

NATALY DE ALMEIDA COSTA

**AVALIAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS DE PAREDE DE BASE VEGETAL PARA
MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS POR *SPRAY DRYING***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

Orientador: Afonso Mota Ramos

Coorientadores: Érica Nascif Rufino Vieira
Eliane Maurício Furtado Martins
Paulo César Stringheta

**VIÇOSA - MINAS GERAIS
2023**

**Ficha catalográfica elaborada pela Biblioteca Central da Universidade
Federal de Viçosa - Campus Viçosa**

T

C837a
2023
Costa, Nataly de Almeida, 1993-
Avaliação de novos materiais de parede de base vegetal
para microencapsulação de probióticos por *spray drying* / Nataly
de Almeida Costa. – Viçosa, MG, 2023.
1 tese eletrônica (156 f.): il. (algumas color.).

Texto em português e inglês.

Orientador: Afonso Mota Ramos.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2023.

Inclui bibliografia.

DOI: <https://doi.org/10.47328/ufvbbt.2023.462>

Modo de acesso: World Wide Web.

1. Farinhas. 2. Microencapsulação. 3. Secagem por
pulverização. 4. Produtos novos. I. Ramos, Afonso Mota, 1957-.
II. Universidade Federal de Viçosa. Departamento de Tecnologia
de Alimentos. Programa de Pós-Graduação em Ciência e
Tecnologia de Alimentos. III. Título.

CDD 22. ed. 664.72272

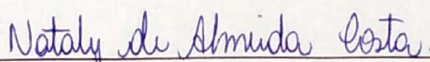
NATALY DE ALMEIDA COSTA

**AVALIAÇÃO DE NOVOS MATERIAIS DE PAREDE DE BASE VEGETAL PARA
MICROENCAPSULAÇÃO DE PROBIÓTICOS POR *SPRAY DRYING***

Tese apresentada à Universidade Federal de Viçosa, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, para obtenção do título de *Doctor Scientiae*.

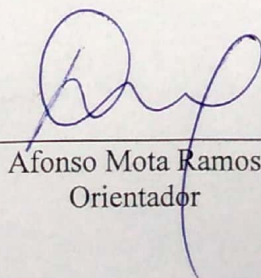
APROVADA: 22 de junho de 2023.

Assentimento:



Nataly de Almeida Costa

Autora



Afonso Mota Ramos

Orientador

A minha mãe, Regina.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, pela vida, saúde, força e por iluminar o meu caminho todos os dias.

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade de realizar a pós-graduação.

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

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), pelo financiamento dos projetos de pesquisa.

Ao orientador, Prof. Afonso Mota Ramos e a coorientadora Prof^a. Érica Nascif Rufino Vieira, por me acompanharem ao longo desses 4 anos de doutorado, por todo apoio, paciência, confiança e por todos os ensinamentos ao longo da condução deste trabalho.

Aos coorientadores, Prof^a. Eliane Maurício Furtado Martins e Prof. Paulo César Stringheta por todo incentivo e disponibilidade durante a pesquisa engrandecendo ainda mais este trabalho.

Ao Prof. Bruno de Castro Leite Júnior por toda ajuda na revisão dos artigos, tradução e submissão para as revistas.

Ao Prof. Maurílio Lopes Martins e a Prof^a. Daniele de Almeida Paula pela disponibilidade e por aceitarem o convite de participação na banca de defesa.

Aos estudantes de iniciação científica Laura, Ester e Gabriel por toda ajuda durante a execução dos experimentos. Muito obrigada por todo apoio, por todas as risadas e por todo incentivo. Nada disso seria possível sem a ajuda de vocês e com certeza, eu sou a aprendiz de vocês!!!

Aos amigos do Laboratório de Frutas e Hortaliças, nosso eterno LAFRUHTEC, Dani, Ariana, Paty, Arthur e Alisson por todo apoio e amizade.

Aos amigos do Laboratório de Inovação no Processamento de Alimentos (LIPA), em especial a Maria José, Daniele, Vanessa, Nicole e Isabela por todo apoio e amizade.

Aos funcionários da fábrica, Ademir e Elvécio, por todos os cafezinhos e por toda ajuda durante o experimento.

Ao Laboratório de Pigmentos e Compostos Bioativos, coordenado pelo Prof. Paulo César Stringheta e todos os seus orientados pela parceria durante esse projeto. Ao Sr. Valério

por me acompanhar durante a realização da secagem, sempre com muita disponibilidade e bom humor.

Ao Laboratório de Operações Unitárias (LOP), a Prof^a. Jane Célia Coimbra e ao Prof. César Augusto Sodré da Silva pela disponibilidade para realização da secagem. E aos pós-graduandos Otávio, José Roberto, Camila e Dani por toda paciência e companhia durante o uso do *spray dryer*.

Aos meus pais, Regina e Juarez, pelo amor, dedicação e por todos os ensinamentos. Vocês são a base fundamental da minha vida e diversas vezes abdicaram dos próprios sonhos para realização dos meus. Agradeço aos meus irmãos, Helione, Fabiano e Jhony, por todo carinho e atenção durante essa caminhada.

Ao Rodrigo, pelo carinho, paciência, compreensão, apoio e por me incentivar e estar sempre ao meu lado em todos os momentos.

À minha sobrinha Maria Julia, a Alice e aos meus afilhados Laura e Manoel por tornarem meus dias mais leves e coloridos.

À todos meus familiares pelas orações e incentivo, em especial ao meu primo Márcio que sempre esteve presente e sempre me incentivou.

Aos meus amigos por todas as conversas, risadas, apoio e incentivo! Vocês tornaram meus dias mais felizes!

À todos os professores do DTA-UFV por contribuírem com meu conhecimento.

Aos meus professores do IF Sudeste MG, Campus Rio Pomba, por todos os ensinamentos e por acreditarem em mim. Sem a base e o conhecimento que vocês me proporcionaram durante a graduação eu não teria chegado até aqui.

Enfim, muito obrigada a todos que de alguma forma contribuíram com a realização desse trabalho!!!

RESUMO

COSTA, Nataly de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, junho de 2023. **Avaliação de novos materiais de parede de base vegetal para microencapsulação de probióticos por *spray drying***. Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Érica Nascif Rufino Vieira, Eliane Maurício Furtado Martins e Paulo César Stringheta.

Spray drying é uma das técnicas mais utilizadas para microencapsulação de microrganismos probióticos e a seleção do material de parede utilizado é uma fase importante. É crescente a tendência de utilizar novos tipos de biopolímeros como materiais de parede para a microencapsulação, tanto por substituição total ou combinado com materiais convencionais. Nesse contexto, esse estudo objetivou avaliar novos materiais de parede combinados com materiais convencionais para a microencapsulação de probióticos por *spray drying*. Para o estudo, utilizou-se diferentes farinhas provenientes de fontes vegetais para o desenvolvimento de micropartículas probióticas que foram avaliadas quanto a resistência às condições adversas de processamento, armazenamento e simulação gastrointestinal *in vitro*. Em um primeiro momento, avaliou-se o efeito da combinação de farinha de batata-doce com materiais convencionais para microencapsular *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V[®]. Na segunda etapa, farinha da batata de yacon foi avaliada como material de parede combinada com maltodextrina e gelatina para microencapsular *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG e as micropartículas foram aplicadas em geleia de pitaya. Na terceira etapa, avaliou-se farinha de banana verde combinada com materiais de parede convencionais para microencapsular *L. rhamnosus* GG e aplicar em doce de banana em massa. As micropartículas desenvolvidas foram avaliadas quanto a resistência térmica (80 °C/2 min, 72 °C/15 s e 63 °C/30 min), resistência ao pH (2,0 e 7,4), estabilidade durante armazenamento (-18, 8 e 25 °C), caracterização físico-química (teor de água, atividade de água, higroscopicidade e solubilidade) e sobrevivência dos probióticos ao trato gastrointestinal simulado *in vitro*. Tanto a geleia quanto o doce de banana em massa foram avaliados quanto a viabilidade do probiótico durante armazenamento e caracterização físico-química. As micropartículas contendo a farinha de batata-doce apresentaram alta resistência térmica (> 59%) e resistência ao pH ácido (> 80%), sobrevivência de *L. plantarum* > 6 log UFC.g⁻¹ durante armazenamento por 45 dias a 8 °C e -18 °C e resistência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* (> 8 log UFC.g⁻¹). As micropartículas com farinha de batata yacon apresentaram alta resistência térmica (> 64%), sobrevivência do probiótico em pH ácido (> 76%) e alta estabilidade do probiótico (> 6 log UFC.g⁻¹) durante armazenamento por 120 dias a -18 °C, resistindo às condições gastrointestinais simuladas *in*

in vitro com cerca de 5,64 log UFC.g⁻¹ das células viáveis. Quando incorporada na geleia, a micropartícula proporcionou alta sobrevivência (> 70%) do probiótico após 60 dias a 8 °C. A micropartícula contendo farinha de banana verde apresentou eficiência de encapsulação maior que 80%, alta resistência térmica (> 77%) e sobrevivência em pH ácido (> 74%). *L. rhamnosus* GG microencapsulado resistiu à simulação gastrointestinal *in vitro* com cerca de 5,53 log UFC.g⁻¹ das células viáveis. Quando adicionada ao doce de banana, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou maior viabilidade em relação ao probiótico livre armazenados a 25 °C. Dessa forma, esse estudo demonstra que a aplicação de novos materiais de parede de fontes vegetais são uma alternativa eficiente para microencapsulação de probióticos e aplicação em diferentes produtos alimentícios.

Palavras-chave: Farinhas vegetais. Microencapsulação. Novos produtos. Prebióticos. Probióticos.

ABSTRACT

COSTA, Nataly de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, June 2023. **Evaluation of new plant-based wall materials for microencapsulation of probiotics by spray drying.** Advisor: Afonso Mota Ramos. Co-advisors: Érica Nascif Rufino Vieira, Eliane Maurício Furtado Martins and Paulo César Stringheta.

Spray drying is one of the most used techniques for microencapsulation of probiotic microorganisms and the selection of the wall material used is an important phase. There is a growing tendency to use new types of biopolymers as wall materials for microencapsulation, either by total replacement or combined with conventional materials. In this context, this study aimed to evaluate new wall materials combined with conventional materials for microencapsulation of probiotics by spray drying. For the study, different flours from plant sources were used for the development of probiotic microparticles that were evaluated for resistance to adverse conditions of processing, storage, and *in vitro* gastrointestinal simulation. At first, the effect of combining sweet potato flour with conventional materials to microencapsulate *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® was evaluated. In the second step, yacon potato flour was evaluated as a wall material combined with maltodextrin and gelatin to microencapsulate *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, and the microparticles were applied in pitaya jelly. In the third stage, unripe banana flour was combined with conventional wall materials to microencapsulate *L. rhamnosus* GG and apply it in banana jam in dough. The developed microparticles were evaluated for thermal resistance (80 °C/2 min, 72 °C/15 s, and 63 °C/30 min), resistance to pH (2.0 and 7.4), stability during storage (-18, 8, and 25 °C), physical-chemical characterization (water content, water activity, hygroscopicity, and solubility) and survival of probiotics in the simulated gastrointestinal tract *in vitro*. Both jelly and banana jam in mass were evaluated for the viability of the probiotic during storage and physical-chemical characterization. The microparticles containing sweet potato flour showed high thermal resistance (> 59%) and acid pH resistance (> 80%), *L. plantarum* survival > 6 log CFU.g⁻¹ during storage for 45 days at 8 °C and -18 °C and resistance to *in vitro* simulated gastrointestinal conditions (> 8 log CFU.g⁻¹). Microparticles with yacon potato flour showed high thermal resistance (> 64%), probiotic survival in acidic pH (> 76%), and high probiotic stability (> 6 log CFU.g⁻¹) during storage for 120 days at -18 °C, resisting simulated *in vitro* gastrointestinal conditions with about 5.64 log CFU.g⁻¹ of viable cells. When incorporated into the jelly, the microparticle provided high survival (> 70%) of the probiotic after 60 days at 8 °C. The microparticle containing green banana flour showed encapsulation efficiency greater

than 80%, high thermal resistance (> 77%), and survival in acidic pH (> 74%). Microencapsulated *L. rhamnosus* GG resisted *in vitro* gastrointestinal simulation with approximately 5.53 log CFU.g⁻¹ of viable cells. When added to banana jam, microencapsulated *L. rhamnosus* GG showed greater viability compared to the free probiotic stored at 25 °C. Thus, this study demonstrates that the application of new wall materials from plant sources is an efficient alternative for the microencapsulation of probiotics and application in different food products.

Keywords: Vegetable flours. Microencapsulation. New products. Prebiotics. Probiotics.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

CAPÍTULO 1

Figura 1. Técnicas de microencapsulação utilizadas24

Figura 2. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*25

CAPÍTULO 2

Figure 1. Thermal resistance of microparticles containing *L. plantarum* in different thermal treatments45

Figure 2. Rupture test of microparticles containing *Lactoplantibacillus plantarum* under different pH conditions47

Figure 3. Scanning Electron Microscopy (SEM) images49

Figure 4. Survival of *L. plantarum* in microparticles stored at different temperatures for 45 days.50

Figure 5. Survival of free and microencapsulated *L. plantarum* under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions52

CAPÍTULO 3

Figura 1. Resistência térmica de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG em diferentes tratamentos térmicos76

Figura 2. Resistência das micropartículas desenvolvidas em diferentes condições de pH.....78

Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas contendo 11,11% de maltodextrina, 2,22% de gelatina, 6,67% de farinha de batata yacon e 5% de pellet de *L. rhamnosus* GG.....81

Figura 4. Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em micropartículas armazenadas em diferentes temperaturas por 120 dias.82

Figura 5. Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*84

Figura 6. Viabilidade e taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em geleia de pitaya durante 60 dias de armazenamento a 8°C e 25 °C87

Figura 7. Tensão de cisalhamento (τ , Pa) versus taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) a 8 e 25 °C de células livres de *L. rhamnosus* GG (FC) e células microencapsuladas (MC) após produção (tempo 0), 45 e 60 dias de armazenamento.93

CAPÍTULO 4

- Figura 1.** Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas em diferentes tratamentos térmicos.122
- Figura 2.** Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas desenvolvidas em diferentes condições de pH.125
- Figura 3.** Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de pellet de *L. rhamnosus* GG.128
- Figura 4.** Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG microencapsulado em diferentes condições de armazenamento.129
- Figura 5.** Taxa de sobrevivência (%) de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado durante simulação gastrointestinal *in vitro*132
- Figura 6.** Viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado adicionado em doce de banana em massa.135
- Figura 7.** Sobrevivência de *L. rhamonosus* GG livre e microencapsulado em doce de banana em massa durante a simulação gastrointestinal *in vitro* no tempo 0 dia.136

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 2

Table 1. Count of *Lactoplantibacillus plantarum* and encapsulation efficiency (%) after spray drying44

Table 2. Characterization of selected microparticles48

CAPÍTULO 3

Tabela 1. Viabilidade de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG antes e após *spray drying* e eficiência de encapsulação (%).74

Tabela 2. Avaliação do pH de geleias contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado, armazenadas em diferentes temperaturas.....90

Tabela 3. Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo de Lei de Potência (Ostwald-de-Waele) e viscosidade aparente (η_{app} , Pa·s) de geleias contendo *L. rhamnosus* GG célula livre (FC) e célula microencapsulada (MC) após 0, 45 e 60 dias de armazenamento.....91

CAPÍTULO 4

Tabela 1. Contagem de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG e eficiência de encapsulação (%)120

Tabela 2. Avaliação físico-química de doces de banana em massa contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado durante período de armazenamento134

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO GERAL	18
OBJETIVOS	20
Objetivo Geral	20
Objetivos Específicos	20
CAPÍTULO I: REFERENCIAL TEÓRICO	21
1. Probióticos	21
2. Microencapsulação por <i>spray drying</i>	22
3. Materiais de parede usados na microencapsulação	26
4. Referências bibliográficas	28
CAPÍTULO 2: Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating <i>Lactiplantibacillus plantarum</i> by spray drying: Thermal resistance, <i>in vitro</i> release behavior, storage stability and physicochemical properties	34
1. INTRODUCTION	37
2. MATERIALS AND METHODS.....	38
2.1 Materials	38
2.2 Cultivation of the microorganism and growth conditions	38
2.3 Development of microcapsules.....	39
2.3.1 Preparation of sweet potato flour used as wall material	39
2.3.2 Definition of formulations and preparation of the microencapsulating solutions.....	39
2.3.3 Production of <i>L. plantarum</i> microcapsules by spray dryer.....	40
2.4 Evaluation of resistance of the microparticles produced	40
2.4.1 Viability	40
2.4.2 Encapsulation efficiency (EE)	40
2.4.3 Thermal resistance of microparticles	40
2.4.4 Microparticle rupture test	41
2.5 Characterization of selected microparticles	41
2.5.1 Water activity.....	41
2.5.2 Water Content	41
2.5.3 Hygroscopicity.....	42
2.5.4 Solubility.....	42
2.5.5 Morphology and average particle size	42
2.5.6 Viability of the probiotic in microparticles at different storage temperatures.....	42
2.5.7 <i>In vitro</i> simulation of gastrointestinal conditions	42
2.6 Statistical analysis.....	43

