorganism *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, using maltodextrin and inulin as encapsulating agents. Three microcapsules formulations were obtained, which were characterized in terms of their morphological, physicochemical and technological properties (morphology, particle size, bulk and tapped densities, flow properties, hygroscopicity, degree of caking and thermogravimetric properties) after microencapsulation process; and in relation to moisture content, water activity, water solubility and color throughout 30 days of storage at 4 and 25 °C. The encapsulation efficiency was evaluated based on probiotic viable cell counts before and after the microencapsulation by spray drying. The viability of the probiotic bacteria in the microcapsules was also evaluated during the storage period at both temperatures. Both encapsulating agents were considered efficient in the protection of bifidobacteria during spray drying, however, the use of inulin promoted a better recovery of viable cells after the drying process, implying in greater encapsulation efficiency. The storage of the microcapsules at 4 °C resulted in a recovery of injured *Bifidobacterium* BB-12 cells during the spray drying process, and the viable cell counts were maintained above 6 log CFU g⁻¹ over the entire storage period. During the storage at 25 °C, microcapsules made with maltodextrin showed significant losses of bifidobacteria's viability, in contrast with the sample made only with inulin, which offered better protection to the encapsulated bacteria. The use of different encapsulating agents affected the morphology and particle size of the microcapsules. Carr and Hausner indexes indicated that the microcapsules obtained in this study presented higher cohesion and compressibility, with poor ability to flow freely. In general, microcapsules produced with inulin presented more adequate physicochemical characteristics, such as lower values for moisture content, water activity and water solubility. In addition, greater physical stability of the microcapsules was achieved by the use of inulin, in relation to the hygroscopicity and the degree of caking, when samples were submitted to a high relative humidity condition. An increase in luminosity was observed and, concurrently, a reduction of the parameter b* throughout the storage for all microcapsules at both temperatures, but more markedly at 25 °C, probably due to

carotenoid oxidation. The results of thermogravimetric analyses suggested that both encapsulating agents conferred greater stability to passion fruit juice. In a second stage, the cell viability of the probiotic microorganism was monitored in the three different formulations of microencapsulated probiotic passion fruit juice during 30 days of storage at 4 °C, by using culture-independent methods. A quantitative PCR assay (qPCR) coupled with propidium monoazide (PMA-qPCR) was developed for quantification of viable cells of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in the powdered juice samples. Viable cells were quantified using the qPCR and PMA-qPCR assays, also through the traditional plate count method with selective medium. The values obtained by plate count were similar to the CFU g⁻¹ values obtained by PMA-qPCR, for all samples, which remained stable and above 8 log CFU g⁻¹ during the evaluated storage period. These results demonstrated that PMA-qPCR technique is a promising, rapid and efficient approach for quantifying viable *B. lactis* BB-12 cells in complex matrices such as passion fruit juice microcapsules, compared with culture-dependent methods.

Keywords: Non-dairy functional beverage. Passion fruit. Probiotic. Microencapsulation. Prebiotic. PMA-qPCR.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.1: Fruto do maracujazeiro-amarelo (<i>Passiflora edulis</i> Sims f. <i>flavicarpa</i>)	32
Figura 1.2: Micropartículas com diferentes tipos de estrutura	42
Figura 1.3: Representação esquemática do processo de microencapsulação pela técnica de <i>spray drying</i>	44
Figura 1.4: Representação da estrutura química da maltodextrina	47
Figura 1.5: Representação da estrutura química da inulina	49
Figura 1.6: Ilustração esquemática do princípio do tratamento utilizando o corante PMA para quantificação de células viáveis de bactérias por qPCR. O PMA é um corante impermeável à membrana celular e modifica seletiva e covalentemente o DNA de células mortas cujas membranas estão danificadas	57
Figura 2.1: Micrografias das microcápsulas de suco de maracujá contendo <i>Bifidobacterium</i> BB-12 produzidas com: (a) maltodextrina (PFM), (b) maltodextrina e inulina (PFMI) e (c) inulina (PFI)	95
Figura 2.2: Efeito da adsorção de umidade durante a determinação de higroscopicidade no aspecto físico das amostras em pó. (1) Amostras antes da determinação da higroscopicidade; (2) Amostras após 7 dias a 75,3% de umidade relativa (UR). PFM: microcápsulas elaboradas com 200 g L ⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas com 100 g L ⁻¹ de maltodextrina e 100 g L ⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas com 200 g L ⁻¹ de inulina	100
Figura 2.3: Curvas de TGA /DTG obtidas para as matérias primas: (a) maltodextrina (MD), (b) inulina (IN) e (c) suco de maracujá (SM) ...	110

Figura 2.4: Curvas de TGA/DTG obtidas para as diferentes formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado: (a) PFM, (b) PFMI e (c) PFI 113

LISTA DE TABELAS

- Tabela 2.1:** Contagens de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 antes e após o processo de microencapsulação do suco de maracujá usando inulina e maltodextrina como agentes carreadores e eficiências de encapsulação (EE)..... 92
- Tabela 2.2:** Viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 nas diferentes formulações de suco de maracujá microencapsulado, durante 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. 93
- Tabela 2.3:** Caracterização das microcápsulas de sucos de maracujá probiótico preparadas com diferentes agentes encapsulantes, em relação ao tamanho de partícula, densidades, propriedades de fluxo, higroscopicidade e grau de aglomeração (*caking*).
..... 97
- Tabela 2.4:** Características das amostras de suco de maracujá probiótico microencapsulado, preparadas com diferentes agentes encapsulantes, durante o armazenamento a 4 e 25 °C 102
- Tabela 2.5:** Parâmetros de cor das microcápsulas de suco de maracujá probiótico preparadas com diferentes agentes encapsulantes, durante o armazenamento a 4 e 25 °C 106
- Tabela 3.1:** Composição das soluções de alimentação para cada formulação utilizada no processo de *spray drying*
..... 133
- Tabela 3.2:** Parâmetros de qPCR das curvas padrão elaboradas com DNA extraído a partir de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em meio de cultura, obtidas a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias 138
- Tabela 3.3:** Parâmetros das curvas padrão para quantificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 utilizando os iniciadores TUF e DNA bacteriano extraído a partir das três formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado, um dia após o processo de microencapsulação 139

Tabela 3.4: Comparação das contagens de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (log UFC g⁻¹) obtidas por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placas, a partir de amostras das três formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado coletadas após 1 e 30 dias de armazenamento a 4 °C 142

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	23
REFERÊNCIAS	27
CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica	31
1.1 Maracujá.....	31
1.1.1 Suco de maracujá	33
1.2 Alimentos funcionais e probióticos.....	35
1.3 Microencapsulação.....	40
1.3.1 Agentes encapsulantes	45
1.3.1.1 Probióticos.....	48
1.4 Caracterização de microcápsulas obtidas por <i>spray drying</i> ..	51
1.5 Emprego de métodos independentes de cultivo para quantificação de bactérias probióticas em matrizes alimentares	53
REFERÊNCIAS	60
CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de microcápsulas de suco de maracujá adicionado de <i>Bifidobacterium</i> BB-12: avaliação das propriedades físico-químicas e tecnológicas e viabilidade da cultura probiótica ao longo do armazenamento	79
RESUMO	79
ABSTRACT	81
1 INTRODUÇÃO	82
2 MATERIAL E MÉTODOS.....	84
2.1 Preparo do suco de maracujá.....	84
2.2 Preparo da suspensão de células probióticas.....	84
2.3 Microencapsulação por <i>spray drying</i>	85
2.3.1 Preparo das soluções de alimentação	85
2.3.2 <i>Spray drying</i>	85
2.4 Viabilidade das bifidobactérias microencapsuladas após o <i>spray drying</i> e durante o armazenamento.....	86
2.5 Eficiência de encapsulação (EE).....	86
2.6 Caracterização dos sucos de maracujá probióticos em pó.....	87
2.6.1 Morfologia e tamanho de partícula	87
2.6.2 Umidade e atividade de água	87
2.6.3 Densidade aparente e compactada.....	87
2.6.4 Propriedades de fluxo	88
2.6.5 Higroscopicidade.....	88

2.6.6	Grau de aglomeração (<i>caking</i>).....	88
2.6.7	Solubilidade em água.....	89
2.6.8	Análise de cor	89
2.6.9	Análise termogravimétrica (TGA/DTG).....	90
2.7	Análise estatística	90
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	90
3.1	Eficiência de encapsulação e viabilidade das bifidobactérias microencapsuladas após o <i>spray drying</i> e durante o armazenamento.	90
3.2	Caracterização dos sucos de maracujá probióticos em pó	95
4	CONCLUSÃO	115
	REFERÊNCIAS	116

CAPÍTULO 3 - Aplicação da técnica de monoazida de propídio acoplado a PCR quantitativa (PMA-qPCR) para avaliar a viabilidade de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> em uma bebida probiótica não láctea.		
	RESUMO	125
	ABSTRACT	127
1	INTRODUÇÃO	129
2	MATERIAL E MÉTODOS	132
2.1	Cepas bacterianas e condições de cultivo	132
2.2	Microencapsulação por <i>spray drying</i>	132
2.2.1	Preparo da suspensão bacteriana	132
2.2.2	Preparo das soluções de alimentação	133
2.2.3	<i>Spray drying</i> e condições de amostragem	134
2.3	Tratamento com monoazida de propídio (PMA)	134
2.4	Extração de DNA.....	135
2.5	Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)	135
2.6	Construção das curvas padrão para qPCR	136
2.7	Enumeração de <i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12 por qPCR e contagem por semeadura em placas	136
3	RESULTADOS E DISCUSSÃO	137
3.1	Parâmetros de qPCR para quantificação de <i>B. animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	137
3.2	Quantificação de células viáveis de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em amostras de suco de maracujá probiótico microencapsulado por PMA-qPCR	140
4	CONCLUSÃO	145
	REFERÊNCIAS	145

CONSIDERAÇÕES FINAIS 151

ANEXO A – Artigo “Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery” publicado na revista Food Bioscience, 2018 (ISSN:2212-4292)..... 153

ANEXO B - Comprovante de apresentação do trabalho “Propriedades físicas de microcápsulas de suco de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) e polissacarídeos contendo *Bifidobacterium* BB-12” no XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXV CBCTA, 2016), Gramado/RS, Brasil 154

ANEXO C - Comprovante de apresentação do trabalho “Avaliação da estabilidade da cor de suco de maracujá probiótico em pó durante o armazenamento” no 6º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul/ 6º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul (6º COSIMP, 2016), Cascavel/PR, Brasil. 155

ANEXO D - Comprovante de apresentação do trabalho “Eficiência de encapsulação e viabilidade de *Bifidobacterium animalis ssp. lactis* BB-12 em suco de maracujá (*Passiflora edulis f. flavicarpa*) microencapsulado por *spray drying*” no 12º Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos (12 SLACA, 2017), Campinas/SP, Brasil..... 156

ANEXO E - Comprovante de apresentação do trabalho “Microencapsulation of *Bifidobacterium* BB-12 in passion fruit juice: evaluation of survival under simulated gastrointestinal conditions” no 1st International Congress on Bioactive Compounds/ 2nd International Workshop on Bioactive Compounds (1st ICBC, 2018), Campinas/SP, Brasil..... 157

INTRODUÇÃO

O uso de alimentos para melhorar a saúde, além da função primária de fornecer nutrientes para satisfazer as necessidades metabólicas, é uma prática cada vez mais difundida na sociedade nas últimas décadas. Neste contexto, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais, tais como os probióticos (MOUMITA et al., 2018). Culturas probióticas são comumente conhecidas por sua capacidade de auxiliarem na manutenção do equilíbrio e composição da microbiota intestinal (HILL et al., 2014), embora vários outros benefícios já tenham sido relatados na literatura, como efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos, redução dos níveis de colesterol plasmático, diminuição dos sintomas de intolerância à lactose e estímulo da resposta imune (TRIPATHI; GIRI, 2014).

As bifidobactérias são consideradas um dos grupos mais importantes de bactérias probióticas, e diversas espécies desse gênero têm sido incorporadas na produção de alimentos funcionais, majoritariamente em derivados lácteos fermentados, como queijos e iogurtes (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014). No entanto, matrizes alimentares não lácteas têm sido estudadas como potenciais carreadores para estes microrganismos, considerando a alta prevalência de problemas como intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite e hipercolesterolemia na população, além de dietas restritivas ao consumo de produtos de origem animal (GRANATO et al., 2019). Dentro deste contexto, os sucos de frutas podem representar um veículo promissor para incorporação destes microrganismos, uma vez que são produtos ricos em vitaminas, minerais e compostos antioxidantes e, portanto, possuem um forte apelo saudável (KANDYLIS et al., 2016).

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*), nativo da América tropical, é considerado uma boa fonte de vitaminas, principalmente A e C, minerais e compostos antioxidantes, além de desempenhar um papel importante na economia do agronegócio brasileiro, já que o país é o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo (IBGE, 2017). Considerando esses fatores, o suco de maracujá apresenta potencial para ser empregado como carreador para microrganismos probióticos.

Entretanto, alguns fatores tornam a adição de probióticos em sucos de frutas mais complexa em relação à formulação de produtos lácteos para

a mesma finalidade. Os principais desafios enfrentados neste caso se devem às características intrínsecas desses produtos, como alta concentração de ácidos orgânicos e condições de baixo pH, consideradas desfavoráveis para a manutenção da viabilidade destes microrganismos (MARTINS et al., 2013). No entanto, para que exerçam seus efeitos benéficos à saúde, os probióticos devem permanecer viáveis e em quantidades adequadas no alimento durante sua fabricação e ao longo de sua vida útil, até o momento do consumo (SAAD et al., 2013).

Neste contexto, métodos de microencapsulação têm sido empregados com a finalidade de proteger os probióticos contra condições adversas a que são expostos, melhorando sua sobrevivência. A técnica de *spray drying* é a mais utilizada para a microencapsulação de componentes bioativos, incluindo probióticos, apresentando como vantagens principais a facilidade de operação, custo relativamente baixo e as altas taxas de produção (CELLI; GHANEM; BROOKS, 2015). Os sucos de frutas são considerados produtos perecíveis, com alta atividade de água. Sendo assim, a aplicação da técnica de *spray drying* para o desenvolvimento de sucos de frutas probióticos em pó é uma alternativa promissora para a indústria de alimentos, a qual permite a conversão dos mesmos em produtos em pó com aplicações diversas e facilidade de consumo, mais estáveis, com reduzido volume e, conseqüentemente, mais fáceis de transportar e armazenar (SHISHIR; CHEN, 2017).

Com relação aos biopolímeros aplicados como agentes encapsulantes, as maltodextrinas têm sido amplamente utilizadas para a microencapsulação de culturas probióticas por *spray drying*, devido ao seu baixo custo e eficácia (BARBOSA et al., 2015). Com o intuito de aumentar a proteção das culturas probióticas microencapsuladas, polissacarídeos com propriedades prebióticas, tais como a inulina, também têm sido aplicados com sucesso como agentes encapsulantes para essa finalidade (FRITZEN-FREIRE et al., 2012; AVILA-REYES et al., 2014; PINTO et al., 2015).

No entanto, as altas temperaturas de processo de microencapsulação e o baixo teor de umidade nos produtos resultantes, são condições estressantes que podem levar a uma diminuição na sobrevivência das culturas probióticas durante a secagem e posterior armazenamento (MARTÍN et al., 2015). Dessa forma, considerando que a manutenção da viabilidade das culturas probióticas em um produto é de suma importância para garantir sua funcionalidade, o seu monitoramento ao longo da estocagem do produto torna-se essencial (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013).

A viabilidade probiótica é geralmente monitorada através de métodos tradicionais, baseados em plaqueamento em meios de cultura. No entanto, técnicas dependentes de cultivo apresentam certas limitações, como o tempo necessário para obtenção de resultados, além da possibilidade de subestimarem as contagens de células viáveis, devido à existência de células em estado viável não cultivável (VNC) nas amostras, as quais estão viáveis, porém, são incapazes de crescerem em meios de cultura (DAVIS, 2014).

Métodos moleculares independentes de cultivo têm sido propostos como alternativa aos métodos baseados na microbiologia clássica. A técnica de PCR (Reação em Cadeia da Polimerase) quantitativa (qPCR) tem sido amplamente utilizada para quantificação rápida e específica de diferentes microrganismos probióticos em matrizes diversas (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; ILHA et al., 2016; LAWLEY et al., 2018). No entanto, sua principal limitação se deve à incapacidade de diferenciação entre células viáveis e não viáveis, ou que estejam em estado VNC, visto que na qPCR o DNA total pode ser amplificado, mesmo após a morte celular (FITIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Nesse sentido, ensaios de qPCR associados ao tratamento com corantes intercalantes de DNA, como o monoazida de propídio (PMA), têm sido propostos para detecção e quantificação de células viáveis de microrganismos probióticos em diferentes matrizes alimentares, sobretudo em produtos lácteos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; VILLARREAL et al., 2013; MATIAS et al., 2016; SCARIOT et al., 2018). A técnica de monoazida de propídio acoplado a PCR quantitativa (PMA-qPCR) permite a detecção de células viáveis de microrganismos, com base na integridade da membrana celular, visto que o PMA penetra somente em células cujas membranas estão danificadas, e se intercala com o DNA. Após exposição a luz visível, o PMA se liga covalentemente ao DNA, modificando-o irreversivelmente, o qual não pode ser amplificado por PCR. Consequentemente, através deste método, o DNA das células cujas membranas estão intactas é detectado seletivamente (ELIZACUÍVEL; AZNAR; SÁNCHEZ, 2013).

Até o momento, não havia estudos envolvendo o desenvolvimento e caracterização de microcápsulas de suco de maracujá adicionado do microrganismo probiótico *Bifidobacterium* BB-12 produzidas por *spray drying* com diferentes agentes encapsulantes, bem como o desenvolvimento e aplicação da técnica de PMA-qPCR para a

quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulado por *spray drying* em uma matriz não láctea.

A fim de abordar todos os aspectos supracitados, este trabalho está estruturado em capítulos, sendo o primeiro referente à revisão bibliográfica e os demais referentes aos resultados da pesquisa experimental, os quais foram elaborados no formato de artigos científicos.

No Capítulo 1, de revisão bibliográfica, são abordados os principais temas envolvidos no desenvolvimento do trabalho: maracujá e produtos derivados, sucos de frutas, alimentos funcionais e probióticos, técnicas de microencapsulação, agentes encapsulantes, prebióticos, caracterização das microcápsulas obtidas por *spray drying* e técnicas moleculares para quantificação de bactérias probióticas em matrizes alimentares.

O Capítulo 2 apresenta o estudo do desenvolvimento de um novo produto não lácteo funcional em pó, através da microencapsulação por *spray drying* do suco de maracujá adicionado de cultura probiótica *Bifidobacterium* BB-12. Neste estudo, diferentes agentes encapsulantes foram utilizados, entre eles um prebiótico, sendo realizada a caracterização dos pós obtidos quanto às suas propriedades físico-químicas e tecnológicas, além da avaliação da estabilidade do produto e da viabilidade do microrganismo probiótico em diferentes condições de armazenamento.

O Capítulo 3 apresenta o estudo do desenvolvimento e aplicação de um ensaio de PCR quantitativa associada a monoazida de propídio (PMA-qPCR), como uma ferramenta para monitorar a viabilidade celular de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em um produto probiótico não lácteo em pó durante o armazenamento refrigerado. Os resultados deste estudo derivam de uma importante colaboração com o grupo de pesquisa de Biologia Molecular e Alimentos – CAL/UFSC. Cabe ressaltar que a escolha da temperatura de 4 °C utilizada para armazenamento das microcápsulas avaliadas no Capítulo 3, foi realizada de acordo com os resultados obtidos no Capítulo 2.

O artigo publicado em revista indexada (Anexo A) e os demais comprovantes dos trabalhos parciais publicados em eventos científicos da área de Ciência dos Alimentos (Anexos B-E) estão apresentados em anexo.

REFERÊNCIAS

- ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013.
- AVILA-REYES, S. V et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 423–30, 2014.
- BARBOSA, J. et al. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 340–351, 2015.
- CELLI, G. B.; GHANEM, A.; BROOKS, M. S. L. Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods - a Review of Methods and Current Limitations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1825–1837, 2015.
- CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614–628, 2013.
- DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9–17, 2014.
- ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, 2013.
- FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 405–409, 2009.

GRANATO, D. et al. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. In: FERRANTI, P.; BERRY, E. M.; ANDERSON, J. R. (Eds.) **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Elsevier, 2019, v.1, p.422-428.

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

ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.

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

LAWLEY, B. et al. *Tuf* gene sequence variation in *Bifidobacterium longum* subspecies *infantis* detected in fecal microbiota of Chinese infants. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 84, n. 13, 2018.

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

MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764–770, 2013.

MATIAS, N. S. et al. *In vitro* gastrointestinal resistance of *Lactobacillus*

acidophilus La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83–93, 2016.

MOUMITA, S. et al. Effect of long-term storage on viability and acceptability of lyophilized and spray-dried synbiotic microcapsules in dry functional food formulations. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 127–132, 2018.

PINTO, S. S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400–408, 2015.

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

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1–16, 2013.

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 1–7, 2018.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

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

VILLARREAL, M. L. M. et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under *in vitro*

gastrointestinal conditions by propidium monoazide - qPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

CAPÍTULO 1 – Revisão Bibliográfica

1.1 Maracujá

Maracujá é a denominação dada ao fruto de várias espécies do gênero *Passiflora*, pertencente à família *Passifloraceae*, originária da América Tropical. Inseridas neste gênero, existem cerca de 530 espécies de maracujazeiros distribuídas em regiões tropicais e subtropicais no mundo, sendo 140 espécies nativas do Brasil; porém destas, somente cerca de 60 produzem frutos comestíveis (SCHOTSMANS; FISCHER; YAHIA, 2011). Embora o gênero *Passiflora* agrupe diversas espécies que produzem frutos, poucas apresentam importância comercial, destacando-se o maracujazeiro-doce (*Passiflora alata*), o maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*) e o maracujazeiro-roxo (*Passiflora edulis* Sims) (DHAWAN; DHAWAN; SHARMA, 2004). Dentre estas, o maracujazeiro-amarelo, também conhecido como maracujazeiro-azedo, é o mais importante e corresponde a mais de 95% dos pomares e do volume de frutos comercializado no Brasil, sendo cultivado em todo o território nacional em função da qualidade de seus frutos, produtividade e rendimento em suco (CERQUEIRA-SILVA et al., 2014).

O maracujazeiro é uma planta trepadeira herbácea, possui gavinhas e apresenta crescimento rápido e contínuo. Os frutos do maracujazeiro-amarelo são do tipo baga, com formato variando entre globoso e ovoide, com diâmetro médio variando entre 8 e 10 cm, e apresentam epicarpo duro e liso, de coloração amarela ou verde no estágio de maturação (Figura 1.1). No interior dos frutos, há uma cavidade que abriga a polpa gelatinosa de coloração amarela, que possui aroma intenso e sabor doce-ácido, que envolve cerca de 200 sementes ovais pretas (LÓPEZ-VARGAS et al., 2013).

Figura 1.1: Fruto do maracujazeiro-amarelo (*Passiflora edulis* Sims f. *flavicarpa*)



Fonte: Acervo do autor

O maracujá vem se destacando na fruticultura tropical como um importante produto do agronegócio brasileiro, sendo explorado comercialmente por pequenas, médias e grandes empresas. Na cadeia produtiva, a cultura é considerada uma alternativa agrícola interessante para pequenas propriedades, por oferecer retorno econômico rápido, sendo uma importante fonte de geração de emprego e renda, principalmente para a agricultura familiar (MELETTI, 2011).

O Brasil ocupa lugar de destaque como maior produtor e consumidor mundial do fruto, cuja produção no ano de 2017 correspondeu a 554 mil toneladas, representando cerca de 60% do maracujá produzido mundialmente, com uma área plantada de 41 mil hectares, destacando-se os estados da Bahia, com 31% da produção nacional, seguido do Ceará (17%), Santa Catarina (8%), São Paulo e Rio Grande do Norte (5%) (IBGE, 2017).

A região sul do Brasil apresenta certa restrição ao cultivo do maracujazeiro, principalmente devido às características climáticas pertinentes à região, com inverno bem definido, com baixas temperaturas, chuvas irregulares e mal distribuídas, baixo fotoperíodo, além da incidência de geadas em algumas regiões, fatores estes que podem levar

à baixa produtividade (WEBER, 2013). No entanto, na contrapartida deste cenário, o estado de Santa Catarina desponta como o terceiro maior produtor de maracujá do país, com produção de 47 mil toneladas em 2017, com rendimento médio de 21 toneladas por hectare, acima da média nacional (IBGE, 2017).

O maracujazeiro-amarelo é uma das cinco frutíferas mais cultivadas no Estado nos últimos cinco anos. Na safra 2016/2017 foram cultivados 2.276 hectares por mais de 1000 famílias de agricultores, cujo valor bruto da produção foi superior a R\$ 34 milhões, voltado principalmente para o mercado de frutas frescas (*in natura*). A produção de maracujá em Santa Catarina concentra-se na região Sul do Estado, que compreende mais de 90% da produção catarinense. Os municípios de São João do Sul e Sombrio estão entre os dez maiores produtores do Brasil, sendo os únicos fora da região Nordeste do país (IBGE, 2017; EPAGRI-CEPA, 2018).

Em relação ao destino da produção de maracujá amarelo no Brasil, houve uma grande mudança neste panorama ao longo das últimas décadas, uma vez, que até o final da década de 1990 cerca de 30% da produção era destinada ao mercado '*in natura*' e 70% seguiam para a indústria de sucos. Nos últimos anos houve uma inversão desta distribuição e mais de 60% da produção é destinada ao consumo de frutas frescas '*in natura*', sendo o restante destinado às agroindústrias de processamento, onde o suco concentrado é o principal produto derivado (VIANNA-SILVA et al., 2008; MELETTI, 2011).

1.1.1 Suco de maracujá

Conforme o Regulamento Técnico para Fixação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Suco e Polpa de Fruta, aprovado pela Instrução Normativa/MAPA n° 49, de 26 de setembro de 2018, suco de maracujá, é a bebida não fermentada destinada ao consumo, obtida da parte comestível da fruta madura e sã (*Passiflora spp.*), por meio de processamento tecnológico adequado e submetida a tratamento que assegure a sua apresentação e conservação até o momento do consumo. Este regulamento estabelece os requisitos físico-químicos de composição para o suco de maracujá, que deve apresentar valores mínimos de sólidos solúveis totais a 20 °C correspondente a 11 °Brix, além de concentração de açúcares totais de no máximo 18 g/100 gramas. Em relação à acidez total, expressa em ácido cítrico, o suco deve apresentar valores mínimos

de 2,5 gramas de ácido cítrico/100 gramas de produto e valor mínimo de pH igual a 2,7 (BRASIL, 2018).

A composição do suco de maracujá amarelo é dada tanto pela variedade, quanto pelas condições de cultivo, sendo composto, em média, por cerca de 85% de água, 14% de carboidratos, 0,67% de proteínas, 0,18% de lipídeos e 0,2% de fibras alimentares totais (RODRIGUEZ-AMAYA, 2012). É caracterizado por ser um produto bastante ácido, com pH variando entre 2,6 a 3,4, e a presença de ácidos orgânicos confere ao suco aroma e sabor característicos, sendo o ácido cítrico predominante, seguido pelo ácido málico, e em menores proporções os ácidos láctico, malônico, succínico e mícico. Em relação à composição de açúcares, os majoritários são glicose, sacarose e frutose, presentes em concentrações aproximadas de 38%, 32% e 29%, respectivamente. É rico em vitaminas A, C e do complexo B, sendo também uma boa fonte de β -caroteno, além de conter quantidades significativas de minerais, principalmente potássio, fósforo, magnésio, cálcio e ferro (CABRAL; JÚNIOR; MATTA, 2010). A coloração do suco varia de amarelo ao alaranjado, e se deve a diferentes pigmentos carotenoides, principalmente ζ -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina e prolipopeno (MERCADANTE; BRITTON; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1998).

Entre os sucos de frutas tropicais, o de maracujá tem grande aceitação pelos consumidores, impulsionando a demanda do mercado interno, mas também consolidando o Brasil como um dos principais exportadores do suco dessa fruta, na forma de suco concentrado, principalmente para países como Estados Unidos, Holanda, Reino Unido, Portugal e Uruguai (EMBRAPA, 2017).

A alta perecibilidade é o principal problema que desafia a produção e comercialização de frutas, visto que a rápida deterioração pós-colheita resulta em grande volume de descarte. Sendo assim, bebidas à base de frutas são elaboradas principalmente em função da facilidade de consumo e com o intuito de prolongar a conservação destes produtos, além de superar as questões relativas à sazonalidade (BORRMANN et al., 2013). Neste contexto, considerando as atuais demandas por alimentos nutritivos e de preparo rápido, a desidratação de sucos de frutas destaca-se como uma abordagem de grande potencial econômico em relação à contraparte líquida, além de ser uma alternativa em substituição aos similares artificiais existentes no mercado (SHISHIR; CHEN, 2017).

Os sucos desidratados em pó vêm aumentando seu espaço no mercado, pois apresentam pouca umidade residual e baixa atividade de água, o que dificulta o crescimento de microrganismos e a ocorrência de

reações físico-químicas responsáveis por sua deterioração, aumentando, assim, sua estabilidade e vida útil. Outras vantagens relacionadas à produção de alimentos em pó são a redução de custos referentes à embalagem, transporte, manuseio, armazenamento e conservação, agregação de valor às matérias primas vegetais, além de facilitar formulações e abertura de novas possibilidades de uso (SOUZA et al., 2015).

Outra tendência inovadora relacionada ao mercado de sucos é a incorporação de culturas probióticas, de forma a atender a busca crescente pelo desenvolvimento de bebidas funcionais inovadoras. Em relação ao suco de maracujá, até o momento, poucos estudos envolveram a aplicação de culturas probióticas a essa matriz. Recentemente, Farias, Soares e Gouveia (2016) avaliaram o potencial da incorporação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 em suco de maracujá do Cerrado, obtendo resultados promissores. Dessa forma, há a necessidade de desenvolvimento de estudos para ampliar a exploração dessas matrizes neste sentido, o qual será discutido posteriormente de forma detalhada.