3. RESULTS AND DISCUSSION	43
3.1 Resistance of the microparticles produced	43
3.1.1 Viability e encapsulation efficiency (EE).....	43
3.1.2 Thermal resistance of microparticles	44
3.1.3 Microparticle rupture test	46
3.2 Characterization of selected microcapsules	47
3.2.1 Water activity, water content, hygroscopicity and solubility	47
3.2.2 Morphology and average particle size of microcapsules.....	49
3.2.3 Viability of the probiotic in microparticles at different storage temperatures.....	50
3.2.4 <i>In vitro</i> simulation of gastrointestinal conditions	51
4. CONCLUSION.....	53
5. REFERENCES	54
CAPÍTULO 3: Farinha de yacon (<i>Smallanthus sonchifolius</i>) como material de parede para microencapsulação de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG: caracterização das micropartículas e adição em geleia de pitaya	
1. INTRODUÇÃO	66
2. MATERIAL E MÉTODOS	67
2.1 Materiais	67
2.2 Cultivo microbiano e condições de crescimento	68
2.3 Preparo da farinha de batata yacon utilizada como material de parede.....	68
2.4 Definição dos tratamentos e preparo das soluções encapsulantes	68
2.5 Microencapsulação de <i>L. rhamnosus</i> GG por <i>spray drying</i>	68
2.6 Avaliação das micropartículas produzidas	69
2.6.1 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> GG	69
2.6.2 Eficiência da encapsulação (EE)	69
2.6.3 Resistência térmica de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas.....	69
2.6.4 Resistência de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas em diferentes valores de pH	70
2.7 Seleção da micropartícula.....	70
2.8 Caracterização da micropartícula selecionada.....	70
2.8.1 Atividade de água	70
2.8.2 Teor de água	70
2.8.3 Higroscopicidade	70
2.8.4 Solubilidade	70
2.8.5 Morfologia de tamanho de partícula.....	71

2.8.6 Viabilidade do probiótico em micropartículas em diferentes temperaturas de armazenamento	71
2.8.7 Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais	71
2.9 Aplicação da micropartícula em geleia de pitaya	72
2.9.1 Elaboração da geleia de pitaya contendo <i>L. rhamnosus</i> GG	72
2.9.2 Caracterização da geleia de pitaya potencialmente probiótica	72
2.9.2.1 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> GG	72
2.9.2.2 pH	73
2.9.2.3 Comportamento reológico das geleias	73
2.10 Análise estatística	73
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	73
3.1 Resistência de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas produzidas	73
3.1.1 Viabilidade e eficiência de encapsulamento (EE)	73
3.1.2 Resistência térmica de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas.....	75
3.1.3 Resistência de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas submetidas a diferentes valores de pH	78
3.2 Seleção da micropartícula.....	79
3.2.1 Caracterização físico-química da micropartícula selecionada.....	79
3.2.2 Morfologia e tamanho médio de partícula das microcápsulas.....	81
3.2.3 Viabilidade do probiótico na micropartícula selecionada em diferentes temperaturas de armazenamento.....	81
3.2.4 Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais na micropartícula selecionada	84
3.3 Aplicação da micropartícula em geleia de pitaya	86
3.3.1 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> GG microencapsulado em geleia de pitaya	87
3.3.2 Avaliação do pH das geleias durante o armazenamento	89
3.3.3 Comportamento reológico das geleias produzidas	90
4. CONCLUSÃO.....	93
<u>5. AGRADECIMENTOS</u>	<u>94</u>
<u>6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</u>	<u>94</u>
CAPÍTULO 4: Maltodextrina, farinha de banana verde e gelatina como materiais de parede para microencapsulação de <i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i> GG: sobrevivência do probiótico, caracterização da micropartícula e aplicação em doce de banana.....	
1. INTRODUÇÃO	112
2. MATERIAL E MÉTODOS	113
2.1 Material.....	113
2.2 Cultivo do microrganismo probiótico e condições de crescimento.....	114

2.3 Desenvolvimento das micropartículas	114
2.4 Microencapsulação de <i>L. rhamnosus</i> GG por <i>spray drying</i>	114
2.5 Avaliação da resistência do probiótico nas micropartículas produzidas	115
2.5.1 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas	115
2.5.2 Eficiência da encapsulação (EE)	115
2.5.3 Resistência térmica de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas.....	115
2.5.4 Resistência de <i>L. rhamnosus</i> GG em diferentes valores de pH.....	115
2.6 Seleção da micropartícula.....	116
2.7 Caracterização físico-química da micropartícula selecionada.....	116
2.7.1 Atividade de água	116
2.7.2 Teor de água	116
2.7.3 Higroscopicidade	116
2.7.4 Solubilidade	116
2.7.5 Morfologia e tamanho médio.....	117
2.7.6 Viabilidade do probiótico microencapsulado em diferentes temperaturas de armazenamento	117
2.7.7 Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais	117
2.8 Aplicação da micropartícula selecionada em doce de banana.....	118
2.8.1 Elaboração do doce de banana contendo <i>L. rhamnosus</i> GG	118
2.8.2 Viabilidade.....	119
2.8.3 Determinação das características físico-químicas do doce de banana em massa	119
2.8.4 Simulação <i>in vitro</i> das condições gastrointestinais	119
2.9 Análise estatística	119
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	120
3.1 Eficiência da encapsulação (EE %)	120
3.2 Resistência térmica de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas.....	121
3.3 Resistência de <i>L. rhamnosus</i> GG nas micropartículas em diferentes valores de pH	124
3.4 Caracterização da micropartícula selecionada.....	126
3.4.1 Caracterização físico-química.....	126
3.5 Morfologia e tamanho de partícula.....	127
3.6 Viabilidade durante o armazenamento	128
3.7 Sobrevivência de <i>L. rhamanosus</i> GG livre e microencapsulado durante a simulação gastrointestinal <i>in vitro</i>	131
3.8 Aplicação da micropartícula desenvolvida em doce de banana	133

3.8.1 Caracterização físico-química de doce de banana em massa	133
3.8.2 Viabilidade de <i>L. rhamnosus</i> GG livre e microencapsulado em doce de banana em massa durante armazenamento	134
4. CONCLUSÃO	138
5. AGRADECIMENTOS	139
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	139
CONCLUSÃO GERAL.....	156

INTRODUÇÃO GERAL

Os alimentos além de promoverem a nutrição, também podem influenciar na saúde e no bem-estar do consumidor. Nos últimos anos, ocorreram algumas mudanças nos hábitos alimentares e os consumidores começaram a optar por alternativas mais saudáveis. Novos hábitos influenciaram a indústria de alimentos a buscar o desenvolvimento de produtos direcionados para o público preocupado com a saúde e com o bem-estar. Nesse contexto, surgiram alimentos com apelo funcional, que são aqueles capazes de proporcionar efeitos benéficos à saúde além da nutrição básica.

Dentre os alimentos funcionais, encontram-se os alimentos adicionados de microrganismos probióticos que, quando consumidos regularmente e em quantidades suficientes, são capazes de promover benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2001). Entretanto, a grande maioria dos produtos contendo probióticos são de base láctea, como leite fermentados, iogurtes, sobremesas lácteas, queijos e sorvetes. Contudo, o mercado de alimentos probióticos demanda por outros produtos de base não-láctea afim de suprir as necessidades dos consumidores intolerantes à lactose, alérgicos às proteínas do leite ou adeptos do vegetarianismo.

Durante o desenvolvimento de alimentos probióticos, etapas como a formulação, o processamento e o armazenamento dos produtos devem favorecer a sobrevivência dos microrganismos. Da mesma maneira, as tecnologias e a matriz alimentar devem proteger as células probióticas contra fatores de estresses externos, mantendo a viabilidade das culturas. Além disso, uma vez que o alimento é consumido, as etapas e os efeitos gerados durante a passagem pelo sistema gastrointestinal como pH ácido do estômago, a presença de sais biliares e as enzimas digestivas também podem afetar a viabilidade dos microrganismos.

Uma alternativa para minimizar os danos aos probióticos durante as etapas de processamento e incorporação em diferentes produtos é a técnica de microencapsulação que consiste em uma estratégia amplamente conhecida por melhorar a proteção física e a estabilidade dos probióticos nos alimentos. Dentre as técnicas existentes, *spray drying* se destaca devido à alta flexibilidade do processo, baixo custo para produção das micropartículas e a possibilidade de produção em grande escala quando comparada com outras técnicas. O princípio da técnica envolve a pulverização de uma solução contendo o material de parede e os probióticos em paralelo a uma corrente de ar aquecido ($> 100\text{ }^{\circ}\text{C}$) dentro da câmara de secagem para formação das micropartículas em pó.

A seleção do material de parede utilizado é de fundamental importância na microencapsulação, pois ele deve proteger o microrganismo probiótico, não interferir nas características sensoriais da matriz, apresentar alta estabilidade e boa solubilidade. A microencapsulação através da técnica de *spray drying* possibilita trabalhar com diferentes materiais de parede e, assim, aumentando as possibilidades para o desenvolvimento de novas micropartículas eficientes.

Nos últimos anos, surgiu uma busca crescente por novos materiais de parede provenientes de fontes naturais ou do reaproveitamento de subprodutos da indústria de alimentos, com alta disponibilidade, seguros e de baixo custo e, assim, possibilitando o emprego dessas micropartículas em diferentes produtos desenvolvidos pela indústria.

Dessa forma, a avaliação de novos materiais de parede para a microencapsulação de probióticos por *spray drying* torna-se necessária, a fim de produzir micropartículas com alta eficiência de encapsulação, resistência a temperaturas elevadas e pH ácido, estabilidade nas condições de armazenamento e sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo sistema gastrointestinal *in vitro*. Além disso, se faz necessária a aplicação dessas micropartículas desenvolvidas em diferentes produtos de base não-láctea possibilitando novas alternativas de matrizes carreadoras de probióticos disponíveis para os consumidores.

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Desenvolver micropartículas contendo *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® e *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG probióticos utilizando materiais de parede convencionais combinados com materiais não-convencionais, caracterizar e avaliar as micropartículas obtidas quanto a resistência, armazenamento, às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e a incorporação em produtos vegetais.

Objetivos Específicos

- Avaliar diferentes materiais de parede convencionais combinados com materiais não-convencionais para microencapsulação de probióticos por *spray drying*;
- Analisar as micropartículas quanto a eficiência da encapsulação, resistência térmica e ruptura em diferentes condições de pH;
- Caracterizar as micropartículas mais resistentes quanto às características físico-químicas de atividade de água, teor de água, higroscopicidade, solubilidade, morfologia e tamanho de partícula;
- Avaliar a viabilidade de *L. plantarum* e *L. rhamnosus* GG microencapsulados quando armazenados em diferentes temperaturas (-18, 8 e 25 °C);
- Verificar a sobrevivência dos probióticos microencapsulados quando submetidos às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*;
- Aplicar as micropartículas desenvolvidas em produtos de base vegetal como geleia de pitaya e doce de banana em massa;
- Caracterizar os produtos contendo probióticos microencapsulados quanto à viabilidade dos microrganismos e as características físico-químicas.

CAPÍTULO I REFERENCIAL TEÓRICO

1. Probióticos

Probióticos são microrganismos vivos, que conferem efeitos benéficos ao hospedeiro, quando administrados em quantidades adequadas (HILL et al., 2014). Dentre esses benefícios, encontram-se a redução do risco de câncer de cólon, o equilíbrio da microbiota intestinal, prevenção de alergias alimentares, controle de doenças, inibição de bactérias ou fungos prejudiciais e aumento das ações de defesa que ocorrem naturalmente no sistema imunológico do hospedeiro (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2019; PECH-CANUL et al., 2020).

Tais efeitos podem resultar da interação direta entre probiótico e hospedeiro ou de forma indireta, através da modulação da microbiota intestinal (BAUTISTA-GALLEGO et al., 2019). No entanto, esses benefícios são obtidos apenas com o consumo regular dos alimentos probióticos e a matriz alimentar deve conter quantidades suficientes desses microrganismos em sua forma viável (LOPES et al., 2018).

Dentre os gêneros de probióticos no mercado de alimentos funcionais, os mais utilizados são *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp. (GRAND VIEW RESEARCH, 2019). Geralmente, esses microrganismos probióticos são disponibilizados à indústria na forma de pó seco para ser adicionado aos alimentos. Também podem ser encontrados em produtos alimentícios fermentados ou não fermentados, principalmente produtos lácteos, ou como suplementos alimentares em pó, cápsulas ou comprimidos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Na literatura, não existe um consenso da concentração mínima de microrganismos probióticos necessária para promover benefícios ao organismo (MARTINS et al., 2016). A concentração mínima sugerida em produtos alimentares é em torno de 10^6 - 10^7 UFC/mL ou UFC/g no final da vida útil para fornecer os benefícios à saúde (DING; SHAH, 2008; BAKR et al., 2015). Recomenda-se que os alimentos contendo bactérias probióticas estejam na faixa de 10^8 a 10^9 UFC/g ou UFC/mL antes da ingestão para garantir que o mínimo terapêutico suficiente de 10^6 - 10^7 UFC/g ou UFC/mL possa atingir o cólon (NAZZARO et al., 2009; MEIRA et al., 2015).

Existe uma variedade de alimentos contendo microrganismos probióticos, principalmente os produtos de base láctea. Entretanto, a sobrevivência desses microrganismos em determinados alimentos ou sua adição durante as etapas de processamento ainda representam consideráveis desafios tecnológicos. Tais desafios estão associados à dificuldade de garantir a sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento dos produtos e a

necessidade de adicioná-los às formulações após o processamento térmico devido à baixa resistência térmica (DE ALMADA et al., 2016).

Diversos fatores durante as etapas de processamento e armazenamento como pH, temperatura e oxigênio podem afetar a viabilidade dos probióticos (REALE; DI RENZO; COPPOLA, 2019). Além disso, as características da matriz responsável por carrear esses microrganismos também afetam sua viabilidade, principalmente aqueles alimentos com pH ácido, baixa atividade de água ou que serão expostos a processos térmicos com temperaturas superiores a 60 ° C, visto que esses microrganismos não sobrevivem por muito tempo em condições adversas (PIMENTEL et al., 2019).

Além das etapas de processamento e as características da matriz carreadora, os microrganismos probióticos após serem ingeridos, também precisam sobreviver às condições gastrointestinais do organismo como a acidez do estômago, a presença de sais biliares, enzimas digestivas e serem capazes de atingir o intestino em quantidades suficientes para permitir a colonização e multiplicação e, assim, promover os efeitos benéficos ao hospedeiro (BERNUCCI et al., 2017; LI et al., 2019).

Dessa forma, algumas alterações nas etapas de processamento de alimentos e na adição dos microrganismos probióticos são necessárias para manter a viabilidade das células sendo o uso de alternativas para proteger as células probióticas durante o processamento como a técnica de microencapsulação uma alternativa promissora.

2. Microencapsulação por *spray drying*

A microencapsulação pode ser definida como um processo em que o composto a ser encapsulado é envolvido por um material de revestimento ou incorporado em uma matriz contendo o agente encapsulante, com o objetivo de produzir pequenas cápsulas com propriedades suficientes para proteger e promover a estabilidade do composto encapsulado (CARVALHO; ESTEVINHO; SANTOS, 2016). Assim, a microencapsulação é uma tecnologia de inclusão de ingredientes sensíveis em várias matrizes, uma vez que os ingredientes são presos ou completamente cercados pelas matrizes protetoras (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016).

A técnica de microencapsulação vem sendo amplamente utilizada com a finalidade de estabilizar compostos sensíveis e pode ser um sistema transportador adequado para aumentar a capacidade dos probióticos de resistir sob condições extremas, como baixo pH e longo período de armazenamento (ERATTE et al., 2018). Os processos de encapsulamento visam aumentar a estabilidade do composto quando submetido às condições adversas como temperatura,

umidade, oxigênio e luz durante o processamento e armazenamento. Além disso, a encapsulação tem como vantagem proporcionar a liberação controlada do composto sob condições específicas e no local de ação desejado, proporcionando melhor atividade (FIGUEIREDO et al., 2020).

De acordo com Shahidi e Han (1993), existem diferentes razões para a aplicação da microencapsulação na indústria de alimentos, como reduzir a reatividade do material encapsulado com fatores ambientais; diminuir a taxa de transferência do material encapsulado para o ambiente externo; promover fácil manuseio; controlar a liberação do material encapsulado; mascarar o sabor e para diluir o material encapsulado quando esse deve ser usado apenas em quantidades muito pequenas.

O processo de microencapsulação permite a utilização de microrganismos probióticos no sistema alimentar de forma eficiente, pois mantém a viabilidade estável, sendo esses protegidos de condições ambientais (ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017). Além disso, a microencapsulação tem a capacidade de melhorar o manuseio de culturas probióticas, minimizando os efeitos nas características dos produtos, pois impede que as cepas interajam com a matriz, reduzindo seu impacto nas propriedades sensoriais (DE PRISCO; MAURIELLO, 2016).

Nesse caso, a estabilização ocorre porque o material da parede atua como uma barreira física e de permeabilidade, conseqüentemente, a vida útil dos produtos contendo microrganismos encapsulados pode ser prolongada. Várias técnicas de microencapsulação, como *spray drying*, coacervação complexa, emulsões, extrusão, liofilização, entre outras, foram desenvolvidas (LUCAS et al., 2020). Algumas técnicas estão apresentadas na Figura 1.

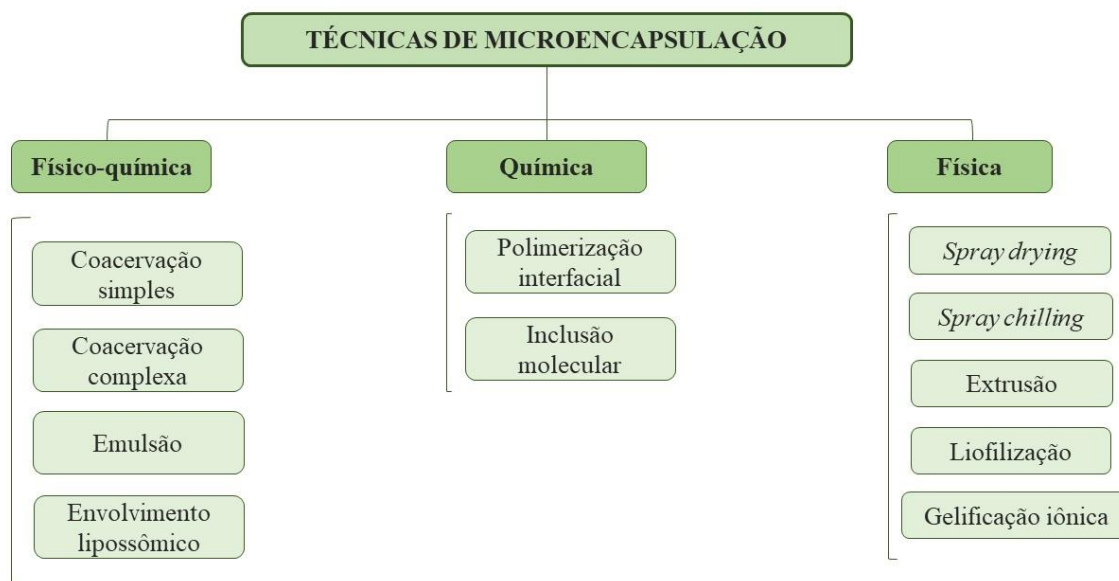


Figura 1. Técnicas de microencapsulação utilizadas.

Dentre as técnicas de microencapsulação, o método mais utilizado para desenvolver micropartículas é o *spray drying*, porque compreende os menores custos de produção em nível industrial para o desenvolvimento de ingredientes ativos (BERNUCCI et al., 2017). É a técnica mais empregada tanto na indústria de alimentos como na indústria farmacêutica devido à alta flexibilidade do processo, baixo custo para produção das micropartículas e possibilidade de produção em grande escala quando comparada com outras técnicas (ESTEVINHO et al., 2019). Além disso, é amplamente utilizada para microencapsular diferentes tipos de compostos como vitaminas ou microrganismos probióticos devido ao seu baixo tempo de processamento e alto rendimento (POLEKKAD et al., 2021).

A técnica de *spray drying* consiste em uma operação unitária onde um produto líquido é atomizado em pequenas gotículas com cerca de 10 a 150 μm através de um bico atomizador em fluxo paralelo ao ar quente e seco com temperatura acima de 100 $^{\circ}\text{C}$ e, devido a esse aumento da área de interface ar-líquido ocorre o aumento da cinética de secagem e em poucos segundos é obtido o pó (GHARSALLAOUI et al., 2007; RADOSAVLJEVIĆ et al., 2022).

O processo de microencapsulação de probióticos por *spray drying* está descrito na Figura 2.

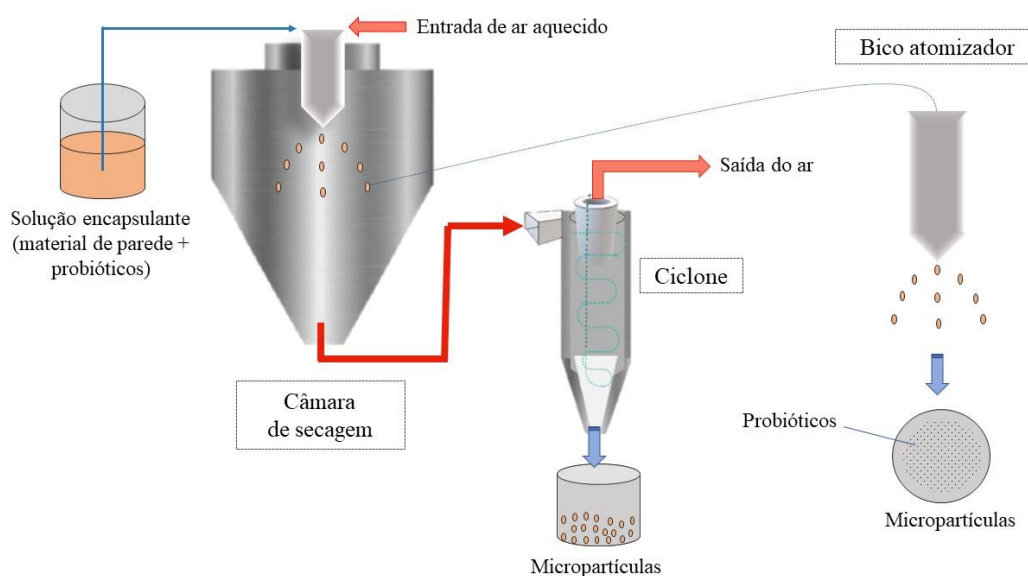


Figura 2. Microencapsulação de probióticos por *spray drying*.

De acordo com Vivek et al. (2023), este processo de secagem consiste em 4 etapas. Inicialmente, a solução contendo os microrganismos probióticos é submetida a atomização através do bico atomizador, que converte o líquido em pequenas gotículas dentro da câmara de secagem, ao mesmo tempo ocorre a entrada do ar aquecido de acordo com a temperatura de entrada programada. Na segunda etapa, essas gotículas atomizadas entram em contato com ar quente fornecido à câmara de secagem. Como a solução encapsulante foi atomizada em pequenas gotículas com uma extensa área de superfície, ocorre um aumento nas taxas de transferência de calor e massa. Na terceira etapa ocorre a evaporação da água presente nas gotículas atomizadas e a formação das micropartículas contendo os probióticos. Por fim, na quarta etapa do processo as micropartículas formadas são carregadas para o ciclone que promove um fluxo em espiral causando a sedimentação das micropartículas no copo coletor.

A microencapsulação de probióticos por *spray drying* possui algumas vantagens tais como ser um processo simples, rápido e econômico, ser uma técnica flexível, ter baixo custo operacional e ser escalonável (BUSTAMANTE et al., 2015; ZHANG et al., 2020). Entretanto, a temperatura elevada utilizada na secagem pode reduzir a viabilidade do microrganismo probiótico. Fatores como a temperatura de entrada da câmara de secagem, direção do fluxo de ar, tipo de bicos e o material de parede utilizado podem influenciar na viabilidade do probiótico

(SANTIVARANGKNA et al., 2007). Com isso, tais parâmetros empregados na secagem podem determinar a eficiência da encapsulação e, conseqüentemente, as propriedades funcionais e potenciais aplicações das micropartículas em diferentes matrizes, fazendo-se necessário o estudo de novos materiais de parede capazes de promover proteção ao probiótico.

3. Materiais de parede usados na microencapsulação

Um fator importante na microencapsulação é a seleção do material de parede ideal, o qual deve possuir algumas características como alta estabilidade, alta atividade emulsificante e tendência a formar uma boa rede sendo capaz de evitar a separação do material do núcleo durante o processo de secagem (POLEKKAD et al., 2021). Além disso, outras características como estrutura molecular, propriedades do filme, estabilidade da emulsificação, propriedades reológicas, tamanho das gotículas, teor de água, rendimento, eficiência, distribuição de tamanho de partícula e densidade aparente são fatores decisivos que afetam as características das micropartículas (LU et al., 2021).

Os materiais de parede podem consistir em carboidratos, proteínas ou polissacarídeos de baixo peso molecular (VANDEN BRABER et al., 2020) e entre os vários materiais utilizados nas técnicas de microencapsulação, goma arábica, maltodextrina e amido modificado são os materiais de revestimento mais empregados (RAVICHAI; MUANGRAT, 2019). A proteção do material do núcleo microencapsulado, ao passar pelo estômago, pode ser aumentada usando materiais de parede insolúveis em água ou tratamentos após microencapsulação para diminuir a solubilidade (ARSLAN et al., 2015). A seleção da técnica de microencapsulação e o material de parede são interdependentes. Portanto, com base no agente ou método de encapsulamento aplicado, faz-se a seleção de ambos.

Geralmente, os sistemas de parede de microencapsulação podem ser divididos em duas categorias: material de parede do tipo único (carboidratos, proteínas ou gomas hidrofílicas) e materiais de parede do tipo misto (mais de um material/polímero associado). Os mecanismos de microencapsulação por trás da formação da estrutura parede/núcleo são diferentes de acordo com a classificação dos materiais da parede, bem como os componentes do núcleo (LU et al., 2021).

Dentre os materiais de parede mais utilizados, encontram-se a gelatina que pertence ao grupo das proteínas. É um material biodegradável derivado do colágeno que pode ser obtido a partir da hidrólise ácida ou alcalina. Na extração ácida, a gelatina obtida é classificada como Tipo A, apresenta ponto isoelétrico entre pH 7,0 e 9,0. Já na hidrólise alcalina, o produto é

denominado gelatina Tipo B e apresenta ponto isoelétrico entre pH 4,7 e 5,5 (LU et al., 2021; MO et al., 2021).

A gelatina ainda é a principal opção comercial utilizada como material de parede devido à sua excelente solubilidade em água, capacidade de emulsificação, espessamento e alta atividade de reticulação, que se deve à presença de grupos amino primário (JAFARZADEH et al., 2021). A estrutura polipeptídica da molécula de gelatina facilita suas interações com outros polímeros carregados com carga elétrica oposta, o que a torna um importante material de parede (ZHANG; SIMPSON; DUMONT, 2018). Entretanto, as soluções encapsulantes contendo gelatina, mesmo em baixas concentrações, apresentam alta viscosidade podendo acarretar problemas durante a secagem no *spray dryer*.

Outro material de parede muito utilizado por *spray drying* é a maltodextrina devido ao seu baixo custo, baixa viscosidade em alta concentração de sólidos, sabor neutro, boa proteção contra oxidação e baixa capacidade de emulsificação (KARRAR et al., 2021). Esse material de parede consiste em um amido hidrolisado produzido a partir da hidrólise parcial de amido com ácido ou enzimas, constituído por unidades D-glicose unidas por ligações glicosídicas (1,4). As maltodextrinas podem ser classificadas pelo seu grau de hidrólise, expresso em dextrose equivalente (DE), que é a porcentagem de açúcares redutores calculada como glicose em relação ao seu peso seco de amido (LABUSCHAGNE, 2018).

Gomas como a goma carragena, goma xantana e goma guar também são utilizadas na microencapsulação por *spray drying*. As carragenas são polissacarídeos neutros extraídos de algas vermelhas (Rhodophyta) em três tipos distintos de carragenina comercial (κ -, ι - e λ -carragenina) apresentando diferenças em suas estruturas e propriedades químicas (CHAKRABORTY, 2017). A goma xantana, também muito utilizada como material de parede, consiste em um polissacarídeo extracelular de alto peso molecular que é produzido através da fermentação da bactéria *Xanthomonas campestris* (CAI et al., 2019). Possui características de interesse, tais como ser um material incolor, insípido, inodoro e por apresentar estabilidade em altas temperaturas e em condições ácidas (JO; BAK; YOO, 2018).

O rendimento e eficiência da microencapsulação são parâmetros importantes para verificar se os materiais de parede utilizados são adequados, pois estes interferem diretamente no grau de incorporação do material do núcleo (encapsulado) e a qualidade do produto. Os materiais de parede utilizados para microencapsulação de probióticos devem apresentar características que proporcionam maior estabilidade do composto, segurança para o consumo, alta solubilidade, baixa higroscopicidade, fácil disponibilidade e ter baixo custo viabilizando a aplicação na indústria.

Durante a última década, observa-se uma tendência de utilizar novos tipos de biopolímeros como materiais de parede, sendo complementares ou substitutos completos de materiais utilizados convencionalmente. Essa abordagem oferece propriedades “*clean label*”, “*green label*” e promotoras de saúde para as microcápsulas obtidas (SAMBORSKA et al., 2021). Dessa forma, pesquisas estão sendo realizadas a fim de encontrar compostos alternativos e de baixo custo para o desenvolvimento desses materiais que podem ser considerados “naturais” e utilizados na microencapsulação afim de aumentar a estabilidade e a sobrevivência de microrganismos probióticos (ABDOLHOSSEINZADEH et al., 2018; POURJAFAR et al., 2018; RAMOS et al., 2018; SAMBORSKA et al., 2021).

4. Referências bibliográficas

ABDOLHOSSEINZADEH, E.; DEHNAD, A. R.; POURJAFAR, H.; HOMAYOUNI, A.; AN-SARI, F. The production of probiotic scallion yogurt: viability of *Lactobacillus acidophilus* freely and microencapsulated in the product. **Carpathian Journal of Food Science & Technology**. 2018.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* with different wall materials by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 685-690, 2015.

ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. Single and double layered microencapsulation of probiotics by Spray Drying and Spray Chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160–169, 2017.

BAKR, H. A.; HASSAN, M. S.; GIADINIS, N. D.; PANOUSIS, N.; OSTOJIĆ- ANDRIĆ, D.; ABD, E. T. M.; BOJKOVSKI, J. Effect of *Saccharomyces cerevisiae* supplementation on health and performance of dairy cows during transition and early lactation period. **Biotechnology in Animal Husbandry**, v. 31, n. 3, p. 349-364, 2015.

BAUTISTA-GALLEGO, J.; FERROCINO, I.; BOTTA, C.; ERCOLINI, D.; COCOLIN, L.; RANTSIOU, K. Probiotic potential of a *Lactobacillus rhamnosus* cheese isolate and its effect on the fecal microbiota of healthy volunteers. **Food Research International**, v. 119, p. 305–314, 2019.

BERNUCCI, B. S. P.; LOURES, C. M. G.; LOPES, S. C. A.; OLIVEIRA, M. C.; SABINO, A. P.; VILELA, J. M. C.; ANDRADE, M. S.; LACERDA, I. C.; NICOLI, J. R.; OLIVEIRA, E. S. Effect of microencapsulation conditions on the viability and functionality of *Bifidobacterium longum* 51A. **LWT - Food Science and Technology**, v. 80, p. 341–347, 2017.

CAI, X.; DU, X.; CUI, D.; WANG, X.; YANG, Z.; ZHU, G. Improvement of stability of blueberry anthocyanins by carboxymethyl starch/xanthan gum combinations microencapsulation. **Food Hydrocoll**, v. 1, n.91, p. 238–245, 2019.

CARVALHO, I. T.; ESTEVINHO, B. N.; SANTOS, L. Application of microencapsulated essential oils in cosmetic and personal healthcare products – a review. **International Journal of Cosmetic Science**, v. 38, n. 2, p. 109–119, 2016.

CHAKRABORTY, S. Carrageenan for encapsulation and immobilization of flavor, fragrance, probiotics, and enzymes: A review. **Journal of Carbohydrate Chemistry**, v. 36, n. 1, p. 1-19, 2017.

DE ALMADA, C. N.; ALMADA, C. N.; MARTINEZ, R. C. R.; SANT'ANA, A. S. Paraprobiotics: Evidences on their ability to modify biological responses, inactivation methods and perspectives on their application in foods. **Trends in Food Science & Technology**, v. 58, p. 96–114, 2016.

DE PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of Foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27–39, 2016.

DING, W. K.; 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.

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

ESTEVINHO, B.N.; MOTA, R.; LEITE, J.P.; TAMAGNINI, P.; GALES, L.; ROCHA, F. Application of a cyanobacterial extracellular polymeric substance in the microencapsulation of vitamin B12. **Powder Technology**, v. 1, n. 343, p. 644–651, 2019.

FIGUEIREDO, A. J.; LAGO, A. M. T.; MAR, J. M.; SILVA, L. S.; SANCHES, E. A.; SOUZA, T. P.; BEZERRA, J. A.; CAMPELO, P. H.; BOTREL, D. A.; BORGES, S. V. Stability of camu-camu encapsulated with different prebiotic biopolymers. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 100, n. 8, p. 3471-3480, 2020.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food research international**, v. 40, n. 9, p. 1107-1121, 2007.

GRAND VIEW RESEARCH, 2019. Functional Foods Market Size, Growth & Trends | Industry Report, 2025 <https://www.grandviewresearch.com/industryanalysis/functional-food-market> (accessed Apr 14, 2020).

HILL, C.; GUARNER, F.; REID, G.; GIBSON, G. R.; MERENSTEIN, D. J.; POT, B.; MORELLI, L.; CANANI, R. B.; FLINT, H. J.; SALMINEN, S.; CALDER, P. C.; SANDERS, M. E. 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, n. 8, p. 506–514, 2014.

JAFARZADEH, S.; NAFCHI, A. M.; SALEHABADI, A.; OLADZAD-ABBASABADI, N.; JAFARI, S. M. Application of bio-nanocomposite films and edible coatings for extending the shelf life of fresh fruits and vegetables. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 291, 102405, 2021.

JO, W.; BAK, J. H.; YOO, B. Rheological characterizations of concentrated binary gum mixtures with xanthan gum and galactomannans. **International Journal of Biological Macromolecules**, 114, 263-269, 2018.