1.2 Alimentos funcionais e probióticos

Nos últimos anos, os consumidores têm percebido os alimentos não só como veículos para obtenção de nutrientes essenciais para o desenvolvimento das funções do organismo, mas também como uma via de promoção de saúde e bem-estar, tendo em vista a alta incidência de doenças crônico-degenerativas entre a população (MITSUOKA, 2014). Desta forma, inúmeras pesquisas vêm sendo realizadas para o desenvolvimento de alimentos com propriedades funcionais.

O conceito de alimentos funcionais foi definido e utilizado pela primeira vez na década de 1980, no Japão, e ganhou *status* legal em 1991 através da implementação do programa FOSHU (*Food for Specified Health Use*), “Alimentos para Uso Específico de Saúde”, como consequência de estudos que buscavam desenvolver alimentos que reduzissem os gastos com saúde pública através da melhora da saúde geral e redução do risco ou evolução de doenças (PRADO et al., 2008; GRANATO et al., 2010).

A legislação brasileira define como propriedade funcional aquela relativa à função metabólica ou fisiológica que o nutriente ou não nutriente exerce no crescimento, desenvolvimento, manutenção e demais funções normais do organismo humano. Sendo assim, alimentos ou

ingredientes com alegações de propriedades funcionais são produtos que contém além dos nutrientes básicos, compostos biologicamente ativos, que contribuem para a melhora e/ou manutenção da saúde, devendo ser seguros para consumo e apresentar comprovação científica de seus efeitos no organismo (BRASIL, 1999).

Avanços nos estudos sobre a microbiota intestinal humana são um dos principais fatores para o crescimento do interesse sobre o papel funcional dos alimentos, uma vez que diversos estudos mostraram que a composição da microbiota está intimamente ligada a diversas funções essenciais para a saúde humana, e seu desequilíbrio, conhecido por disbiose, leva à inúmeras condições patológicas (PRINCIPI et al., 2018).

Inseridos na classificação de alimentos funcionais estão aqueles adicionados de culturas probióticas. A palavra probiótico tem origem grega, e significa "para a vida". Há mais de um século, em 1908, Elie Metchnikoff, cientista russo laureado com o prêmio Nobel, propôs que a ingestão de alimentos fermentados, particularmente bactérias ácido lácticas, ofereciam benefícios à saúde humana e poderiam retardar a deterioração da saúde durante o envelhecimento, promovendo assim a longevidade (KLEEREBEZEM et al., 2019). Este foi o início do conceito de probiótico, e desde as descobertas originais de Metchnikoff, vários estudos foram desenvolvidos com o objetivo de verificar o impacto positivo das cepas probióticas no estado de saúde de indivíduos.

Uma equipe de especialistas da Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos (ISAPP) se reuniu em 2013 para estabelecer um consenso sobre o escopo e uso apropriado do termo "probiótico". De acordo com este último, a definição proposta pela Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação (FAO/OMS) em 2001 foi mantida e reforçada, a qual define probióticos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro (HILL et al., 2014).

Os principais benefícios à saúde, atribuídos ao consumo de produtos contendo bactérias probióticas, estão associados à modulação da microbiota intestinal, através do aumento da motilidade intestinal, da maior resistência à colonização por patógenos através de mecanismos antagônicos e do aumento na concentração de microrganismos benéficos, com a melhoria das funções da barreira intestinal (KHALESI et al., 2018). O benefício geral de promover um trato digestivo saudável é reforçado por evidências reunidas em um grande número de estudos clínicos e meta-análises com diferentes cepas probióticas representando as espécies comumente estudadas, frente à uma diversidade de condições clínicas,

tais como diarreia infecciosa, diarreia associada a antibióticos, síndrome do intestino irritável e colite ulcerativa (RITCHIE; ROMANUK, 2012; GOLDENBERG et al., 2013; HILL et al., 2014; PRINCIPI et al., 2018).

Outros efeitos benéficos relacionados à ingestão de probióticos são relatados na literatura, incluindo o alívio de sintomas de intolerância à lactose, redução dos níveis séricos de colesterol e melhora do perfil lipídico do sangue (GUO et al., 2011; SUN; BUYS, 2015), redução da pressão arterial (KHALESI et al., 2014), melhora da tolerância à glicose e controle de diabetes (SUN; BUYS, 2016; NIKBAKHT et al., 2018), e estímulo benéfico da resposta imune (YAN; POLK, 2011). Entretanto, é necessário salientar que os efeitos benéficos atribuídos aos probióticos são específicos de cada cepa, e não existe uma única cepa capaz de proporcionar simultaneamente todos os benefícios citados (WATSON; PREEDY, 2015).

Cremon et al. (2018) afirmaram, que embora cada uma das alegações funcionais mencionadas seja baseada em evidências, os mecanismos exatos pelos quais os probióticos exercem suas ações benéficas no organismo humano ainda não foram completamente elucidados, embora alguns processos tenham sido sugeridos, que podem atuar de forma isolada ou conjuntamente. De acordo com Saad et al. (2013), a propriedade de inibição da colonização do intestino humano por microrganismos patogênicos parece ser a característica mais importante para o desenvolvimento de produtos probióticos eficazes, e ocorre através de mecanismos diversos, que incluem a competição por sítios de adesão e nutrientes, produção de substâncias antimicrobianas, além de modificações nas condições do meio, como a acidificação do ambiente. Dessa forma, o princípio da exclusão competitiva se alinha à necessidade de administração de forma contínua e em grandes quantidades dos probióticos para que estes possam manifestar tais efeitos benéficos.

A seleção de microrganismos probióticos para aplicação em alimentos deve seguir alguns critérios importantes. Primeiramente, é necessário que os microrganismos pertençam à microbiota intestinal humana, tendo em vista que estes adaptam-se melhor a ambientes semelhantes ao qual foram isolados inicialmente. Além disso, é de suma importância que o microrganismo seja reconhecido como seguro para consumo humano (GRAS - *Generally Recognized As Safe*). Ademais, estes devem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal, isto é, apresentar resistência ao pH baixo e à presença de enzimas e sais biliares. Outro critério importante é a capacidade de aderir à mucosa e de colonizar

o trato gastrointestinal humano, sendo desejável também que o microrganismo produza substâncias antimicrobianas, apresente-se metabolicamente ativo no intestino e atue antagonicamente em relação às bactérias patogênicas (YADAV; SHUKLA, 2017).

Além destes fatores, em relação aos processos tecnológicos, é fundamental que o microrganismo escolhido possa ser cultivado em escala industrial, com a habilidade de sobreviver e manter-se viável durante as etapas de processamento do alimento no qual será aplicado e durante todo o período de validade do produto, em contagens de células viáveis iguais ou superiores a 6 log UFC/ mL ou grama (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Entretanto, para que os efeitos benéficos sejam alcançados, as culturas probióticas devem ser ingeridas regularmente e em quantidade suficiente para que mantenham seu efeito sobre a microbiota intestinal, sendo recomendável a ingestão mínima diária entre 10^8 e 10^9 células viáveis, que pode ser obtida com o consumo de no mínimo 100 gramas de um produto contendo entre 10^6 e 10^7 células viáveis por grama (HILL et al., 2014).

Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são relatadas pela literatura como as mais empregadas em produtos alimentícios (KANDYLIS et al., 2016). Em relação às espécies e cepas do gênero *Bifidobacterium*, estas são classificadas como bastonetes gram-positivos, não formadores de esporos, sem motilidade e anaeróbios estritos, porém, algumas cepas possuem diferentes graus de tolerância ao oxigênio. Quanto à morfologia, as bifidobactérias apresentam polimorfismo, podendo se apresentar como bastonetes curvados ou bifurcados em forma de “Y” ou “V”, embora essa característica seja variável de acordo com o meio de cultura e as condições de crescimento empregadas. Apresentam crescimento em ampla faixa de pH, entre 4,5-8,5, embora o pH ótimo para crescimento varie de 6,0 a 7,0 (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014).

As bifidobactérias diferem de outros gêneros quanto ao mecanismo empregado para fermentação de carboidratos, uma vez que são incapazes de realizar a via glicolítica normal, já que não possuem as enzimas aldolase e glicose-6-fosfato NADP⁺ oxido-redutase. Dessa forma, as bactérias desse gênero possuem uma via metabólica distinta, caracterizada pela presença da enzima frutose-6-fosfato fosfoacetolase, que permite com que estes microrganismos produzam mais ATP a partir dos carboidratos (MATTARELLI et al., 2018). As espécies mais

utilizadas industrialmente são *Bifidobacterium adolescentis*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium longum*, *Bifidobacterium lactis* e *Bifidobacterium animalis* (FOLIGNÉ; DANIEL; POT, 2013).

A cepa *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, pertencente à coleção de culturas lácteas da empresa Chr. Hansen, é a bifidobactéria mais bem documentada do mundo, sendo utilizada desde 1985 como ingrediente em alimentos e suplementos alimentares. Esta cepa foi selecionada principalmente para aplicação em produtos lácteos, devido à sua alta tolerância ao oxigênio e às condições do trato gastrointestinal, como baixo pH e presença de sais de bile. Inicialmente, quando foi isolada em 1983, foi considerada como pertencente à espécie *Bifidobacterium bifidum*. No entanto, posteriormente foi reclassificada, primeiramente como *Bifidobacterium animalis*, e depois como uma nova espécie, *Bifidobacterium lactis*. Porém, foi demonstrado que a classificação *B. lactis* não atendia completamente aos critérios da espécie e, assim, a nomenclatura “*lactis*” foi incluída como subespécie (MASCO et al., 2004; JUNGENSEN et al., 2014).

Tradicionalmente, as culturas probióticas têm sido incorporadas majoritariamente em produtos lácteos fermentados, os quais compreendem ainda a categoria com maior representatividade quanto à disponibilidade de produtos probióticos no mercado (GRANATO et al., 2019). Entretanto, há um interesse crescente no estudo e desenvolvimento de outras matrizes alimentares como potenciais carreadores para incorporação destes microrganismos na dieta, sobretudo de origem não láctea, sendo possível a administração de probióticos em casos onde a intolerância à lactose, alergias às proteínas do leite, dislipidemias, e dietas restritivas ao consumo de produtos de origem animal são barreiras de consumo (BAKR, 2015; PANGHAL et al., 2018).

Inseridos neste contexto, os sucos de frutas podem representar uma matriz em potencial para incorporação de culturas probióticas, tendo em vista que são produtos ricos em vitaminas, minerais, compostos bioativos com propriedade antioxidante, além de apresentarem um forte apelo saudável e serem consumidos regularmente por uma grande parcela da população, o que representa um fator importante para que os probióticos exerçam suas funções no organismo do hospedeiro (SHORI, 2016).

Diversos estudos recentes relataram a adição de probióticos a diferentes sucos de frutas para a produção de bebidas funcionais, obtendo resultados promissores. Pereira, Maciel e Rodrigues (2011) elaboraram

uma bebida probiótica a base de suco de caju, fermentada com *Lactobacillus casei*, obtendo contagens acima de 8 log UFC mL⁻¹ após 21 dias de armazenamento refrigerado. Já Fonteles et al. (2012) e Costa et al. (2013) utilizaram sucos de melão e abacaxi, respectivamente, como substratos para aplicação de *Lactobacillus casei*, visando o desenvolvimento de bebidas probióticas. Pimentel et al. (2015) avaliaram o efeito da suplementação de suco de maçã clarificado com *Lactobacillus paracasei* e/ou oligofrutose nas características físico-químicas, viabilidade probiótica e aceitabilidade durante o armazenamento refrigerado por 28 dias. Mais recentemente, Farias, Soares e Gouveia (2016) demonstraram a adequação do suco de maracujá da Caatinga como matriz para fermentação de *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469, o qual manteve contagens acima de 8 log UFC mL⁻¹ após 28 dias de armazenamento a 4 °C.

Entretanto, a adição de microrganismos em sucos de frutas apresenta maior complexidade em relação à aplicação de probióticos em produtos lácteos para a mesma finalidade. A manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos em sucos de frutas é considerada um desafio tecnológico, tendo em vista os fatores adversos à sobrevivência dos mesmos nesses produtos. Muitas condições podem afetar a viabilidade das bactérias probióticas em sucos de frutas, sobretudo a alta concentração de ácidos orgânicos e o pH, geralmente encontrado em valores abaixo de 4,0; a toxicidade ao oxigênio no caso de bactérias anaeróbias, o tempo e a temperatura de estocagem, além da ausência ou insuficiência de alguns peptídeos e aminoácidos livres necessários ao metabolismo dos probióticos (SHORI, 2016).

Dessa forma, há uma demanda crescente por tecnologias que permitam solucionar estas limitações, de forma a garantir a estabilidade dos probióticos em sucos de frutas, mantendo suas características funcionais desejadas de forma prolongada (BORGES et al., 2016). Com o objetivo de manter a viabilidade dos microrganismos probióticos durante as etapas de produção, armazenamento e passagem do alimento pelo trato gastrointestinal, e, concomitantemente, proporcionar estabilidade aos sucos de frutas, diversos métodos de microencapsulação vêm sendo estudados (CELLI; GHANEM; BROOKS, 2015).

1.3 Microencapsulação

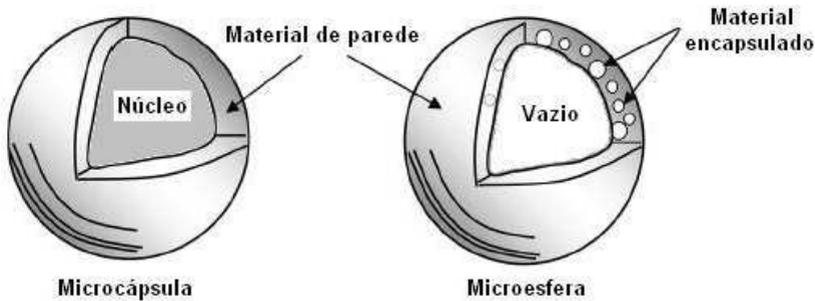
O conceito da técnica de microencapsulação tem como base o modelo celular, em que ocorre o envolvimento de um núcleo por uma

membrana semipermeável, que confere proteção em relação ao meio externo e, ao mesmo tempo, controla de forma seletiva a entrada e saída de substâncias da célula (RÉ, 2006). Sendo assim, a microencapsulação compreende um processo tecnológico de empacotamento de materiais ativos (pequenas partículas sólidas, líquidos ou compostos gasosos) em cápsulas de tamanho reduzido, as quais podem ter a liberação de seu conteúdo controlada e sob condições estabelecidas (DESAI; PARK, 2005).

As microcápsulas consistem em uma camada do agente encapsulante ou material de parede, que atua como um filme protetor, isolando a substância ativa e evitando os efeitos de sua exposição ao ambiente em questão. Normalmente, as microcápsulas apresentam forma esférica, com diâmetros que variam de 1 a 5000 μm , porém, o tamanho e a morfologia das microcápsulas variam de acordo com o método de microencapsulação adotado, bem como com os materiais ativos e agentes encapsulantes empregados no processo (MISHRA, 2015).

Em relação à morfologia obtida pelos diferentes métodos de microencapsulação, o material ativo pode ficar concentrado na região central da cápsula, envolvido pelo agente encapsulante, caracterizando as microcápsulas “verdadeiras”; ou estar adsorvido, incorporado ou ligado covalentemente à matriz constituída pelo agente encapsulante, com uma pequena porção do material ativo exposta na superfície, neste caso sendo denominadas micropartículas ou microesferas (Figura 1.2). Embora apresentem diferenças estruturais, o termo “microencapsulação” tem sido empregado em referência tanto à formação de microcápsulas quanto de micropartículas. As microcápsulas podem ser classificadas ainda em mononucleares, quando são constituídas por um núcleo simples, ou polinucleares, quando existe um agrupamento de núcleos no interior da mesma partícula (JAFARI et al., 2008; ESTEVINHO et al., 2013).

Figura 1.2: Micropartículas com diferentes tipos de estrutura



Fonte: Adaptado de Jafari et al. (2008).

Na indústria de alimentos, a microencapsulação é uma ferramenta que tem sido utilizada há mais de 60 anos, em razão de suas inúmeras aplicações, que compreendem a transformação de um líquido em sólido, facilitando assim o manuseio, transporte e garantindo a estabilização do produto; para controle de reações de oxidação, pela separação dos componentes reativos, evitando o contato destes com o oxigênio, luz ou umidade, promovendo a extensão da vida útil do produto; para retenção ou liberação de sabores, cores e aromas de forma controlada (DESAI; PARK, 2005)

Diversos materiais com propriedades bioativas têm sido encapsulados, tendo em vista sua sensibilidade, incluindo as vitaminas, óleos essenciais, lipídeos, aminoácidos, minerais, corantes, enzimas, além de microrganismos probióticos (VOS et al., 2010).

No caso das culturas probióticas, a microencapsulação é realizada com a finalidade de proteger as células bacterianas contra injúrias ocasionadas por condições adversas do meio externo, auxiliando na resistência dos microrganismos, tanto às condições de processamento quanto pela passagem dos mesmos pelo trato gastrointestinal (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016; CHAMPAGNE; GOMES DA CRUZ; DAGA, 2018).

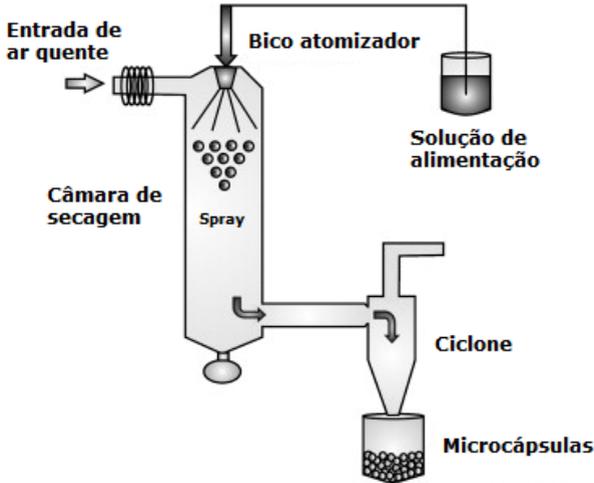
Diversos métodos de microencapsulação têm sido empregados para a microencapsulação de bactérias probióticas, tais como a emulsificação, coacervação, extrusão, liofilização, *spray chilling* e *spray drying*, sendo que a seleção de cada método depende da finalidade que será dada às microcápsulas, bem como das propriedades físico-químicas do material ativo e do agente encapsulante (SEMYONOV et al., 2010;

KAILASAPATHY, 2014). É necessário levar em consideração também a forma de liberação das microcápsulas, que normalmente ocorre devido a mecanismos como variação de pH e temperatura, solvatação, ruptura por ação mecânica, atividade enzimática, difusão, entre outros (ĐORĐEVIĆ et al., 2014).

A técnica de microencapsulação mais utilizada na indústria de alimentos é a de secagem por atomização ou *spray drying*, sendo também a mais utilizada para obtenção de produtos probióticos microencapsulados (SHISHIR; CHEN, 2017). Este processo oferece diversas vantagens, como o fato de ser um processo realizado em etapa única, possui baixo custo de produção, apresenta facilidade de execução e operação contínua, apresenta alto rendimento e eficiência, além de resultar em cápsulas relativamente uniformes e de boa qualidade (HUANG et al., 2017).

O princípio da técnica de *spray drying* consiste em preparar uma solução contendo o material ativo e o agente encapsulante escolhido, e esta solução é subsequentemente aspergida sob a forma de *spray* na câmara de secagem, ocorrendo o contato entre gotículas e o ar quente, cuja temperatura varia normalmente entre 120 e 220 °C, o que promove uma rápida evaporação do solvente. Subsequentemente, ocorre a separação das micropartículas do ar de secagem, as quais são arrastadas até o ciclone e recolhidas em um recipiente na parte inferior do atomizador (RATHORE et al., 2013; DRUSCH; DIEKMANN, 2015). A Figura 1.3 apresenta um esquema do processo de microencapsulação pela técnica de *spray drying*.

Figura 1.3: Representação esquemática do processo de microencapsulação por *spray drying*.



Fonte: Adaptado de Sosnik e Seremeta (2015).

Todavia, a exposição às altas temperaturas, que são necessárias para facilitar a evaporação do solvente durante a passagem das bactérias na câmara de secagem, exerce um efeito negativo sobre a integridade das células, ocasionando uma redução da viabilidade dos probióticos encapsulados (MARTÍN et al., 2015). Nesse caso, a escolha de agentes encapsulantes adequados ao tipo de microrganismo a ser encapsulado, assim como a concentração adequada do mesmo, a contagem de células viáveis inicial, e o controle das condições operacionais tais como taxa de fluxo de alimentação e velocidade e temperaturas de entrada e saída de ar no equipamento são de suma importância para garantir a sobrevivência da cultura probiótica, protegendo-a durante a desidratação por *spray drying* (HUANG et al., 2017; KROKIDA, 2018).

1.3.1 Agentes encapsulantes

Os agentes encapsulantes têm por função proporcionar proteção ao material ativo, neste caso às bactérias probióticas, durante o processo de microencapsulação, bem como ao longo do armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal, evitando que ocorra perda da viabilidade (QUIRÓS-SAUCEDA et al., 2014). Diversos materiais estão disponíveis para utilização, sozinhos ou em associações, como agentes encapsulantes. Dentre os mais utilizados para microencapsular culturas probióticas, destacam-se os alginatos (KRASAEKOOPT; WATCHARAPOKA, 2014), goma arábica (ARSLAN et al., 2015), amido (YING et al., 2016), quitosana (YONEKURA et al., 2014); maltodextrinas (CHAIKHAM, 2015), leite em pó desnatado e soro de leite (FRITZEN-FREIRE et al., 2012; PINTO et al., 2015), além de prebióticos como a inulina e os fruto-oligossacarídeos (AVILA-REYES et al., 2014; RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015).

A escolha do agente encapsulante deve ser baseada, sobretudo, nas características físicas e químicas do composto que se pretende encapsular, no tipo de aplicação e no método de microencapsulação selecionado (WANDREY; BARTKOWIAK; HARDING, 2010). Além disso, algumas características são necessárias para que o agente encapsulante seja considerado ideal, considerando a microencapsulação por *spray drying*, incluindo baixa viscosidade em concentrações elevadas; ser de fácil manuseio durante o processo de microencapsulação; conferir proteção ao material ativo frente às condições adversas do meio externo; ser inerte em relação ao composto a encapsular; e apresentar propriedades desejadas de liberação (QUIRÓS-SAUCEDA et al., 2014; MISHRA, 2015).

Nos estudos existentes até o momento sobre a aplicação da técnica de *spray drying* para microencapsulação de sucos probióticos, as maltodextrinas são amplamente empregadas como agentes carreadores, de forma isolada ou em associação a outros encapsulantes, tais como a goma arábica e inulina, apresentando-se eficiente na proteção das culturas probióticas nessas matrizes (MESTRY; MUJUMDAR; THORAT, 2011; PEREIRA et al., 2014; ANEKELLA; ORSAT, 2014; BARBOSA et al., 2015; ALVES et al., 2016; CHAIKHAM; KEMSAWASD; SEESURIYACHAN, 2017).

Maltodextrinas são definidas como carboidratos formados a partir da hidrólise parcial de amidos, através da ação enzimática e/ou por ácidos,

que consistem em unidades de α -D-glicose unidas principalmente por ligações glicosídicas (Figura 1.4). São obtidas principalmente a partir de amidos de milho, batata e arroz. Visto que são produtos hidrolisados de amido, são formadas por uma mistura de malto-oligossacarídeos (CHRONAKIS, 1998). Em contraste com os amidos, as maltodextrinas são solúveis em água fria, embora a propriedade de solubilidade varie conforme o grau de polimerização e DE (dextrose equivalente) (ROWE; SHESKEY; COOK, 2009).

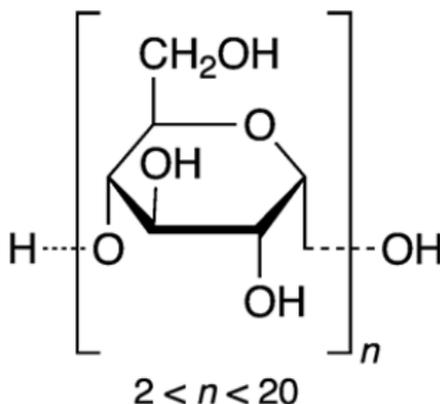
As maltodextrinas são descritas pelo seu valor de dextrose equivalente (DE), que é uma medida que caracteriza a extensão da hidrólise do amido e também indica uma média da massa molar (AVALTRONI; BOUQUERAND; NORMAND, 2004). A DE é relacionada ao DP (grau de polimerização) por meio da Equação 1.1, onde DE e DP são valores médios das populações de moléculas (DAMODARAM; PARKIN; FENNEMA, 2010):

$$DE = \frac{100}{DP} \quad (1.1)$$

Conforme aumenta o grau de hidrólise, a massa molar diminui e a DE aumenta. Esta é uma medida empírica da quantidade de açúcar redutor presente no produto, expressa em base seca. Por definição, as maltodextrinas são os produtos com valores de $DE < 20$. De acordo com Wandrey, Bartkowiak e Harding (2010), o aumento da DE aproxima o hidrolisado das propriedades da dextrose, enquanto a diminuição aproxima às propriedades do amido. Sendo assim, variações nos valores de DE resultam em maltodextrinas com propriedades físico-químicas distintas (CASTRO et al., 2016).

As maltodextrinas são empregadas na indústria de alimentos com diversas finalidades, atuando como agente espessante, substituto de gordura, formador de filmes, agente de controle de cristalizações durante processos de congelamento e como complemento nutricional (WANG; WANG, 2000).

Figura 1.4: Representação da estrutura química da maltodextrina



Fonte: American Chemical Society (ACS) (2018).

O uso de maltodextrinas como agentes encapsulantes de ingredientes bioativos tem sido amplamente difundido, devido a sua propriedade de proteção contra oxidação, capacidade de formar filmes e seu poder redutor (ZHU, 2017). Além disso, apresenta baixo custo, em comparação com outros hidrocolóides utilizados para esta finalidade.

Ademais, Shishir e Chen (2017) afirmaram que o uso da maltodextrina como agente de secagem para extratos e sucos de frutas submetidos ao processo de *spray drying* é de grande importância, visto que estas matrizes alimentares apresentam elevadas concentrações de açúcares e ácidos orgânicos, os quais apresentam baixas temperaturas de transição vítrea (T_g), que conduzem a problemas de pegajosidade durante o processo de secagem. Sendo assim, o uso da maltodextrina permite o aumento da temperatura de transição vítrea, melhorando o processo de secagem e permitindo a obtenção de produtos em pó com propriedades adequadas.

De modo geral, as maltodextrinas com maiores valores de DE apresentam higroscopicidade moderada, boa solubilidade e não apresentam sabor doce, possibilitando sua aplicação como agente encapsulante para preparações destinadas à administração via oral, incluindo sucos microencapsulados (ROWE; SHESKEY; COOK, 2009).

Além disso, aumento da DE possui correlação positiva com a diminuição da permeabilidade ao oxigênio. Esta característica mostra-se interessante para aplicação de maltodextrinas com maior DE no processo de microencapsulação de culturas probióticas, sobretudo para as bifidobactérias, uma vez que pode promover um ambiente anaeróbio mais favorável no interior das microcápsulas (SAARELA et al., 2006; DING, W. K.; SHAH, 2008).

Além da maltodextrina, ingredientes prebióticos também apresentam potencial para serem empregados como agentes encapsulantes durante a microencapsulação de culturas probióticas (PEREDO et al., 2016).

1.3.1.1 Prebióticos

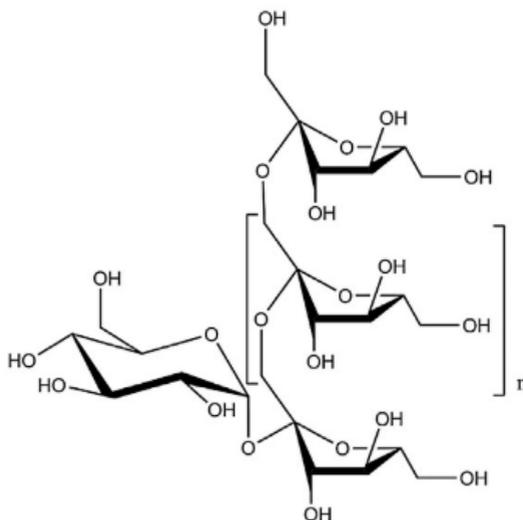
Em 1995, Gibson e Roberfroid definiram pela primeira vez os prebióticos como ingredientes alimentícios não digeríveis que afetam benéficamente o hospedeiro, por estimularem seletivamente o crescimento e atividade de um número limitado de bactérias do cólon. Esta definição sofreu algumas modificações ao longo dos anos, e em 2016, uma equipe de especialistas em microbiologia, nutrição e pesquisa clínica foi convocada pela Associação Científica Internacional para Probióticos e Prebióticos para revisar a definição e o escopo dos prebióticos. Dessa forma, a definição de prebióticos foi atualizada, e os prebióticos passaram a ser definidos como substratos que são utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo benefícios para a saúde. Essa definição expande o conceito de prebióticos para possivelmente incluir ingredientes que não sejam carboidratos e aplicação em locais do corpo que não o trato gastrointestinal (e.g. trato vaginal e pele), porém, a exigência de mecanismos seletivos mediados pela microbiota foi mantida (GIBSON et al., 2017).

Estes ingredientes estão associados à redução do risco de doenças uma vez que promovem alterações benéficas na microbiota. Os principais benefícios relacionados ao consumo de prebióticos, principalmente de fruto-oligossacarídeos e inulina, incluem a produção de ácidos graxos de cadeia curta (AGCC), melhora da motilidade e da função gastrointestinal, melhora na biodisponibilidade de cálcio, redução do colesterol sérico, regulação de desordens metabólicas relacionadas à obesidade, além de redução da inflamação e da constipação (CHOQUE-DELGADO; TAMASHIRO, 2018).

A inulina e os fruto-oligossacarídeos (FOS) são os prebióticos cujas aplicações em alimentos vêm sendo mais amplamente estudadas. Entretanto, além destes, outros ingredientes com potenciais propriedades prebióticas são relatados na literatura, como os galacto-oligossacarídeos (GOS), xilo-oligossacarídeos (XOS), isomalto-oligossacarídeos (IMO) e as ciclodextrinas (CD) (WATSON; PREEDY, 2015).