KARRAR, E.; MAHDI, A. A.; SHETH, S.; AHMED, I. A. M.; MANZOOR, M. F.; WEI, W.; WANG, X. Effect of maltodextrin combination with gum arabic and whey protein isolate on

the microencapsulation of gurum seed oil using a spray-drying method. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 171, p. 208-216, 2021.

LABUSCHAGNE, P. Impact of wall material physicochemical characteristics on the stability of encapsulated phytochemicals: A review. **Food Research International**, v. 107, p. 227-247, 2018.

LI, K.; WANG, B.; WANG, W.; LIU, G.; GE, W.; ZHANG, M.; YUE, B.; KONG, M. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, p. 1-8, 2019.

LOPES, R. DE C. S. O.; DE LIMA, S. L. S.; DA SILVA, B. P.; TOLEDO, R. C. L.; MOREIRA, M. E. DE C.; ANUNCIÇÃO, P. C.; WALTER, E. H. M.; CARVALHO, C. W. P.; QUEIROZ, V. A. V.; RIBEIRO, A. Q.; MARTINO, H. S. D. Evaluation of the health benefits of consumption of extruded tannin sorghum with unfermented probiotic milk in individuals with chronic kidney disease. **Food Research International**, v. 107, p. 629–638, 2018.

LU, W.; YANG, X.; SHEN, J.; LI, Z.; TAN, S.; LIU, W.; CHENG, Z. Choosing the appropriate wall materials for spray drying microencapsulation of natural bioactive ingredients: Taking phenolic compounds as examples. **Powder Technology**, v. 1, n. 394, p. 562–574, 2021.

LUCAS, J.; RALAIVAO, M.; ESTEVINHO, B. N.; ROCHA, F. A new approach for the microencapsulation of curcumin by a Spray Drying method, in order to value food products. **Powder Technology**, v. 362, p. 428–435, 2020.

MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; LEITE JÚNIOR, B. R. C. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 540-548, 2016.

MEIRA, Q. G. S.; MAGNANI, M.; DE MEDEIROS JÚNIOR, F. C.; QUEIROGA, R. C. R. E.; MADRUGA, M. S.; GULLÓN, B.; GOMES, A. M. P.; PINTADO, M. M. E.; DE SOUZA, E. L. Effects of added *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* probiotics on the

quality characteristics of goat ricotta and their survival under simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 76, p. 828-838, 2015.

MO, X.; PENG, X.; LIANG, X.; FANG, S.; XIE, H.; CHEN, J.; MENG, Y. Development of antifungal gelatin-based nanocomposite films functionalized with natamycin-loaded zein/casein nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 113, 106506, 2021.

NAZZARO, F.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R.; SADA, A.; ORLANDO, P. Fermentative ability of alginate-prebiotic encapsulated *Lactobacillus acidophilus* and survival under simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Functional Foods**, v. 1, n. 3, p. 319–323, 2009.

PECH-CANUL, A. DE LA C.; ORTEGA, D.; GARCÍA-TRIANA, A.; GONZÁLEZ-SILVA, N.; SOLIS-OVIEDO, R. L. A brief review of edible coating materials for the microencapsulation of probiotics. **Coatings**, v. 10, n. 3, p. 197, 2020.

PIMENTEL, T. C.; KLOSOSKI, S. J.; ROSSET, M.; BARÃO, C. E.; MARCOLINO, V. A. Fruit juices as probiotic foods. In *Sports and Energy Drinks*; Elsevier, 2019; p. 483–513.

POLEKKAD, A., FRANKLIN, M. E. E., PUSHPADASS, H. A., BATTULA, S. N., RAO, S. B. N., PAL, D. T. Microencapsulation of zinc by spray-drying: Characterisation and fortification. **Powder Technology**, v. 1, n. 381, p. 1–16, 2021.

POURJAFAR, H.; NOORI, N.; GANDOMI, H.; BASTI, A. A.; ANSARI, F. Stability and efficiency of double-coated beads containing *Lactobacillus acidophilus* obtained from the calcium alginate-chitosan and eudragits100 nanoparticles microencapsulation. **International Journal of Probiotics & Prebiotics**, v. 18, p. 77-83, 2018.

RADOSAVLJEVIĆ, M.; LEVIĆ, S.; PEJIN, J.; MOJOVIĆ, L.; NEDOVIĆ, V. (2022). Encapsulation technology of lactic acid bacteria in food fermentation. In *Lactic Acid Bacteria in Food Biotechnology* (pp. 319-347). Elsevier.

RAMOS, P. E.; CERQUEIRA, M. A.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 58, p. 1864-1877, 2018.

RAVICHAI, K.; MUANGRAT, R. Effect of different coating materials on freeze-drying encapsulation of bioactive compounds from fermented tea leaf wastewater. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 43, n. 10, p. e14145, 2019.

REALE, A.; DI RENZO, T.; COPPOLA, R. Factors affecting viability of selected probiotics during cheese-making of pasta filata dairy products obtained by direct-to-vat inoculation system. **LWT - Food Science and Technology**, v. 116, p. 1-8, 2019.

SAMBORSKA, K.; BOOSTANI, S.; GERANPOUR, M.; HOSSEINI, H.; DIMA, C.; KHOSHNOUDI-NIA, S.; ROSTAMABADI, H.; FALSAFI, S. R.; SHADDEL, R.; AKBARI-ALAVI-JEH, S.; JAFARI, S. M. Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. **Trends in Food Science & Technology**, v. 108, p. 297-325, 2021.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology progress**, v. 23, n. 2, p. 302-315, 2007.

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

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.

VANDEN BRABER, N. L.; DÍAZ VERGARA, L. I.; ROSSI, Y. E.; AMINAHUEL, C. A.; MAURI, A. N.; CAVAGLIERI, L. R.; MONTENEGRO, M. A. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 118, p. 1-8, 2020.

ZHANG, Y.; SIMPSON, B. K.; DUMONT, M. J. Effect of beeswax and carnauba wax addition on properties of gelatin films: A comparative study. **Food Bioscience**, v. 26, p. 88-95, 2018.

CAPÍTULO 2

Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, *in vitro* release behavior, storage stability and physicochemical properties

Trabalho publicado na revista *Food Research International*. Costa, N.A.; Silveira, L.R.; Amaral, E.P.; Pereira, G.C.; Paula, D.A.; Vieira, E.N.R.; Martins, E.M.F.; Stringheta, P.C.; Leite Júnior, B.R.C.; Ramos, A.M. (2023). Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, *in vitro* release behavior, storage stability and physicochemical properties. **Food Research International**, 112367, 2023.

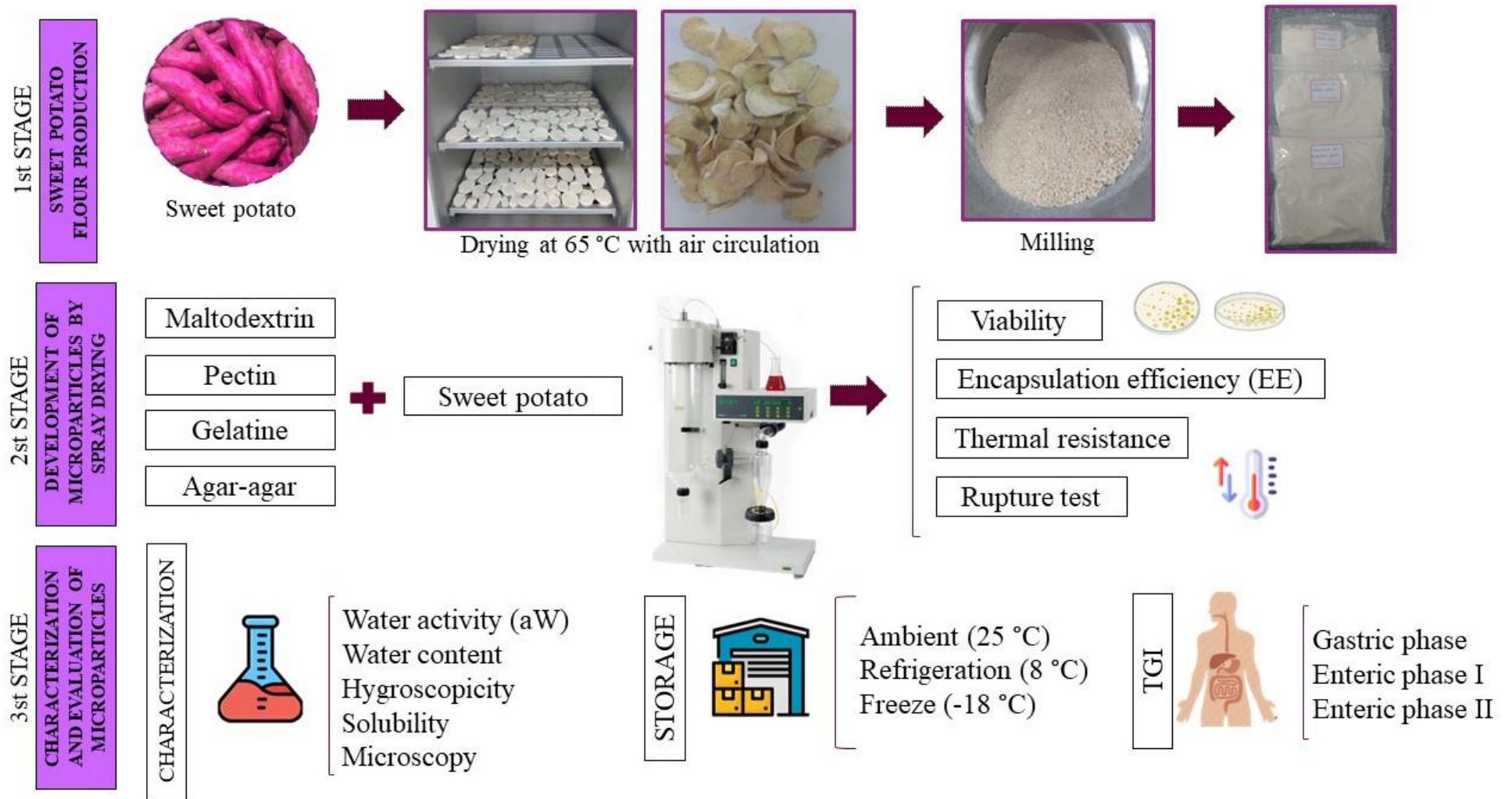
CAPÍTULO 2

Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, *in vitro* release behavior, storage stability and physicochemical properties

Abstract

Different plant products and co-products have been studied as wall materials for the microencapsulation of probiotics due to the need for new low-cost, abundant, and natural materials. In this study, microparticles were developed by spray drying using different combinations of conventional materials such as maltodextrin, pectin, gelatin, and agar-agar with unconventional materials such as sweet potato flour to microencapsulate *Lactiplantibacillus plantarum*. The microparticles obtained were evaluated for encapsulation efficiency, thermal resistance, and rupture test. The most resistant microparticles were characterized and evaluated for probiotic viability during storage and survival to *in vitro* gastrointestinal conditions. Microparticles A (10 % maltodextrin, 5 % sweet potato flour, and 1 % pectin) and B (10 % maltodextrin, 4 % sweet potato flour, and 2 % gelatin) showed high thermal resistance (> 59 %) and survival in acidic conditions (> 80%). *L. plantarum* in microparticles A and B remained viable with counts > 6 log CFU.g⁻¹ for 45 days at 8 °C and -18 °C and resisted *in vitro* gastrointestinal conditions after processing with counts of 8.38 and 9.10 log CFU.g⁻¹, respectively. Therefore, the selected microparticles have great potential for application in different products in the food industry, as they promote the protection and distribution of probiotic microorganisms.

Keywords: microencapsulation, spray dryer, *Lactiplantibacillus plantarum*, plant products, thermal resistance, storage, *in vitro* digestion.



1. INTRODUCTION

Probiotics are microorganisms that confer beneficial effects on the host when administered in adequate amounts (Hill et al., 2014). Foods with probiotics have become a subject of great interest to the industry due to the potential health benefits when kept at counts above $6 \log \text{CFU.g}^{-1}$ and consumed regularly (WHO/FAO, 2002).

Extrinsic factors such as temperature, humidity, oxygen as well as some steps in food processing affect the survival of these microorganisms (Sarao & Arora, 2017). Furthermore, the acidic pH of the stomach, bile salts, and digestive enzymes can affect the stability and, subsequently, reduce the viability of probiotic microorganisms (Ester et al., 2019).

An alternative to minimize these damages to probiotics is the microencapsulation technique, which can be defined as a process in which a highly sensitive component is coated with a membrane or semipermeable matrix (Chen et al., 2009; Paula et al., 2019). The food industry seeks microencapsulation as a possibility to stabilize sensitive compounds added during processing steps, being a way to aggregate value to products and differentiate them in the market (Da Silva, de Deus, Fonsenca, Lopes, & Cichoski, 2019).

Spray drying is one of the most used methods in the industry for the microencapsulation of sensitive compounds due to its flexibility to work with different wall materials, low energy consumption, and high production efficiency (Ré, 1998). The process involves the dispersion of the core material in a solution containing the wall material, this dispersion is homogenized and atomized in the drying chamber leading to evaporation of the solvent (Martín, Lara-Villoslada, Ruiz, & Morales, 2015).

Among the wall materials most used in the spray drying microencapsulation technique, water-soluble polymers such as modified starch, whey protein, maltodextrin, Arabic gum, and their combinations stand out to maintain the stability of the probiotic during drying (Arslan-Tontul, & Erbas, 2017). Research is being carried out to find new alternative and low-cost compounds for the development of wall materials that can be considered “naturals” and used in microencapsulation to increase the stability of phytochemicals such as phenolic compounds (Samborska et al., 2021; Jafari et al., 2022) and survival of the probiotic microorganism (Ramos, Cerqueira, Teixeira & Vicente, 2018). Among the materials obtained from plant sources, soy isolate protein (Chen, Liu, & Tang, 2020); carrot fiber (Nishad, Mir, & Walia, 2019); and by-products of orange juice (Kaderides, & Goula, 2019) have been studied. Sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) has become a relevant research topic in recent years due to its nutritional and functional properties (Alam, 2021; Zhu, Mu, Ma, Sun, & Zhao, 2022; Sun et al.,

2022; Liu, Zhou, Li, Tian, & Zhang, 2021). However, there is a gap in the literature regarding studies that evaluated the use of this material to produce probiotic microparticles using the spray dryer technique.

Therefore, the present study aimed to develop and characterize microparticles containing *Lactiplantibacillus plantarum* using sweet potato flour as a wall material combined with conventional materials and to evaluate the microparticles obtained for resistance to heat treatment and survival of the probiotic to gastrointestinal conditions simulated *in vitro*.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Materials

A culture of *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® was purchased from Jamieson™ Natural Sources (Canada). The sweet potato was purchased at a local supermarket in the city of Viçosa (Brazil) and the tubers with the greatest homogeneity in size, maturity and without physical defects such as cracks were selected. Maltodextrin was purchased from Gemacom Tech (Brazil), gelatin was purchased from Gelita (Germany), and citrus pectin and agar-agar were purchased from Adicel (Brazil). Other chemicals and enzymes used were: NaOH e NaH₂PO₄ · 2H₂O (Synth, São Paulo, Brazil), HCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), NaCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), Ca₃CO (QEEL, São Paulo, Brazil), pepsin isolated from the swine gastric mucosa (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), lipase from *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), pancreatin from swine pancreas (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), bovine bile (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), Man-Rogosa-Sharpe culture medium (MRS; Kasvi, São Paulo, Brazil), MRS broth (TM Media, São Paulo, Brazil), calcium carbonate (QEEL, São Paulo, Brazil) and bromocresol purple (Êxodo Científica, São Paulo, Brazil).

2.2 Cultivation of the microorganism and growth conditions

The freeze-dried probiotic culture of *Lactiplantibacillus plantarum* LP299V® (Jamieson™ Natural Sources) with 10 log CFU.g⁻¹ was activated according to Paula et al. (2019) with modifications, being cultivated twice in Man Rogosa and Sharp broth (MRS) and incubated at 37 °C for 48 h. Subsequently, the broth was centrifuged at 5000 rpm for 10 min at 8 °C. The supernatant was removed, and the pellet was resuspended twice in a sterile saline solution (0.85 %), followed by centrifugation at 5000 rpm for 10 minutes at 8 °C. The pellet obtained showed counts around 12 log CFU.g⁻¹, similar counts were also found by Rosolen et al. (2019) and Azizi et al. (2021). Then, the pellet was stored in sterile centrifuge tubes and kept under refrigeration at 8 °C until the use.

2.3 Development of microcapsules

To produce microcapsules, the wall materials used were sweet potato flour, maltodextrin, gelatin, pectin, and agar-agar. These materials were chosen considering the cost, availability, and ability to protect and maintain probiotic viability, as well as the inclusion of "green" wall materials obtained from plant sources, such as sweet potato flour.

2.3.1 Preparation of sweet potato flour used as wall material

Sweet potato flour was prepared according to Simanca-Sotelo, De Paula, Domínguez-Anaya, Pastrana-Puche, and Álvarez-Badel (2021) with modifications. Potatoes were immersed in a solution containing 100 mg/L of active chlorine for 10 minutes. Subsequently, they were rinsed in the same solution but with a concentration of 10 mg/L of active chlorine, and then the tubers were peeled and cut into thin slices that were immersed in a 2 % citric acid solution for 5 minutes to avoid dimming. The slices were distributed in the trays of the drying oven with circulation and renewal air (model SSDcr-85L, Solidsteel, Piracicaba, São Paulo) and remained for 8 hours at 65 °C, to reach a water content < 10%. Posteriorly, the dried slices were ground in a basic analytical mill (IKA® A11 B S32, 180 W). The flour was stored in polypropylene packages that were sealed in a sealer (Selovac model Jumbo PLUS) and stored in a cool and ventilated place until use.

2.3.2 Definition of formulations and preparation of the microencapsulating solutions

The concentrations of each wall material to produce microcapsules were defined in pretests (data not shown) by assessing the solubility and viscosity of the material after thermal treatment (121 °C/15 minutes). The treatments were defined as follows:

- Microparticle A: 10 % maltodextrin, 5 % sweet potato flour and 1 % pectin.
- Microparticle B: 10 % maltodextrin, 4 % sweet potato flour and 2 % gelatin.
- Microparticle C: 12.5 % maltodextrin, 3 % sweet potato flour and 0.5 % agar-agar.
- Microparticle D: 14 % maltodextrin, 2 % sweet potato flour.

In detail, to produce microencapsulating solutions, the wall materials (A, B, C, and D) were dissolved in distilled water and mixed at 500 rpm for 1 hour using a magnetic stirrer (Fisatom, Brazil, model 752A). Then, the solutions were filtered through a polyester fabric, autoclaved at 121 °C for 15 minutes and cooled to 25 °C. Subsequently, the *L. plantarum* cell suspension (prepared as described in item 2.2) was added to each encapsulation solution at a

concentration of 5 % and mixed on a shaker table (Fisatom, Brazil, model 752A) at 350 rpm for 10 minutes at 25 °C.

2.3.3 Production of *L. plantarum* microcapsules by spray dryer

To obtain the microparticles, the encapsulant solutions were dried in a benchtop Spray Dryer (BÜCHI® B-191), according to Braber et al. (2020) with modifications. The operating parameters used for drying were an inlet temperature of 130 °C and an outlet temperature of 57 °C, with a feed flow of 0.25 L/h⁻¹ and a drying airflow of 3.00 m³/min⁻¹. After drying, the powdered microparticles were stored in sterile vials.

2.4 Evaluation of resistance of the microparticles produced

2.4.1 Viability

One gram of microparticles was reconstituted in 9 ml of saline solution (0.85 %), obtaining a 10⁻¹ dilution. The suspension was kept for 5 minutes at 25 °C under agitation on a vortex mixer (KASVI® basic K45-2810) to release the probiotic cells (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). Then, viability was determined by counting lactic acid bacteria, according to Richter & Vedamuthu (2001) using da Man, Rogosa and Sharpe agar (MRS, Merck, Darmstadt, Germany).

2.4.2 Encapsulation efficiency (EE)

The encapsulation efficiency (EE) is the survival rate of the microorganism during the microencapsulation process, calculated according to Eq. (1), as proposed by Annan, Borza, & Hansen (2008):

$$EE(\%) = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Where:

N: is the number of viable cells (log CFU.g⁻¹) released from the microparticles;

N₀: number of free viable cells (log CFU.g⁻¹) in the feed solution before the encapsulation process.

2.4.3 Thermal resistance of microparticles

The resistance of the free cell (control) and microparticles were evaluated by dissolving 1 g of the samples in 9 ml of saline solution (0.85 %) and then subjected to thermal conditions

of 63 °C for 30 minutes (come-up time: 3.57 min), 72 °C for 15 s (come-up time: 2.01 min) and 80 °C for 2 minutes (come-up time: 1.43 min), followed by immediate cooling until reaching room temperature (Zhang, Lin, & Zhong, 2015). According to Pitarch et al. (2021), the come-up time can be defined as the time required for the samples to reach the temperature defined in the heat treatment. This factor is directly linked to the energy transfer rate, being lower in equipment with higher efficiency (Santos, Leite Júnior, & Tribst, 2022). In this study, for heat treatments at 72 °C and 80 °C, higher heating rates were used to simulate continuous processes. The viable cell count was performed using the plate counting method described in item 2.4.1.

2.4.4 Microparticle rupture test

Two solutions were used to determine microparticle disruption: PBS buffer solution (100 mM, pH 7.4) and 0.5 % saline (mv^{-1}) pH 2.0 containing 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ pepsin. For this purpose, 0.1 g of the sample was resuspended in 1 mL of each solution, mixed by vortex, and maintained on a shaker at 150 rpm at 37 °C for 120 min (Rosolen et al., 2019). The viable cell count was performed using the plate counting method described in item 2.4.1.

2.5 Characterization of selected microparticles

The treatments (microcapsules A and B) that showed the highest encapsulation efficiency, thermal resistance, and acid pH resistance were characterized in terms of physicochemical properties such as water activity, water content, hygroscopicity, solubility. The microparticles morphology, probiotic viability at different storage temperatures, and *in vitro* gastrointestinal simulation were also performed.

2.5.1 Water activity

Water activity was determined using a water activity meter. (Aqualab 4TE, Decágono Devices, Pullman, Washington, EUA) at 25 °C.

2.5.2 Water Content

The water content of the microparticles was gravimetrically determined with heat (AOAC, 2000). For this analysis, 2 g of the microparticles were weighed and spread evenly into dried metal capsules and dried at 105 °C (± 2 °C) until they reached a constant mass.

2.5.3 Hygroscopicity

Hygroscopicity of the samples was measured according to the method described by Cai & Corke (2000). About 1.0 g of microparticles were placed in a Petri dish and stored in a container with a NaCl saturated solution (UR 75.29 %) for one week. Hygroscopicity was expressed as g of water absorbed per 100 g of sample (%).

2.5.4 Solubility

One gram of microparticles was transferred to a Falcon tube containing 100 mL of distilled water. The sample was shaken until complete dispersion and centrifuged at 3000 rpm for 5 min. A 25 mL aliquot of the supernatant was transferred to a dry, weighed aluminum plate, which was kept at 105 °C to remove moisture (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, & Cal-Vidal, 2005). Then the solubility (%) was calculated by weight difference.

2.5.5 Morphology and average particle size

Morphology of the microparticles was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (TM3000, HITACHI®), with 800x magnification. The average particle size was determined using ImageJ 1.50i software (Pitigraisorn, Srichaisupakit, Wongpadungkiat, & Wongsasulak, 2017).

2.5.6 Viability of the probiotic in microparticles at different storage temperatures

The microparticles were stored at room temperature (25 °C), under refrigeration (8 °C), and under freezing (−18 °C) for 45 days. Viable cell counts were evaluated at 0, 9, 18, 27, 36, and 45 days of storage according to item 2.4.1., and the results were expressed as log CFU·g⁻¹.

2.5.7 *In vitro* simulation of gastrointestinal conditions

After processing of the microparticles containing the probiotic microorganism (A and B), the methodology described by Bedani, Rossi, & Saad (2013) was used to simulate the 3 phases: gastric, enteric I and enteric II.

In the gastric phase, 10 mL aliquots of the 10⁻¹ dilution of microparticles were transferred to sterile 100 mL flasks where the pH was adjusted to 2.3–2.6 with 1 N HCl. Subsequently, porcine mucosa from porcine stomach (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) and lipase *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) were added to the concentration of 3 g·L⁻¹ and 0.9 mg·L⁻¹, respectively. The flasks were incubated at 37 °C for 2 h with shaking at 150 rpm in a SOLAB shaker incubator (SL 222).

In enteric phase I, the pH was adjusted to 5.4–5.7, using alkaline solution (pH 12, 1 N NaOH and NaH₂PO₄·2H₂O), also containing bovine bile (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) and pancreatic swine pancreatin (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil) at concentrations of 10 g·L⁻¹ and 1 g·L⁻¹, respectively. The vials were re-incubated at 37 °C for 2 h with shaking.

In enteric phase II, the pH of the enteric phase I system was elevated to 6.8–7.2 using the same alkaline solution. Bovine bile and pancreatin were then added at concentrations of 10 g·L⁻¹ and 1 g·L⁻¹, respectively. The systems were again incubated at 37 °C for 2 h with shaking, totaling 6 h of test.

The counting of surviving cells after each phase of the gastrointestinal simulation was performed by removing 1 mL of aliquots that were diluted in saline. The count of probiotic bacteria was performed as described in item 2.4.1, but the release mechanism was not applied (stirring for 5 minutes) precisely to verify the ability of the microparticle to break and release the probiotic.

2.6 Statistical analysis

The data were submitted to analysis of variance (ANOVA) using the F test followed by Tukey's means comparison test at a level of 5 % significance. For this, the software RStudio[®], version 1.4.1717 was used.

3. RESULTS AND DISCUSSION

3.1 Resistance of the microparticles produced

3.1.1 Viability e encapsulation efficiency (EE)

The viability of the probiotic cells before and after drying was observed and the encapsulation efficiency (%) was calculated (Table 1). Microparticles A and B showed higher *L. plantarum* counts after spray drying compared to microparticles C and D ($p < 0.05$). Consequently, these microcapsules showed higher values of encapsulation efficiency ($p < 0.05$). However, regardless of the microcapsule used, the EE values obtained ($> 85\%$) demonstrate a high survival of the microorganism after drying.

The high survival indices obtained in the present work may be related to both the encapsulating matrices used and the concentration of the wall material (16 % m/v), since a solids concentration of around 20 % in the feed solution is one of the best conditions to ensure high viability after drying (Huang et al., 2017).

Table 1. Count of *Lactoplantibacillus plantarum* and encapsulation efficiency (%) after spray drying.

Microparticle	Before drying (log CFU.g ⁻¹)	After drying (log CFU.g ⁻¹)	EE (%)
A	10.14 ± 0.86 ^a	9.60 ± 0.29 ^a	94.67 ± 1.21 ^a
B	10.03 ± 0.47 ^a	9.41 ± 0.08 ^a	93.82 ± 0.89 ^a
C	9.56 ± 0.12 ^b	8.17 ± 0.34 ^c	85.46 ± 0.64 ^b
D	10.09 ± 0.25 ^a	8.69 ± 0.67 ^b	86.12 ± 0.93 ^b

EE: encapsulation efficiency. *Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey's test at 5% probability. A: microparticle containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; B: microparticle containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; C: microparticle containing 12.5% maltodextrin, 3% sweet potato flour, 0.5% agar-agar and 5% *L. plantarum* pellet; D: microparticle containing 14% maltodextrin, 2% sweet potato flour and 5% *L. plantarum* pellet.

Among the treatments evaluated, microparticles A and B containing higher amounts of sweet potato flour, 5 % and 4 %, respectively, and combined with gelatin and pectin showed high viability of *L. Plantarum* after drying. Sweet potato is composed of about 50-80 % starch (Zhu, Yang, Cai, Bertoft, & Corke, 2011). From the total starch content, about 25 % correspond to resistant starch fractions (Trung et al., 2017). However, the resistant starch content can increase depending on the treatment used in the vegetable. Some studies have shown that after heat treatment, there is an increase in the resistant starch content present in sweet potatoes, with concentrations ranging from 11,44 to 39,30 % (Huang et.al., 2016; Trung et al., 2017; Na et al., 2020; Ye, Li, & Zhao, 2020). According to the results (Table 1), this new wall material did not affect the encapsulation efficiency and maintained the viability of *L. plantarum* above 8 log CFU.g⁻¹ after drying, which is a promising result. Results from other works shows the importance of the presence of resistant starch on probiotic viability. To exemplify, Nunes et al. (2018) evaluated different wall materials to microencapsulate *Lactobacillus acidophilus* by spray drying and microparticles with the addition of resistant starch (hi maize) and with inulin showed the best viability and provided the highest survival rates of 94.26 %. and 93.12 %, respectively.

3.1.2 Thermal resistance of microparticles

The viability of the probiotic microorganisms was performed before and after three different heat treatments and the survival rate was calculated (Figure 1). In low temperature and long time (LTLT) pasteurization (63 °C for 30 min), the survival rate of microparticles A and B was higher compared to free cells and microparticle D (p < 0.05). Among those evaluated, it is worth highlighting the microparticle A, which showed a thermal survival of 66.84 % of *L.*

plantarum. The temperature of 63 °C for a long period is capable of unfolding the structural order of macromolecules, such as nucleic acids and proteins of bacterial cells, breaking bonds and destroying monomer units causing cell death (Ashwar, Gani, Gani, Shah, & Masoodi, 2018).

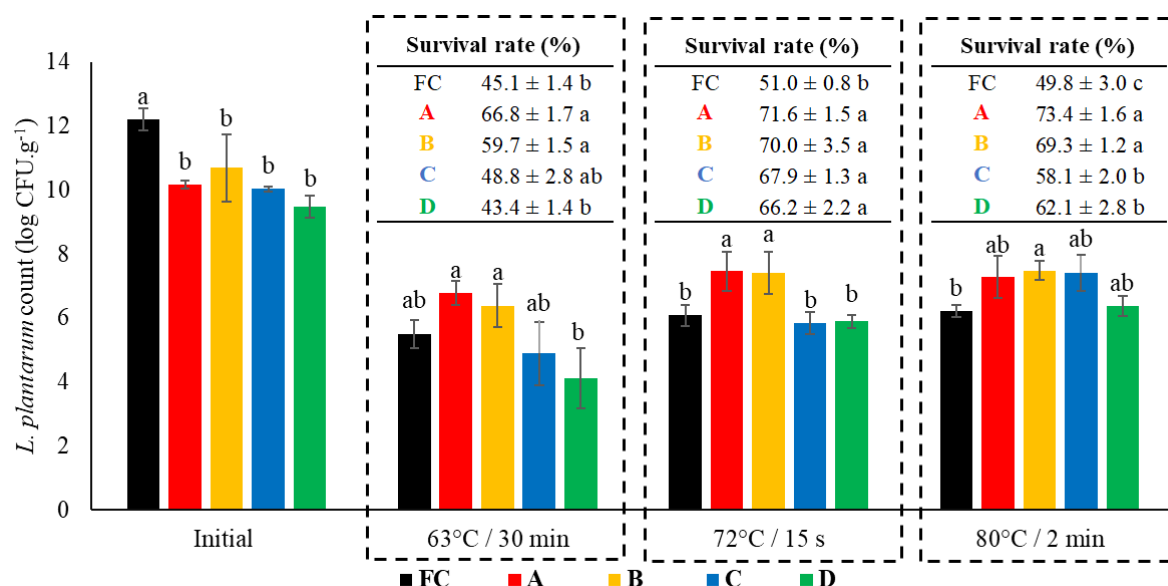


Figure 1. Thermal resistance of microparticles containing *L. plantarum* in different thermal treatments. *Means followed by the same letter in the column (survival rate - %) or in the same thermal process (*L. plantarum* count – log CFU.g⁻¹) do not differ by Tukey's test at 5% probability. Free cell composed of 100% *L. plantarum* pellet (■); Microparticle A (■): containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle B (■): containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% gelatin and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle C (■): containing 12.5% maltodextrin, 3% sweet potato flour, 0.5% agar-agar and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle D (■): containing 14% maltodextrin, 2% sweet potato flour and 5% *L. plantarum* pellet.

In the high temperature and short time (HTST) pasteurization (72 °C for 15 s), all microparticles showed a higher survival rate compared to the free cells, which showed a reduction in viability ($p < 0.05$). In the heat treatment of 80 °C for 2 min, the microparticles A and B showed a higher survival rate compared to other samples ($p < 0.05$).

Based on the survival rates, it is possible to observe similar values for the different samples regardless of the temperature applied. This similarity is due to heat death at the come-up time, as well as heat death during the applied time/temperature binomial. In thermal processes at lower temperatures, the come-up time was higher (as presented in the material and

methods section), since the come-up time was simulated in small (LTLT) or large (HTST) scale equipment.

In all binomials evaluated, microparticles A and B showed the highest survival rates of *L. plantarum*, this characteristic is directly related to the type and concentration of the wall material used. In the preparation of microparticles A and B, the highest concentrations of sweet potato flour were added, 5 % and 4 % respectively, which has starch as the main component, especially resistant starch after microcapsule processing (Trung et al., 2017). Thus, these results can also be linked to the higher content of resistant starch present in these microcapsules. According to the literature, resistant starch can create a protective barrier between the microorganism and the external environment (Ashwar et al., 2018; Nunes et al., 2018). Ashwar et al. (2018) encapsulated *Lacticaseibacillus casei*, *Levilactobacillus brevis*, and *Lactoplantibacillus plantarum* with resistant starch through the emulsion method and evaluated the survival of free and microencapsulated *Lactobacillus* exposed to temperatures of 55, 65 and 75 °C for 10 min. Resistant starch microcapsules showed good thermal stability with a reduction of 0.30 log CFU.g⁻¹. However, free cells were sensitive to heat treatment, with a reduction of approximately 6 log CFU.g⁻¹.

The results found are promising to enable the application of probiotic microorganisms at an industrial level, during the processing stages, and even before heat treatment, since the evaluated microparticles were sufficient to maintain the stability of the probiotic under adverse conditions such as high temperature. Furthermore, resistant starch is widely used in the food industry as a raw material due to its characteristics similar to those of dietary fiber, high thermal stability, and health benefits (Sun et al., 2022). In this sense, taking into account the manufacture of food, the application of microparticles A and B can be extremely advantageous, as it was able to maintain the viability of the probiotic in viable amounts to promote benefits even after different heat treatments.