A inulina constitui um polissacarídeo de reserva, encontrado naturalmente em mais de 30.000 produtos vegetais. No entanto, as raízes da chicória (*Chichorium intybus*) constituem a principal fonte para extração industrial, contendo de 15 a 20% de inulina (SHOAIB et al., 2016). Quimicamente, os frutanos do tipo inulina são carboidratos polidispersos compostos por cadeias lineares de unidades de frutose, ligadas entre si por ligações tipo β -(2-1), na maioria das vezes contendo um resíduo de glicose no final da cadeia (Figura 1.5). Esta configuração química torna este carboidrato indigerível pelo organismo humano (MENSINK et al., 2015a).

Figura 1.5: Representação da estrutura química da inulina



Fonte: Mensink et al. (2015).

O grau de polimerização (DP) da inulina extraída da chicória varia entre 3 e 60 unidades de monossacarídeos, com média de 10 unidades. Uma vez submetida à hidrólise enzimática parcial, utilizando uma endoinulinase, produz-se a oligofrutose, a qual possui DP variando entre 2 e 9 unidades (MEYER; BLAAUWHOED, 2009). O emprego de processos físicos de separação permite eliminar os oligômeros com DP < 10, possibilitando produzir inulina com alto grau de polimerização, entre 23 e 25 unidades, denominada como inulina de alta performance (*high performance inulin* - HP), que apresenta características funcionais distintas da inulina nativa, com menor solubilidade, maior viscosidade e estabilidade térmica (GLIBOWSKI; BUKOWSKA, 2011).

De acordo com De Prisco e Mauriello (2016), o uso da inulina e outros prebióticos como agentes encapsulantes para a melhoria da viabilidade probiótica durante a produção e armazenamento de microcápsulas vêm recebendo grande atenção. Essa abordagem é considerada de grande utilidade especialmente quando técnicas como *spray drying* e liofilização são utilizadas para o processo de microencapsulação, visto que apresentam condições potencialmente desfavoráveis à viabilidade celular (HUANG et al., 2017).

Fritzen-Freire et al. (2012) verificaram que a utilização de uma combinação de prebióticos (inulina enriquecida com oligofrutose) e leite em pó desnatado como agentes encapsulantes para *Bifidobacterium* BB-12 resultou em maior proteção do microrganismo durante a secagem por *spray drying* e posterior estocagem das cápsulas. Já Avila-Reyes et al. (2014) verificaram que a utilização tanto da inulina quanto de amido nativo de arroz como agentes encapsulantes conferiu proteção à cultura probiótica de *Lactobacillus rhamnosus* durante o processo de *spray drying* e ao longo do armazenamento das microcápsulas a 25 e a 4 °C. Lorenzoni et al. (2018) produziram microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* La-5 por *spray drying*, utilizando inulina, *hi-maize* (amido resistente) e trealose como agentes encapsulantes, e verificaram que o uso de inulina e amido resistente resultaram nas maiores taxas de sobrevivência do microrganismo probiótico após o processo de microencapsulação.

Esta abordagem também vem sendo utilizada para a microencapsulação de sucos de frutas probióticos, embora os estudos disponíveis até o momento sejam escassos. Kingwatee et al. (2015) verificaram entre diversas combinações entre maltodextrina, inulina e goma arábica, que a combinação de inulina e maltodextrina como agentes encapsulantes de *Lactobacillus casei* 01 em suco de lichia conferiu

melhor proteção ao microrganismo probiótico. Recentemente, Chaikham, Kemsawasd e Seesuriyachan (2017) verificaram que o uso de inulina e da goma proveniente da espécie vegetal *Tiliacora triandra* para produção de suco probiótico de *maoluang* em pó conferiu maior proteção às bactérias probióticas *Lactobacillus casei* 01 e *Lactobacillus acidophilus* La-5 contra as condições adversas do modelo gastrointestinal simulado.

1.4 Caracterização de microcápsulas obtidas por *spray drying*

O uso de diferentes agentes encapsulantes para compor a matriz protetora das microcápsulas produzidas pelo método de *spray drying* resulta em pós com características físico-químicas distintas, tornando essencial o conhecimento das propriedades das microcápsulas formadas para possibilitar a otimização de processos, funcionalidades e condições ideais de aplicação (WANDREY; BARTKOWIAK; HARDING, 2010).

De acordo com Bhandari (2013), as propriedades de um produto em pó podem ser classificadas em três categorias: fundamentais, funcionais e indesejáveis. As propriedades fundamentais são características que apresentam impacto significativo sobre todas as demais propriedades de um produto em pó, e incluem o teor de umidade, atividade de água, microestrutura, tamanho e distribuição das partículas e densidade. Já as propriedades funcionais relacionam-se com as possíveis aplicações dos pós como produto ou como ingredientes em uma formulação, e são diretamente influenciadas pela combinação das propriedades fundamentais. Dentre as propriedades relativas à funcionalidade, destacam-se as relacionadas à fluidez e compressibilidade, além das características de reconstituição. Por fim, é necessário avaliar também as propriedades indesejáveis dos pós, que muitas vezes restringem seu uso para aplicações particulares. Neste sentido, sugere-se a investigação dos mecanismos relacionados à ocorrência de aglomeração e pegajosidade (*stickness*) em amostras em pó.

A umidade e a atividade de água (A_w) são fatores essenciais no que diz respeito à estabilidade e estocagem das microcápsulas, bem como dos microrganismos probióticos durante o armazenamento de produtos microencapsulados. Teores de umidade abaixo de 4% e atividade de água inferior a 0,3 são geralmente aceitos para garantir a estabilidade de microrganismos microencapsulados (VESTERLUND; SALMINEN; SALMINEN, 2012).

A análise de microestrutura, realizada através da microscopia eletrônica de varredura (MEV) permite monitorar a formação das cápsulas, além de fornecer informações acerca do tamanho das partículas geradas pelo processo de microencapsulação, sendo possível verificar a integridade das mesmas. Dessa forma, pode-se afirmar que esta propriedade está intimamente ligada à funcionalidade (ALLAN-WOJTAS; HANSEN; PAULSON, 2008). Zhang, Law e Lian (2010) relataram que o tamanho das partículas pode ter influência na mistura de componentes, afetando o aroma, a textura e a aparência dos alimentos no qual as microcápsulas são incorporadas. Além disso, esta propriedade pode influenciar as características de umidade, propriedades de escoamento, compactação, capacidade de reidratação e solubilidade dos pós.

O conhecimento da densidade é importante em processos industriais, no ajuste das condições de estocagem, processamento, embalagem e distribuição. Os produtos obtidos por moagem ou secagem geralmente são caracterizados por sua densidade aparente (*bulk density*) (BHANDARI et al., 2013). Pode-se obter ainda a medida da densidade compactada (*tapped density*), batendo-se ou submetendo o cilindro de medição à vibração, o qual promove o assentamento do pó e o aumento da densidade aparente, uma vez que as partículas são rearranjadas pela ação mecânica, preenchendo os espaços vazios na massa de pó. Essas propriedades estão intimamente relacionadas com a porosidade das partículas, bem como forças de atração interparticulares (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). A partir da relação entre estas duas medidas, é possível obter indicativos sobre as propriedades de fluxo dos pós, através do índice de compressibilidade de Carr (IC) e da razão de Hausner. A razão de Hausner (HR) é um número que está relacionado com a capacidade de fluxo de um pó ou material particulado, sendo calculado pela razão entre a densidade compactada e a densidade aparente (CELLI; GHANEM; BROOKS, 2015). Já o índice de Carr (CARR, 1965) fornece indicativos sobre o grau de compressibilidade de uma amostra. Tanto as densidades como as propriedades de fluxo são importantes sob o ponto de vista do processamento e armazenamento de produtos em pó, visto que baixa fluidez e alta compressibilidade são características que podem acarretar em dificuldades no manuseio dos produtos em pó.

A solubilidade é considerada uma propriedade importante para a qualidade e funcionalidade de produtos em pó, estando diretamente relacionada com a reconstituição dos mesmos. Do ponto de vista dos consumidores, a reconstituição rápida e completa é um dos principais

indicadores de qualidade. Dessa forma, o índice de solubilidade em água fornece informações representativas sobre o comportamento do produto na fase aquosa de um sistema alimentar, sendo influenciada pela estrutura química do agente encapsulante empregado, além de possuir correlação com outras propriedades, como tamanho e morfologia das partículas (SELOMULYA; FANG, 2013).

Outra propriedade importante a ser analisada é a higroscopicidade, visto que é possível obter informações sobre a estabilidade física das microcápsulas e possíveis modificações ocasionadas pela incorporação de umidade em caso de armazenamento em condições de umidade relativa alta. Além disso, é possível estimar a vida útil do produto ou determinar as propriedades de barreira de umidade necessárias ao desenvolvimento de embalagens (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). A partir da análise de higroscopicidade pode-se avaliar o grau de aglomeração de um produto em pó. A aglomeração é um fenômeno indesejado pelo qual pós alimentícios amorfos são transformados em um material pegajoso, resultando em perda de funcionalidade e qualidade (AGUILERA; DEL VALLE; KAREL, 1995).

Por fim, o estudo das propriedades térmicas através da análise termogravimétrica é uma ferramenta interessante para a caracterização de produtos microencapsulados com constituintes poliméricos, como é o caso dos agentes encapsulantes empregados. A análise termogravimétrica permite, através das curvas de variação de massa em função da temperatura, tirar conclusões sobre como a água se encontra associada aos demais constituintes na matriz das microcápsulas, além de fornecer informações sobre interações entre os componentes e estabilidade térmica das amostras (BISINELLA et al., 2016).

1.5 Emprego de métodos independentes de cultivo para quantificação de bactérias probióticas em matrizes alimentares

Análises microbiológicas para identificação e quantificação de microrganismos são fundamentais na produção de alimentos, visto que são aplicadas em diversas etapas do processamento com múltiplas finalidades, tais como para controle de qualidade e segurança, sendo empregadas também como ferramenta para identificação da diversidade microbiana presente em uma matriz, de forma a compreender seus efeitos sobre as características e conservação do produto; bem como para

monitorar a funcionalidade, no caso de alimentos fermentados ou adicionados de culturas probióticas (HÚNGARO et al., 2014).

Considerando que a obtenção dos benefícios terapêuticos associados à ingestão de probióticos é condicionada à permanência destes microrganismos vivos e em quantidades adequadas em um produto até o momento do consumo, é fundamental estabelecer métodos específicos e apropriados para quantificá-los e monitorar sua viabilidade (POUTSIAKA et al., 2017).

Os microrganismos foram inicialmente quantificados em alimentos através de abordagens baseadas em cultivo e caracterizados fenotípica, taxonômica e fisiologicamente através de análises microscópicas e testes bioquímicos (DAVIS, 2014; BATT, 2016). As técnicas microbiológicas clássicas, denominadas dependentes de cultivo, baseiam-se principalmente na capacidade de um microrganismo em crescer e multiplicar-se em meios de cultura sob condições específicas (WILKINSON, 2018). Embora sejam consideradas como “padrão ouro” para enumeração de muitos microrganismos em alimentos para fins de rotina laboratorial, essas técnicas apresentam algumas limitações e desvantagens.

Uma das desvantagens reside na falta de especificidade e seletividade, principalmente para microrganismos cujas espécies são filogeneticamente intimamente relacionadas e que apresentam necessidades nutricionais e condições de crescimento semelhantes, como é o caso de bactérias probióticas pertencentes aos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* e bactérias ácido lácticas utilizadas como iniciadoras em processos fermentativos (VINDEROLA et al., 2011). A gama de meios seletivos disponíveis para identificar e enumerar cepas de interesse probiótico é relativamente limitada, e é importante destacar que não existe nenhum meio de cultura ou protocolo oficial padronizado aplicável a todos os microrganismos probióticos atualmente utilizados em alimentos, já que há grande variabilidade de respostas ao plaqueamento a nível de espécies, subespécies e cepas (VINDEROLA et al., 2011; DAVIS, 2014).

Além disso, métodos dependentes de cultivo envolvem técnicas laboriosas, que empregam grandes volumes de meios de cultura, requerem tempo considerável para obtenção de resultados (em geral entre 24-72 horas) e podem subestimar a população de microrganismos viáveis na amostra. De acordo com Zhao et al. (2017), em resposta à condições de estresse ambiental durante a formulação e armazenamento, tais como exposição a ambientes ácidos, aquecimento ou secagem, os

microrganismos podem fazer a transição para um estado fisiológico viável mas não cultivável (VNC), em que se mantêm metabolicamente ativos, porém, perdem a capacidade de se multiplicar e, portanto, crescer em meios de cultivo. Essa limitação é importante sob a perspectiva dos produtos probióticos, visto que a população de células em estado viável não cultivável contribui para a funcionalidade destes produtos, uma vez que a capacidade metabólica destas é mantida e, ao atingir o cólon no hospedeiro, onde encontram condições favoráveis, podem reestabelecer o amplo funcionamento celular (MILLS et al., 2011).

Em face de tais limitações, os métodos independentes de cultivo foram rapidamente reconhecidos como alternativa promissora aos métodos tradicionais dependentes de cultivo. Através do uso destas abordagens, os microrganismos são estudados em função de seus ácidos nucleicos ou proteínas, os quais são extraídos diretamente da matriz alimentar e utilizados como alvo nessas técnicas, e não pela capacidade de se multiplicar em meios de cultivo específicos (COCOLIN et al., 2013).

A maioria dos métodos independentes de cultivo desenvolvidos para identificação e quantificação de microrganismos baseia-se na Reação em Cadeia da Polimerase (do inglês, *Polymerase Chain Reaction*) - PCR, mais especificamente, na PCR em tempo real, também denominada PCR quantitativa (qPCR).

A PCR quantitativa é baseada na PCR convencional, a qual tem como objetivo a multiplicação *in vitro* de sequências específicas de DNA, de modo que possam ser detectadas (ZHANG; FANG, 2006). Diferentemente da PCR convencional, na qPCR a concentração do fragmento amplificado é monitorada à medida que a amplificação ocorre, através da detecção do aumento do sinal fluorescente, que é proporcional à quantidade de DNA produzido a cada ciclo da PCR (POSTOLLEC et al., 2011). Na qPCR os dados são coletados durante a fase exponencial da reação, quando a quantidade dos produtos de amplificação dobra a cada ciclo e é diretamente proporcional à quantidade de DNA alvo inicial. Dessa forma, é possível quantificar as populações microbianas medindo a abundância de uma sequência alvo em amostras de DNA extraídas a partir de matrizes alimentares (DAVIS, 2014).

A técnica de qPCR apresenta diversas vantagens em relação aos métodos dependentes de cultivo e à própria PCR convencional, como a alta sensibilidade, rapidez, uso de sistema automatizado, além do risco de contaminação ser reduzido (ZIELIŃSKA et al., 2018); e tem sido

amplamente empregada para detecção e quantificação de diferentes microrganismos probióticos em matrizes alimentares diversas, sobretudo em produtos lácteos (SHEU et al., 2013; GANESAN et al., 2014; ILHA et al., 2016).

Diversos ensaios de qPCR foram desenvolvidos utilizando pares de iniciadores sintetizados com base na variabilidade de sequências do gene 16S rRNA, para enumeração de bactérias ácido lácticas e probióticas (LAHTINEN et al., 2008; GARCÍA-CAYUELA et al., 2009). No entanto, este gene pode estar presente em múltiplas cópias no genoma bacteriano, e a ocorrência de similaridades nas sequências 16S rRNA entre espécies estreitamente relacionadas dificulta o desenvolvimento de iniciadores altamente específicos (BAGHERIPOOR-FALLAH et al., 2015). O gene do fator de alongação (*tuf*) tem sido utilizado como gene alvo para desenvolvimento de métodos para identificação e quantificação específica de bactérias pertencentes ao gênero *Lactobacillus*, incluindo espécies estreitamente relacionadas como *L. casei* e *L. paracasei*, que são reconhecidamente de difícil distinção através de metodologias clássicas (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; ILHA et al., 2016). No caso da bactéria probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, Solano-Aguilar et al. (2008) propuseram o uso de iniciadores baseados no gene *tuf* altamente conservado e verificaram que este representa um marcador capaz de diferenciar a *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 de outras espécies de *Bifidobacterium*, o qual tem sido utilizado para desenvolver ensaios de PCR quantitativa específicos para enumeração desta cepa (POUTSIKA et al., 2017; ODOOLI et al., 2018).

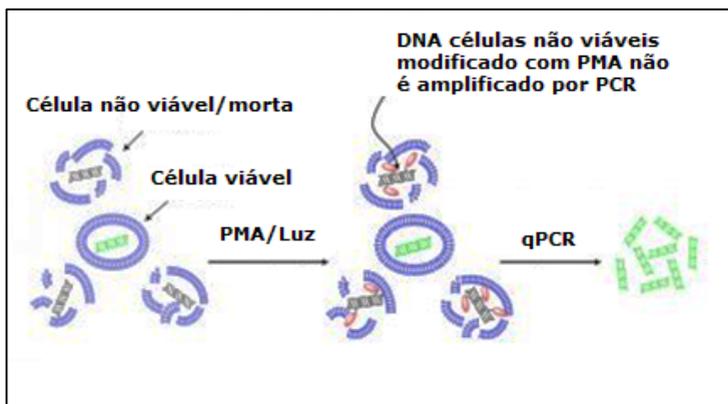
A principal desvantagem dos ensaios baseados na técnica de qPCR consiste na incapacidade de diferenciação entre células viáveis e não viáveis. Dessa forma, a enumeração de células viáveis pode ser superestimada ou apresentar resultados falso-positivos, tendo em vista a capacidade do DNA em permanecer no ambiente mesmo após a morte celular, podendo ser amplificado (FITTIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Nesse contexto, o tratamento de amostras com corantes intercalantes de DNA, previamente à qPCR, tem sido sugerido como uma abordagem alternativa para superar este problema, possibilitando a quantificação diferencial de células viáveis com base na integridade das membranas celulares. A manutenção da integridade da membrana é considerada um dos principais marcadores para células viáveis, uma vez que danos severos na estrutura da membrana são geralmente permanentes

e muito provavelmente resultam na morte celular, devido à incapacidade de reter o ambiente intracelular definido (VONDRAKOVA et al., 2018).

Os corantes intercalantes de DNA mais utilizados para essa finalidade são o monoazida de etídio (EMA) e monoazida de propídio (PMA), que possuem mecanismos de ação semelhantes (Fig. 1.6) (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006). Estes corantes são impermeáveis à membrana intacta de células viáveis, todavia, penetram facilmente as células cujas membranas celulares estejam danificadas. Dentro da célula, o corante se intercala na fita dupla de DNA. Mediante exposição à luz, ocorre a fotólise do grupamento azida, que é convertido em um radical nitreno altamente reativo, que se liga covalentemente ao DNA, promovendo uma modificação irreversível. Simultaneamente, qualquer excesso de corante não ligado ao DNA reage com moléculas de água, resultando em hidroxilamina, que não é mais reativa, prevenindo a ocorrência de reação do corante com o DNA extraído de células intactas (viáveis). O processo de modificação do DNA resulta na forte inibição da amplificação deste por qPCR, o qual não é detectado. Dessa forma, o DNA das células cujas membranas estão intactas é detectado seletivamente (ERKUS et al., 2016).

Figura 1.6: Ilustração esquemática do princípio do tratamento utilizando o corante PMA para quantificação de células viáveis de bactérias por qPCR.



Fonte: Adaptado de Biotium (*Product Information brochure*, 2015)

Versão original disponível em: <https://biotium.com/product/pmatm-dye-propidium-monoazide/>

Apesar da semelhança relativa ao modo de ação, estes corantes apresentam diferenças em relação à permeabilidade através das membranas celulares. Nocker e Camper (2006) verificaram que o corante EMA penetrou em células viáveis intactas de algumas espécies bacterianas, tanto gram-positivas como gram-negativas, resultando em perda parcial de DNA. Já em relação ao corante PMA, foi verificada a supressão incompleta dos sinais provenientes de células mortas, podendo ocasionar resultados falso positivos. Estas variações são atribuídas às estruturas químicas dos dois corantes, visto que o EMA apresenta uma carga positiva apenas, penetrando mais facilmente nas membranas bacterianas do que o PMA, que possui dupla carga positiva, e pode não permear tão facilmente células com membranas pouco comprometidas (EMERSON et al., 2017). Dessa forma, embora o corante EMA seja considerado mais eficaz na supressão de sinais, o PMA é preferencialmente escolhido por ser mais eficiente quanto à discriminação de células viáveis e não viáveis (FITIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

A utilização da técnica de qPCR combinada ao tratamento com corantes intercalantes demonstrou ser uma ferramenta importante e eficaz para detecção e quantificação de uma vasta gama de microrganismos de interesse em alimentos, incluindo patogênicos, deteriorantes e benéficos (ELIZAGUÍVEL; AZNAR; SÁNCHEZ, 2013). No que diz respeito ao uso desta abordagem para quantificação de microrganismos probióticos, García-Cayueta et al. (2009) descreveram pela primeira vez um ensaio de qPCR utilizando o corante PMA (PMA-qPCR) para quantificação específica de células viáveis de diferentes espécies de bactérias probióticas e culturas iniciadoras do iogurte, em leites fermentados, o qual possibilitou a correta identificação e enumeração das diferentes populações de bactérias viáveis nestes produtos.

O uso de diferentes matrizes alimentares para incorporação de microrganismos probióticos pode afetar não somente a viabilidade dos mesmos, como também a eficiência do método utilizado para a sua enumeração, visto que a maioria das amostras de alimentos são consideradas matrizes complexas e seus componentes podem interferir em várias etapas da análise de qPCR utilizando corantes intercalantes de DNA. Portanto, há a necessidade do desenvolvimento de ensaios que considerem as particularidades de diferentes matrizes alimentares.

Ensaio de PMA-qPCR foram desenvolvidos com sucesso para a quantificação de microrganismos probióticos em produtos lácteos

diversos, como queijo *cheddar* (DESFOSSÉS-FOUCAULT et al., 2012; GANESAN et al., 2014), *petit-suisse* (VILLARREAL et al., 2013; PADILHA; VILLARREAL; VIEIRA, 2016) e iogurtes (MENG et al., 2010; SCARIOT et al., 2018).

Acompanhando a tendência recente de desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, foram desenvolvidos até o momento dois estudos acerca da aplicação da técnica de PMA-qPCR para matrizes não lácteas. Lupien-Meilleur, Roy e Lagacé (2016) avaliaram a viabilidade de cepas probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* R0011, *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12) em bebidas à base de xarope de bordo (*maple*) durante o armazenamento refrigerado, utilizando a técnica PMA-qPCR. Matias et al. (2016) empregaram a técnica de PMA-qPCR para avaliar a viabilidade e resistência às condições gastrointestinais simuladas das cepas probióticas *Lactobacillus acidophilus* La-5 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 adicionadas em sorvete simbiótico de maçã elaborado à base de extrato hidrossolúvel de soja.

Entretanto, em relação à aplicação desta técnica para quantificação de microrganismos probióticos encapsulados, também existem poucos estudos disponíveis na literatura. Oketič et al. (2015) avaliaram o potencial da técnica de PMA-qPCR como método alternativo ou complementar à contagem em placas para enumeração de *Lactobacillus gasseri* K7 e *Lactobacillus delbrueckii subsp. bulgaricus* em microcápsulas de alginato de sódio produzidas por extrusão. Mais recentemente, Atia et al. (2018) estudaram o comportamento de liberação e a sobrevivência de três cepas potencialmente probióticas (*Pediococcus acidilactici* UL5, *Lactobacillus reuteri* e *Lactobacillus salivarius*) encapsuladas em microesferas de alginato e inulina, frente às condições do trato gastrointestinal *in vitro*, através de um ensaio PMA-qPCR.

REFERÊNCIAS

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013.

AGUILERA, J. M.; DEL VALLE, J. M.; KAREL, M. Caking phenomena in amorphous food powders. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 149–155, 1995.

ALLAN-WOJTAS, P.; TRUELSTRUP HANSEN, L.; PAULSON, A. T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 1, p. 101–108, 2008.

ALVES, N. N. et al. Effect of drying technique and feed flow rate on bacterial survival and physicochemical properties of a non-dairy fermented probiotic juice powder. **Journal of Food Engineering**, v. 189, p. 45–54, 2016.

ANEKELLA, K. .; ORSAT, V. Shelf life stability of *lactobacilli* encapsulated in raspberry powder: Insights into non-dairy probiotics. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 411–418, 2014.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.

ATIA, A. et al. Study and Understanding Behavior of Alginate-Inulin Synbiotics Beads for Protection and Delivery of Antimicrobial-Producing Probiotics in Colonic Simulated Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 10, p. 157–167, 2018.

AVALTRONI, F.; BOUQUERAND, P.; NORMAND, V. Maltodextrin molecular weight distribution influence on the glass transition temperature and viscosity in aqueous solutions. **Carbohydrate Polymers**, v. 58, n. 3, p. 323–334, 2004.

AVILA-REYES, S. V et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 423–30, 2014.

BAGHERIPOOR-FALLAH, N. et al. Comparison of Molecular Techniques with other Methods for Identification and Enumeration of Probiotics in Fermented Milk Products. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 55, n. 3, p. 396–413, 2015.

BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423–431, 2015.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. **Food Powders - Physical Properties, Processing and Functionality**. 1. ed. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2005.

BARBOSA, J. et al. Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder. **Journal of Functional Foods**, v. 17, p. 340–351, 2015.

BATT, C. A. Technology in Food Microbiology. **Reference Module in Food Science**, Elsevier, 2016. doi:10.1016/B978-0-08-100596-5.03439-9.

BHANDARI, B. et al. **Handbook of Food Powder Processes and Properties**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013.

BISINELLA, R. Z. B. et al. Thermal analysis as screening technique to assess spray-drying process of encapsulated “yacon” juice. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 126, n. 3, p. 1841–1849, 2016.

BORGES, S. et al. A feasibility study of *Lactobacillus plantarum* in fruit powders after processing and storage. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 2, p. 381–388, 2016.

BORRMANN, D. et al. Microencapsulation of passion fruit (*Passiflora*)

juice with n-octenylsuccinate-derivatised starch using spray-drying. **Food and Bioproducts Processing**, v. 91, n. 1, p. 23–27, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução n. 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que Estabelece as Diretrizes Básicas para Análise e Comprovação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde Alegadas em Rotulagem de Alimentos. **Diário Oficial da União**, Brasília, 1999.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n° 49, de 26 de setembro de 2018. Estabelece a complementação dos Padrões de Identidade e Qualidade de Suco e Polpa de Fruta Tropical. **Diário Oficial da União**, Brasília, 2018.

CABRAL, L. M. C.; JÚNIOR, M. F.; MATTA, V. M. Suco de maracujá In: **Bebidas não alcoólicas: Ciência e Tecnologia**, v.2, Waldemar G. Venturini Filho (Coord.). São Paulo: Blucher, 2010

CARR, L. R. Evaluating flow properties of powders. **Chemical Engineering**, v. 72, p. 116–124, 1965.

CASTRO, N. et al. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 464–473, 2016.

CELLI, G. B.; GHANEM, A.; BROOKS, M. S. L. Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods - a Review of Methods and Current Limitations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1825–1837, 2015.

CERQUEIRA-SILVA, C. B. M. et al. A history of passion fruit woodiness disease with emphasis on the current situation in Brazil and prospects for Brazilian passion fruit cultivation. **European Journal of Plant Pathology**, v. 139, n. 2, p. 255–264, 2014.

CHAIKHAM, P. Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. **Food Bioscience**, v. 12, p. 61–66, 2015.

CHAIKHAM, P.; KEMSAWASD, V.; SEESURIYACHAN, P. Spray drying probiotics along with maoluang juice plus *Tiliacora triandra* gum for exposure to the *in vitro* gastrointestinal environments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 78, p. 31–40, 2017.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotics in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160–166, 2018.

CHOQUE-DELGADO, G. T.; TAMASHIRO, W. M. DA S. C. Role of prebiotics in regulation of microbiota and prevention of obesity. **Food Research International**, v. 113, p. 183–188, 2018.

CHRONAKIS, I. S. On the molecular characteristics, compositional properties, and structural-functional mechanisms of maltodextrins: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 38, n. 7, p. 599–637, 1998.

COCOLIN, L. et al. Culture independent methods to assess the diversity and dynamics of microbiota during food fermentation. **International Journal of Food Microbiology**, v. 167, n. 1, p. 29–43, 2013.

COSTA, M. G. M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261–266, 2013.

CREMON, C. et al. Pre- and probiotic overview. **Current Opinion in Pharmacology**, v. 43, p. 87–92, 2018.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K.L.; FENNEMA, O.R. **Química de Alimentos de Fennema**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2010.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9–17, 2014.

DE PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on

microencapsulation tool. **Trends in Food Science and Technology**, v. 48, p. 27–39, 2016.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients, **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005

DESFOSSÉS-FOUCAULT, É. et al. Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–11, 2012.

DHAWAN, K.; DHAWAN, S.; SHARMA, A. *Passiflora*: a review update. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 94, n. 1, p. 1–23, 2004.

DING, W. K. AND SHAH, N. P. Survival of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria in Orange and Apple Juices. **International Food Research Journal**, v. 15, n. 2, p. 219–232, 2008.

DORĐEVIĆ, V. et al. Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds. **Food Engineering Reviews**, v. 7, p.452-490, 2014.

DRUSCH, S.; DIEKMANN, S. Microencapsulation by Spray drying. In: MISHRA, M. (Ed.). **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**. Boca Raton: CRC Press, 2015. p. 35–44.

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, 2013.

EMERSON, J. B. et al. Schrödinger’s microbes: Tools for distinguishing the living from the dead in microbial ecosystems. **Microbiome**, v. 5, n. 86, p. 1–23, 2017.

EMBRAPA - EMPRESA BRASILEIRA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA **Destinos das exportações brasileiras de maracujá em 2017**, 2017. Disponível em:

http://www.cnpmf.embrapa.br/Base_de_Dados/index_pdf/dados/brasil/maracuja/b61_maracuja.pdf. Acesso em: 19 nov. 2018.

EPAGRI - EMPRESA DE PESQUISA AGROPECUÁRIA E EXTENSÃO RURAL DE SANTA CATARINA. **Estudo e diagnóstico da cultura do maracujazeiro na mesorregião Sul Catarinense**, 2018, Florianópolis: Epagri/Cepa.

ERKUS, O. et al. Use of propidium monoazide for selective profiling of viable microbial cells during Gouda cheese ripening. **International Journal of Food Microbiology**, v. 228, p. 1–9, 2016.