3.1.3 Microparticle rupture test

In the acid condition (pH 2.0), microparticles A, B, and C showed a higher survival rate compared to microparticle D and free cells ($p < 0.05$) (Figure 2). Specifically, microparticles A, B, and C maintained the viability of *L. plantarum* at approximately 80 %. However, the microparticle D and the free cell, when subjected to acidic conditions, showed a survival rate of 54.30 % and 53.33 % of the probiotic microorganism, respectively. On the other hand, under basic conditions (pH 7.4), there was an increase ($p < 0.05$) of *L. plantarum* viability, especially in microparticles A and B. These results suggest that the microorganism was released from the

microcapsules and reacted in different ways depending on the pH of the solution during the two hours of the test. At alkaline pH, possibly the microorganism found favorable conditions to maintain viability and used wall materials (especially from microcapsules A and B) as substrate for growth. Oppositely, at acid pH (2.0), the reduction in microbial count may be correlated with the acid stress conferred by the environmental conditions.

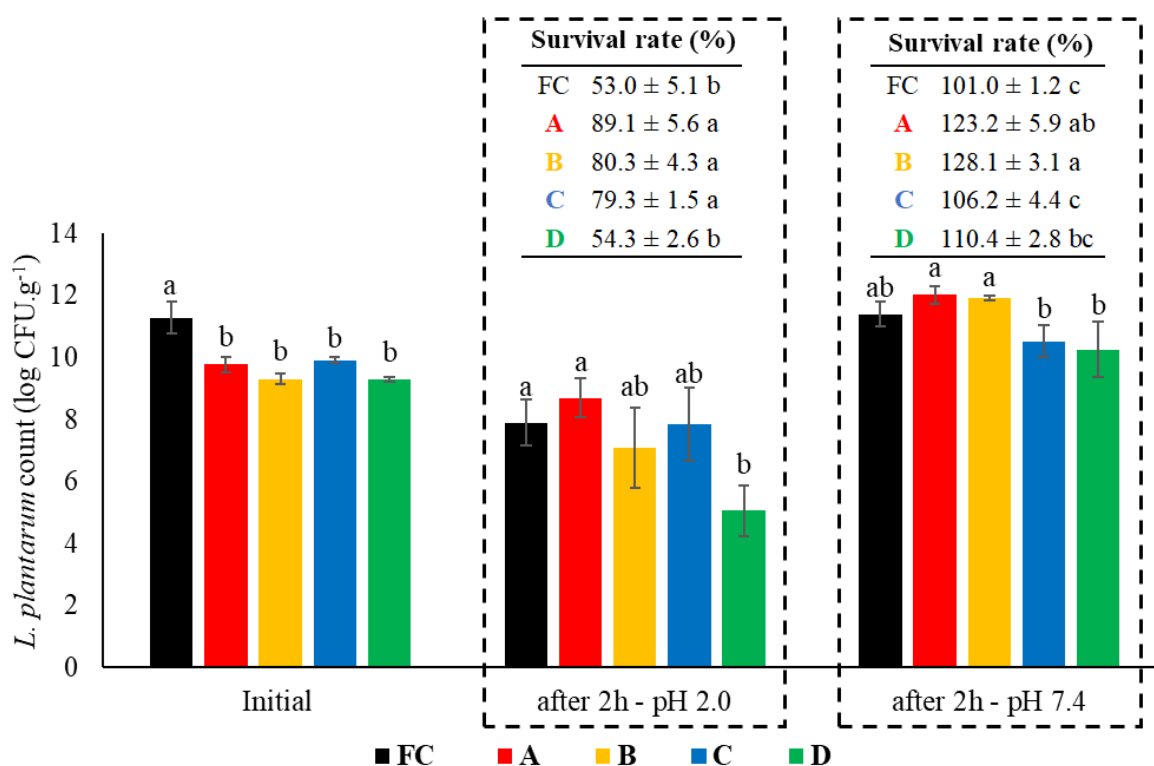


Figure 2. Rupture test of microparticles containing *Lactoplantibacillus plantarum* under different pH conditions. *Means followed by the same letter in the column (survival rate - %) or in the same rupture pH (*L. plantarum* count – log CFU.g⁻¹) do not differ by Tukey's test at 5% probability. Free cell composed of 100% *L. plantarum* pellet (■); Microparticle A (■): containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle B (■): containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% gelatin and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle C (■): containing 12.5% maltodextrin, 3% sweet potato flour, 0.5% agar-agar and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle D (■): containing 14% maltodextrin, 2% sweet potato flour and 5% *L. plantarum* pellet.

3.2 Characterization of selected microcapsules

3.2.1 Water activity, water content, hygroscopicity and solubility

After evaluating the different microparticles, the microparticles A and B were selected due to greater encapsulation efficiency and higher survival rate of the probiotic when submitted to different thermal conditions and acidic pH. The physical properties of powders have direct implications for the quality, useful life, cell viability, storage stability, and protection of probiotic bacteria (Yoha & Moses, 2020). Thus, the results presented in Table 2 refer to the two selected microparticles.

Table 2. Characterization of selected microparticles.

Microparticle	aW	Water content (%)	Hygroscopicity (g.100 g⁻¹)	Solubility (%)
A	0.431 ± 0.003 a	6.23 ± 0.14 a	8.13 ± 0.46 a	77.90 ± 4.39 a
B	0.376 ± 0.001 b	5.28 ± 0.56 b	8.36 ± 0.19 a	79.03 ± 4.95 a

*Means followed by the same letter in the column do not differ by Tukey's test at 5% probability. A: microparticle containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; B: microparticle containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% gelatin and 5% *L. plantarum* pellet.

Although statistically different, the water activity (aW) and water content of microparticles A and B showed similar values with aW ranging from 0.38-0.43 and water content of 5.3-6.2 %, respectively. For powdered products, a water activity of around 0.3 is recommended to promote product stability and ensure its microbiological quality (Baysan, Kabadurmus, Cevikcan, Satoglu, & Durmusoglu, 2019; De Castro-Cislaghi, Carina Dos Reis, Fritzen-Freire, Lorenz, & Sant'Anna, 2012). In addition, for the water content of the microparticles, both are within the range considered ideal for microbial and chemical stability (~6%), prolonging probiotic powders' shelf life (Liao et al., 2017). Thus, the selected microparticles are within the standards for spray-dried products.

According to Rajam & Anandharamakrishnan (2015), the inlet and outlet temperatures of the spray dryer directly influence the water content of the powders, an essential parameter to maintain the stability of dry products and maintain the probiotic viability. Barajas-Álvarez et al. (2022) used different wall materials to microencapsulate *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray dryer (outlet temperature 60 ± 1 °C) and found results similar to the present work, with water content ranging from 5.93-7.41 %. Azizi et al. (2021) evaluated the microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* by different techniques using sesame protein isolate. The microcapsules obtained by the spray dryer technique showed humidity around 6.7 to 7.3 % and greater probiotics survival compared to the lyophilization and electrospray techniques. In general, lower water content and water activity are preferred for better stability of dry products.

However, powders containing probiotic microorganisms with very low water contents (< 2 %) and water activity (<0.1) may affect some cell components, such as the cell membrane, reduce cell metabolism and, consequently, decrease the probiotic viability (Dianawati, Mishra, & Shah, 2016). Therefore, based on these points, the values obtained in this study are within the expected range for adequate microbial viability and microcapsule stability.

Hygroscopicity is a characteristic that depends on the number of hydrophilic groups present in the food structure capable of binding to water molecules that are present in the surrounding air (Šipailienė & Petraitytė, 2018). According to Table 2, there was no difference ($p > 0.05$) in hygroscopicity between microparticles A and B.

The selected microparticles containing *L. plantarum* also showed no difference ($p > 0.05$) in terms of solubility. Both microparticles A and microparticle B presented solubility above 75 %, which is an important characteristic to facilitate the addition of these powders in different food matrices, since a high solubility requires a shorter time to start rehydration of the surface.

3.2.2 Morphology and average particle size of microcapsules

The microparticles showed a spherical shape with irregularity and surface roughness (Figure 3), in addition to various sizes and agglomerates, with superficial fissures, but without rupture of the microcapsule, which confirms its good structural integrity. The different microparticles produced have a spherical shape, with some concavities, which is a typical characteristic of products obtained by spray drying (Fritzen-Freire et al., 2012).

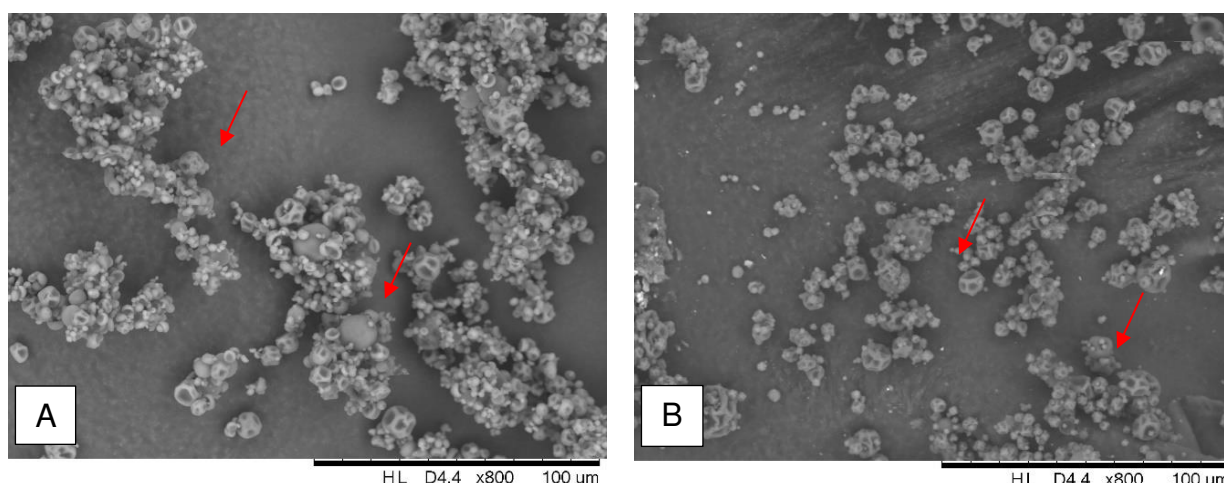


Figure 3. Scanning Electron Microscopy (SEM) images. (A): microparticles A containing 10% maltodextrin, 5 % sweet potato flour, 1 % pectin and 5 % *L. plantarum* pellet; (B): microparticles B containing 10 % maltodextrin, 4 % sweet potato flour, 2 % gelatin and 5 % *L. plantarum* pellet.

For the particle size, there was a variation from 5.89 to 18.94 μm for the different microparticles containing *L. plantarum*. Similar variations were identified by Nunes et al. (2018) in microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 that had sizes ranging from 6.68 to 19.30 μm . The particle size depends on the different properties of the wall materials used, and less variation between the sizes of the microparticles is desirable to ensure homogeneity and quality when applied to foods (Burgain, Gaiani, Linder, & Scher, 2011).

3.2.3 Viability of the probiotic in microparticles at different storage temperatures

The selected microparticles were evaluated for the viability of the probiotic *L. plantarum* under different storage conditions, at room temperature (25 °C), refrigeration (8 °C), and freezing (-18 °C) at times 0, 9, 18, 27, 36 and 45 days. Microparticles stored at 25 °C (Figure 4) present a marked decline in cell viability during the storage period. After the 9th day, the evaluated microparticles had probiotic cell viability below 6 log CFU.g⁻¹, a factor that compromises the delivery of these probiotics at the site of action to promote health benefits. Furthermore, no viable *L. plantarum* cells were detected in microparticles B after 27 days at 25 °C and in the microparticle A after 36 days of storage. Thus, the immediate use of these microparticles is indicated after drying to avoid reducing the viability of the probiotic when stored at a temperature of 25 °C.

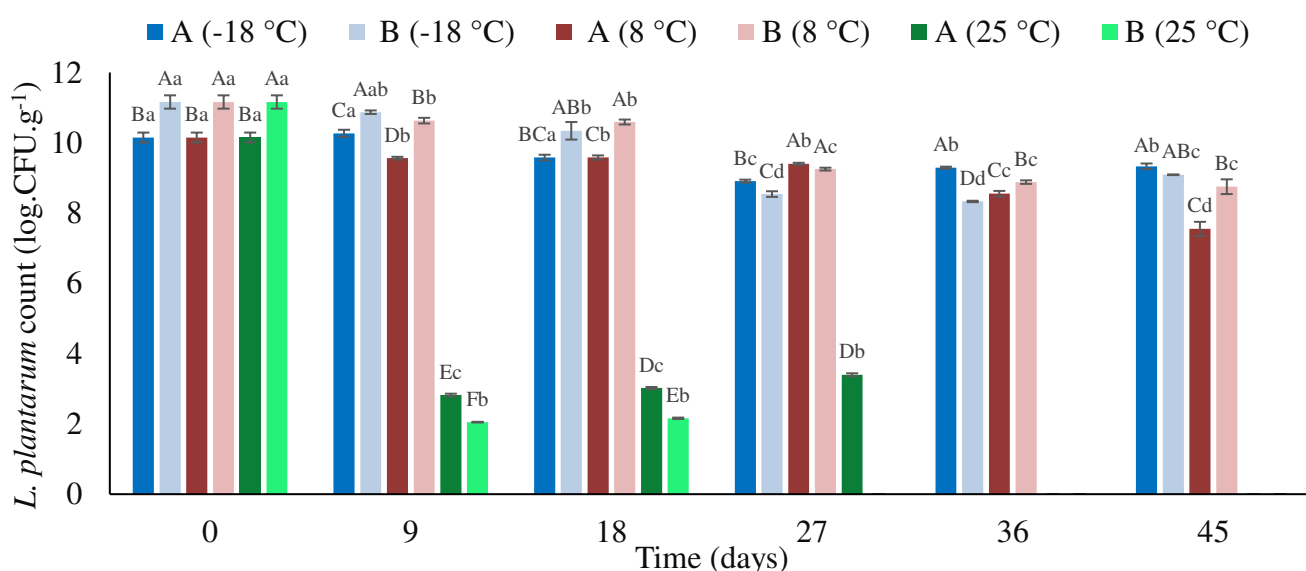


Figure 4. Survival of *L. plantarum* in microparticles stored at different temperatures for 45 days. A: microparticle containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; B: microparticle containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% *L. plantarum* pellet.

gelatin and 5% *L. plantarum* pellet. Different upper-case letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between samples at the same time. Different lower-case letters indicate significant difference ($p < 0.05$) over time for each sample.

Reyes, Chotiko, Chouljenko, & Sathivel (2018) evaluated the viability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* with high content of corn starch, maltodextrin and gum arabic by spray dryer under different storage conditions for 60 days and found that the microparticles stored at 23 °C showed reduced probiotic viability after the 20th day, with counts $< 6 \log \text{CFU.g}^{-1}$, which compromises the health benefits.

On the other hand, the microparticles stored under refrigeration (8 °C) maintained the viability of the probiotic microorganism for 45 days (Figure 4) with counts above 7 log CFU.g⁻¹. The concentration and wall materials used in microparticles A and B protected and preserved the viability of *L. plantarum* during the 45 days of storage at 8 °C. On the 45th day of storage, microparticle B showed higher cell viability than microparticle A, with 8.75 and 7.55 log CFU.g⁻¹, respectively.

When evaluated at freezing temperature (-18 °C), microparticles A and B also maintained the viability of *L. plantarum* during the 45 days of storage (Figure 4). The microparticles differed significantly ($p < 0.05$) regarding the viability of the probiotic over the storage time. However, all counts were above 7 log CFU.g⁻¹, which is ideal to generate beneficial effects for the host.

3.2.4 *In vitro* simulation of gastrointestinal conditions

The release and survival of probiotic microorganisms to gastrointestinal conditions is critical to ensure the delivery and access of these microorganisms at the site of action and survival in sufficient quantities to promote health benefits. The selected microparticles were submitted to *in vitro* gastrointestinal resistance simulation and the microencapsulated probiotic and free cell viability were calculated and represented in log CFU.g⁻¹ at baseline and after exposure to simulated gastric and intestinal fluids (Figure 5).

In the gastric phase, there was a difference ($p < 0.05$) between microparticles A and B, in relation to the free cell, which reduced 6.04 log CFU.g⁻¹, while the microparticles reduced 1.33 and 1.88 log CFU.g⁻¹, respectively, when exposed to acidic pH. These results demonstrated how the microparticles developed were able to maintain the stability of the probiotic under acidic pH conditions (2.0-2.5) and in the presence of enzymes, such as lipase and pepsin (Figure 5).

The wall materials must protect the probiotics from the acid pH of the stomach and other stressful conditions and allow a total or controlled release of these microorganisms under specified conditions (Razavi et al., 2021). In terms of structure, the microparticles obtained by spray drying have the shape of a multinucleated sphere, this factor allows the probiotic to be released gradually until it reaches the intestinal phase, where the best conditions for total release are found, with a pH around 6.0-7.0 (Fang & Bhandari, 2010; Haffner, Diab & Pasc, 2016). In enteric phases I and II, microparticles A and B showed higher resistance compared to the free cell ($p < 0.05$) (Figure 5). After enteric phase II, microparticles A and B finished the *in vitro* gastrointestinal simulation with a reduction of 1.87 and 2.20 log CFU.g⁻¹, respectively, when compared to the initial viability (Figure 5). While the free cell reached the last phase with a reduction of 5.39 log CFU.g⁻¹. In the last phase, simulation of the small intestine, the viability of the probiotic is essential, because the microorganism needs to reach this location in sufficient quantities to promote benefits to the organism, usually at counts greater than 6 log CFU.g⁻¹ (WHO/FAO, 2002), values that were reached by microparticles A and B.