ESTEVINHO, B. N. et al. Microencapsulation with chitosan by spray drying for industry applications - A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 31, p. 138–135, 2013.

FARIAS, N.; SOARES, M.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 149–154, 2016.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012.

FOLIGNÉ, B.; DANIEL, C.; POT, B. Probiotics from research to market: the possibilities, risks and challenges. **Current Opinion in Microbiology**, v. 16, n. 3, p. 284–92, 2013.

FONTELES, T. V. et al. Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2860–2869, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

GANESAN, B. et al. Probiotic bacteria survive in Cheddar cheese and modify populations of other lactic acid bacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, p. 1642–1656, 2014.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 405–409, 2009.

GIBSON, G. R. et al. The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. **Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology**, v. 14, n. 8, p. 491–502, 2017.

GLIBOWSKI, P.; BUKOWSKA, A. The effect of pH, temperature and heating time on inulin chemical stability. **Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria**, v. 10, n. 2, p. 189–196, 2011.

GOLDENBERG, J. Z. et al. Probiotics for the prevention of *Clostridium difficile*- associated diarrhea in adults and children (Review). **Cochrane Database Systematic Reviews**, n. 5, p. 1–149, 2013.

GRANATO, D. et al. Functional Foods and Nondairy Probiotic Food Development : Trends , Concepts , and Products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, p. 292–302, 2010.

GRANATO, D. et al. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. In: FERRANTI, P.; BERRY, E. M.; ANDERSON, J. R. (Eds.) **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Elsevier, 2019, v.1, p.422-428.

GUO, Z. et al. Influence of consumption of probiotics on the plasma lipid profile: A meta-analysis of randomised controlled trials. **Nutrition, Metabolism and Cardiovascular Diseases**, v. 21, n. 11, p. 844–850, 2011.

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

HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1–17, 2017.

HÚNGARO, H. M. et al. Food Microbiology. **Encyclopedia of Agriculture and Food Systems**, v. 3, p. 213–231, 2014.

IBGE-INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICAS. **Produção Agrícola Municipal: culturas temporárias e permanentes**. v. 44, p. 1-22, 2017. Disponível em:http://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/periodicos/66/pam_2017_v44_br_notas_tecnicas.pdf. Acesso em: 30 set. 2018.

ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.

JAFARI, S. M. et al. Encapsulation efficiency of food flavours and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, n. 7, p. 816–835, 2008.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation for Gastrointestinal Delivery of Probiotic Bacteria. In: KWAK, H. S. (Ed.). **Nano- and Microencapsulation for Foods**. 1st. ed. John Wiley & Sons Ltd., 2014. p. 167–197.

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

KHALESİ, S. et al. Effect of probiotics on blood pressure: A systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **Hypertension**, v. 64, n. 4, p. 897–903, 2014.

KHALESİ, S. et al. A review of probiotic supplementation in healthy adults: helpful or hype? **European Journal of Clinical Nutrition**, p. 1–14, 2018.

KINGWATEE, N. et al. Spray drying *Lactobacillus casei* 01 in lychee juice varied carrier materials. **LWT - Food Science and Technology**, v.

62, n. 1, p. 847–853, 2015.

KLEEREBEZEM, M. et al. Understanding mode of action can drive the translational pipeline towards more reliable health benefits for probiotics. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 56, p. 55–60, 2019.

KRAMER, M. et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 84, p. 1137–1147, 2009.

KRASAEEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, n. 2, p. 761–766, 2014.

KROKIDA, M. **Thermal and Nonthermal Encapsulation Methods**. Boca Raton: CRC Press, Taylor & Francis Group, 2018.

LAHTINEN, S. J. et al. Degradation of 16S rRNA and attributes of viability of viable but nonculturable probiotic bacteria. **Letters in Applied Microbiology**, v. 46, n. 6, p. 693–698, 2008.

LÓPEZ-VARGAS, J. H. et al. Chemical, physico-chemical, technological, antibacterial and antioxidant properties of dietary fiber powder obtained from yellow passion fruit (*Passiflora edulis* var. *flavicarpa*) co-products. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 756–763, 2013.

LORENZONI, G. et al. Inulin, hi-maize, and trehalose as thermal protectants for increasing viability of *Lactobacillus acidophilus* encapsulated by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, p. 128–133, 2018.

LUPIEN-MEILLEUR, J.; ROY, D.; LAGACÉ, L. Viability of probiotic bacteria in a maple sap beverage during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 160–167, 2016.

MARTÍN, M. J. et al. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects.

Innovative Food Science & Emerging Technologies, v. 27, p. 15–25, 2015.

MASCO, L. et al. Polyphasic taxonomic analysis of *Bifidobacterium animalis* and *Bifidobacterium lactis* reveals relatedness at the subspecies level: Reclassification of *Bifidobacterium animalis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *animalis* subsp. *nov* and *Bifidobacterium lactis* as *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* subsp. *nov*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, v. 54, n. 4, p. 1137–1143, 2004.

MATIAS, N. S. et al. *In vitro* gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83–93, 2016.

MATTARELLI, P. et al. **The Bifidobacteria and related organisms - Biology, Taxonomy, Applications**. London: Academic Press - Elsevier, 2018.

MELETTI, L. M. M. Avanços na cultura do maracujá no Brasil. **Revista Brasileira de Fruticultura**, v. Especial, p. 83–91, 2011.

MENG, X. C. et al. Rapid and direct quantitative detection of viable bifidobacteria in probiotic yogurt by combination of ethidium monoazide and real-time PCR using a molecular beacon approach. **Journal of Dairy Research**, v. 77, n. 4, p. 498–504, 2010.

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 405–419, 2015.

MERCADANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4102–4106, 1998.

MESTRY, A. P.; MUJUMDAR, A. S.; THORAT, B. N. Optimization of Spray Drying of an Innovative Functional Food: Fermented Mixed Juice of Carrot and Watermelon. **Drying Technology**, v. 29, n. 10, p.

1121–1131, 2011.

MEYER, D.; BLAAUWHOED, J.-P. Inulin. In: PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P. A. **Handbook of Hydrocolloids**, 2 ed., Cambridge: Woodhead Publishing Limited, 2009, p. 829–848.

MILLS, S. et al. Enhancing the stress responses of probiotics for a lifestyle from gut to product and back again. **Microbial Cell Factories**, v. 10, n.1, p. 1–15, 2011.

MISHRA, M. **Handbook of Encapsulation and Controlled Release**. Boca Raton, Florida: CRC Press, 2015.

MITSUOKA, T. Development of Functional Foods. **Bioscience of Microbiota, Food and Health**, v. 33, n. 3, p. 117–128, 2014.

NIKBAKHT, E. et al. Effect of probiotics and synbiotics on blood glucose: a systematic review and meta-analysis of controlled trials. **European Journal of Nutrition**, v. 57, n. 1, p. 95–106, 2018.

NOCKER, A.; CAMPER, A. K. Selective Removal of DNA from Dead Cells of Mixed Bacterial Communities by Use of Ethidium Monoazide. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, n. 3, p. 1997–2004, 2006.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.-Y.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs . dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. **Journal of Microbiological Methods**, v. 67, p. 310–320, 2006.

ODOOLI, S. et al. Comparison of tuf gene-based qPCR assay and selective plate count for *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* BB-12 quantification in commercial probiotic yoghurts. **International Food Research Journal**, v. 25, n. August, p. 1708–1719, 2018.

OKETIĆ, K. et al. Evaluation of propidium monoazide real-time PCR for enumeration of probiotic lactobacilli microencapsulated in calcium alginate beads. **Beneficial Microbes**, v. 6, n. 4, p. 573–581, 2015.

OLIVEIRA, E. M. S.; REGIS, S. A.; RESENDE, E. D. Caracterização dos resíduos da polpa do maracujá-amarelo. **Ciência Rural**, v. 41, n.4, p.725-730, 2011.

PADILHA, M.; VILLARREAL, M. L. M.; VIEIRA, A. D. S. A prebiotic mixture improved *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* gastrointestinal *in vitro* resistance in petisuisse. **Food & Function**, v. 7, p. 2312–2319, 2016.

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

PEREDO, A. G. et al. The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 191–196, 2016.

PEREIRA, A. L. F. et al. Spray-Drying of Probiotic Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n. 9, p.2492-2499, 2014.

PEREIRA, A. L. F.; MACIEL, T. C.; RODRIGUES, S. Probiotic beverage from cashew apple juice fermented with *Lactobacillus casei*. **Food Research International**, v. 44, n. 5, p. 1276–1283, 2011.

PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015.

PINTO, S. S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400–408, 2015.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848–861, 2011.

POUTSIAKA, D. D. et al. Selective method for identification and quantification of *Bifidobacterium animalis* subspecies *lactis* BB-12

(BB-12) from the gastrointestinal tract of healthy volunteers ingesting a combination probiotic of BB-12 and *Lactobacillus rhamnosus* GG.

Journal of Applied Microbiology, v. 122, n. 5, p. 1321–1332, 2017.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111–123, 2008.

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

PRINCIPI, N. et al. Gut dysbiosis and irritable bowel syndrome: The potential role of probiotics. **Journal of Infection**, v. 76, n. 2, p. 111–120, 2018.

QUIRÓS-SAUCEDA, A. E. et al. Edible coatings as encapsulating matrices for bioactive compounds: a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 51, n. 9, p. 1674–85, 2014.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015.

RATHORE, S. et al. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, n. 2, p. 369–381, maio 2013.

RÉ, M. I. Formulating drug delivery systems by spray drying. **Drying Technology**, v. 24, n. 4, p. 433–446, 2006.

RITCHIE, M. L.; ROMANUK, T. N. A meta-analysis of probiotic efficacy for gastrointestinal diseases. **PLoS ONE**, v. 7, n. 4, p. 1–11, 2012.

RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Passion Fruit. In: SIDDQ, M. (Ed.). **Tropical and Subtropical Fruits: Postharvest Physiology, Processing and Packaging**, 1 ed. Iowa: John Wiley & Sons Ltd., 2012, p. 325-329.

ROWE, R. C. R.; SHESKEY, P. J. S.; COOK, W. **Handbook of Pharmaceutical Excipients**, 6 Ed., London: Pharmaceutical Press, 2009

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1–16, 2013.

SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477–1482, 2006.

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 1–7, 2018.

SCHOTSMANS, W. C.; FISCHER, G.; YAHIA, E. M. Passion fruit (*Passiflora edulis* Sim.). In: YAHIA, E. M. (Ed.). . **Postharvest Biology and Technology of Tropical and Subtropical Fruits - Volume 4: Mangosteen to white sapote**. 1. ed. Cambridge: Woodhead Publishing, 2011. p. 125–142.

SELOMULYA, C.; FANG, Y. Food powder rehydration. In: BHANDARI, B. ET AL . (Ed.). . **Handbook of Food Powders: Processes and Properties**. Cambridge, UK: Woodhead Publishing, 2013. p. 379–402.

SEMYONOV, D. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, n. 1, p. 193–202, 2010.

SHEU, S. et al. Development and application of tuf gene-based PCR and PCR- DGGE methods for the detection of 16 *Bifidobacterium* species. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 21, n. 2, p. 177–183, 2013.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science &**

Technology, v. 65, p. 49–67, 2017.

SHOAIB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 444–454, 2016.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria : A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SOLANO-AGUILAR, G. et al. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* (Bb12) in the Intestine after Feeding of Sows and Their Piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6338–6347, 2008.

SOSNIK, A.; SEREMETA, K. P. Advantages and challenges of the spray-drying technology for the production of pure drug particles and drug-loaded polymeric carriers. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 223, p. 40–54, 2015.

SOUZA, A. L. R. DE et al. Microencapsulação de sucos e polpas de frutas por spray drying : uma revisão. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 17, n. 3, p. 327–338, 2015.

SUN, J.; BUYS, N. Effects of probiotics consumption on lowering lipids and CVD risk factors: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. **Annals of Medicine**, v. 47, n. 6, p. 430–440, 2015.

SUN, J.; BUYS, N. J. Glucose and glycaemic factor-lowering effects of probiotics on diabetes: A meta-analysis of randomised placebo-controlled trials. **British Journal of Nutrition**, v. 115, n. 7, p. 1167–1177, 2016.

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.

VESTERLUND, S.; SALMINEN, K.; SALMINEN, S. Water activity in dry foods containing live probiotic bacteria should be carefully considered: a case study with

Lactobacillus rhamnosus GG in flaxseed. **International Journal of Food Microbiology**, v. 157, n. 2, p. 319–21, 2012.

VIANNA-SILVA, T. et al. Qualidade do suco de maracujá-amarelo em diferentes épocas de colheita. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 28, n. 3, p. 545–550, 2008.

VILLARREAL, M. L. M. et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under *in vitro* gastrointestinal conditions by propidium monoazide - qPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

VINDEROLA, G. et al. Cell viability and functionality of probiotic bacteria in dairy products. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, p. 1–6, 2011.

VONDRAKOVA, L. et al. Impact of various killing methods on EMA/PMA-qPCR efficacy. **Food Control**, v. 85, p. 23–28, 2018.

VOS, P. DE et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food compounds. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.

WANDREY, C.; BARTKOWIAK, A.; HARDING, S. E. Materials for Encapsulation. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. (Eds.). . **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. New York: Springer Science+Business Media, 2010. p. 31–100.

WANG, Y.-J.; WANG, L. Structures and Properties of Commercial Maltodextrins from Corn, Potato, and Rice Starches. **Starch - Stärke**, v. 52, n. 8–9, p. 296–304, 2000.

WATSON, R. R.; PREEDY, V. R. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics: Bioactive Foods in Health Promotion**. London: Academic Press, Elsevier, 2016

WEBER, D. **Densidade de plantio e produção do maracujazeiro-amarelo no sul do Brasil**. Dissertação (Mestrado em Agronomia) –

Programa de Pós-Graduação em Agronomia da Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2013.

WILKINSON, M. G. Flow cytometry as a potential method of measuring bacterial viability in probiotic products: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 1–10, 2018.

YADAV, R.; SHUKLA, P. An Overview of Advanced Technologies for Selection of Probiotics and Their Expediency : A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 15, p. 3233–3242, 2017.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and immune health. **Current Opinion in Gastroenterology**, v. 27, n. October, p. 496–501, 2011.

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

YONEKURA, L. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. **Journal of functional foods**, v. 6, n. 100, p. 205–214, 2014.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 281–289, 2006.

ZHANG, Z.; LAW, D.; LIAN, G. Characterization Methods of Encapsulates. In: ZUIDAM, N. J.; NEDOVIC, V. A. (Eds.). **Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing**. New York: Springer Science+Business Media, 2010. p. 101–125.

ZHAO, X. et al. Current perspectives on viable but non-culturable state in foodborne pathogens. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 1-16, 2017.

ZHU, F. Encapsulation and delivery of food ingredients using starch

based systems. **Food Chemistry**, v. 229, p. 542–552, 2017.

ZIELIŃSKA, D. et al. Enumeration and Identification of Probiotic Bacteria in Food Matrices. **Advances in Biotechnology for Food Industry**, v. 14, p. 167–196, 2018.

CAPÍTULO 2 - Desenvolvimento de microcápsulas de suco de maracujá adicionado de *Bifidobacterium* BB-12: avaliação das propriedades físico-químicas e tecnológicas e viabilidade da cultura probiótica ao longo do armazenamento

Os resultados do presente capítulo foram publicados na forma de artigo em: DIAS, C. O.; ALMEIDA, J. S. O.; PINTO, S. S.; SANTANA, F. C. O.; VERRUCK, S.; MÜLLER, C. M. O.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: a functional non-dairy product for probiotic delivery. **Food Bioscience**, v. 24, p. 26-36, 2018. (ANEXO A)

RESUMO

O objetivo deste estudo foi produzir um suco de maracujá probiótico em pó, de modo a desenvolver uma nova bebida probiótica não láctea. Para este propósito, o suco de maracujá acrescido de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 foi microencapsulado pela técnica de *spray drying*, utilizando maltodextrina e/ou inulina como agentes encapsulantes. As microcápsulas obtidas foram caracterizadas em relação as suas propriedades morfológicas, físicas e termogravimétricas após o *spray drying*. A viabilidade da cultura probiótica, bem como o teor de umidade, atividade da água, solubilidade em água e cor foram avaliados ao longo de 30 dias de armazenamento a 25 e 4 °C. O armazenamento a 4 °C resultou em uma melhor manutenção da viabilidade probiótica ao longo do período de estocagem das amostras. Durante o armazenamento a 25 °C, a amostra produzida apenas com maltodextrina demonstrou perda de viabilidade da bifidobactéria, enquanto que a amostra produzida com inulina ofereceu melhor proteção à bactéria microencapsulada. Os diferentes agentes carreadores afetaram a morfologia e o tamanho de partícula das microcápsulas. Todos os sucos probióticos em pó apresentaram propriedades de fluxo semelhantes. Uma maior estabilidade física das microcápsulas foi alcançada pelo uso de inulina, em termos de higroscopicidade e grau de aglomeração das partículas. O uso de maltodextrina resultou em valores mais altos de umidade e atividade da água. Durante o armazenamento, um aumento no teor de umidade e atividade da água foi observado para todas as amostras. Todos os pós apresentaram altos índices de solubilidade em água. Um aumento na

luminosidade e uma redução simultânea nos valores de b^* durante todo o armazenamento foi observado para todas as formulações de suco em pó em ambas as temperaturas, porém, mais acentuadamente a 25 °C. Os resultados da análise termogravimétrica mostraram que ambos os agentes encapsulantes melhoraram a estabilidade do suco de maracujá.

Palavras-chave: Microencapsulação. *Passiflora edulis flavicarpa*. Maltodextrina. Inulina. Bifidobactéria. *Spray drying*.

Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: a functional non-dairy product for probiotic delivery

ABSTRACT

The aim of this study was to produce a powdered probiotic passion fruit juice, in order to develop a new non-dairy probiotic beverage. For this purpose, passion fruit juice added with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 was microencapsulated by spray drying using maltodextrin and/or inulin as encapsulating agents. The microcapsules obtained were characterized in relation to their morphological, physical and thermogravimetric properties after spray drying. The viability of probiotic microorganism, as well as the powders' moisture content, water activity, solubility and color were evaluated throughout 30 days of storage at 25 and 4 °C. The storage at 4 °C resulted in a better maintenance of probiotic viability throughout the storage period. During storage at 25 °C, the sample made only with maltodextrin showed loss of viability of the bifidobacteria while the sample made with inulin offered better protection to the encapsulated bacteria. The different carrier agents affected the morphology and the particle size of the microcapsules. All the probiotic juice powders had similar flow characteristics. Greater physical stability of the microcapsules was achieved by the use of inulin, in terms of hygroscopicity and degree of caking. The use of maltodextrin resulted in higher values for moisture content and water activity. Throughout storage, an increase in moisture content and water activity was noted for all the samples. All the powders showed high solubility indexes. An increase in luminosity and a concurrent reduction in b* values throughout storage was noted for all the juice powder formulations at both temperatures, but more markedly at 25 °C. The results of the thermal analysis showed that both encapsulating agents improved the stability of the passion fruit juice.

Keywords: Microencapsulation. *Passiflora edulis flavicarpa*. Maltodextrin. Inulin. Bifidobacteria. Spray drying.

1 INTRODUÇÃO

O crescente interesse dos consumidores em utilizar alimentos para melhorar a saúde e bem-estar tem motivado pesquisadores e a indústria alimentícia a desenvolver novos produtos funcionais, como os probióticos (MISHRA; MISHRA, 2013). Culturas probióticas como as bifidobactérias têm sido destacadas por sua capacidade de promover o equilíbrio da microbiota intestinal, embora vários outros benefícios tenham sido relatados na literatura, como efeitos anticarcinogênicos e antimutagênicos, redução dos níveis plasmáticos de colesterol, diminuição dos sintomas de intolerância à lactose e estímulo da resposta imune (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Tradicionalmente, probióticos são incorporados em produtos lácteos. No entanto, matrizes alimentares não lácteas têm sido estudadas como potenciais carreadores para estes microrganismos, devido ao crescente número de indivíduos afetados por intolerância à lactose, alergia às proteínas do leite, galactosemia e hipercolesterolemia (RIVERA-ESPINOZA; GALLARDO-NAVARRO, 2010). Neste contexto, os sucos de frutas podem representar um veículo ideal para culturas probióticas, uma vez que são produtos ricos em vitaminas, minerais e compostos antioxidantes, tendo assim um forte apelo saudável (PERES et al., 2012). Diversos estudos relataram a adição de probióticos a diferentes sucos de frutas para a produção de bebidas funcionais (FONTELES et al., 2012; COSTA et al., 2013; PIMENTEL; MADRONA; PRUDENCIO, 2014).

O maracujá-amarelo (*Passiflora edulis flavicarpa*), nativo da América tropical, é considerado uma boa fonte de vitaminas, principalmente A e C, além de minerais. Esta fruta desempenha um papel importante na economia brasileira, uma vez que o país emergiu como o maior produtor e consumidor de maracujá do mundo, respondendo por quase 60% da produção mundial (CORRÊA et al., 2016). Considerando estes fatores, o suco de maracujá pode ser uma matriz em potencial para a incorporação de probióticos.

No entanto, a adição de probióticos em sucos de frutas é mais complexa quando comparada à formulação de produtos lácteos probióticos. Os principais desafios enfrentados neste caso se devem a algumas características intrínsecas a estes produtos, como alta concentração de ácidos orgânicos e condições de baixo pH, associados a outros fatores, como tempo de estocagem e temperatura, condições consideradas desfavoráveis para a manutenção da viabilidade dos

probióticos (MARTINS et al., 2013). No entanto, para que seus efeitos benéficos à saúde sejam alcançados, os probióticos devem permanecer viáveis em quantidades adequadas em um produto alimentício durante sua fabricação e ao longo de sua vida útil (SAAD et al., 2013).

Além disso, os sucos de frutas são considerados produtos altamente perecíveis e contêm uma grande quantidade de água, aumentando seu custo de transporte. Nesse sentido, o desenvolvimento de sucos de frutas em pó adicionados de probióticos é uma alternativa interessante para a indústria de alimentos, resultando em produtos mais estáveis, ocupando menores volumes e, conseqüentemente, mais fáceis de transportar e armazenar (SHISHIR; CHEN, 2017).

A técnica de secagem por *spray drying* é a mais comumente utilizada na produção de sucos em pó. Além disso, também é largamente empregada para a microencapsulação de componentes bioativos, incluindo os microrganismos probióticos, conferindo proteção contra condições ambientais adversas, além de melhorar seu processamento bem como sua estabilidade durante o armazenamento (CELLI; GHANEM; BROOKS, 2015). Além de ser um processo de secagem rápida, essa técnica apresenta outras vantagens, tais como seu custo relativamente baixo, simplicidade de uso e capacidade de operação contínua. No entanto, as altas temperaturas empregadas nesse processo e o baixo teor de umidade nos produtos resultantes são condições que podem prejudicar a integridade celular, levando a uma diminuição na sobrevivência das células probióticas durante a secagem e subsequente estocagem (MARTÍN et al., 2015). Ademais, os elevados teores de açúcares de baixa massa molecular e ácidos orgânicos na composição do suco de maracujá afetam sua secagem, uma vez que causam problemas de aderência à câmara de secagem, resultando em baixo rendimento de processo e dificuldades de operação (CANO-CHAUCA et al., 2005). Nesse sentido, diferentes agentes carreadores, principalmente polissacarídeos, podem ser utilizados para a microencapsulação de sucos probióticos, a fim de superar essas limitações.

As maltodextrinas, que são carboidratos formados pela hidrólise parcial de amidos, têm sido amplamente utilizadas como agentes encapsulantes para a microencapsulação de culturas probióticas por *spray drying*, devido ao seu baixo custo e eficácia (ARSLAN et al., 2015; BARBOSA; BORGES; TEIXEIRA, 2015). Além disso, polissacarídeos com propriedades prebióticas, tais como a inulina, também têm sido aplicados como agentes encapsulantes de microrganismos probióticos,

visando aumentar sua taxa de sobrevivência durante o processo de secagem e ao longo de todo o período de armazenamento (FRITZEN-FREIRE et al., 2012; AVILA-REYES et al., 2014; PINTO et al., 2015).

No entanto, até o momento, estudos acerca da aplicação da técnica de microencapsulação por *spray drying* para a produção de sucos probióticos ainda são escassos e majoritariamente envolvem o uso de culturas probióticas pertencentes ao gênero *Lactobacillus*. Desse modo, o objetivo deste estudo foi desenvolver um novo produto probiótico não lácteo, composto de suco de maracujá incorporado com *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12, microencapsulado por *spray drying*. Os sucos de maracujá probióticos em pó produzidos com diferentes agentes encapsulantes foram caracterizados em relação às suas propriedades físicas e tecnológicas. Além disso, a viabilidade das bactérias microencapsuladas e a estabilidade das microcápsulas foram avaliadas após o processo de *spray drying* e durante 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Preparo do suco de maracujá

O suco de maracujá amarelo (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) foi obtido a partir da polpa integral da fruta congelada, sem adição de aditivos (DeMarchi, Jundiá, Brasil), adquirida no comércio local, em Florianópolis, Santa Catarina. A polpa foi descongelada e misturada com água destilada na proporção de 1:1 (m/m). O suco obtido foi filtrado duas vezes com auxílio de um filtro tipo dessorador, para reduzir a quantidade de sólidos suspensos e fragmentos de sementes, com o intuito de prevenir o entupimento do bico atomizador. O suco de maracujá foi analisado em relação a sua composição físico-química e apresentou as seguintes características: $5,00 \pm 0,02$ g 100 g⁻¹ sólidos solúveis, acidez titulável de $1,37 \pm 0,03$ g 100 g⁻¹ ácido cítrico e pH de $3,09 \pm 0,03$.

2.2 Preparo da suspensão de células probióticas

Cultura pura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Nu-trish® BB-12®, Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca) foi reidratada conforme o procedimento descrito por Fritzen-Freire et al. (2012) e armazenada como solução estoque em frascos estéreis a -20 ± 1 °C. O preparo da suspensão de células foi realizado conforme descrito por

Rodrigues et al. (2011) com algumas modificações. A solução estoque foi adicionada ao caldo MRS (Difco, Sparks, EUA) modificado com adição de 0,2 g 100 g⁻¹ de cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,3 g 100 g⁻¹ de propionato de sódio (Fluka, Neu-Ulm, Alemanha) e incubada em jarras de anaerobiose contendo AnaeroGen[®] (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) a 37 ± 1 °C por 48 horas. Após o período de incubação, as células foram coletadas por centrifugação (1.000 x g, 15 min, 25 °C; Nova Técnica, São Paulo, Brasil), o sobrenadante foi descartado e as células lavadas três vezes por centrifugação com solução salina estéril 0,85 g 100 mL⁻¹. Após as sucessivas lavagens, os precipitados de células foram ressuspensos em solução salina estéril. A contagem final de *Bifidobacterium* BB-12 na suspensão bacteriana foi de 9,31 ± 0,02 log UFC mL⁻¹ em solução salina, através de plaqueamento em meio ágar MRS-LP conforme descrito detalhadamente no item 2.4.

2.3 Microencapsulação por *spray drying*

2.3.1 Preparo das soluções de alimentação

Três soluções de alimentação foram preparadas combinando o suco de maracujá e maltodextrina DE 16,5-19,5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e /ou inulina (Orafti[®] HPX, Orafti, Tienen, Bélgica, com grau de polimerização (DP) ≥ 23) como agentes encapsulantes, conforme descrito a seguir: PFM, preparado com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI com 200 g L⁻¹ de inulina. Todas as soluções de alimentação foram homogeneizadas e tratadas termicamente a 80 °C por 1 minuto. Subsequentemente, as soluções foram resfriadas a 25 °C e inoculadas com 100 mL L⁻¹ da suspensão de células de *Bifidobacterium* BB-12.

2.3.2 *Spray drying*

O processo de microencapsulação foi realizado em *spray dryer* de escala laboratorial (Buchi B-290 Mini Spray Dryer, Flawil, Suíça), operado com temperatura de entrada de ar de 130 ± 3 °C e temperatura de saída de 45 ± 3 °C. As soluções de alimentação contendo *Bifidobacterium* BB-12 foram mantidas sob agitação magnética constante em temperatura ambiente e introduzidas na câmara de secagem utilizando uma bomba peristáltica com taxa de vazão de alimentação de 6 mL.min⁻¹

¹, taxa de fluxo de ar de secagem de 35 m³ h⁻¹ e pressão de atomização de 0,7 MPa. Os pós obtidos foram transferidos para frascos plásticos de polipropileno estéreis e armazenados sem controle de umidade relativa e na ausência de luz a 25 ± 1 °C em uma estufa B.O.D e sob refrigeração a 4 ± 1 °C.

A avaliação das microcápsulas em relação à morfologia, tamanho de partícula, densidades aparente e compactada, propriedades de fluxo, higroscopicidade, grau de aglomeração e análise termogravimétrica foi realizada após o processo de secagem, enquanto que as análises de umidade, atividade de água, solubilidade em água e cor, bem como a viabilidade de bifidobactérias, foram realizadas nos dias 1, 15 e 30 de armazenamento, a 4 e 25 °C.

2.4 Viabilidade das bifidobactérias microencapsuladas após o *spray drying* e durante o armazenamento

Com o objetivo de determinar as contagens de células viáveis, primeiramente as bifidobactérias foram liberadas das microcápsulas utilizando tampão fosfato (0,1 mol L⁻¹, pH 7,0), conforme o método proposto por Sheu, Marshall e Heymann (1993). As bifidobactérias foram enumeradas utilizando Ágar MRS modificado com a adição de 0,2 g 100 g⁻¹ de cloreto de lítio e 0,3 g 100 g⁻¹ de propionato de sódio, conforme descrito por Vinderola e Reinheimer (2000). As placas foram incubadas em jarras de anaerobiose contendo AnaeroGen[®] a 37 ± 1 °C por 72 horas. A sobrevivência de bifidobactérias após a microencapsulação por *spray drying* foi expressa pela redução logarítmica da contagem de células viáveis, conforme descrito na Equação 2.1.

$$\text{Redução logarítmica} = \text{Log } N_0 - \text{Log } N \quad (2.1)$$

Onde N₀ corresponde ao número de células viáveis (UFC g⁻¹, base seca) nas soluções de alimentação antes da secagem e N corresponde ao número de células viáveis (UFC g⁻¹, base seca) nas microcápsulas. A viabilidade das bifidobactérias foi expressa em log unidade formadora de colônia por grama (log UFC g⁻¹).

2.5 Eficiência de encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) corresponde à taxa de sobrevivência do microrganismo durante o processo de

microencapsulação e foi calculada utilizando a Equação 2.2, conforme proposto por Simpson et al. (2005).

$$EE \% = (N/N_0) \times 100 \quad (2.2)$$

Onde N é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹, base seca) liberadas das microcápsulas e N₀ é o número de células viáveis (log UFC g⁻¹, base seca) na solução de alimentação antes do processo de secagem por *spray drying*. A contagem de células viáveis foi realizada conforme descrito na Seção 2.4.

2.6 Caracterização dos sucos de maracujá probióticos em pó

2.6.1 Morfologia e tamanho de partícula

A morfologia e o tamanho de partícula foram avaliados utilizando microscópio eletrônico de varredura Jeol, modelo JSM 6390 LV (Jeol, Tóquio, Japão), a uma voltagem de aceleração de 10 kV. As amostras foram previamente fixadas em suportes e revestidas com ouro, em equipamento de pulverização catódica sob vácuo (Leica, EM SCD 500, Wetzlar, Alemanha). O diâmetro médio das partículas foi medido a partir das micrografias obtidas em sua ampliação original, utilizando o software Image J (versão 1.49; <http://rsb.info.nih.gov/ij/>) e 300 partículas de cada uma das diferentes formulações de suco em pó probiótico foram medidas.

2.6.2 Umidade e atividade de água

O teor de umidade foi determinado gravimetricamente através de secagem em estufa a vácuo a 70 °C, até peso constante (AOAC, 2005). A atividade de água das microcápsulas foi mensurada a 25 °C, utilizando um analisador de atividade de água AquaLab 4TE (Decagon Devices, Pulmann, WA, EUA).

2.6.3 Densidade aparente e compactada

A densidade aparente (ρ_{ap}) foi determinada conforme descrito por Şahin-Nadeem et al. (2013). Para tal, 2 g de pó foram transferidos para um cilindro graduado de 10 mL e o volume ocupado foi registrado. A densidade aparente foi calculada como a razão entre a massa de pó contida

no cilindro e o volume ocupado. Para determinar a densidade compactada (ρ_{cp}), o mesmo cilindro foi batido gentilmente 100 vezes sobre uma superfície emborrachada, a partir de uma altura de 10 cm e o volume da amostra após a compactação foi registrado (JINAPONG; SUPHANTHARIKA; JAMNONG, 2008). Os valores de densidade foram expressos em g mL^{-1} .

2.6.4 Propriedades de fluxo

A fluidez das amostras foi avaliada a partir do Índice de Carr (CI) e razão de Hausner (HR), de acordo com Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014). Tanto o CI como a HR foram calculados a partir das densidades aparente (ρ_{ap}) e compactada (ρ_{cp}) dos pós usando as Equações (2.3) e (2.4), respectivamente.

$$CI (\%) = \frac{\rho_{cp} - \rho_{ap}}{\rho_{cp}} \times 100 \quad (2.3)$$

$$HR = \frac{\rho_{cp}}{\rho_{ap}} \quad (2.4)$$

2.6.5 Higroscopicidade

Para a determinação da higroscopicidade, porções de 1 g de cada amostra de pó foram colocadas em um dessecador contendo solução saturada de cloreto de sódio (75,3% UR), mantido a 25 °C em estufa B.O.D. Após 7 dias (168 horas), atingido o equilíbrio (massa constante), as amostras foram pesadas e a higroscopicidade foi expressa como g de umidade adsorvida por 100 g de sólidos secos ($\text{g } 100 \text{ g}^{-1}$) (CAI; CORKE, 2000; FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

2.6.6 Grau de aglomeração (*caking*)

O grau de aglomeração (*caking*) dos sucos probióticos em pó foi determinado a partir do método descrito por Fontes et al. (2014) com algumas modificações. Após a determinação da higroscopicidade, a amostra úmida foi submetida a secagem em estufa a 70 °C, até peso constante. Após o resfriamento em um dessecador, a amostra seca foi pesada e transferida para uma peneira com abertura de 500 μm . A peneira foi então agitada manualmente por 5 minutos. A massa do pó retida na

peneira foi medida, e o grau de aglomeração foi calculado a partir da Equação 2.5.

$$\text{Grau de aglomeração (\%)} = 100 \times \frac{a}{b} \quad (2.5)$$

Onde a é a quantidade de pó (g) retido na peneira após o peneiramento e b corresponde à quantidade de pó inicialmente colocada na peneira (g).

2.6.7 Solubilidade em água

A solubilidade em água foi avaliada de acordo com o método proposto por Fernandes, Borges e Botrel (2014). Os pós foram pesados (1 g) e agitados em 25 mL de água destilada por 5 minutos, utilizando um agitador magnético. A solução foi centrifugada a 760 x g durante 10 min (Z-200, Hermle, Wehingen, Alemanha). Uma alíquota de 20 mL do sobrenadante foi transferida para uma placa de Petri previamente pesada, e submetida à secagem em estufa a 105 °C *overnight*. A solubilidade foi calculada como a porcentagem de sobrenadante seco em relação à quantidade de pó inicial.

2.6.8 Análise de cor

A cor das amostras foi determinada utilizando colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japão) ajustado para operar com iluminante D65 e ângulo de observação de 2°, previamente calibrado. A escala de cor CIELab foi empregada para medir os parâmetros L^* , a^* e b^* . A diferença total de cor (ΔE^*) entre os valores observados no início e ao final do período de armazenamento dos pós foi calculada de acordo com a Equação 2.6.

$$\Delta E^* = \sqrt{[(L^*_{t_1} - L^*_{t_{30}})^2 + (a^*_{t_1} - a^*_{t_{30}})^2 + (b^*_{t_1} - b^*_{t_{30}})^2]} \quad (2.6)$$

Na qual L^* , a^* e b^* são as coordenadas de cor no tempo inicial (t_1) e no trigésimo dia de armazenamento (t_{30}). Os valores ΔE^* foram classificados conforme descrito por Cserhalmi et al. (2006), levando-se em consideração a percepção do olho humano.

2.6.9 Análise termogravimétrica (TGA/DTG)

As análises termogravimétricas foram realizadas utilizando uma termobalança TGA-50 (Shimadzu, Kyoto, Japão). Aproximadamente 10 mg de amostras foram pesadas em painéis de alumínio e aquecidas de 25 a 500 °C, a uma taxa de aquecimento de 10 °C min⁻¹ sob atmosfera dinâmica de nitrogênio (70 mL min⁻¹). As curvas termogravimétricas (TGA) e suas respectivas derivadas (DTG) foram calculadas com o software TA-60 WS. Temperaturas de taxa máxima de degradação (T_{max}) foram coletadas dos máximos dos picos das curvas de DTG. As curvas de TGA/DTG foram construídas com as matérias primas desidratadas e as diferentes formulações de suco probiótico obtidas por *spray drying*, exceto para o suco de maracujá, que foi desidratado por liofilização devido ao seu alto teor de açúcares de baixa massa molecular e ácidos orgânicos.

2.7 Análise estatística

A análise dos dados foi realizada utilizando o software STATISTICA 7.0 (StatSoft Inc., Tulsa, USA). A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras, e diferenças entre as médias foram detectadas pelo teste de Tukey. Todas as análises foram realizadas em triplicata, exceto para morfologia, tamanho de partícula e análise termogravimétrica.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Eficiência de encapsulação e viabilidade das bifidobactérias microencapsuladas após o *spray drying* e durante o armazenamento.

A contagem de células viáveis nas soluções de alimentação e nas microcápsulas imediatamente após o processo de *spray drying* e as eficiências de encapsulação são mostradas na Tabela 2.1.

As eficiências de encapsulação foram significativamente afetadas pela composição das soluções de alimentação. A amostra PFM, produzida apenas com maltodextrina, apresentou a maior ($p < 0,05$) redução na viabilidade celular, correspondendo a cerca de 20% da população de células de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 inicialmente adicionada à

solução de alimentação, resultando na menor ($p < 0,05$) eficiência de encapsulação dentre as formulações. Em contraste, para as amostras PFMI e PFI, as reduções observadas nas contagens de células viáveis após o processo de *spray drying* foram menores, resultando em maiores eficiências de encapsulação, correspondentes a 84,40 e 86,67%, respectivamente. Estes resultados sugerem que a presença de inulina, um componente prebiótico, influenciou positivamente a sobrevivência das bifidobactérias durante o processo de microencapsulação, provavelmente devido à sua atuação como termoprotetor para as células submetidas ao processo de secagem, prevenindo a ruptura da membrana celular, estando de acordo com o que foi relatado anteriormente por Fritzen-Freire et al. (2012). De acordo com Lian, Hsiao e Chou (2002), os agentes encapsulantes possuem diferentes propriedades físico-químicas e tais diferenças podem influenciar o seu grau de proteção sobre as bactérias encapsuladas quando expostas ao estresse térmico durante a secagem por *spray drying*, e assim, resultar em diferentes níveis de sobrevivência das bifidobactérias.

Além disso, as altas eficiências de encapsulação, acima de 75%, observadas no presente estudo também podem ser atribuídas à baixa temperatura de saída (45 ± 3 ° C) que foi mantida durante a secagem, o que provavelmente minimizou a ocorrência de danos causados pelo calor às células das bifidobactérias. As eficiências de encapsulação obtidas neste estudo podem ser consideradas satisfatórias e foram similares as obtidas em outros estudos. Pereira et al. (2013) relataram que as taxas de sobrevivência de *L. casei* NRRL B-442 após o processo de secagem foram de 77 e 82%, quando 20% de maltodextrina e uma mistura de maltodextrina (10%) e goma arábica (10%) foram utilizados como agentes carreadores, respectivamente. Já Anekella e Orsat (2013) obtiveram 81,17% de sobrevivência para as condições otimizadas de microencapsulação de probióticos em suco de framboesa por *spray drying*.

Tabela 2.1: Contagem de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 antes e após o processo de microencapsulação do suco de maracujá usando inulina e maltodextrina como agentes carreadores e eficiências de encapsulação (EE).

	Número de células viáveis (UFC g ⁻¹)		Redução log (Log N ₀ -log N)	EE (%)
	Antes <i>spray-</i> <i>drying</i>	Após <i>spray-drying</i>		
	Log N ₀	Log N		
PFM	8,88 ± 0,01 ^b	7,03 ± 0,01 ^c	1,86 ± 0,01 ^a	79,11 ± 0,08 ^c
PFMI	8,88 ± 0,01 ^b	7,51 ± 0,01 ^b	1,39 ± 0,02 ^b	84,40 ± 0,24 ^b
PFI	9,04 ± 0,05 ^a	7,84 ± 0,08 ^a	1,21 ± 0,08 ^c	86,67 ± 0,86 ^a

Resultados estão expressos como média ± desvio padrão (n=3)

^{a-c} Letras diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as microcápsulas

PFM: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

Os resultados referentes à viabilidade celular de *Bifidobacterium* BB-12 nos sucos de maracujá microencapsulados durante o armazenamento a 4 e 25 °C estão apresentados na Tabela 2.2. Durante o período de armazenamento, os valores de contagem de bifidobactérias para todas as amostras armazenadas a 4 °C foram superiores a 6 log UFC g⁻¹, que é o valor limiar recomendado para que um alimento exerça seus benefícios probióticos no hospedeiro (MACIEL et al., 2014). Todas as microcápsulas armazenadas a 4 °C apresentaram um aumento ($p < 0,05$) na viabilidade durante os 30 dias de armazenamento, em comparação com as contagens iniciais. No entanto, este aumento não pode ser atribuído à multiplicação celular, e provavelmente ocorreu como consequência da recuperação de células lesadas sub-letalmente após o processo de *spray drying* (PICOT; LACROIX, 2004). Tripathi e Giri (2014) relataram que o emprego de altas temperaturas e a rápida desidratação durante o processo de secagem são as principais causas de estresse às células bacterianas e perda de viabilidade, tendo em vista a ocorrência de um aumento da permeabilidade celular, além de danos às membranas celulares e ao material genético. Esses resultados positivos para o armazenamento refrigerado das microcápsulas podem ser explicados pela

manutenção das bifidobactérias em estado de latência em baixas temperaturas, condição em que as taxas de reações químicas são menores e, portanto, permitem que as células se recuperem das condições de estresse (PEDROSO et al., 2012).

Tabela 2.2: Viabilidade de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 nas diferentes formulações de suco de maracujá microencapsulado, durante 30 dias de armazenamento a 4 e 25 °C.

Dias	Temp. (°C)	Número de células viáveis (log UFC g ⁻¹)		
		PFM	PFMI	PFI
0	4	7,03 ± 0,01 ^{Bc}	7,51 ± 0,01 ^{Cb}	7,84 ± 0,08 ^{Ba}
	25	7,03 ± 0,01 ^{Bc}	7,51 ± 0,01 ^{Cb}	7,84 ± 0,08 ^{Ba}
15	4	8,09 ± 0,01 ^{Ab}	8,04 ± 0,06 ^{Bb}	8,39 ± 0,01 ^{Aa}
	25	4,27 ± 0,13 ^{Cc}	5,33 ± 0,09 ^{Db}	7,62 ± 0,09 ^{Ba}
30	4	8,08 ± 0,01 ^{Ab}	8,37 ± 0,02 ^{Aa}	8,41 ± 0,04 ^{Aa}
	25	ND	ND	6,61 ± 0,01 ^{Ca}

ND = Não detectado (perda total da viabilidade).

Resultados expressos como média ± desvio padrão (n=3).

^{A-D} Letras maiúsculas diferentes sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os dias de armazenamento e temperaturas para uma mesma amostra estudada.

^{a-c} Letras minúsculas diferentes sobrescritas na mesma linha indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras para um mesmo período de armazenamento e temperatura.

PFM: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

Para as amostras mantidas a 25 °C, esse efeito de recuperação celular não foi observado, uma vez que estas apresentaram valores decrescentes ($p < 0,05$) para a viabilidade das bifidobactérias durante o período de armazenamento. As contagens de células viáveis nas microcápsulas PFM e PFMI apresentaram reduções de 2,76 e 2,18 log UFC g⁻¹, respectivamente, dentro do período de 15 dias de armazenamento, resultando em contagens de células viáveis abaixo do recomendado para produtos probióticos. No 30º dia de armazenamento, não foi possível enumerar células viáveis para estas amostras nesta temperatura. Resultados semelhantes foram relatados por Pereira et al.

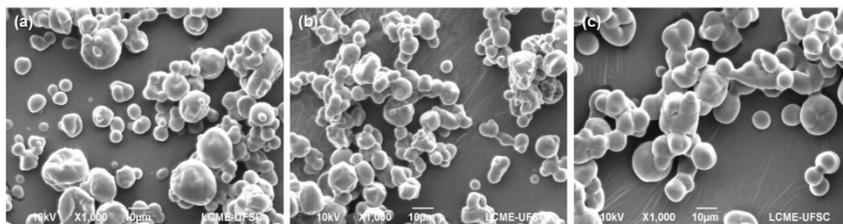
(2013), que avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus casei* NRRL B-422 em suco de caju desidratado por *spray drying* durante 35 dias de armazenamento a 4 e 25 °C. Estes autores observaram uma redução na contagem de células viáveis para as amostras armazenadas em 25 °C e após 21 dias essas amostras apresentaram perda total de viabilidade. De acordo com Meng et al. (2008), o comprometimento da viabilidade celular durante o armazenamento em temperaturas mais elevadas pode estar relacionado com a oxidação da membrana lipídica das células bacterianas, o que leva a alterações em sua composição e induz danos ao DNA, resultando em morte celular. Além disso, temperaturas de armazenamento mais altas também implicam em um aumento da atividade metabólica dos microrganismos, o que pode resultar no acúmulo de metabólitos tóxicos, que são prejudiciais à sua viabilidade (RANADHEERA et al., 2015). O efeito negativo da temperatura sobre a estabilidade de culturas probióticas microencapsuladas ao longo do armazenamento também foi observado por outros autores (SAARELA et al., 2006; SHAMEKHI et al., 2013; ANEKELLA; ORSAT, 2014; YONEKURA et al., 2014).

Em relação à amostra PFI, houve um comportamento distinto em relação às demais amostras armazenadas a 25 °C. Embora tenha sido observada uma redução ($p < 0,05$) de 1,23 log UFC g⁻¹ no período 30 dias de armazenamento, a contagem de células viáveis permaneceu acima de 6 log UFC g⁻¹, garantindo assim a propriedade probiótica desta amostra. Neste caso, o melhor desempenho da amostra PFI em relação à manutenção da viabilidade celular pode ser explicado pela maior proporção de inulina na composição das microcápsulas, o que pode proporcionar melhor proteção às bifidobactérias microencapsuladas durante o armazenamento a 25 °C. Além disso, a maior concentração de inulina usada nesta formulação de microcápsulas resultou em uma menor taxa de lesão celular após o processo de secagem, conforme discutido anteriormente, tornando as bifidobactérias menos sensíveis aos efeitos do armazenamento à temperatura ambiente. Este resultado está de acordo com os obtidos por Okuro et al. (2013), que observaram que a presença de inulina ou polidextrose aumentou a viabilidade celular de *Lactobacillus acidophilus* em microcápsulas lipídicas sólidas, em comparação com amostras sem adição de prebióticos, durante o armazenamento em diferentes temperaturas.

3.2 Caracterização dos sucos de maracujá probióticos em pó

A Figura 2.1 mostra as micrografias das diferentes formulações de microcápsulas de suco de maracujá probiótico. Foi possível observar que o uso de diferentes materiais de parede afetou diretamente a morfologia das partículas. Para a amostra PFM (Figura 2.1a), que foi produzida com maltodextrina, a maioria das partículas apresenta menor grau de aglomeração e formas esféricas irregulares com algumas concavidades e superfícies com aparência enrugada. Segundo Teixeira et al. (2004), as concavidades na superfície são formadas devido ao encolhimento das partículas durante os estágios iniciais do processo de secagem. Já a aparência enrugada da superfície está relacionada à formação lenta do filme que constitui as microcápsulas durante a secagem das gotículas atomizadas, associada ao uso de baixas temperaturas de secagem. Neste caso, a difusão da água é mais lenta, e a camada externa das microcápsulas permanece úmida e flexível por mais tempo, ocasionando em partículas murchas e/ou enrugadas quando resfriadas (NIJDAM; LANGRISH, 2006).

Figura 2.1: Micrografias das microcápsulas de suco de maracujá contendo *Bifidobacterium* BB-12 produzidas com: (a) maltodextrina (PFM), (b) maltodextrina e inulina (PFMI) e (c) inulina (PFI).



Em relação ao uso de inulina, ambas as amostras PFMI e PFI (Figuras 2.1b e 2.1c) apresentaram formas esféricas irregulares, bem como um grande número de partículas fundidas e aglomeradas. A ocorrência de aglomeração nestas amostras foi mais pronunciada e pode estar relacionada à viscosidade causada pela baixa temperatura de transição vítrea da inulina (RAJAM; ANANDHARAMAKRISHNAN, 2015). Para todas as amostras, as micrografias revelaram a ausência de fissuras visíveis ou danos na superfície da maioria das partículas,

indicando uma permeabilidade reduzida ao ar, o que poderia fornecer melhores condições para as bifidobactérias. Além disso, não foram observadas células livres na superfície ou no exterior das partículas, confirmando que a utilização da técnica de *spray drying* foi eficaz na formação das microcápsulas, para todos os agentes encapsulantes utilizados.

O tamanho das microcápsulas variou entre 10,65 e 16,52 μm (Tabela 2.3). Esses valores de tamanho de partícula estão dentro da faixa esperada para pós produzidos por *spray drying*, que, segundo Fang e Bhandari (2010), podem variar entre 10 a 100 μm . Observou-se que os tamanhos das partículas foram significativamente afetados ($p < 0,05$) pelos diferentes agentes encapsulantes utilizados. A produção de partículas com maior tamanho médio na presença de maior concentração de inulina pode estar relacionada à capacidade desse polissacarídeo em formar soluções com alta viscosidade (MENSINK et al., 2015a). Tonon et al. (2009) relataram que o tamanho médio das gotas atomizadas varia diretamente em relação à viscosidade do líquido. Assim, quanto maior a viscosidade da solução de alimentação, maiores são as gotículas formadas durante o processo de atomização e, conseqüentemente, maiores partículas de pó são obtidas. Bhandari et al. (2013) relataram que tanto a morfologia quanto o tamanho das partículas em um alimento em pó são características conhecidas por afetar muitas outras de suas propriedades, incluindo a densidade aparente, fluidez, compactação, reidratação e solubilidade.

A Tabela 2.3 apresenta as características de densidades aparente e compactada, os índices de Carr e Hausner, bem como as propriedades de higroscopicidade e grau de aglomeração dos sucos probióticos microencapsulados. Em relação à densidade aparente, não foram observadas diferenças significativas ($p > 0,05$) entre as amostras. No entanto, os valores para densidade compactada diferiram significativamente ($p < 0,05$) entre as amostras e variaram entre 0,53 e 0,57 g mL^{-1} . Isto pode ser explicado pela forma como essas duas medidas são obtidas, já que a medição da densidade aparente de um pó leva em consideração a contribuição do volume vazio entre as partículas, dependendo de sua disposição espacial no instrumento de medição, densidade de partículas e também a quantidade de ar retido entre as partículas (FITZPATRICK, 2013). Por outro lado, na densidade compactada, as partículas sofrem um rearranjo por ação mecânica, preenchendo os espaços vazios na massa do pó. Neste caso, a diferença de densidade entre as amostras pode estar relacionada à porosidade das

partículas e à forças de atração interparticulares (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). A densidade compactada é uma característica importante relacionada à embalagem, transporte e armazenamento de alimentos em pó. Um produto seco que possui alta densidade implica em menor volume de embalagem (QUISPE-CONDORI; SALDAÑA; TEMELLI, 2011).

Tabela 2.3: Caracterização das microcápsulas de sucos de maracujá probiótico preparadas com diferentes agentes encapsulantes, em relação ao tamanho de partícula, densidades, propriedades de fluxo, higroscopicidade e grau de aglomeração (*caking*)

	Microcápsulas		
	PFM	PFMI	PFI
Tamanho de partícula (µm)	10,65 ± 4,98 ^c	12,62 ± 4,37 ^b	16,52 ± 5,25 ^a
Densidade aparente (g mL⁻¹)	0,35 ± 0,01 ^a	0,36 ± 0,01 ^a	0,35 ± 0,01 ^a
Densidade compactada (g mL⁻¹)	0,53 ± 0,02 ^b	0,57 ± 0,01 ^a	0,56 ± 0,02 ^{ab}
Índice de Carr (%)	36,37 ± 0,68 ^a	37,11 ± 1,29 ^a	34,73 ± 1,84 ^a
Razão de Hausner	1,57 ± 0,02 ^a	1,55 ± 0,03 ^a	1,53 ± 0,04 ^a
Higroscopicidade (g 100 g⁻¹)	17,47 ± 0,24 ^a	14,46 ± 0,34 ^b	10,70 ± 0,11 ^c
Grau de aglomeração (%)	88,53 ± 0,31 ^a	44,37 ± 0,35 ^b	27,32 ± 0,62 ^c

Resultados expressos como média ± desvio padrão.

^{a-c} Em uma mesma linha, letras diferentes sobrescritas indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as microcápsulas.

PFM: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

As propriedades de fluxo dos pós foram avaliadas através do índice de Carr e da razão de Hausner. Todas as microcápsulas apresentaram características de fluxo semelhantes. Os valores para o índice de Carr variaram de 34,73 a 37,11%, e não foram observadas diferenças significativas entre as amostras ($p > 0,05$). De acordo com a classificação

de Carr, as amostras apresentaram fluidez muito ruim, o que pode acarretar em dificuldades no manuseio das amostras em pó. Do mesmo modo, os valores para a razão de Hausner também foram elevados, indicando que as microcápsulas obtidas neste estudo apresentaram maior compressibilidade e coesão e, portanto, menor capacidade de fluir livremente. De acordo com Bhusari, Muzaffar e Kumar (2014), a baixa fluidez para pós produzidos por *spray drying* se deve principalmente ao reduzido tamanho das partículas, resultando em maior área de contato entre as partículas, disponíveis para forças de coesão e atrito, que ocasionam maior resistência ao fluxo.

A higroscopicidade e o grau de aglomeração foram avaliados nas microcápsulas a fim de obter informações sobre sua estabilidade física, em caso de armazenamento em condições de alta umidade relativa (Tabela 2.3). O uso de diferentes agentes encapsulantes afetou significativamente ($p < 0,05$) a higroscopicidade das microcápsulas. As microcápsulas produzidas somente com maltodextrina (PFM) foram as mais higroscópicas. A ocorrência de adsorção de água por um carboidrato pode ser atribuída às ligações entre o hidrogênio das moléculas de água e os grupos hidroxila disponíveis nas regiões amorfas de suas estruturas. Sendo assim, a maior higroscopicidade atribuída à maltodextrina com DE 20 ocorreu devido à sua estrutura química, com grande número de ramificações com grupos hidrofílicos disponíveis, que podem facilmente se ligar às moléculas de água presentes no ar ambiente durante o manuseio das amostras em pó, bem como durante o armazenamento (GOULA; ADAMOPOULOS, 2008). Em contraste, as microcápsulas produzidas com inulina apresentaram os menores ($p < 0,05$) valores para este parâmetro. Comportamento semelhante foi observado por Fernandes, Borges e Botrel (2014), que relataram que a presença de inulina em microcápsulas de óleo essencial de alecrim causou uma diminuição na higroscopicidade das mesmas sob condição de alta umidade relativa. De acordo com Mensink et al. (2015b), a inulina com maior grau de polimerização apresenta menos grupos redutores em sua estrutura, maior temperatura de transição vítrea e, portanto, menor tendência a absorver a umidade ambiente. Além dos agentes encapsulantes, a presença de ácidos orgânicos amorfos e açúcares no suco de maracujá também confere às microcápsulas uma característica altamente higroscópica (BHANDARI; DATTA; HOWES, 1997). Valores semelhantes de higroscopicidade foram obtidos por Kalita et al. (2018) para microencapsulação de *Lactobacillus plantarum* em suco de lichia com maltodextrina, fruto-oligossacarídeo (FOS) e pectina.

Em relação ao grau de aglomeração, os resultados obtidos podem ser relacionados com a higroscopicidade, onde quanto maior for a higroscopicidade, maior o grau de aglomeração. Segundo Aguilera, Del Valle e Karel (1995), *caking* é um fenômeno no qual pós amorfos de fluxo livre se agregam para formar aglomerados maiores de partículas, através de um processo dependente do tempo, sendo transformados em um material indesejável e pegajoso, resultando em perda da estrutura física original e, conseqüentemente, em perda da funcionalidade e qualidade. A aglomeração de pós amorfos é fortemente dependente da umidade relativa (UR) do ar ambiente. Após a exposição à UR de 75% por um período de sete dias, as microcápsulas produzidas apenas com maltodextrina (PFM) apresentaram o maior grau de aglomeração, de 88%. Nesta amostra, a adsorção de água promoveu uma perda da estrutura inicial das microcápsulas, transformando-se em um aglomerado completamente pegajoso, devido ao efeito plastificante da água, como pode ser observado na Figura 2.2 (2).

Figura 2.2: Efeito da adsorção de umidade durante a determinação de higroscopicidade no aspecto físico das amostras em pó. (1) Amostras antes da determinação da higroscopicidade; (2) Amostras após 7 dias a 75,3% de umidade relativa (UR). PFM: microcápsulas elaboradas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas com 200 g L⁻¹ de inulina.



Fonte: Elaborado pelo autor, adaptado de Dias et al. (2018).

A adsorção contínua de água resulta na aglomeração, devido à formação de uma fase líquida entre as partículas de pó, fazendo com que estas adiram fortemente (BOTREL et al., 2014). Comportamento semelhante de aglomeração foi observado por Fontes et al. (2014), para o uso de maltodextrina com alto equivalente de dextrose (DE 20), o qual resultou em uma menor temperatura de transição vítrea para uma bebida probiótica desidratada a base de suco de melão. Considerando os resultados da higroscopicidade e grau de aglomeração, pode-se afirmar que o uso de inulina como agente encapsulante do suco de maracujá probiótico é desejável para melhor conservação e estabilidade física das microcápsulas.

Com o objetivo de avaliar o efeito do armazenamento sob diferentes condições de temperatura sobre a estabilidade das microcápsulas de suco de maracujá probiótico, algumas das propriedades foram determinadas ao longo do período de armazenamento das amostras, sendo estas: umidade, atividade de água e solubilidade (Tabela 2.4).

Tabela 2.4: Características das amostras de suco de maracujá probiótico microencapsulado, preparadas com diferentes agentes encapsulantes, durante o armazenamento a 4 e 25 °C.