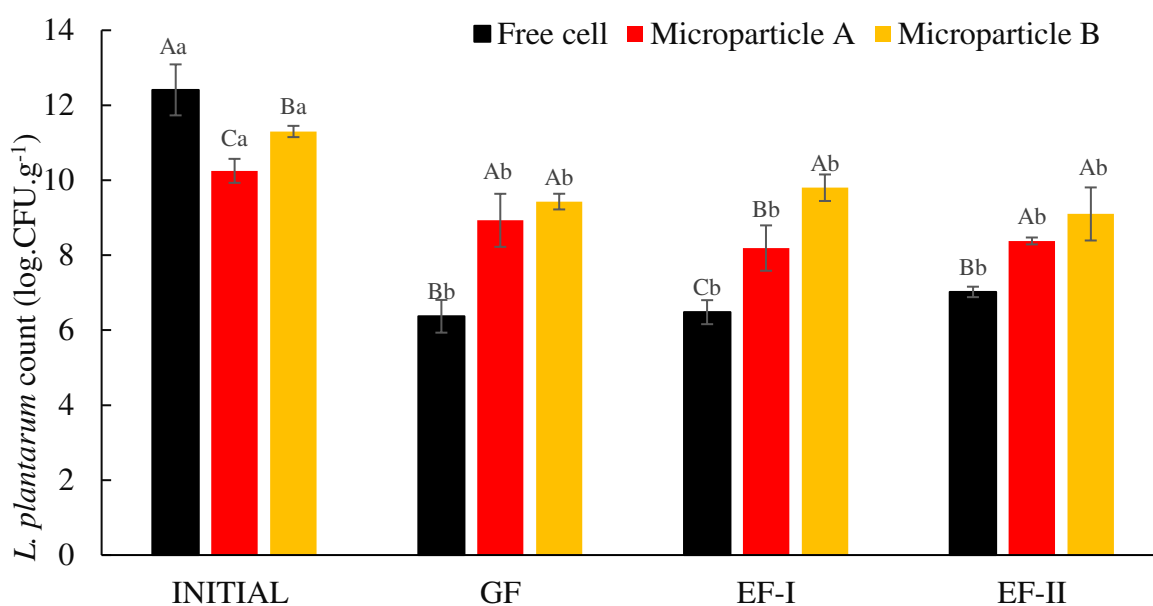


Figure 5. Survival of free and microencapsulated *L. plantarum* under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. Free cell (■); Microparticle A (■): containing 10% maltodextrin, 5% sweet potato flour, 1% pectin and 5% *L. plantarum* pellet; Microparticle B (■) containing 10% maltodextrin, 4% sweet potato flour, 2% gelatin and 5% *L. plantarum* pellet. INITIAL: before the simulation; GF: gastric phase; EF-I: enteric phase I; EF-II: enteric phase II; Different upper-case letters indicate a significant difference ($p < 0.05$) between samples at the same phase.

Different lower-case letters indicate significant difference ($p < 0.05$) for the same sample over the phases.

Therefore, microparticles A and B were able to release the nucleus at the site of action (intestinal phase) and maintain the stability of the microorganism in relation to the free cell and their use is promising. These results corroborate those of Braber et al. (2020), who reported increased resistance of microencapsulated probiotic microorganisms when exposed to simulated gastrointestinal conditions compared to free cell survival.

The positive results obtained from the *in vitro* assay are associated with the encapsulation efficiency and with the stability of the encapsulating material (Calabuig-Jiménez et al., 2019). The wall materials used were fundamental to protect *L. plantarum* from adverse conditions caused by pH changes and the addition of digestive enzymes.

Protein-based wall materials such as gelatin have fewer polar groups than polysaccharides, and this feature contributes to keeping the acidic effect out of the microparticle core (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). Another wall material with important characteristics is pectin, which is an important alternative to transport probiotic microorganisms because it can be degraded in the presence of pectinolytic enzymes present in the intestine and cause the release of probiotic microorganisms at the site of action (Heumann et al., 2020).

Resistant starch present in sweet potato flour also contributes to the delivery of viable and metabolically active *L. plantarum* to the intestine (Crittenden et al., 2001; Mortazavian et al., 2008). De Albuquerque et al. (2020) evaluated different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots grown in Northeast Brazil in relation to potential prebiotic properties. The results showed that white and purple peel sweet potato flours have varying levels of fiber, resistant starch, fructooligosaccharides, phenolic compounds, and sugars. These flours led to positive prebiotic activity scores with probiotic strains of *L. acidophilus*, *L. casei*, and *B. animalis*, indicating their ability to selectively stimulate beneficial bacteria while limiting enteric competitors. Therefore, considering the results obtained in this study, it is worth highlighting the potential of this matrix in the production of *L. plantarum*-carrying microcapsules.

4. CONCLUSION

The use of sweet potato flour as a component of microparticle wall material was reported for the first time and demonstrated that when combined with conventional materials such as maltodextrin, pectin and gelatin it is a promising alternative for carrying probiotic

microorganisms. The microparticles were resistant to heat treatment and acidic pH conditions, presented acceptable physicochemical characteristics, and maintained the viability of the probiotic during storage under refrigeration and freezing. Microparticles A and B protected *L. plantarum* during simulated *in vitro* gastrointestinal conditions, ensuring high survival (>8 log CFU.g⁻¹) after large intestine simulation, ideal for promoting consumer benefits. Therefore, composite matrices containing combinations of sweet potato flour, maltodextrin, gelatin and pectin are good wall materials for probiotic microorganisms, easy availability, low cost and potential properties for industrial use.

5. REFERENCES

- Alam, M.K. A comprehensive review of sweet potato (*Ipomoea batatas* [L.] Lam): Revisiting the associated health benefits. (2021). *Trends in Food Science & Technology*, 115, 512-529. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.07.001>
- Annan, N.T., Borza, A.D., Hansen, L.T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, v. 41, p. 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.001>
- AOAC. (2000). Official Method 991.36. In *Official Methods Analysis of the AOAC* (17th ed.). AOAC, Gaithersburg, MD, USA.
- Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* with different wall materials by Spray Drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 63, p. 685-690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>
- Arslan-Tontul, S., Erbas, M. (2017). Single and double layered microencapsulation of probiotics by Spray Drying and Spray Chilling. *LWT - Food Science and Technology*, 81, 160-169. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.060>
- Ashwar, B.A., Gani, A., Gani, A., Shah, A., Masoodi, F.A. (2018). Production of RS4 from rice starch and its utilization as an encapsulating agent for targeted delivery of probiotics. *Food Chemistry*, v. 239, p. 287-294. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.06.110>

Azizi, S., Rezazadeh-Bari, M., Almasi, H., Amiri, S. (2021). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* using sesame protein isolate: Effect of encapsulation method and transglutaminase. *Food Bioscience*, v. 41, p. 101012.

<https://doi.org/10.1016/j.fbio.2021.101012>

Barajas-Alvarez, P., Gonzalez-Avila, M., Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by spray drying and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 153, p. 112485.

Baysan, S., Kabadurmus, O., Cevikcan, E., Satoglu, S.I., Durmusoglu, M.B. (2019). A simulation-based methodology for the analysis of the effect of lean tools on energy efficiency: An application in power distribution industry. *Journal of Cleaner Production*, v. 211, p. 895-908. <https://doi.org/10.1016/j.jclepro.2018.11.217>

Bedani, R., Rossi, E.A., Isay Saad, S.M. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 34, p. 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.012>

Braber, N.V., Vergara, L.D., Rossi, Y.E., Aminahuel, C.A., Mauri, A.N., Cavaglieri, L.R., Montenegro, M.A. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 118, p. 108844. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844>

Burgain, J., Gaiani, C., Linder, M., Scher, J. (2011). Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. *Journal of Food Engineering*, v. 104, p. 467-483. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031>

Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of Spray-Dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>

Calabuig-Jiménez, L., Betoret, E., Patrignani, F., Betoret, N., Lanciotti, R., Dalla Rosa, M. (2019). High pressures homogenization (HPH) to microencapsulate *L. salivarius* spp. *salivarius* in mandarin juice. Probiotic survival and *in vitro* digestion. *Journal of Food Engineering*, v. 240, p. 43-48. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.07.012>

Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J. (2005). 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, p. 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>

Chen, A.Z., Li, Y., Chau, F.T., Lau, T.Y., Hu, J.Y., Zhao, Z., Mok, D.K.W. (2009). Microencapsulation of puerarin nanoparticles by poly (L-lactide) in a supercritical CO₂ process. *Acta Biomaterialia*, 5, 2913-2919. <https://doi.org/10.1016/j.actbio.2009.04.032>

Chen, F., Liu, L., Tang, C. Spray-drying microencapsulation of curcumin nanocomplexes with soy protein isolate: Encapsulation, water dispersion, bioaccessibility and bioactivities of curcumin. *Food Hydrocolloids*, v. 105, p. 105821, 2020. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.105821>

Crittenden, R.G., Morris, L.F., Harvey, M.L., Tran, L.T., Mitchell, H.L., Playne, M.J. (2001). Selection of a *Bifidobacterium* strain to complement resistant starch in a synbiotic yoghurt. *Journal of Applied Microbiology*, v. 90, p. 268-278. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2672.2001.01240.x>

Da Silva, T.M., de Deus, C., de S. Fonseca, B., Lopes, E.J., Cichoski, A.J., Esmerino, E.A., Da Silva, C. de B., Muller, E.I., Moraes Flores, E.M., de Menezes, C.R. (2019). The effect of enzymatic crosslinking on the viability of probiotic bacteria (*Lactobacillus acidophilus*) encapsulated by complex coacervation. *Food Research International*, 125, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2019.108577>

De Albuquerque, T.M.R., Borges, C.W.P., Cavalcanti, M.T., dos Santos Lima, M., Magnani, M., de Souza, E.L. (2020). Potential prebiotic properties of flours from different varieties of sweet potato (*Ipomoea batatas* L.) roots cultivated in Northeastern Brazil, *Food Bioscience*, v. 36, p. 100614. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100614>

De Castro-Cislaghi, F.P., Carina Dos Reis, E.S., Fritzen-Freire, C.B., Lorenz, J.G., Sant'Anna, E.S. (2012). *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. *Journal of Food Engineering*, v. 113, p. 186-193. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006>

Dianawati, D., Mishra, V., Shah, N.P. (2016). Survival of microencapsulated probiotic bacteria after processing and during storage: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, v. 56, p. 1685-1716. <https://doi.org/10.1080/10408398.2013.798779>

Ester, B., Noelia, B., Laura, C.J., Francesca, P., Cristina, B., Rosalba, L. (2019). Probiotic survival and *in vitro* digestion of *L. salivarius* spp. *salivarius* encapsulated by high homogenization pressures and incorporated into a fruit matrix. *LWT - Food Science and Technology*, 111, 883-888. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.05.088>

Fang, Z., Bhandari, B. (2010). Encapsulation of polyphenols—a review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 21, n.10, p. 510-523. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.08.003>

Fritzen-Freire, C.B., Prudêncio, E.S., Amboni, R.D., Pinto, S.S., Negrão-Murakami, A.N., Murakami, F.S. (2012). Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. *Food Research International*, v. 45, p. 306-312. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.09.020>

Haffner, F. B., Diab, R., Pasc, A. (2016). Encapsulation of probiotics: insights into academic and industrial approaches. *AIMS Materials Science*, v. 3, n. 1, p. 114-136. <https://doi.org/10.3934/matersci.2016.1.114>

Heumann, A., Assifaoui, A., Barreira, D.D.S., Thomas, C., Briandet, R., Laurent, J., Beney, L., Lapaquete, P., Guzzo, J., Rieu, A. (2020). Intestinal release of biofilm-like microcolonies encased in calcium-pectinate beads increases probiotic properties of *Lacticaseibacillus paracasei*. *NPJ - Biofilms and Microbiomes*, v. 6, p. 1-12. <https://doi.org/10.1038/s41522-020-00159-3>

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G.R., Merenstein, D.J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M.E. (2014). The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 11 (8), 506–514. <https://doi:10.1038/nrgastro.2014.66>

Huang, S., Vignolles, M.L., Chen, X.D., Le Loir, Y., Jan, G., Schuck, P., Jeantet, R. (2017). Spray drying of probiotics and other food-grade bacteria: A review. *Trends in Food Science & Technology*, v. 63, p. 1-17. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2017.02.007>

Huang, T. T., Zhou, D. N., Jin, Z. Y., Xu, X. M., Chen, H. Q. (2016). Effect of repeated heat-moisture treatments on digestibility, physicochemical and structural properties of sweet potato starch. *Food Hydrocolloids*, 54, 202-210. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.10.002>

Jafari, S., Jafari, S. M., Ebrahimi, M., Kijpatanasilp, I., Assatarakul, K. (2022). A decade overview and prospect of spray drying encapsulation of bioactives from fruit products: characterization, food application and in vitro gastrointestinal digestion. *Food Hydrocolloids*, 108068. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2022.108068>

Kaderides, K., Goula, A. M. (2019). Encapsulation of pomegranate peel extract with a new carrier material from orange juice by-products. *Journal of Food Engineering*, v. 253, p. 1-13. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.019>

Liao, L.K., Wei, X.Y., Gong, X., Li, J.H., Huang, T., Xiong, T. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and *in vitro* digestion. *LWT-Food Science and Technology*, v. 82, p. 82-89. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.03.065>

Liu, M., Zhou, S., Li, Y., Tian, J., Zhang, C. (2021). Structure, physicochemical properties and effects on nutrients digestion of modified soluble dietary fiber extracted from sweet potato residue. *Food Research International*, v. 150, p. 110761. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110761>

Martín, M.J., Lara-Villoslada, F., Ruiz, M.A., Morales, M.E. (2015). Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 27, 15–25. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2014.09.010>

Mortazavian, A.M., Azizi, A., Ehsani, M.R., Razavi, S.H., Mousavi, S.M., Sohrabvandi, S., Reinheimer, J.A. (2008). Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. *Milchwissenschaft, Milk Science International*, v. 63, p. 427.

Na, J. H., Kim, H. R., Kim, Y., Lee, J. S., Park, H. J., Moon, T. W., Lee, C. J. (2020). Structural characteristics of low-digestible sweet potato starch prepared by heat-moisture treatment. *International journal of biological macromolecules*, v. 151, p. 1049-1057. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.10.146>

Nishad, J., Mir, S. A., Walia, K. Optimization of spray drying technology for sugarcane juice using natural and synthetic encapsulating agents. *Sugar Tech*, v. 21, n. 5, p. 749-755, 2019.

Nunes, G. L., de Araújo Etchepare, M., Cichoski, A.J., Zepka, L.Q., Lopes, E.J., Barin, J.S., Flores, E.M.M., Silva, C.B., Menezes, C.R. (2018). 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.10.032>

Paula, D.A., Martins, E.M.F., Costa, N.A., de Oliveira, P. M., de Oliveira, E.B., Ramos, A.M. (2019). Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex co-precipitation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.110>

Pitarch, J. L., Vilas, C., de Prada, C., Palacín, C. G., Alonso, A. A. (2021). Optimal operation of thermal processing of canned tuna under product variability. *Journal of Food Engineering*, 304, 110594. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2021.110594>

Pitigraisorn, P., Srichaisupakit, K., Wongpadungkiat, N., Wongsasulak, S. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules. *Journal of Food Engineering*, v. 192, p. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.022>

Rajam, R., Anandharamakrishnan, C. (2015). Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* (MTCC 5422) with fructooligosaccharide as wall material by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, v. 60, p. 773-780. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>

Ramos, P.E., Cerqueira, M.A., Teixeira, J.A., Vicente, A.A. (2018). Physiological protection of probiotic microcapsules by coatings. *Critical reviews in food science and nutrition*, 58, 1864-1877. <https://doi.org/10.1080/10408398.2017.1289148>

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, v. 120, 106882. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>

Ré, M. Microencapsulation by spray drying. (1998). *Drying technology*, 16, 1195-1236. <https://doi.org/10.1080/07373939808917460>

Reyes, V., Chotiko, A., Chouljenko, A., Sathivel, S. (2018). Viability of *Lactobacillus acidophilus* NRRL B-4495 encapsulated with high maize starch, maltodextrin, and gum arabic, *LWT-Food Science and Technology*, v. 96, p. 642-647. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.06.017>

Richter, R.L., Vedamuthu, E.R. (2001). Milk and milk products. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, v. 4, p. 483-505.

Rosolen, M.D., Bordini, F.W., DE Oliveira, P.D., Conceição, F.R., Pohndorf, R.S., Fiorentini, Â.M., Da Silva, W.P., Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by Spray Drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 115, p. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S.R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S., Jafari, S.M. (2021). Green

biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 297-325.