Amostras	Dias	Temp. (°C)	Umidade (g 100 g ⁻¹)	Atividade de água	Solubilidade em água (%)
PFM	1	4	4,28 ± 0,04 ^{Ca}	0,2918 ± 0,002 ^{Ca}	75,79 ± 0,04 ^{Aa}
	15	4	4,37 ± 0,05 ^{BCa}	0,2934 ± 0,003 ^{Ba}	75,22 ± 0,05 ^{Aba}
	30	4	4,52 ± 0,02 ^{Aa}	0,2942 ± 0,002 ^{Aa}	74,64 ± 0,19 ^{Ba}
	1	25	4,29 ± 0,03 ^{BCa}	0,2919 ± 0,005 ^{Ca}	75,42 ± 0,01 ^{Aa}
	15	25	4,38 ± 0,02 ^{Ba}	0,2936 ± 0,003 ^{Aba}	73,61 ± 0,41 ^{Ca}
	30	25	4,55 ± 0,03 ^{Aa}	0,2940 ± 0,003 ^{Aa}	73,04 ± 0,02 ^{Ca}
PFMI	1	4	3,41 ± 0,02 ^{Cb}	0,2849 ± 0,003 ^{Cb}	75,35 ± 0,06 ^{Ab}
	15	4	3,49 ± 0,04 ^{Bb}	0,2862 ± 0,002 ^{Bb}	74,26 ± 0,18 ^{Bb}
	30	4	3,60 ± 0,09 ^{Ab}	0,2874 ± 0,004 ^{Ab}	73,75 ± 0,07 ^{Cb}
	1	25	3,42 ± 0,05 ^{Cb}	0,2845 ± 0,002 ^{Cb}	75,26 ± 0,03 ^{Ab}
	15	25	3,50 ± 0,05 ^{Bb}	0,2866 ± 0,002 ^{Bb}	73,57 ± 0,11 ^{Ca}
	30	25	3,62 ± 0,03 ^{Ab}	0,2879 ± 0,004 ^{Ab}	73,02 ± 0,08 ^{Da}
PFI	1	4	2,37 ± 0,03 ^{Cc}	0,2698 ± 0,003 ^{Cc}	63,07 ± 0,05 ^{Ac}
	15	4	2,52 ± 0,02 ^{Bc}	0,2741 ± 0,003 ^{Bc}	62,09 ± 0,07 ^{Bc}
	30	4	2,60 ± 0,05 ^{Ac}	0,2756 ± 0,003 ^{Ac}	61,32 ± 0,16 ^{Cc}
	1	25	2,39 ± 0,04 ^{Cc}	0,2696 ± 0,002 ^{Cc}	63,08 ± 0,04 ^{Ac}
	15	25	2,53 ± 0,03 ^{Bc}	0,2738 ± 0,002 ^{Bc}	60,59 ± 0,12 ^{Db}
	30	25	2,61 ± 0,04 ^{Ac}	0,2757 ± 0,005 ^{Ac}	60,21 ± 0,10 ^{Db}

^{A-D} Médias ± desvio padrão (n = 3) com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento e as temperaturas para cada amostra estudada. ^{a-c} Médias ± desvio padrão

(n = 3) com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras estudadas para o mesmo período de armazenamento e a mesma temperatura. PFM: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

Quanto ao teor de umidade, as microcápsulas PFM, produzidas apenas com maltodextrina, apresentaram os maiores valores, enquanto que aquelas produzidas com inulina (PFI) apresentaram os menores valores para este parâmetro. Este fato pode ser atribuído à estrutura química da maltodextrina com DE 20, que confere alta característica higroscópica a essa formulação, conforme descrito detalhadamente anteriormente. Esse mesmo comportamento foi observado por Tonon et al. (2009), que avaliaram o efeito de agentes carreadores, incluindo maltodextrinas, em suco de açaí desidratado por *spray drying*. O maior teor de umidade para a amostra PFM, com média de $4,28 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$ (Tabela 2.4), representa um aspecto negativo em relação à estabilidade desta formulação, que pode estar relacionada à menor viabilidade das bifidobactérias durante o armazenamento a $25 \text{ }^{\circ}\text{C}$, conforme apresentado anteriormente. Por outro lado, as demais amostras apresentaram teores de umidade inferiores a $4 \text{ g } 100 \text{ g}^{-1}$, que é o valor máximo recomendado para garantir a estabilidade prolongada durante o armazenamento de alimentos em pó, bem como a viabilidade dos microrganismos probióticos encapsulados (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2010). Durante o armazenamento, foi observado um ligeiro aumento ($p < 0,05$) nos teores de umidade das amostras, o qual não foi afetado pela temperatura. Este aumento pode ser atribuído ao fato de que amostras foram armazenadas em frascos que não possuem uma barreira completa à umidade e não foram acondicionadas sob condições controladas de baixa umidade relativa. Paralelamente, as amostras também apresentaram um ligeiro aumento ($p < 0,05$) na atividade de água durante o armazenamento, o que pode ser explicado por estes mesmos fatores.

As microcápsulas de suco de maracujá apresentaram valores de atividade de água dentro da faixa normalmente encontrada para produtos atomizados, estando também abaixo de 0,3, que é o limite recomendado para garantir a estabilidade química e microbiológica destes produtos. A atividade de água é considerada um fator crítico para a estabilidade de produtos probióticos microencapsulados, uma vez que as bactérias probióticas sobrevivem melhor em ambientes com baixa atividade de água, embora a presença de água residual seja essencial para manter a estabilidade estrutural das membranas celulares (PEIGHAMBARDUST; TAFTI; HESARI, 2011).

No que diz respeito à solubilidade, esta propriedade é considerada um fator decisivo para a qualidade dos produtos, especialmente aqueles a serem reconstituídos. Todas as amostras apresentaram valores de solubilidade em água satisfatórios, variando de 63,07% a 75,79%. O uso

de maltodextrina resultou em maiores índices de solubilidade ($p < 0,05$) para as amostras PFM e PFMI. Esse comportamento ocorre devido à alta solubilidade da maltodextrina, atribuída à cadeia pequena e ramificada desse polímero, que possui um grande número de grupos hidrofílicos. Além disso, a maior solubilidade também pode ser correlacionada com o menor tamanho de partícula obtido para essas amostras, uma vez que quanto menor o tamanho de partícula, maior a área superficial disponível para a hidratação (KUCK; NOREÑA, 2016). Por outro lado, a amostra PFI apresentou a menor solubilidade, intimamente relacionada com a estrutura química da inulina, que possui alto grau de polimerização ($DP > 23$) e uma cadeia linear. A menor solubilidade conferida pela inulina pode ser considerada como uma característica positiva, uma vez que promove um maior controle da liberação dos probióticos a partir das microcápsulas quando em contato com uma solução aquosa, prolongando sua proteção contra as condições externas do ambiente (PINTO et al., 2015).

Ao longo do armazenamento, houve uma pequena redução ($p < 0,05$) na solubilidade em água para todas as amostras analisadas. Esse comportamento pode ser explicado pelo aumento no teor de umidade das microcápsulas durante o armazenamento. Segundo Fazaeli et al. (2012), pós que possuem menor teor de umidade tendem a ter uma capacidade de reidratação mais rápida. Essa tendência ocorre porque quanto menor o teor de umidade, menor será a pegajosidade e a interação entre as partículas, e assim, maior será a área superficial em contato com a água de reidratação.

As características relativas a cor das microcápsulas durante o armazenamento são apresentadas na Tabela 2.5.

Tabela 2.5: Parâmetros de cor das microcápsulas de suco de maracujá probiótico preparadas com diferentes agentes encapsulantes, durante o armazenamento a 4 e 25 °C

Amostras	Dias	Temp. (°C)	L*	a*	b*	ΔE*
PFM	1	4	90,28 ± 0,13 ^{Da}	-1,89 ± 0,04 ^{Db}	31,73 ± 0,36 ^{Ab}	4,25
	15	4	91,71 ± 0,15 ^{Ba}	-2,07 ± 0,05 ^{Eb}	28,24 ± 0,11 ^{Cc}	-
	30	4	92,04 ± 0,37 ^{Ba}	-1,13 ± 0,07 ^{Bb}	27,64 ± 0,23 ^{Db}	-
	1	25	90,85 ± 0,29 ^{Ca}	-2,04 ± 0,03 ^{Eb}	28,89 ± 0,14 ^{Bc}	7,06
	15	25	91,91 ± 0,08 ^{Ba}	-1,73 ± 0,03 ^{Cb}	23,82 ± 0,09 ^{Ec}	-
	30	25	92,54 ± 0,27 ^{Aa}	-0,65 ± 0,03 ^{Ab}	21,97 ± 0,08 ^{Fc}	-
PFMI	1	4	89,51 ± 0,39 ^{Cb}	-1,88 ± 0,06 ^{Db}	29,72 ± 0,33 ^{Bc}	2,41
	15	4	90,09 ± 0,04 ^{BCc}	-2,05 ± 0,02 ^{Eb}	28,79 ± 0,14 ^{Cb}	-
	30	4	90,21 ± 0,27 ^{Bb}	-1,08 ± 0,09 ^{Bb}	27,83 ± 0,27 ^{Db}	-
	1	25	90,26 ± 0,43 ^{Ba}	-1,96 ± 0,06 ^{Db}	30,70 ± 0,24 ^{Ab}	7,75
	15	25	90,86 ± 0,12 ^{Ab}	-1,51 ± 0,08 ^{Ca}	24,77 ± 0,08 ^{Eb}	-
	30	25	91,07 ± 0,08 ^{Ab}	-0,67 ± 0,06 ^{Ab}	23,43 ± 0,34 ^{Fb}	-
PFI	1	4	89,16 ± 0,40 ^{Bb}	-1,54 ± 0,05 ^{CDa}	32,95 ± 0,11 ^{Aa}	1,32
	15	4	90,60 ± 0,13 ^{Ab}	-1,73 ± 0,03 ^{Ea}	32,15 ± 0,10 ^{Ba}	-
	30	4	90,08 ± 0,09 ^{Ab}	-0,91 ± 0,05 ^{Ba}	31,79 ± 0,18 ^{Ba}	-
	1	25	88,94 ± 0,70 ^{Bb}	-1,55 ± 0,05 ^{Da}	33,11 ± 0,25 ^{Aa}	7,41
	15	25	90,53 ± 0,12 ^{Ac}	-1,45 ± 0,03 ^{Ca}	28,16 ± 0,11 ^{Ca}	-
	30	25	90,56 ± 0,45 ^{Ab}	-0,47 ± 0,17 ^{Aa}	25,80 ± 0,40 ^{Da}	-

^{A-F} Médias ± desvio padrão (n = 3) com diferentes letras maiúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas (p < 0,05) entre os diferentes períodos de armazenamento e as temperaturas para cada amostra estudada. ^{a-c} Médias ± desvio padrão

(n = 3) com diferentes letras minúsculas sobrescritas na mesma coluna indicam diferenças significativas ($p < 0,05$) entre as amostras estudadas, para o mesmo período de armazenamento e a mesma temperatura. PFM: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; PFMI: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e PFI: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

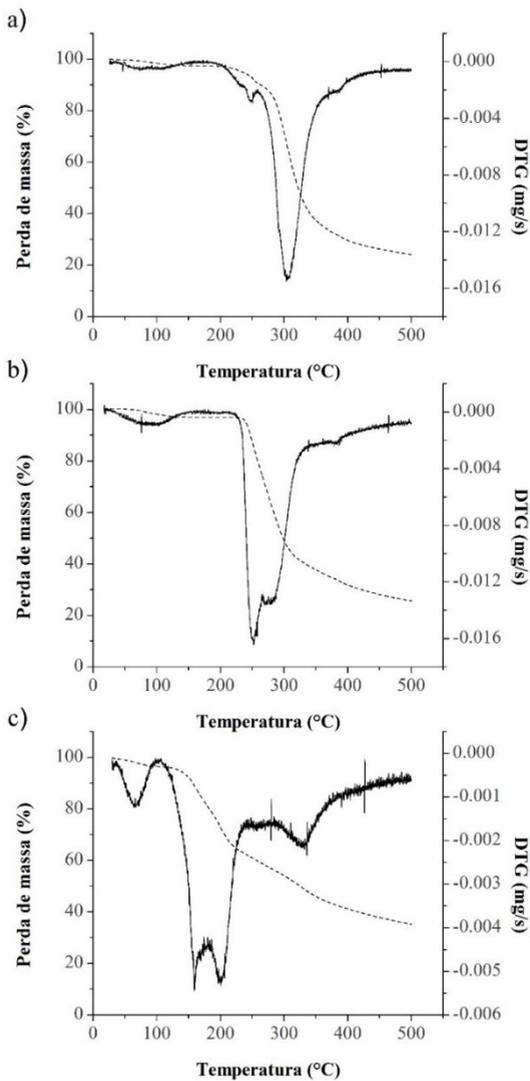
Devido ao uso dos agentes encapsulantes, que possuem coloração branca, todas as amostras apresentaram valores altos para o parâmetro L^* , o qual denota a luminosidade das amostras. Em relação aos parâmetros a^* e b^* , todas as amostras apresentaram valores negativos para o parâmetro a^* , indicando uma tendência para a cor verde; e valores altos e positivos para o parâmetro b^* , que denota uma tendência à coloração amarela. Tal comportamento era esperado, uma vez que a cor do suco de maracujá varia de amarelo ao alaranjado, e se deve aos pigmentos carotenoides, principalmente ζ -caroteno, β -caroteno, β -criptoxantina e prolicopeno (MERCADANTE; BRITTON; RODRÍGUEZ-AMAYA, 1998).

Os parâmetros de cor das microcápsulas foram significativamente afetados durante o armazenamento a diferentes temperaturas. Foi observado um aumento ($p < 0,05$) na luminosidade das amostras e, concomitantemente, uma redução ($p < 0,05$) do parâmetro b^* durante o armazenamento em ambas as temperaturas; no entanto, este efeito foi mais acentuado a 25 °C. Estas alterações indicam que houve perda da coloração amarelo-alaranjada das microcápsulas, as quais estão associadas à oxidação dos pigmentos carotenoides presentes no maracujá, acelerada pelo calor, umidade e exposição ao oxigênio. Resultados semelhantes foram observados por Endo et al. (2007) ao avaliar a vida útil do suco de maracujá-amarelo desidratado.

Através do cálculo da diferença total de cor (ΔE^*), é possível avaliar quais parâmetros têm maior influência e se as mudanças na cor das amostras ao final do período de armazenamento podem ser percebidas pelo olho humano. Sendo assim, os valores de ΔE^* mostraram que o parâmetro que mais afetou a diferença de cor nas microcápsulas de suco de maracujá probiótico foi o parâmetro b^* , uma vez que este se alterou significativamente durante o armazenamento, especialmente para as amostras armazenadas a 25 °C, resultando em valores de ΔE^* maiores. De acordo com a classificação proposta por Cserhalmi et al. (2006), é possível inferir que o armazenamento a 25 °C teve um impacto significativo na cor das amostras, resultando em uma diferença visível para o olho humano, já que os valores de ΔE^* variaram de 7,06 a 7,75. Por outro lado, menores valores de ΔE^* foram observados para as microcápsulas armazenadas a 4 °C, especialmente para a amostra PFI, cujo valor de ΔE^* foi igual a 1,32. Este valor denota diferenças que são ligeiramente perceptíveis ao olho humano, e assim indica que o uso de inulina como agente encapsulante proporcionou maior estabilidade aos pigmentos nesta formulação.

As diferenças na estabilidade térmica entre as amostras de microcápsulas de suco de maracujá probiótico e seus componentes foram examinadas por análise termogravimétrica. As curvas dos termogramas TGA e DTG para as matérias primas - maltodextrina (MD), inulina (IN), suco de maracujá (SM) - e para as diferentes formulações de microcápsulas (PFM, PFMI e PFI) são mostrados nas Figuras 2.3 e 2.4, respectivamente.

Figura 2.3: Curvas de TGA (.....) e DTG (—) obtidas para as matérias primas: (a) maltodextrina (MD), (b) inulina (IN) e (c) suco de maracujá (SM).



O primeiro evento térmico observado nas curvas TGA/DTG para todas as amostras ocorreu entre 25 °C e aproximadamente 150 °C, a uma taxa de perda de massa inferior a 5%, dependendo da amostra, correspondendo à perda de água que ocorre durante o processo de aquecimento. A diferença nas temperaturas de taxa máxima de degradação (T_{\max}) para este evento térmico pode estar relacionada com o modo de ligação da água entre os diferentes componentes das amostras, o que modifica as propriedades coligativas da água e, conseqüentemente, a energia necessária para mudança de estado (KLEIN et al., 2015). Acima dessa faixa de temperatura, o processo de decomposição térmica ocorreu em duas ou três etapas, de acordo com cada amostra.

A maltodextrina (Figura 2.3a) apresentou dois estágios de perda de massa: um pico em 244,3 °C, com uma taxa de perda de massa de cerca de 7%, relacionada com a decomposição de oligossacarídeos de baixa massa molecular; e um pico maior com T_{\max} de 307,9 °C, com uma taxa de perda de massa de aproximadamente 55%, relacionada à degradação térmica das cadeias moleculares longas deste biopolímero. Segundo Castro et al. (2016), as maltodextrinas possuem uma ampla distribuição de massa molecular, associada a uma mistura de oligossacarídeos que possuem diferentes massas moleculares.

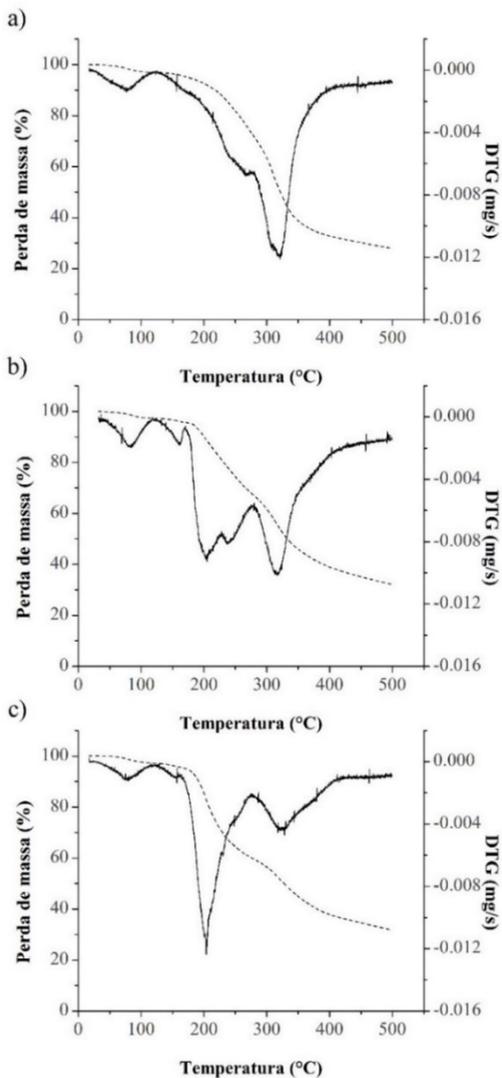
A Figura 2.3b mostra as curvas termogravimétricas obtidas para a inulina, que apresentou perdas de massa em dois estágios, caracterizadas por dois picos observados na curva de DTG, um com T_{\max} de 250,4 °C e o outro com T_{\max} de 280,7 °C, atribuído à decomposição de cadeias de inulina de baixa e alta massa molecular, respectivamente, como consequência da quebra das cadeias de frutose (DAN; GHOSH; MOULIK, 2009). Resultados semelhantes foram relatados por Silva e Meireles (2015), que avaliaram o efeito do grau de polimerização (DP) da inulina em suas propriedades como agente encapsulante para o óleo de semente de urucum.

O processo de degradação térmica do suco de maracujá ocorreu em três estágios de perda de massa (Figura 2.3c). O primeiro e o segundo pico na curva derivada ocorreram dentro de uma faixa de temperatura muito estreita, entre 162,3 e 200,0 °C, correspondendo a aproximadamente 40% de perda de massa. Estes eventos podem estar relacionados com a decomposição de componentes de baixa massa molecular presentes na amostra de suco de maracujá. Os ácidos orgânicos, presentes em grandes quantidades no suco de maracujá, principalmente o ácido cítrico, sofrem reações de desidratação e descarboxilação a

temperaturas entre 150 e 180 °C, conforme relatado em estudos anteriores (WYRZYKOWSKI et al., 2011). Além disso, os monossacarídeos e dissacarídeos são suscetíveis a processos de caramelização nesta mesma faixa de temperatura (SAAVEDRA-LEOS et al., 2012). O terceiro pico observado, em aproximadamente 320 °C, está provavelmente relacionado com a decomposição dos componentes de alta massa molecular presentes na amostra de suco, como as pectinas (ALMEIDA et al., 2015).

O comportamento térmico das diferentes formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado é apresentado na Figura 2.4.

Figura 2.4: Curvas de TGA (.....) e DTG (—) obtidas para as diferentes formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado: (a) PFM, (b) PFMI e (c) PFI.



Além dos primeiros estágios de perda de massa citados anteriormente, que estão associados aos processos de desidratação e volatilização, as microcápsulas apresentaram perdas de massa em mais dois ou quatro estágios.

De acordo com o termograma mostrado na Figura 2.4a, o processo de degradação da amostra PFM iniciou dentro de uma faixa de temperatura entre 150 e 200 °C, em dois estágios principais. O primeiro pico da curva de DTG, cujo T_{\max} foi de 256,8 °C, corresponde tanto à decomposição dos principais componentes contidos no suco de maracujá quanto à fração de oligossacarídeos de baixa massa molecular presentes na maltodextrina. No segundo estágio, observou-se que a temperatura de taxa máxima de degradação foi deslocada, quando comparada com o perfil de DTG da maltodextrina pura. Isso pode ser atribuído à reação de policondensação entre a maltodextrina e os ácidos policarboxílicos do suco de maracujá, que resultam em produtos mais estáveis termicamente do que a maltodextrina pura. Estudos recentes revelaram a propriedade do ácido cítrico como agente de reticulação (*cross-linking*), uma vez que este possui três grupos carboxila que podem reagir com grupamentos hidroxila ou outros grupos ativos presentes nas cadeias dos polissacarídeos (REDDY; YANG, 2010; CASTRO-CABADO; CASADO; SAN ROMÁN, 2016).

De forma semelhante, as amostras PFMI e PFI (Figuras 2.4b e 2.4c) apresentaram picos deslocados nas curvas de DTG, sendo estes deslocamentos atribuídos à formação de associações entre seus constituintes durante o processo de encapsulação, conforme descrito anteriormente, o que levou a alterações na cinética de degradação térmica destas amostras. Além disso, observou-se a presença de picos sobrepostos e pontos de inflexão nas curvas de DTG, e estes eventos térmicos estão associados aos processos de degradação dos constituintes do suco de maracujá, dos agentes encapsulantes correspondentes, bem como dos produtos complexos resultantes das interações entre eles.

Com base nestes resultados, pode-se afirmar que o processo de microencapsulação utilizando maltodextrina e/ou inulina conferiu maior estabilidade ao suco de maracujá. Além disso, observou-se uma estabilidade térmica relativa até aproximadamente 150 °C, para todas as formulações testadas, com perdas mínimas de massa, implicando assim que os materiais empregados na produção das microcápsulas não sofreram nenhuma degradação significativa durante o processo de secagem por *spray drying* realizado neste estudo, com temperatura de entrada de ar de 130 °C.

4 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou que a presença de inulina melhorou a sobrevivência das bifidobactérias durante o processo de microencapsulação do suco de maracujá. O principal efeito na perda de viabilidade microbiana durante o armazenamento das microcápsulas foi a temperatura de armazenamento utilizada. As microcápsulas armazenadas a 4 °C apresentaram uma recuperação das células de *Bifidobacterium* BB-12 que foram injuriadas durante o processo de secagem por *spray drying*, e as contagens de células viáveis mantiveram-se acima de 6 log UFC g⁻¹ durante todo o período de vida útil avaliado. Durante o armazenamento a 25 °C, as amostras produzidas com maltodextrina apresentaram perda de viabilidade das bifidobactérias, enquanto a amostra produzida apenas com inulina proporcionou melhor proteção às bactérias encapsuladas ao longo de 30 dias de armazenamento.

As características físicas das microcápsulas foram significativamente afetadas pelo uso dos diferentes agentes encapsulantes. A partir do monitoramento das propriedades das amostras de microcápsulas durante o período de armazenamento, observou-se que aquelas produzidas com inulina apresentaram características físicas e tecnológicas mais desejáveis, ou seja, menores valores de umidade, atividade de água e solubilidade.

Embora o armazenamento a 25 °C seja desejável para produtos probióticos em pó, a fim de reduzir os custos de armazenamento e transporte, os resultados obtidos neste estudo mostraram que o armazenamento sob refrigeração é necessário para garantir a estabilidade da cultura probiótica no suco de maracujá microencapsulado por *spray drying*, por mais tempo. Este estudo forneceu novas informações sobre a importância das formulações de agentes encapsulantes em combinação com as condições de temperatura de armazenamento, para alcançar a estabilidade de um suco de fruta probiótico em pó produzido por *spray drying*, a fim de contribuir com o desenvolvimento de novos produtos não lácteos probióticos.

REFERÊNCIAS

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS - AOAC.

Official Methods of analysis of the Association of Analytical

Chemists. 18 th ed. Gaithersburg, Maryland, EUA, 2005.

AGUILERA, J. M.; DEL VALLE, J. M.; KAREL, M. Caking phenomena in amorphous food powders. **Trends in Food Science and Technology**, v. 6, n. 5, p. 149–155, 1995.

ALMEIDA, E. A. M. S. et al. Synthesis and characterization of pectin derivative with antitumor property against Caco-2 colon cancer cells. **Carbohydrate Polymers**, v. 115, p. 139–145, 2015.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 17–24, 2013.

ANEKELLA, K. .; ORSAT, V. Shelf life stability of lactobacilli encapsulated in raspberry powder: Insights into non-dairy probiotics. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 65, n. 4, p. 411–418, 2014.

ARSLAN, S. et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 685–690, 2015.

AVILA-REYES, S. V et al. Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. **Carbohydrate Polymers**, v. 102, p. 423–30, 15 fev. 2014.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V. et al. **Food Powders - Physical Properties, Processing and Functionality**. 1. ed. New York: Kluwer Academic/ Plenum Publishers, 2005.

BARBOSA, J.; BORGES, S.; TEIXEIRA, P. Influence of sub-lethal stresses on the survival of lactic acid bacteria after spray-drying in orange juice. **Food Microbiology**, v. 52, p. 77–83, 2015.

BHANDARI, B. et al. **Handbook of Food Powder Processes and**

Properties. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013.

BHANDARI, B. R.; DATTA, N.; HOWES, T. Problems Associated With Spray Drying Of Sugar-Rich Foods. **Drying Technology**, v. 15, n. 2, p. 37–41, 1997.

BHUSARI, S. N. N.; MUZAFFAR, K.; KUMAR, P. Effect of carrier agents on physical and microstructural properties of spray dried tamarind pulp powder. **Powder Technology**, v. 266, p. 354–364, 2014.

BOTREL, D. A. et al. Influence of wall matrix systems on the properties of spray-dried microparticles containing fish oil. **Food Research International**, v. 62, p. 344–352, 2014.

CAI, Y. Z.; CORKE, H. Production and Properties of Spray-dried Amaranthus Betacyanin Pigments. **Journal of Food Science**, v. 65, n. 6, p. 1248–1252, 2000.

CANO-CHAUCA, M. et al. Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 6, n. 4, p. 420–428, 2005.

CASTRO-CABADO, M.; CASADO, A. L.; SAN ROMÁN, J. Bio-based thermosets: Effect of the structure of polycarboxylic acids on the thermal crosslinking of maltodextrins. **European Polymer Journal**, v. 78, p. 91–105, 2016.

CASTRO, N. et al. Influence of DE-value on the physicochemical properties of maltodextrin for melt extrusion processes. **Carbohydrate Polymers**, v. 144, p. 464–473, 2016.

CELLI, G. B.; GHANEM, A.; BROOKS, M. S. L. Bioactive Encapsulated Powders for Functional Foods - a Review of Methods and Current Limitations. **Food and Bioprocess Technology**, v. 8, n. 9, p. 1825–1837, 2015.

CORRÊA, R. C. G. et al. The past decade findings related with nutritional composition, bioactive molecules and biotechnological applications of *Passiflora* spp. (passion fruit). **Trends in Food Science**

& Technology, v. 58, p. 79–95, 2016.

COSTA, M. G. M. et al. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, p. 261–266, 15 ago. 2013.

CSERHALMI, Z. et al. Study of pulsed electric field treated citrus juices. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 7, p. 49–54, 2006.

DAN, A.; GHOSH, S.; MOULIK, S. P. Physicochemical studies on the biopolymer inulin: A critical evaluation of its self-aggregation, aggregate-morphology, interaction with water, and thermal stability. **Biopolymers**, v. 91, n. 9, p. 687–699, 2009.

ENDO, E. et al. Avaliação da vida de prateleira do suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) desidratado. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 2, p. 382–386, 2007.

FANG, Z.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols - A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FAZAELI, M. et al. Effect of spray drying conditions and feed composition on the physical properties of black mulberry juice powder. **Food and Bioproducts Processing**, v. 90, n. 4, p. 667–675, out. 2012.

FERNANDES, R. V. D. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 101, p. 524–32, 2014.

FITZPATRICK, J. J. Powder properties in food production systems. In: BHANDARI, B. et al. (Eds.). **Handbook of Food Powder Processes and Properties**. Cambridge: Woodhead Publishing, 2013. p. 285–308.

FONTELES, T. V. et al. Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. **Food Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2860–2869, 2012.

FONTES, C. P. M. L. et al. Dehydration of Prebiotic Fruit Drinks by Spray Drying: Operating Conditions and Powder Characterization. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, p. 2942–2950, 2014.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

GOULA, A. M.; ADAMOPOULOS, K. G. Effect of Maltodextrin Addition during Spray Drying of Tomato Pulp in Dehumidified Air: I. Drying Kinetics and Product Recovery. **Drying Technology**, v. 26, n. 6, p. 714–725, 2008.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, n. 3, p. 309–316, 2010.

JINAPONG, N.; SUPHANTHARIKA, M.; JAMNONG, P. Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, spray drying and fluidized bed agglomeration. **Journal of Food Engineering**, v. 84, n. 2, p. 194–205, 2008.

KALITA, D. et al. Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. **LWT - Food Science and Technology**, v. 87, p. 351–360, 2018.

KLEIN, T. et al. Microparticles containing Guaraná extract obtained by spray-drying technique: Development and characterization. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 25, n. 3, p. 292–300, 2015.

KUCK, L. S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of grape (*Vitis labrusca* var. Bordo) skin phenolic extract using gum Arabic, polydextrose, and partially hydrolyzed guar gum as encapsulating agents. **Food Chemistry**, v. 194, p. 569–576, 2016.

LIAN, W. C.; HSIAO, H.-C.; CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, n. 1–2, p. 79–86, 2002.

MACIEL, G. M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 1991–1998, 2014.

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

MARTINS, E. M. F. et al. Products of vegetable origin: A new alternative for the consumption of probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 51, n. 2, p. 764–770, 2013.

MENG, X. C. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, n. 4, p. 1406–1416, 2008.

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide I: Review of its physicochemical characteristics. **Carbohydrate Polymers**, v. 130, p. 405–419, 2015a.

MENSINK, M. A. et al. Inulin, a flexible oligosaccharide. II: Review of its pharmaceutical applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 134, p. 418–428, 2015b.

MERCANDANTE, A. Z.; BRITTON, G.; RODRÍGUEZ-AMAYA, D. B. Carotenoids from Yellow Passion Fruit (*Passiflora edulis*). **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 46, p. 4102–4106, 1998.

MISHRA, S.; MISHRA, H. N. Technological aspects of probiotic functional food development. **Nutrafoods**, v. 11, n. 4, p. 117–130, 2013.

NIJDAM, J. J.; LANGRISH, T. A. G. The effect of surface composition on the functional properties of milk powders. **Journal of Food Engineering**, v. 77, n. 4, p. 919–925, 2006.

OKURO, P. K. et al. Co-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, n. 1, p. 96–103, 2013.

PEDROSO, D. D. L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, n. 2, p. 127–132, 2012.

PEIGHAMBARDOUST, S. H.; TAFTI, A. G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 5, p. 215–224, 2011.

PEREIRA, A. L. F. et al. Spray-Drying of Probiotic Cashew Apple Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v.7, n. 9, p.2492-2499, 2014.

PERES, C. M. et al. Review on fermented plant materials as carriers and sources of potentially probiotic lactic acid bacteria - With an emphasis on table olives. **Trends in Food Science and Technology**, v. 26, n. 1, p. 31–42, 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, 2004.

PIMENTEL, T. C.; MADRONA, G. S.; PRUDENCIO, S. H. Probiotic clarified apple juice with oligofructose or sucralose as sugar substitutes: Sensory profile and acceptability. **LWT - Food Science and Technology**, 2014.

PINTO, S. S. et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400–408, 2015.

QUISPE-CONDORI, S.; SALDAÑA, M. D. A.; TEMELLI, F. Microencapsulation of flax oil with zein using spray and freeze drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 9, p. 1880–1887, 2011.

RAJAM, R.; ANANDHARAMAKRISHNAN, C. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**,

v. 60, n. 2, p. 773–780, 2015.

RANADHEERA, C. S. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 and *Propionibacterium jensenii* 702 by spray drying in goat's milk. **Small Ruminant Research**, v. 123, n. 1, p. 155–159, 2015.

REDDY, N.; YANG, Y. Citric acid cross-linking of starch films. **Food Chemistry**, v. 118, n. 3, p. 702–711, 2010.

RIVERA-ESPINOZA, Y.; GALLARDO-NAVARRO, Y. Non-dairy probiotic products. **Food Microbiology**, v. 27, n. 1, p. 1–11, 2010.

RODRIGUES, D. et al. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, n. 11, p. 869–876, 2011.

SAAD, N. et al. An overview of the last advances in probiotic and prebiotic field. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, p. 1–16, 2013.

SAARELA, M. et al. Stability and functionality of freeze-dried probiotic *Bifidobacterium* cells during storage in juice and milk. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 12, p. 1477–1482, 2006.

SAAVEDRA-LEOS, M. Z. et al. Towards an improved calorimetric methodology for glass transition temperature determination in amorphous sugars. **CyTA - Journal of Food**, v. 10, n. 4, p. 258–267, 2012.

ŞAHIN-NADEEM, H. et al. Influence of inlet air temperature and carrier material on the production of instant soluble sage (*Salvia fruticosa* Miller) by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 52, n. 1, p. 31–38, 2013.

SHAMEKHI, F. et al. Cell viability of microencapsulated *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* under freeze-drying, storage and gastrointestinal tract simulation conditions. **Folia Microbiologica**, v. 58, n. 2, p. 91–101, 2013.

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

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

SILVA, E. K.; MEIRELES, M. A. A. Influence of the degree of inulin polymerization on the ultrasound-assisted encapsulation of annatto seed oil. **Carbohydrate Polymers**, v. 133, p. 578–86, 2015.

SIMPSON, P. J. et al. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v. 99, p. 493–501, 2005.

TEIXEIRA, M. I. et al. Characterization of short chain fatty acid microcapsules produced by spray drying. **Materials Science and Engineering C**, v. 24, n. 5, p. 653–658, 2004.

TONON, R. V. et al. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 44, n. 10, p. 1950–1958, 2009.

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

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v. 10, p. 271–275, 2000.

WYRZYKOWSKI, D. et al. Thermal behaviour of citric acid and isomeric aconitic acids. **Journal of Thermal Analysis and Calorimetry**, v. 104, n. 2, p. 731–735, 2011.

YONEKURA, L. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after *in vitro* digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, n. 100, p. 205–214, 2014.

CAPÍTULO 3 - Aplicação da técnica de monoazida de propídio acoplado a PCR quantitativa (PMA-qPCR) para avaliar a viabilidade celular de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* em uma bebida probiótica não láctea.

RESUMO

A viabilidade celular de culturas probióticas presentes em alimentos é tradicionalmente avaliada utilizando métodos convencionais baseados na microbiologia clássica, através de plaqueamento em meios de cultura. No entanto, nos últimos anos, técnicas moleculares independentes de cultivo têm sido propostas para essa finalidade. A técnica de PCR quantitativa (qPCR) associada ao tratamento com monoazida de propídio (PMA-qPCR) têm sido utilizada para enumeração de células viáveis de microrganismos em matrizes alimentares diversas, sobretudo em produtos lácteos probióticos. Neste estudo, um ensaio de PMA-qPCR foi desenvolvido para quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em amostras de microcápsulas de suco de maracujá, uma matriz não láctea. A viabilidade do microrganismo probiótico foi monitorada em três diferentes formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado por *spray drying*, durante 30 dias de armazenamento a 4 °C. As células viáveis foram quantificadas usando os ensaios qPCR e PMA-qPCR tendo como alvo o gene *tuf*, e também através do método tradicional de contagem em placas com meio seletivo MRS-LP. Foram preparadas curvas padrão para a quantificação por qPCR, considerando o efeito da composição da matriz das diferentes formulações de microcápsulas. As curvas padrão apresentaram valores de eficiência média aceitáveis ($R^2 > 0,99$), de 85% para *B. lactis* BB-12 extraído a partir de meio de cultura, e de 82, 88 e 93% para o DNA extraído a partir das diferentes formulações de microcápsulas de suco de maracujá um dia após a microencapsulação. O limite de detecção para ambas as amostras foi de 10^3 cópias de DNA, correspondente a 2,13 pg de DNA. Foram observados maiores valores para a enumeração de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 por qPCR, quando comparado àqueles obtidos por PMA-qPCR e contagem em placas, para todas as formulações de microcápsulas, e as contagens permaneceram praticamente inalteradas durante o período de armazenamento avaliado. Os valores obtidos pela quantificação por PMA-qPCR foram semelhantes aos valores de UFC g⁻¹

¹ obtidos por contagem em placas, para todas as amostras avaliadas, e mantiveram-se estáveis e acima de 8 log UFC g⁻¹ durante o período de 30 dias de armazenamento avaliado. Estes resultados demonstraram que a técnica de PMA-qPCR é uma abordagem promissora para quantificação de células viáveis de *B. lactis* BB-12 em matrizes complexas como os sucos de maracujá em pó, em comparação com a quantificação por plaqueamento em meio de cultivo, além de superar a limitação do método de qPCR, que não permite a diferenciação de células viáveis e não viáveis. O ensaio PMA-qPCR permitiu a obtenção de resultados confiáveis com maior rapidez em relação ao método tradicional de contagem em placas.

Palavras-chave: Bebida funcional não láctea. Bifidobactéria. Microencapsulação. qPCR. monoazida de propídio. PMA-qPCR.

Application of propidium monoazide coupled with quantitative PCR to evaluate the cell viability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in a non-dairy probiotic beverage

Carolinne Odebrecht Dias, Mirella Christine Scariot, Renata Dias de Mello Castanho Amboni, Ana Carolina Maisonnave Arisi

ABSTRACT

The cell viability of probiotic cultures in foods is traditionally assessed by conventional methods based on classical microbiology, through plating in culture media. However, in recent years, several culture-independent molecular techniques have been proposed for this purpose. The quantitative PCR (qPCR) associated with propidium monoazide treatment (PMA-qPCR) has been used to enumerate viable cells of microorganisms in diverse food matrices, mainly in probiotic dairy products. In this study, a PMA-qPCR assay was developed for quantification of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 viable cells in passion fruit juice microcapsules samples, a non-dairy matrix. The viability of the probiotic microorganism was monitored in three different formulations of probiotic passion fruit juice microencapsulated by spray drying, for 30 days of storage at 4 °C. Viable cells were quantified using the qPCR and PMA-qPCR assays targeting the *tuf* gene, and by the traditional plate counting method with MRS-LP selective medium. Standard curves were prepared for quantification by qPCR, considering the matrix composition effect of the different microcapsules formulations. The standard curves showed acceptable average efficiency values ($R^2 > 0.99$), of 85% for *B. lactis* BB-12 extracted from culture medium, and 82, 88 and 93% for the DNA extracted from the different formulations of passion fruit juice microcapsules, one day after microencapsulation. The limit of detection for both samples was 10^3 genome copies, corresponding to 2.13 pg of DNA. Higher values were observed for the enumeration of *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 by qPCR, when compared to those obtained by PMA-qPCR and plate count, for all microcapsule formulations, and the counts remained almost unchanged during the storage period evaluated. The values obtained by the quantification by PMA-qPCR were similar to the CFU g⁻¹ values obtained by plate counting, for all the samples, and remained stable and above 8 log CFU

g⁻¹ during the storage period. These results demonstrated that the PMA-qPCR technique is a promising approach for the quantification of viable *B. lactis* BB-12 cells in complex matrices such as passion fruit juices microcapsules, when compared to plate counting methods. In addition, it overcame the limitation of the qPCR method, which does not allow the differentiation of viable and non-viable cells. The PMA-qPCR assay allowed the achievement of reliable results more quickly than with the traditional plate counting method.

Keywords: Non-dairy functional beverage. Bifidobacteria. Microencapsulation. qPCR. Propidium monoazide. PMA-qPCR.

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são conhecidos por proporcionarem uma série de potenciais benefícios à saúde humana, uma vez que auxiliam na manutenção do equilíbrio e composição da microbiota do trato intestinal, aumentando a resistência do organismo contra a invasão e colonização por patógenos (HILL et al., 2014). O gênero *Bifidobacterium* é considerado um dos mais importantes grupos de bactérias probióticas, as quais têm sido amplamente utilizadas como ingrediente ativo na produção de alimentos lácteos funcionais (PRASANNA; GRANDISON; CHARALAMPOPOULOS, 2014).

Produtos lácteos fermentados compreendem ainda a categoria com maior representatividade quanto à disponibilidade de produtos probióticos no mercado (GRANATO et al., 2019). No entanto, há um interesse crescente no desenvolvimento de produtos probióticos não lácteos, como uma alternativa para consumidores que apresentam restrições quanto ao consumo de derivados lácteos (VINDEROLA; BURNS; REINHEIMER, 2017).

Nesse sentido, buscando a diversificação deste segmento do mercado de alimentos funcionais, sucos de frutas têm sido estudados como matrizes para incorporação de microrganismos probióticos (FONTELES et al., 2012; CHAIKHAM, 2015; PIMENTEL et al., 2015). Recentemente, o suco de maracujá amarelo foi investigado em estudos para desenvolvimento de bebidas funcionais probióticas, apresentando resultados promissores, sendo considerado portanto uma matriz adequada (FARIAS; SOARES; GOUVEIA, 2016; SANTOS; ANDRADE; GOUVEIA, 2017; DIAS et al., 2018).

Para que os efeitos benéficos sejam alcançados, recomenda-se que produtos adicionados de probióticos contenham uma concentração mínima de 6 log UFC por grama de produto até o final de sua vida útil (TRIPATHI; GIRI, 2014). Este requisito representa um dos principais desafios tecnológicos relativos à incorporação de probióticos em sucos de frutas, visto que estes produtos apresentam algumas características consideradas desfavoráveis à manutenção da viabilidade celular, como a alta concentração de ácidos orgânicos e baixo pH, que podem ocasionar em perdas significativas de viabilidade (SHORI, 2016).

Assim, métodos de microencapsulação têm sido propostos, visando proteger os microrganismos probióticos contra condições adversas, melhorando sua sobrevivência. A aplicação da técnica de *spray*

drying para a microencapsulação de sucos de frutas probióticos é uma alternativa promissora, que permite a conversão destes em produtos em pó, resultando em produtos mais estáveis e menores em volume (SHISHIR; CHEN, 2017).

O efeito protetor conferido aos probióticos através da microencapsulação depende das características físicas da matriz que constitui as microcápsulas, e dessa forma, o uso de diferentes agentes encapsulantes pode resultar em níveis distintos de sobrevivência dos probióticos (ANEKELLA; ORSAT, 2013).

O principal desafio inerente ao processo de microencapsulação por *spray drying* está relacionado à exposição das células bacterianas às altas temperaturas necessárias para a secagem, além da rápida desidratação, que são condições de estresse que podem levar a uma diminuição na sobrevivência dessas culturas durante a secagem e posterior armazenamento (HUANG et al., 2017). Sendo assim, uma vez que a manutenção da viabilidade dos microrganismos probióticos em um produto é de suma importância para garantir sua funcionalidade, o monitoramento desta ao longo da vida útil do produto torna-se essencial (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013).

Métodos clássicos de análise microbiológica, baseados em plaqueamento em meios de cultivo, são comumente utilizados para monitoramento da viabilidade celular de microrganismos probióticos (DESFOSSÉS-FOUCAULT et al., 2012). No entanto, as técnicas dependentes de cultivo apresentam certas limitações, relacionadas ao tempo necessário para obtenção de resultados, além da possibilidade de subestimar as contagens de células viáveis presentes em uma amostra, devido a agregados celulares ou à possível existência de células em estado de dormência, as quais estão viáveis, porém são incapazes de crescer em meios de cultivo (estado VNC – viável não cultivável) (DAVIS, 2014). Condições de estresse são capazes de promover modificações e/ou lesões nas membranas celulares, que podem alterar o estado fisiológico e a atividade metabólica das células, limitando a capacidade dos microrganismos de formar colônias (PADILHA; VILLARREAL; VIEIRA, 2016).

Como uma alternativa aos métodos baseados na microbiologia clássica, métodos moleculares independentes de cultivo têm sido propostos. A técnica de PCR quantitativa (qPCR) têm sido amplamente utilizada para quantificação rápida e específica de diferentes microrganismos em matrizes alimentares diversas (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013; ILHA et al., 2016; LAWLEY et al., 2018).

O principal inconveniente associado a esta técnica é a possibilidade de superestimar a enumeração de células viáveis, dada a incapacidade de diferenciação entre células viáveis e não viáveis, ou que estejam em estado VNC, visto que o DNA pode persistir no ambiente mesmo após a morte celular, podendo ser amplificado (FITIPALDI; NOCKER; CODONY, 2012).

Nesse sentido, ensaios de qPCR associados ao tratamento com corantes intercalantes de DNA, como o monoazida de propídio (PMA), têm sido desenvolvidos como uma ferramenta rápida para detecção e quantificação de células viáveis de microrganismos em diferentes matrizes alimentares (LIANG et al., 2011; MAMLOUK et al., 2012; CRESPO-SEMPERE et al., 2013; RIZZOTTI et al., 2015; SHAO et al., 2016).

A técnica de monoazida de propídio acoplado a PCR quantitativa (PMA-qPCR) permite a detecção quantitativa de células viáveis de microrganismos, com base na integridade da membrana celular, visto que o PMA penetra somente em células cujas membranas estão danificadas, e se intercala com o DNA. Após exposição à luz, o PMA sofre fotólise e se torna um radical altamente reativo, que se liga covalentemente ao DNA, promovendo uma modificação irreversível que inibe sua amplificação por PCR. Dessa forma, através deste método, o DNA das células cujas membranas estão intactas é detectado seletivamente (NOCKER; CHEUNG; CAMPER, 2006; ELIZAQUÍVEL; AZNAR; SÁNCHEZ, 2013).

Ensaio de PMA-qPCR têm sido empregados com sucesso para a quantificação de microrganismos probióticos em produtos lácteos (GARCÍA-CAYUELA et al., 2009; VILLARREAL et al., 2013; SANTOS et al., 2018; SCARIOT et al., 2018). Recentemente, Lupien-Meilleur, Roy e Lagacé (2016) avaliaram a viabilidade de cepas probióticas (*Lactobacillus rhamnosus* R0011, *Lactobacillus helveticus* R0052 e *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12) em bebidas à base de bordo (*maple*) durante o armazenamento refrigerado, utilizando a técnica PMA-qPCR. No entanto, a aplicação da técnica de qPCR acoplada ao tratamento com PMA para a quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 em uma matriz não láctea microencapsulada por *spray drying* não foi descrito até o presente momento.

O presente estudo teve como objetivo desenvolver um ensaio PMA-qPCR para quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em suco de maracujá microencapsulado por

spray drying durante 30 dias de armazenamento das microcápsulas a 4 °C. A enumeração da viabilidade da cultura probiótica foi realizada através da comparação entre três diferentes técnicas, incluindo plaqueamento em meio seletivo, ensaio de qPCR baseado no gene *tuf*, combinado ou não com o tratamento com monoazida de propídio.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Cepas bacterianas e condições de cultivo

A cultura liofilizada de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* (Nu-trish® BB-12®, Chr. Hansen, Honsholm, Dinamarca) foi reidratada conforme descrito por Fritzen-Freire et al. (2012) e armazenada na forma de solução estoque a -20 °C em frascos estéreis. A cepa bacteriana utilizada como controle negativo (*Lactobacillus paracasei* ATCC 10746) foi adquirida da coleção da Fundação André Tosello (Campinas, São Paulo, Brasil) e cultivada em caldo MRS (de Man, Rogosa e Sharpe) (Difco, Sparks, EUA) a 30 °C até DO₆₀₀ 1,0, conforme descrito por Scariot et al. (2018). A densidade óptica (DO) da cultura de células foi medida a 600 nm utilizando espectrofotômetro modelo U-2910 (Hitachi, Tóquio, Japão).

2.2 Microencapsulação por *spray drying*

2.2.1 Preparo da suspensão bacteriana

O preparo da suspensão bacteriana de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 foi realizado antes do processo de microencapsulação, conforme descrito por Dias et al. (2018). A solução estoque de *B. lactis* BB-12 foi primeiramente inoculada em caldo MRS (Difco, Sparks, EUA) modificado com adição de 0,2 g 100 g⁻¹ de cloreto de lítio (Vetec, Rio de Janeiro, Brasil) e 0,3 g 100 g⁻¹ de propionato de sódio (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA), e incubado sob condições anaeróbias (AnaeroGen®, Oxoid, Hampshire, UK) a 37 °C durante 48 horas. As células foram coletadas por centrifugação (1000 x g, 15 min, 4 °C) e lavadas três vezes com solução salina estéril a 0,9 g 100 g⁻¹. Após as sucessivas lavagens, o *pellet* de células foi ressuspenso em solução salina estéril, com concentração final de 9,61 ± 0,07 log UFC mL⁻¹.

2.2.2 Preparo das soluções de alimentação

A polpa integral de maracujá, sem adição de açúcares e conservantes (DeMarchi, Jundiaí, Brasil) foi descongelada e misturada com água destilada (1:1 m/m), sendo a mistura filtrada duas vezes para reduzir o teor de sólidos em suspensão e frações de sementes. O filtrado resultante foi denominado suco de maracujá.

As soluções de alimentação foram preparadas pela adição dos agentes encapsulantes ao suco de maracujá, conforme descrito por Dias et al. (2018). Os agentes encapsulantes utilizados foram maltodextrina DE 16,5 – 19,5 (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) e inulina (Orafti HPX, Orafti, Tienen, Bélgica - grau de polimerização ≥ 23), sendo estes utilizados em diferentes proporções para compor as formulações das microcápsulas, conforme descrito na Tabela 3.1. Todas as soluções de alimentação foram homogeneizadas até completa dissolução dos agentes encapsulantes, submetidas a tratamento térmico a 80 °C por 1 minuto e resfriadas até 25 °C. Antes do processo de secagem por *spray drying*, as soluções de alimentação foram divididas em duas partes: inoculadas - com adição da suspensão bacteriana probiótica - e controles, sem adição de suspensão bacteriana.

Tabela 3.1: Composição das soluções de alimentação para cada formulação utilizada no processo de *spray drying*.

Formulação	Suco de maracujá (mL)	Agentes encapsulantes		Suspensão de <i>Bifodobacterium</i> BB-12 (mL)
		Maltodextrina (g)	Inulina (g)	
M1	1000	200	-	100
M2	1000	100	100	100
M3	1000	-	200	100
Controle M1	1000	200	-	-
Controle M2	1000	100	100	-
Controle M3	1000	-	200	-

2.2.3 *Spray drying* e condições de amostragem

A microencapsulação foi realizada em *spray dryer* de escala laboratorial (B-290 Mini Spray Dryer, Büchi, Flawil, Suíça), utilizando os parâmetros operacionais descritos por Dias et al. (2018). O processo de secagem foi realizado utilizando temperatura de entrada de ar constante de 130 °C e temperatura de saída de ar de 43 ± 3 °C. Ao final do processo, as microcápsulas foram recolhidas na base do ciclone, transferidas para frascos estéreis e armazenadas a 4 °C.

A amostragem foi realizada nos dias 1 e 30 após o processo de microencapsulação. Aliquotas de todas as amostras (microcápsulas probióticas e controles) foram utilizadas imediatamente após a coleta, nos dois períodos de armazenamento, para a contagem em placas. Para as análises utilizando as metodologias de qPCR e PMA-qPCR, previamente ao protocolo de extração de DNA, as amostras sofreram uma etapa de preparo, para remoção dos constituintes da matriz das microcápsulas. Aliquotas de 100 mg de cada formulação de microcápsulas, em duplicata, foram homogeneizadas com 1 mL de solução salina a 0,9 g 100 g⁻¹ e submetidas à centrifugação (6000 x g, 2 min) e os *pellets* de células foram lavados duas vezes com solução salina. Após as lavagens, os *pellets* foram estocados a -20 °C até a extração de DNA.

2.3 Tratamento com monoazida de propídio (PMA)

Os *pellets* foram ressuspensos em 500 µL de água ultrapura e, em seguida, o tratamento com PMA foi realizado, seguindo os procedimentos descritos por Scariot et al. (2018). O corante PMA (monoazida de propídio) (Biotium Inc., Hayward, CA, EUA) foi dissolvido em água ultrapura, de acordo com as instruções do fabricante, para obter uma solução estoque com concentração final de 20 mmol L⁻¹, a qual foi armazenada no escuro a -20 °C.

Aliquotas da solução estoque de PMA foram adicionadas a 500 µL de suspensão bacteriana, a fim de obter uma concentração final de 50 µmol L⁻¹ PMA, sendo os tubos incubados no escuro durante 5 minutos. Posteriormente, as amostras foram colocadas sobre um bloco de gelo a uma distância de 20 cm da fonte de luz, para evitar o aquecimento, e expostas durante 15 minutos a uma fonte de luz halógena de 500 W. Após o tratamento, os tubos foram centrifugados a 6000 × g por 10 minutos e os *pellets* foram armazenados a -80 °C, até a extração do DNA.

2.4 Extração de DNA

O DNA genômico foi extraído das amostras de microcápsulas de suco de maracujá probiótico e controles pelo método DNAzol® (ACHILLEOS; BERTHIER, 2013) com modificações propostas por Scariot et al. (2018). Os precipitados de células foram descongelados à temperatura ambiente e ressuspensos em 1 mL de reagente DNAzol® (Life Technologies, CA, EUA), 400 µL de isopropanol foram adicionados e os tubos foram submetidos à centrifugação (6000 × g, 6 min, 4 °C). Os precipitados foram lavados uma vez com 500 µL de reagente DNAzol®, cuidadosamente homogeneizados e centrifugados a 6000 × g, 6 min, 4 °C. Após, os precipitados foram lavados três vezes com 1 mL de etanol a 75% (v/v) e secos à temperatura ambiente. Após as etapas sucessivas de extração e lavagem, o DNA resultante foi dissolvido em 100 µL de água ultrapura e 1 µL de RNase A (10 mg/ mL) foi adicionado, e os tubos foram incubados a 37 °C por 30 minutos. Posteriormente, esta solução foi transferida para a coluna QIAshredder™ (Qiagen, Hilden, Alemanha), submetida à centrifugação a 11.800 × g por 2 minutos e o eluato foi armazenado a -20 °C. A qualidade e a concentração de DNA extraído foram estimadas utilizando espectrofotômetro Nanodrop 2000 (Thermo Scientific, Wilmington, DE, EUA) com medidas a 260 e 280 nm.

2.5 Quantificação por PCR em tempo real (qPCR)

A fim de detectar e quantificar a presença de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* nas amostras de microcápsulas por qPCR, foi utilizado o par de iniciadores TUF (Solano-Aguilar et al., 2008), que amplifica um fragmento de 117 pb do gene *tuf* do fator de alongação Tu. A PCR quantitativa foi realizada no sistema ABI PRISM 7500 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). As reações de amplificação foram realizadas em duplicata, com volume final de 25 µL, contendo 12,5 µL de SYBR Green Master Mix 2X (Applied Biosystems), 200 nM do iniciador TUF *Forward*, 150 nM do iniciador TUF *Reverse*, água ultrapura e 10 ng de DNA molde. Todas as reações de amplificação ocorreram nas seguintes condições: 2 minutos a 50 °C, 10 minutos a 95 °C, seguido por 40 ciclos de 15 segundos a 95 °C e 1 minuto a 60 °C. O sinal de fluorescência foi medido no final de cada etapa de 60 °C. A análise da curva de dissociação foi realizada automaticamente após as reações de amplificação, por aquecimento contínuo a partir de 65 até

95 °C. Todas as corridas de PCR em tempo real foram analisadas usando configurações automáticas do software.

2.6 Construção das curvas padrão para qPCR

Foram preparadas curvas padrão com diluições seriadas de DNA genômico isolado a partir da cultura pura de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 e de cada uma das três formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado, 1 dia após o processo de microencapsulação. Foi realizada a diluição seriada do DNA em água ultrapura para concentrações finais variando de 10^7 a 10^0 cópias de DNA genômico bacteriano por reação, equivalente a 21,3 a $2,13 \times 10^{-6}$ ng de DNA. O número de cópias do DNA bacteriano foi calculado com base no tamanho do genoma de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (Número de acesso no GenBank NC_017214.1) (1,9422 Mpb). As contagens em log UFC correspondentes foram calculadas com base na contagem em placas da mesma amostra. As curvas padrão foram geradas através da plotagem dos valores do ciclo de quantificação (Cq) versus o log do número de cópias de DNA bacteriano ou log UFC. Cada curva padrão foi realizada em três corridas de qPCR independentes, em triplicata. As eficiências de amplificação foram determinadas utilizando a Equação 3.1, conforme descrito por Venturelli et al. (2018).

$$E = 10^{(-1/s)} - 1 \quad (3.1)$$

Onde E é a eficiência e s é o coeficiente angular da reta obtida na curva padrão.

2.7 Enumeração de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 por qPCR e contagem por semeadura em placas

As contagens de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 estimadas por qPCR nas amostras de suco de maracujá probiótico microencapsulado coletadas 1 e 30 dias após o armazenamento foram calculadas como descrito anteriormente por Ilha et al. (2016). A partir das curvas padrão Cq X log UFC, a contagem bacteriana foi calculada utilizando a Equação 3.2.

$$\text{Contagem bacteriana (UFC } g^{-1}) = \frac{A*B*C}{D*E} \quad (3.2)$$

Onde A é o valor de UFC obtido a partir do C_q da amostra de DNA, utilizando curva padrão (C_q em função de \log UFC); B é a concentração do DNA extraído ($\text{ng } \mu\text{L}^{-1}$); C é o volume total de DNA extraído (μL); D é a massa de DNA inicial utilizada na qPCR (ng); e E é a massa de amostra (g) de microcápsulas utilizada na extração de DNA.

A enumeração de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (UFC g^{-1}) nas amostras de suco probiótico microencapsulado por semeadura em placas foi realizada em profundidade, utilizando meio seletivo composto por Ágar MRS-LP, conforme detalhado previamente no item 2.6 do Capítulo 2.

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Parâmetros de qPCR para quantificação de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12

Com o objetivo de detectar e quantificar *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 nas amostras de suco de maracujá microencapsulado, o par de iniciadores TUF foi utilizado, cuja especificidade para detecção exclusiva desta cepa foi previamente verificada por Solano-Aguilar et al. (2008).

Os parâmetros de reação (eficiência e coeficiente de correlação) do ensaio de qPCR utilizando o par de iniciadores TUF foram determinados com base nas curvas padrão obtidas a partir de diluições seriadas do DNA de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 isolado a partir de uma cultura pura e também das três formulações de microcápsulas de suco de maracujá probiótico. Todas as curvas padrão apresentaram coeficientes de correlação linear adequados, com valor médio de R^2 superior a 0,99 e as eficiências médias foram de 85% para as curvas elaboradas com DNA extraído a partir da cultura pura (Tabela 3.2), e variaram de 82 a 93% entre as diferentes formulações de suco probiótico microencapsulado (Tabela 3.3). O limite de detecção (LOD), para ambas as amostras foi de 10^3 cópias de DNA. Neste ensaio de qPCR foi possível detectar com confiança o DNA de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 na faixa de 10^3 cópias de DNA (2,13 pg) a 10^7 cópias de DNA (21,3 ng).

Tabela 3.2: Parâmetros de qPCR das curvas padrão ($C_q \times \log n^\circ$ cópias DNA) elaboradas com DNA extraído a partir de cultura pura de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12, obtidas a partir de três corridas de qPCR em diferentes dias.

qPCR	Eficiência (%)	<i>Slope</i>	R ²
Corrida 1	81	-3,8904	0,9965
Corrida 2	87	-3,6855	0,9997
Corrida 3	87	-3,6889	0,9998

Tabela 3.3: Parâmetros das curvas padrão ($C_q \times \log n^\circ$ cópias DNA) para quantificação de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 utilizando os iniciadores TUF e DNA bacteriano extraído a partir das três formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado, um dia após o processo de microencapsulação.

M1*				M2*			M3*		
qPCR (corrida)	Eficiência (%)	Slope	R ²	Eficiência (%)	Slope	R ²	Eficiência (%)	Slope	R ²
1	94	-3,4641	0,9988	85	-3,7550	0,9997	78	-3,9868	0,9957
2	98	-3,3780	0,9983	92	-3,5196	0,9995	80	-3,9198	0,9817
3	88	-3,6420	0,9993	86	-3,6900	0,9983	87	-3,6807	0,9978

*M1: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; M2: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e M3: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

Uma curva padrão aceitável deve apresentar valores de R^2 superiores a 0,95 e valores de coeficiente angular da reta (*slope*) entre -3,9 e -3,0, correspondendo a eficiências de qPCR entre 80 e 115%, respectivamente (ZHANG; FANG, 2006). Além disso, todos os componentes da matriz devem ser considerados durante a quantificação de microrganismos por qPCR (RIZZOTTI et al., 2015), uma vez que estes podem influenciar na eficiência da reação. Dessa forma, é importante utilizar DNA extraído a partir de matrizes alimentares relevantes e utilizando métodos adequados para extração de DNA bacteriano (CEUPPENS et al., 2010).

Foram observadas variações nos valores de eficiência de amplificação para todas as amostras, as quais podem ser atribuídas à presença de substâncias residuais interferentes, provenientes da matriz complexa das microcápsulas, que não foram completamente removidas durante as etapas de extração de DNA, principalmente os polissacarídeos utilizados como agentes encapsulantes. Estes polissacarídeos apresentam propriedades de solubilidade distintas, o que pode levar à variações na pureza do DNA extraído e a possíveis efeitos inibitórios na reação de PCR (SCHRADER et al., 2012).

Valores similares de eficiências foram obtidos em outros ensaios de qPCR. Solano-Aguilar et al. (2008), que desenvolveram um ensaio de qPCR baseado no gene *tuf* para detecção de *B. animalis subsp lactis* BB-12 no trato gastrointestinal de suínos, relataram eficiências superiores a 89% para curvas padrão construídas com DNA obtido a partir de amostras intestinais. Odooli et al. (2018) relataram eficiência de 90% para um ensaio de qPCR baseado no gene *tuf* para quantificação de *B. lactis* BB-12 em iogurtes probióticos comerciais. No entanto, até o momento, o uso de iniciadores baseados no gene *tuf* em ensaios de qPCR utilizando corantes intercalantes para quantificação de células viáveis de *B. animalis subsp. lactis* BB-12 não havia sido relatado.

3.2 Quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 em amostras de suco de maracujá probiótico microencapsulado por PMA-qPCR

O monitoramento e a quantificação de células viáveis em produtos alimentares probióticos é de suma importância, uma vez que, para exercerem alguns dos benefícios para a saúde do hospedeiro, é necessário

que a maioria das células probióticas sejam viáveis e não estejam apenas presentes nos produtos (DAVIS, 2014).

Métodos independentes de cultivo associados a agentes intercalantes de DNA, como a técnica PMA-qPCR, têm sido propostos para o monitoramento e quantificação de células viáveis em diferentes matrizes alimentares, especialmente para produtos lácteos probióticos (DESFOSSÉS-FOUCAULT et al., 2012; PADILHA et al., 2016; SCARIOT et al., 2018). No entanto, poucos estudos até o momento relataram o desenvolvimento de ensaios de PMA-qPCR destinados à determinação da viabilidade de culturas probióticas em produtos não lácteos (KRAMER et al., 2009; LUPIEN-MEILLEUR; ROY; LAGACÉ, 2016).

Neste estudo, foi desenvolvido um ensaio de PMA-qPCR para quantificação de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 em microcápsulas de suco de maracujá probiótico. Todas as amostras foram quantificadas por contagem de placas e ensaios de qPCR, simultaneamente. As curvas padrão Cq versus log UFC foram plotadas usando as médias das contagens de UFC obtidas por plaqueamento a partir das microcápsulas probióticas coletadas 1 dia após o processo de microencapsulação. Posteriormente, as contagens de *Bifidobacterium* BB-12 ($\log \text{UFC g}^{-1}$) foram calculadas usando os valores de Cq obtidos, conforme detalhado na seção 2.7. A Tabela 3.4 apresenta os resultados das contagens de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 nas diferentes formulações de microcápsulas de suco de maracujá probiótico, obtidas através das três técnicas de quantificação, durante o armazenamento a 4 °C.

Não foi detectada a presença de *B. lactis* BB-12 nas microcápsulas denominadas controles, uma vez que não houve sinal de amplificação nos ensaios de qPCR e PMA-qPCR. Além disso, estas amostras também não apresentaram crescimento quando submetidas ao plaqueamento em meio seletivo. Estes resultados demonstraram que não houve contaminação entre as soluções de alimentação controles e as soluções adicionadas de cultura probiótica durante o processo de microencapsulação, o que poderia causar sinais falso-positivos e imprecisão na quantificação de bactérias probióticas nas microcápsulas resultantes.

Tabela 3.4: Comparação das contagens de células viáveis de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 (log UFC g⁻¹) obtidas por qPCR, PMA-qPCR e contagem em placas, a partir de amostras das três formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado coletadas após 1 e 30 dias de armazenamento a 4 °C.

Amostra	Contagem por qPCR (log UFC g ⁻¹) ^a		Contagem por PMA-qPCR (log UFC g ⁻¹) ^a		Contagem em placas (log UFC g ⁻¹) ^b	
	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30	Dia 1	Dia 30
M1	10,49 ± 0,17	10,43 ± 0,17	7,95 ± 0,08	8,78 ± 0,30	8,74 ± 0,08	8,78 ± 0,04
M2	10,76 ± 0,12	10,22 ± 0,20	8,69 ± 0,09	8,89 ± 0,14	8,69 ± 0,05	8,64 ± 0,05
M3	10,36 ± 0,28	9,95 ± 0,24	8,92 ± 0,51	8,50 ± 0,35	8,51 ± 0,04	8,49 ± 0,03

^a Média ± DP (n = 12), calculados a partir de dois extratos de DNA independentes, avaliados em duplicata na qPCR, em três corridas independentes.

^b Média ± DP (n = 4), das contagens em placas em quadruplicata.

M1: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de maltodextrina; M2: microcápsulas produzidas com 100 g L⁻¹ de maltodextrina e 100 g L⁻¹ de inulina; e M3: microcápsulas produzidas com 200 g L⁻¹ de inulina.

Foram observados maiores valores de log UFC para a enumeração de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12 pelo método de qPCR quando comparado aos obtidos por PMA-qPCR e contagem em placas para todas as amostras de microcápsulas, e as contagens permaneceram praticamente inalteradas durante o período de armazenamento avaliado. Esta diferença observada entre as contagens obtidas pelos métodos de qPCR e PMA-qPCR se deve à incapacidade do ensaio de qPCR convencional em diferenciar células viáveis e não viáveis ou mortas, uma vez que o DNA total extraído das amostras é amplificado, acarretando em um número superestimado de células viáveis (POSTOLLEC et al., 2011). De acordo com Nocker, Cheung e Camper (2006), o DNA pode permanecer intacto no ambiente por até três semanas após a morte celular. Resultados semelhantes foram relatados anteriormente por outros estudos que avaliaram a eficiência de métodos de qPCR e PMA-qPCR para quantificação de células viáveis em produtos probióticos (VILLARREAL et al., 2013; MATIAS et al., 2016; SCARIOT et al., 2018).

Neste estudo, a população de células bacterianas mortas ou cujas membranas foram danificadas irreversivelmente, presentes nas amostras de microcápsulas se deve, provavelmente, ao processo de microencapsulação por *spray drying*, uma vez que as culturas probióticas são submetidas à alta temperatura e rápida desidratação, sendo estas as principais causas de estresse e perda de viabilidade relatadas na literatura para culturas bacterianas submetidas à secagem por atomização (TRIPATHI; GIRI, 2014). De acordo com Meng et al. (2008), a água livre desempenha um papel importante na estabilização da integridade estrutural e funcional de macromoléculas biológicas. Sendo assim, a remoção de água durante o processo de secagem pode levar à desestabilização e danos estruturais às membranas celulares bacterianas, resultando em perda ou comprometimento da função celular.

Por outro lado, valores semelhantes de contagens foram obtidos através dos ensaios de PMA-qPCR e de contagem em placas, para todas as amostras de microcápsulas. Estes resultados demonstram que o tratamento com o corante PMA foi eficiente em discriminar células viáveis e não viáveis nas amostras, permitindo a detecção de DNA proveniente apenas de células com membrana celular íntegra, por meio da inibição da amplificação do DNA de células com membranas danificadas (ELIZAQUÍVEL; AZNAR; SÁNCHEZ, 2013). Resultados similares foram observados em outros estudos. García-Cayuela et al.

(2009) avaliaram a viabilidade de diferentes espécies de bactérias ácido lácticas em um produto comercial simbiótico por qPCR combinado com PMA e por plaqueamento em meios seletivos, e observaram resultados similares entre estes dois métodos de quantificação. Santos et al. (2018) observaram uma alta correlação positiva entre o método de plaqueamento tradicional e o método de PMA-qPCR para a avaliação da viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 em emulsões alimentícias probióticas.

Durante o período de armazenamento, as contagens de *B. animalis* subsp. *lactis* BB-12, obtidas por PMA-qPCR e contagem de placas, permaneceram estáveis em todas as formulações de microcápsulas, com valores superiores a $8 \log \text{ UFC g}^{-1}$, os quais representam dosagens efetivas, segundo o critério recomendado para produtos probióticos ($> 6 \log \text{ UFC/g}$ ou mL), necessárias para alcançar benefícios à saúde (BAKR, 2015). Estes resultados estão de acordo com os observados em um estudo anterior (DIAS et al., 2018) realizado com estas mesmas formulações de suco de maracujá probiótico microencapsulado. No primeiro estudo, observou-se que o armazenamento refrigerado foi favorável e necessário para garantir a estabilidade da cultura probiótica nessas amostras. Entretanto, diferentemente deste estudo, não foi observado no presente estudo um efeito significativo de recuperação celular durante o armazenamento, visto que as diferenças observadas entre as contagens realizadas nos dias 1 e 30 foram consideradas de pouca relevância microbiológica. De forma semelhante, Kramer et al. (2009) relataram contagens elevadas de *Bifidobacterium lactis* em um produto liofilizado em cápsulas, obtidas por PMA-qPCR bem como por contagem em placas, as quais permaneceram praticamente inalteradas durante 90 dias de armazenamento.

De acordo com os resultados obtidos pelos métodos de PMA-qPCR e o método tradicional de contagem em placas, todas as formulações de microcápsulas de suco probiótico de maracujá obtidas pelo uso de diferentes agentes encapsulantes garantiram a manutenção da sobrevivência das bifidobactérias durante o período de armazenamento, podendo ser uma alternativa como matriz alimentar não láctea para incorporação de microrganismos probióticos.

4 CONCLUSÃO

Este estudo mostrou a adequação do método PMA-qPCR desenvolvido para avaliar a viabilidade do microrganismo probiótico *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 em uma matriz alimentar não láctea complexa, como as microcápsulas de suco de maracujá probiótico. O ensaio PMA-qPCR é específico e preciso para quantificação de células viáveis em amostras de alimentos, quando comparado com os métodos tradicionais dependentes de cultivo. Outra vantagem oferecida pelo método PMA-qPCR é que este permite uma quantificação mais rápida e com menor produção de resíduos, quando comparado ao tempo necessário para obter resultados com a contagem em placas (72 horas) e a necessidade do uso de sistemas de geração de atmosfera anaeróbia.

Sendo assim, este método constitui uma abordagem promissora para avaliação rápida da viabilidade do probiótico *Bifidobacterium* BB-12 em um produto alimentício, para monitoramento de rotina, bem como para estudos de estabilidade. Este foi o primeiro estudo a descrever a aplicação da técnica de qPCR acoplada ao tratamento com PMA para a quantificação de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying* em uma matriz não láctea.

REFERÊNCIAS

ACHILLEOS, C.; BERTHIER, F. Quantitative PCR for the specific quantification of *Lactococcus lactis* and *Lactobacillus paracasei* and its interest for *Lactococcus lactis* in cheese samples. **Food Microbiology**, v. 36, n. 2, p. 286–295, 2013.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 17–24, 2013.

BAKR, S. A. The potential applications of probiotics on dairy and non-dairy foods focusing on viability during storage. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 4, n. 4, p. 423–431, 2015.

CEUPPENS, S. et al. Quantification methods for *Bacillus cereus*

vegetative cells and spores in the gastrointestinal environment. **Journal of Microbiological Methods**, v. 83, n. 2, p. 202–210, 2010.

CHAIKHAM, P. Stability of probiotics encapsulated with Thai herbal extracts in fruit juices and yoghurt during refrigerated storage. **Food Bioscience**, v. 12, p. 61–66, 2015.

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural stability and viability of microencapsulated probiotic bacteria: A review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614–628, 2013.

CRESPO-SEMPERE, A. et al. Propidium monoazide combined with real-time quantitative PCR to quantify viable *Alternaria* spp. contamination in tomato products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 165, n. 3, p. 214–220, 2013.

DAVIS, C. Enumeration of probiotic strains: Review of culture-dependent and alternative techniques to quantify viable bacteria. **Journal of Microbiological Methods**, v. 103, p. 9–17, 2014.

DESFOSSÉS-FOUCAULT, É. et al. Assessment of probiotic viability during Cheddar cheese manufacture and ripening using propidium monoazide-PCR quantification. **Frontiers in Microbiology**, v. 3, p. 1–11, 2012.

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

ELIZAQUÍVEL, P.; AZNAR, R.; SÁNCHEZ, G. Recent developments in the use of viability dyes and quantitative PCR in the food microbiology field. **Journal of Applied Microbiology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, 2013.

FARIAS, N.; SOARES, M.; GOUVEIA, E. Enhancement of the viability of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 in passion fruit juice: Application of a central composite rotatable design. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 149–154, 2016.

FITTIPALDI, M.; NOCKER, A.; CODONY, F. Progress in understanding preferential detection of live cells using viability dyes in combination with DNA amplification. **Journal of Microbiological Methods**, v. 91, n. 2, p. 276–289, 2012.

FONTELES, T. V. et al. Stability and Quality Parameters of Probiotic Cantaloupe Melon Juice Produced with Sonicated Juice. **Food and Bioprocess Technology**, v. 6, n. 10, p. 2860–2869, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B. et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Simultaneous detection and enumeration of viable lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented milk by using propidium monoazide and real-time PCR. **International Dairy Journal**, v. 19, n. 6–7, p. 405–409, 2009.

GRANATO, D. et al. Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement. In: FERRANTI, P.; BERRY, E. M.; ANDERSON, J. R. (Eds.) **Encyclopedia of Food Security and Sustainability**, Elsevier, 2019, v.1, p.422-428.

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

HUANG, S. et al. Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria : A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 63, p. 1–17, 2017.

ILHA, E. C. et al. Comparison of real-time PCR assay and plate count for *Lactobacillus paracasei* enumeration in yoghurt. **Annals of Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 597–606, 2016.

KRAMER, M. et al. Quantification of live and dead probiotic bacteria in lyophilised product by real-time PCR and by flow cytometry. **Applied**

Microbiology and Biotechnology, v. 84, p. 1137–1147, 2009.

LAWLEY, B. et al. *Tuf* gene sequence variation in *Bifidobacterium longum* subspecies infantis detected in fecal microbiota of Chine infants. **Applied and Environmental Microbiology**, 2018.

LIANG, N. et al. Detection of Viable *Salmonella* in Lettuce by Propidium Monoazide Real-Time PCR. **Journal of Food Science**, v. 76, n. 4, p. M234–M237, 2011.

LUPIEN-MEILLEUR, J.; ROY, D.; LAGACÉ, L. Viability of probiotic bacteria in a maple sap beverage during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 74, p. 160–167, 2016.

MAMLOUK, K. et al. Quantification of viable *Brochothrix thermosphacta* in cooked shrimp and salmon by real-time PCR. **Food Microbiology**, v. 30, n. 1, p. 173–179, 2012.

MATIAS, N. S. et al. *In vitro* gastrointestinal resistance of *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 in soy and/or milk-based synbiotic apple ice creams. **International Journal of Food Microbiology**, v. 234, p. 83–93, 2016.

MENG, X. C. et al. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v. 106, n. 4, p. 1406–1416, 2008.

NOCKER, A.; CHEUNG, C.; CAMPER, A. K. Comparison of propidium monoazide with ethidium monoazide for differentiation of live vs . dead bacteria by selective removal of DNA from dead cells. v. 67, p. 310–320, 2006.

ODOOLI, S. et al. Comparison of *tuf* gene-based qPCR assay and selective plate count for *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* BB-12 quantification in commercial probiotic yoghurts. **International Food Research Journal**, v. 25, p. 1708–1719, 2018.

PADILHA, M.; VILLARREAL, M. L. M.; VIEIRA, A. D. S. A prebiotic mixture improved *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium animalis* gastrointestinal *in vitro* resistance in petit-suisse. **Food & Function**, v. 7, p. 2312–2319, 2016.

PIMENTEL, T. C. et al. Probiotic viability, physicochemical characteristics and acceptability during refrigerated storage of clarified apple juice supplemented with *Lactobacillus paracasei* ssp. *paracasei* and oligofructose in different package type. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, n. 1, p. 415–422, 2015.

POSTOLLEC, F. et al. Recent advances in quantitative PCR (qPCR) applications in food microbiology. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 848–861, 2011.

RIZZOTTI, L. et al. Effect of UV-C treatment on the microbial population of white and red wines, as revealed by conventional plating and PMA-qPCR methods. **Food Control**, v. 47, p. 407–412, 2015.

SANTOS, C. S. et al. Milk fat protects *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* Bb-12 from in vitro gastrointestinal stress in potentially synbiotic table spreads. **Food and Function**, v. 9, p. 4274–4281, 2018.

SANTOS, E.; ANDRADE, R.; GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, p. 56–61, 2017.

SCARIOT, M. C. et al. Quantification of *Lactobacillus paracasei* viable cells in probiotic yoghurt by propidium monoazide combined with quantitative PCR. **International Journal of Food Microbiology**, v. 264, p. 1–7, 2018.

SCHRADER, C. et al. PCR inhibitors – occurrence, properties and removal. **Journal of Applied Microbiology Microbiology**, v. 113, p. 1014–1026, 2012.

SHAO, Y. et al. Application of propidium monoazide quantitative real-time PCR to quantify the viability of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*. **Journal of Dairy Science**, v. 99, n. 12, p. 9570–9580, 2016.

SHISHIR, M. R. I.; CHEN, W. Trends of spray drying: A critical review on drying of fruit and vegetable juices. **Trends in Food Science & Technology**, v. 65, p. 49–67, 2017.

SHORI, A. B. Influence of food matrix on the viability of probiotic bacteria : A review based on dairy and non-dairy beverages. **Food Bioscience**, v. 13, p. 1–8, 2016.

SOLANO-AGUILAR, G. et al. Detection of *Bifidobacterium animalis* subsp . *lactis* (Bb12) in the Intestine after Feeding of Sows and Their Piglets. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 74, n. 20, p. 6338–6347, 2008.

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

VENTURELLI, G. L. et al. New plasmid calibrators for geminivirus-resistant (EMB-PV051-1 event) common bean (*Phaseolus vulgaris L.*) quantitation using simplex and duplex qPCR. **Food Bioscience**, v. 26, p. 145-151, 2018.

VILLARREAL, M. L. M. et al. Advantageous direct quantification of viable closely related probiotics in petit-suisse cheeses under in vitro gastrointestinal conditions by propidium monoazide - qPCR. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. 1–11, 2013.

VINDEROLA, G.; BURNS, P.; REINHEIMER, J. Probiotics in Nondairy Products. In: MARIOTTI, F. (Ed.). . **Vegetarian and Plant-Based Diets in Health and Disease Prevention**. [s.l.] Academic Press, 2017. p. 809–835.

ZHANG, T.; FANG, H. H. P. Applications of real-time polymerase chain reaction for quantification of microorganisms in environmental samples. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 70, p. 281–289, 2006.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

A microencapsulação do suco de maracujá adicionado da cultura probiótica *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 com diferentes agentes encapsulantes pela técnica de *spray drying* mostrou-se promissora no que diz respeito ao desenvolvimento de novos produtos com potenciais propriedades funcionais. Este foi o primeiro estudo publicado empregando a tecnologia de microencapsulação para o suco de maracujá contendo probióticos, com o objetivo de produzir uma bebida funcional em pó não láctea estável e que preserva a viabilidade probiótica.

Todas as formulações de microcápsulas desenvolvidas foram consideradas probióticas, uma vez que apresentaram contagens de células viáveis acima de 6 log UFC g⁻¹ durante os 30 dias de armazenamento a 4 °C. No entanto, o armazenamento a 25 °C mostrou-se prejudicial para a viabilidade das bifidobactérias. Foi observado que o uso de inulina como agente encapsulante proporcionou melhor proteção às bifidobactérias durante o processo de microencapsulação e posterior armazenamento em ambas as temperaturas, além de resultar em microcápsulas com propriedades físicas e tecnológicas mais adequadas. Sendo assim, sugere-se o uso de inulina na proporção de 20% como a formulação mais adequada de agente encapsulante para microencapsulação de *Bifidobacterium* BB-12 em suco de maracujá. Ademais, os resultados obtidos neste estudo sugerem o potencial uso do suco de maracujá como uma matriz adequada para incorporação de probióticos.

O ensaio PMA-qPCR mostrou-se uma ferramenta eficiente para avaliar a viabilidade celular de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 nas microcápsulas de suco de maracujá durante o armazenamento refrigerado, permitindo a quantificação rápida, específica e precisa deste microrganismo nesta matriz alimentar não láctea complexa. Os valores das contagens obtidas por PMA-qPCR e contagem em placas foram semelhantes. Dessa forma, este estudo trouxe novas informações acerca da aplicabilidade de um método independente de cultivo baseado em abordagem molecular para quantificação deste microrganismo, podendo ser aplicado para estudo de vida útil de demais alimentos adicionados desta cultura probiótica. Tendo em vista o seu excelente desempenho para a quantificação de *Bifidobacterium* BB-12, sugere-se o uso posterior para o estudo da sobrevivência desta cepa microencapsulada em suco de maracujá frente às condições do trato gastrointestinal *in vitro*,

reconhecidas por serem condições promotoras de estresse celular. Através do emprego do método de PMA-qPCR, seria possível avaliar os diferentes graus de suscetibilidade da cultura probiótica à essas condições, visto que este método permite diferenciar a população de células viáveis, não viáveis e viáveis mas não cultiváveis.

Além dos resultados apresentados nesta tese, resultados promissores foram obtidos quanto à sobrevivência das bifidobactérias presentes nas microcápsulas de suco de maracujá probiótico submetidas à simulação das condições gastrointestinais (ANEXO E).

ANEXOS

ANEXO A – Artigo “Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery” publicado na revista Food Bioscience, 2018 (ISSN:2212-4292).



Development and physico-chemical characterization of microencapsulated bifidobacteria in passion fruit juice: A functional non-dairy product for probiotic delivery



Carolinne Odebrecht Dias, Júlia dos Santos Opuski de Almeida, Stephanie Silva Pinto, Fabiani Cristina de Oliveira Santana, Silvani Verruck, Carmen Maria Olivera Müller, Elaine Schwinden Prudêncio, Renata Dias de Mello Castanho Amboni*

Department of Food Science and Technology, Agricultural Sciences Center, Federal University of Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga 1346, 88034-001 Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:

Microencapsulation
Paenibacillus edulis flavicarpa
 Maltodextrin
 Inulin
 Bifidobacteria
 Spray drying

ABSTRACT

The aim of this study was to produce a powdered probiotic passion fruit juice, in order to develop a new non-dairy probiotic beverage. For this purpose, passion fruit juice added with *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 was microencapsulated by spray drying using maltodextrin and/or inulin as encapsulating agents. The microcapsules obtained were characterized in relation to their morphological, physical and thermogravimetric properties after spray drying. The viability of probiotic microorganism, as well as the powder's moisture content, water activity, solubility and color were evaluated throughout 30 days of storage at 25 °C and 4 °C. The storage at 4 °C resulted in a better maintenance of probiotic viability throughout the storage period. During storage at 25 °C, the sample made only with maltodextrin showed loss of viability of the bifidobacteria while the sample made with inulin offered better protection to the encapsulated bacteria. The different carrier agents affected the morphology and the particle size of the microcapsules. All the probiotic juice powders had similar flow characteristics. The use of maltodextrin resulted in higher values for moisture content and water activity. Throughout storage, an increase in moisture content and water activity was noted for all the samples. All the powders showed high solubility indexes. An increase in luminosity and a concurrent reduction in b^* values throughout storage was noted for all the juice powder formulations at both temperatures, but more markedly at 25 °C. The results of

ANEXO B - Comprovante de apresentação do trabalho “Propriedades físicas de microcápsulas de suco de maracujá (*Passiflora edulis flavicarpa*) e polissacarídeos contendo *Bifidobacterium* BB-12” no XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos (XXV CBCTA, 2016), Gramado/RS, Brasil



XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA
Alimentação: a árvore que sustenta a vida

X CIGR Section VI International Technical Symposium
Food: the tree that sustains life

Certificado

24 a 27 de outubro de 2016 - FAURGS - GRAMADO/RS

Certificamos que o trabalho intitulado

PROPRIEDADES FÍSICAS DE MICROCÁPSULAS DE SUCO DE MARACUJÁ (*PASSIFLORA EDULIS FLAVICARPA*) E POLISSACARÍDEOS CONTENDO *BIFIDOBACTERIUM* BB-12

de autoria de

CAROLINE ODEBRECHT DIAS; JÚLIA DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA; SILVANI VERRUCK; LUIZA CIRRA PEREIRA; ELANE SCHWINDEN PRUDÊNCIO; RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI

foi apresentado no formato

PÔSTER

no XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos - CBCTA - Alimentação: a árvore que sustenta a vida e no X CIGR Section VI International Technical Symposium - Food: the tree that sustains life, no período de 24 a 27 de outubro de 2016, no Centro de Eventos da FAURGS, em Gramado/RS.

Roberta Thys

Roberta Thys

Presidente do XXV Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos



Amouri Rosenthal

Presidente do X CIGR Section VI International Technical Symposium

Parceiro



ANEXO C - Comprovante de apresentação do trabalho “Avaliação da estabilidade da cor de suco de maracujá probiótico em pó durante o armazenamento” no 6º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul/ 6º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul (6º COSIMP, 2016), Cascavel/PR, Brasil.

**6º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul
6º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul
X CISDEM - Fórum Internacional de la Cátedra Iberoamericana-Suiza
de Desarrollo de Medicamentos**

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado ANÁLISE DA ESTABILIDADE DA COR DE SUCO DE URTIGES: MARACUJÁ PROBIÓTICO EM PÓ DURANTE O ARMAZENAMENTO foi apresentado na forma de pôster no 6º Congresso de Ciências Farmacêuticas do Mercosul, 6º Simpósio em Ciência e Tecnologia de Alimentos do Mercosul, X CISDEM - Fórum Internacional de la Cátedra Iberoamericana-Suiza de Desarrollo de Medicamentos, realizado no período de 16 a 18 de novembro de 2016 na Universidade Estadual do Oeste do Paraná, campus de Cascavel, cidade de Cascavel, Paraná, Brasil.

Apresentador: CAROLINE ODEBRECHT DIAS

Co-autor(es): CAROLINE ODEBRECHT DIAS; SILVANA VÉLUCK; STEPHANIE SILVA PASTO; LUTZIA CIERA PEREIRA; ELANE SCHINDEN PRUDÊNÇO; RENATA DIAS DE MELLO CASTANHO AMBONI

INSTITUTO DE DESENVOLVIMENTO DE MEDICAMENTOS

Realização:



Luciana Oliveira de Fariña

Profª Dra Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do 6º COSIMP - X CISDEM

ANEXO D - Comprovante de apresentação do trabalho “Eficiência de encapsulação e viabilidade de *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 em suco de maracujá (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) microencapsulado por *spray drying*” no 12º Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos (12 SLACA, 2017), Campinas/SP, Brasil.



12 SLACA
Simpósio Latinoamericano de Ciência de Alimentos

A Ciência de Alimentos e seu Impacto no Mundo em Transformação

04 a 07 de Novembro 2017
Campinas - SP Unicamp

Certificado

Certificamos que o trabalho intitulado:

EFICIÊNCIA DE ENCAPSULAÇÃO E VIABILIDADE DE *Bifidobacterium animalis* ssp. *lactis* BB-12 EM SUCO DE MARACUJÁ (*Passiflora edulis* f. *flavicarpa*) MICROENCAPSULADO POR SPRAY DRYING

de autoria de:

Caroline Odebrecht Dias, JÚLIA DOSSANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, Stephan e Silva Pinto, Lara Felisbino Alves, Hane Schwinden Prudêncio, Renata Amboni

foi apresentado na **SESSÃO de PÓSTER** no 12 SLACA - Simpósio Latino Americano de Ciência de Alimentos “A Ciência de Alimentos e seu Impacto no Mundo em Transformação”, realizado de 4 a 7 de Novembro de 2017, Campinas - São Paulo - Brasil.



Dr. Marina Roberto Maróstica Jr.
Coordenador do Comitê de Programação



Dr. Juliano Lemos Bicas
Coordenador do Comitê Científico



Dra. Glauca Maria Pastore
Presidente do Evento



154302-1/2017-4/1E76C4340E000107

**ANEXO E - Comprovante de apresentação do trabalho
“Microencapsulation of *Bifidobacterium* BB-12 in passion fruit juice:
evaluation of survival under simulated gastrointestinal conditions”
no 1st International Congress on Bioactive Compounds/ 2nd
International Workshop on Bioactive Compounds (1st ICBC, 2018),
Campinas/SP, Brasil.**

Certificate

The Organizing Committee CERTIFIES that the abstract entitled
Microencapsulation of *Bifidobacterium* BB-12 in passion fruit juice: evaluation of survival under
simulated gastrointestinal conditions

authorship:
Caroline Odebrecht Dias, JÚLIA DOS SANTOS OPUSKI DE ALMEIDA, Janaina Alves
Pereira, Michelly Vieira, Renata Dias de Mello Castanho Amboni

has been presented as poster at the 1st International Congress on Bioactive
Compounds and 2nd International Workshop on Bioactive Compounds: Food
Design and Health Nutrition held on 22nd and 23rd November 2018 at
UNICAMP, Campinas – São Paulo – Brazil.
Campinas, November, 2018.

Adriano P. Maciel
Dr. Mário Roberto Marafião Júnior
President of the Event

Carolina Bui Bittim Cozzarin
Dr. Cynthia Bui Bittim Cozzarin
Coordinator of the Scientific Committee

Juliano Lemos Bidas
Dr. Juliano Lemos Bidas
Programming Coordinator

 UNICAMP

abd424ee819e6b1228278610d7d22c3