Santos, F. R., Leite Júnior, B. R. de C., Tribst, A. A. L. (2022). Kinetic parameters of microbial thermal death in goat cheese whey and growth of surviving microorganisms under refrigeration. *Journal of Food Process Engineering*, p. 1-9. <https://doi.org/10.1111/jfpe.14191>

Sarao, L.K., Arora, M. (2017). Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. *Critical reviews in food science and nutrition*, 57, 344-371. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.887055>

Simanca-Sotelo, M., De Paula, C., Domínguez-Anaya, Y., Pastrana-Puche, Y., Álvarez-Badel, B. (2021). Physico-chemical and sensory characterization of sweet biscuits made with Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). *NFS Journal*, v. 22, p. 14-19. <https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.12.001>

Šipailienė, A., Petraitytė, S. (2018). Encapsulation of probiotics: proper selection of the probiotic strain and the influence of encapsulation technology and materials on the viability of encapsulated microorganisms. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, v.10, p. 1-10. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9347-x>

Sun, H., Fan, J., Tian, Z., Ma, L., Meng, Y., Yang, Z., Zeng, X., Liu, X., Kang, L., Nan, X. (2022). Effects of treatment methods on the formation of resistant starch in purple sweet potato. *Food Chemistry*, v. 367, p. 130580. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130580>

Trung, P. T. B., Ngoc, L. B. B., Hoa, P. N., Tien, N. N. T., Van Hung, P. (2017). Impact of heat-moisture and annealing treatments on physicochemical properties and digestibility of starches from different colored sweet potato varieties. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 105, p. 1071-1078. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.07.131>

WHO/FAO, Guidelines for the evaluation of probiotics in food. www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf, 2002; (accessed 2021 June).

Ye, F., Li, J., Zhao, G. (2020). Physicochemical properties of different-sized fractions of sweet potato starch and their contributions to the quality of sweet potato starch. *Food Hydrocolloids*, v. 108, 106023. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2020.106023>

Yoha, K.S., Moses, J.A., Anandharamakrishnan, C. (2020). Effect of encapsulation methods on the physicochemical properties and the stability of *Lactobacillus plantarum* (NCIM 2083) in synbiotic powders and *in-vitro* digestion conditions. *Journal of Food Engineering*, v. 283, p. 110033. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2020.110033>

Zhang, Y., Lin, J., Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, v. 71, p. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>

Zhu, F., Yang, X., Cai, Y.Z., Bertoft, E., Corke, H. (2011). Physicochemical properties of sweetpotato starch. *Starch-Stärke*, v. 63, p. 249-259. <https://doi.org/10.1002/star.201000134>

Zhu, L., Mu, T., Ma, M., Sun, H., Zhao, G. (2022). Nutritional composition, antioxidant activity, volatile compounds, and stability properties of sweet potato residues fermented with selected lactic acid bacteria and bifidobacterial. *Food Chemistry*, v. 374, p. 131500. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131500>

CAPÍTULO 3

Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) como material de parede para microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG: caracterização das micropartículas e adição em geleia de pitaya

Trabalho escrito nas normas da revista *Food Research International* para posterior submissão.

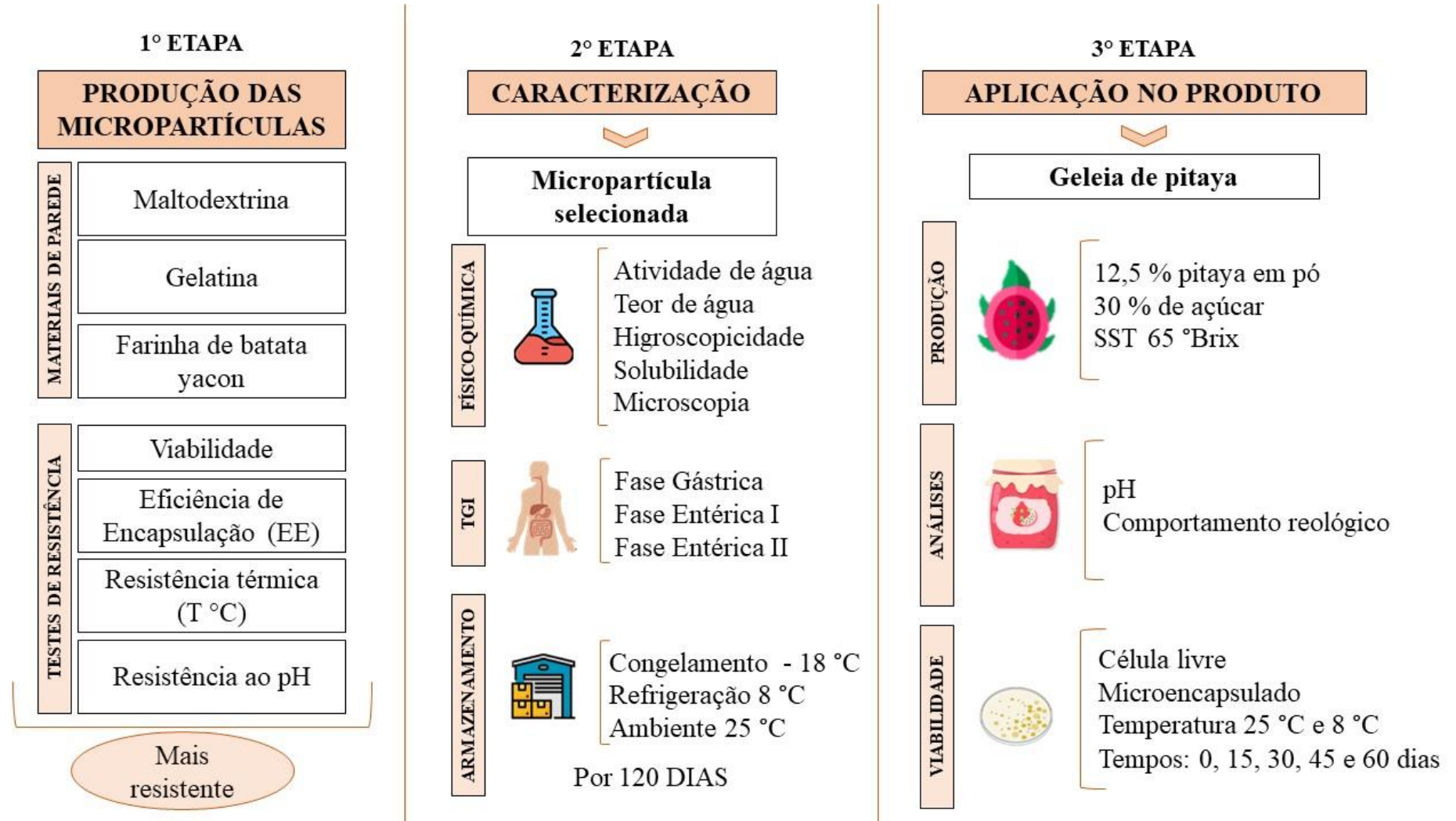
CAPÍTULO 3

Farinha de yacon (*Smallanthus sonchifolius*) como material de parede para microencapsulação de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG: caracterização das micropartículas e adição em geleia de pitaya

Resumo

Ingredientes prebióticos são comumente utilizados para estabilizar ou até mesmo para aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos em alimentos. Diferentes prebióticos já foram utilizados como material de parede para a microencapsulação de probióticos por *spray dryer*. Neste estudo, foram desenvolvidas micropartículas, por *spray drying*, utilizando farinha de yacon, rica em oligossacarídeos, combinada com materiais convencionais como maltodextrina e gelatina para microencapsular *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. As micropartículas obtidas foram avaliadas quanto a eficiência da encapsulação, a resistência do probiótico ao calor e às variações de pH. A micropartícula mais resistente foi selecionada. Após a seleção, a micropartícula foi caracterizada e avaliada em relação a viabilidade do probiótico durante 120 dias em diferentes condições de armazenamento (-18, 8 e 25 °C), sobrevivência às condições gastrointestinais *in vitro* e seu comportamento em geleia de pitaya. Dentre os tratamentos avaliados, a micropartícula contendo 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina e 6,67% farinha de batata yacon apresentou eficiência de encapsulação de 69,92%, alta resistência térmica (> 64%) do probiótico e sobrevivência do mesmo em pH ácido (> 76%). Durante o armazenamento por 120 dias, o probiótico permaneceu viável na micropartícula com contagens > 6 log UFC.g⁻¹ sob congelamento e resistiu às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* com cerca de 5,64 log UFC.g⁻¹ das células viáveis. A micropartícula proporcionou alta sobrevivência (> 70%) do probiótico após 60 dias de estocagem a 8 °C em geleia de pitaya causando pequenas variações no pH e na viscosidade do produto. Assim, acredita-se que a micropartícula composta por maltodextrina, farinha de batata de yacon e gelatina pode carrear e proteger *L. rhamnosus* GG durante etapas de processamento e armazenamento de geleia, sendo uma nova alternativa a ser utilizada na tecnologia de microencapsulação por *spray drying* e desenvolvimento de alimentos potencialmente simbióticos.

Palavras-chaves: alimento funcional, geleia, *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG, prebiótico, *spray dryer*.



1. Introdução

A microencapsulação tem sido considerada uma técnica eficiente e inovadora capaz de estabilizar e manter a viabilidade de microrganismos probióticos adicionados em produtos alimentícios. Além disso, é importante para garantir a sobrevivência dos probióticos durante a passagem pelo sistema gastrointestinal, pois é essencial que os probióticos cheguem ao local de ação em quantidades suficientes para fornecer benefícios à saúde (Abbas et al., 2022; Saeed et al., 2022). Entre esses benefícios se destacam a atividade antimicrobiana, atividade antioxidante, atividade imunomoduladora, contribuição com o equilíbrio microbiano intestinal e saúde geral (Feng e Wang, 2020; Saadat, Khosroushahi, & Gargari, 2019).

Dentre as técnicas de microencapsulação utilizadas, *spray drying* é uma operação unitária em que o líquido é atomizado em pequenas gotículas com cerca de 10 a 150 µm através de um bico atomizador em fluxo paralelo ao ar quente e seco com temperatura acima de 100 °C sendo o pó obtido em poucos segundos (Radosavljević et al., 2022; Gharsallaoui, Roudaut, Chambin, Voilley, Saurel 2007).

É um método amplamente utilizado para ingredientes ativos na indústria alimentícia, farmacêutica e agrícola devido ao seu baixo custo, boa estabilidade do produto final e eficiência de encapsulamento relativamente alta (Núñez-Ramírez et al., 2021). Com esta tecnologia é possível criar micropartículas em pó, de fácil manuseio, a partir de uma solução líquida, em uma operação simples e facilmente escalonável.

Além da técnica utilizada na microencapsulação, a escolha do material de parede ideal é fundamental para promover a proteção necessária, manter a sobrevivência do probiótico, alcançar alta eficiência de encapsulamento e propriedades físicas adequadas. A utilização de materiais de parede de fontes biodegradáveis, consideradas como “verdes”, obtidos através de métodos sustentáveis é uma tendência atual no encapsulamento por *spray dryer* (Samborska et al., 2021).

Nesse sentido, a fim de garantir um maior rendimento de encapsulamento, maior resistência dos probióticos ao estresse gastrointestinal e competição favorável com a microbiota presente no intestino, alguns compostos considerados como prebióticos estão sendo adicionados na matriz de revestimento das microcápsulas desenvolvidas (Yuan, Hu, He, Hu, & Liu, 2023; Fiocco et al., 2020; Raddatz et al., 2020; Peredo et al., 2016). Prebióticos são substratos utilizados seletivamente por microrganismos hospedeiros conferindo benefícios à saúde (Gibson et al., 2017).

As raízes tuberosas de yacon (*Smallanthus sonchifolius*), nativas da região andina da América do Sul, possuem sabor adocicado e contém, principalmente, carboidratos de baixa energia e fibras insolúveis, como frutooligossacarídeos (FOS's) e inulina, sendo considerado como uma fonte de prebióticos, capazes de promover benefícios à saúde do consumidor como a redução de doenças crônicas, redução do níveis glicêmicos, regulação do peso corporal e diminuição do risco de câncer de cólon (Genta et al., 2009; Campos et al., 2012; Fernández et al., 2013; Dwivedi, Sahrawat, Puppala, & Ortiz, 2014; Salinas, Alvarado, Bergenståhl, & Tornberg, 2018; Reis et al., 2021).

São escassos na literatura estudos sobre a avaliação da farinha de yacon como material de parede para microencapsulação de microrganismos probióticos. Portanto, o presente estudo teve como objetivo desenvolver e caracterizar micropartículas contendo *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG usando farinha de batata yacon como material de parede combinada com materiais convencionais, avaliar a incorporação da micropartícula desenvolvida em geleia de pitaya e acompanhar estabilidade do produto ao armazenamento.

2. Material e métodos

2.1 Materiais

A cultura de *L. rhamnosus* GG ATCC53103 foi adquirida da Culturelle® (EUA). A batata yacon foi adquirida em supermercado local da cidade de Viçosa (Brasil) e foram selecionados os tubérculos com maior homogeneidade de tamanho, maturidade e sem defeitos físicos. A maltodextrina foi adquirida da Growth Supplements (Brasil) e a gelatina foi adquirida da Gelita (Alemanha). Outros produtos químicos e enzimas utilizados foram: NaOH e NaH₂PO₄ · 2H₂O (Synth, São Paulo, Brasil), HCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), NaCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), Ca₃CO (QEEL, São Paulo, Brasil), pepsina isolada de mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), lipase de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), pancreatina de pâncreas suíno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), bile bovina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Kasvi, São Paulo, Brasil), caldo MRS (TM Media, São Paulo, Brasil), carbonato de cálcio (QEEL, São Paulo, Brasil) e púrpura de bromocresol (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil). Para o preparo da geleia foram utilizados pitaya liofilizada em pó (Suncore Foods®, EUA) e açúcar (Delta, Brasil).

2.2 Cultivo microbiano e condições de crescimento

Uma cápsula de *L. rhamnosus* GG ATCC53103 (Culturelle®) foi ativada em caldo MRS de acordo com Paula et al. (2019) com modificações. O pellet de células foi ressuspensionado duas vezes em solução salina estéril (0,85 %) e centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos. O pellet obtido foi armazenado sob refrigeração até o momento de sua utilização.

2.3 Preparo da farinha de batata yacon utilizada como material de parede

A farinha de batata yacon foi preparada segundo Simanca-Sotelo et al. (2021) com modificações. As batatas foram imersas em uma solução contendo 100 mg/L de cloro ativo por 10 minutos. Posteriormente, foram enxaguadas em solução de 10 mg/L de cloro ativo, e em seguida descascadas e cortadas em fatias finas que foram imersas em solução de ácido cítrico a 2% por 5 minutos para evitar o escurecimento. As fatias foram distribuídas nas bandejas da estufa de secagem com circulação e renovação de ar (Sinergia Científica modelo SSDcr-85L, 1100 W) onde permaneceram por 11 horas a 65 °C, para atingir teor de água < 10%, b.u. Posteriormente, as fatias secas foram moídas em moinho analítico básico (IKA® A11 B S32, 180 W), sendo a farinha acondicionada em embalagens de polipropileno que foram lacradas em seladora (Selovac modelo Jumbo PLUS) e armazenadas em local fresco e ventilado até o uso.

2.4 Definição dos tratamentos e preparo das soluções encapsulantes

Os tratamentos foram definidos da seguinte forma:

- Micropartícula A: 16,67% maltodextrina, 3,33% gelatina.
- Micropartícula B: 12,5% maltodextrina, 2,5% gelatina e 5% farinha de batata yacon.
- Micropartícula C: 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina e 6,67% farinha de batata yacon.
- Micropartícula D: 10% maltodextrina, 2% gelatina e 8% farinha de batata yacon.

Os materiais foram dissolvidos em água destilada e homogeneizados por 1 hora. Em seguida, as soluções encapsulantes foram filtradas e autoclavadas a 121 °C por 15 minutos. Após o resfriamento, a suspensão de células de *L. rhamnosus* GG na concentração de 5% em relação a quantidade de material da parede (m/m) foi adicionada à solução de encapsulamento e homogeneizada por 10 minutos em agitador magnético (Fisatom® 752 A) a 25 °C.

2.5 Microencapsulação de *L. rhamnosus* GG por *spray drying*

Para a obtenção das micropartículas, as soluções encapsulantes foram secas em um *Spray Dryer* de bancada (BÜCHI® B-290), segundo Braber et al. (2020) com modificações. Os parâmetros operacionais utilizados para a secagem foram temperatura de entrada de 130 °C e

temperatura de saída de 73 °C, com vazão de alimentação de 0,25 L/h⁻¹ e vazão de ar de secagem de 3,00 m³/min⁻¹. As micropartículas em pó foram armazenadas sob refrigeração a 8 °C em frascos estéreis de vidro com tampa de vedação por pressão para posterior análises.

2.6 Avaliação das micropartículas produzidas

2.6.1 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG

Um grama de micropartícula foi reconstituído em 9 ml de solução salina (0,85 %), obtendo-se uma diluição de 10⁻¹. Em seguida, esta diluição foi mantida por 5 minutos a 25 °C sob agitação em um misturador vórtex (KASVI[®] basic K45-2810) para liberar as células probióticas (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). A viabilidade foi determinada por contagem, de acordo com Richter e Vedamuthu (2001).

2.6.2 Eficiência da encapsulação (EE)

A viabilidade do probiótico foi avaliada antes e após a secagem de acordo com item 2.6.1 e a eficiência da encapsulação (EE) foi calculada conforme a Eq. (1), segundo Annan; Borza; Hansen (Annan, Borza e Hansen, 2008):

$$EE(\%) = \frac{N}{N_o} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

N: é o número de células viáveis (Log UFC.g⁻¹) liberadas das micropartículas;

N_o: número de células livres viáveis (Log UFC.g⁻¹) na solução de alimentação antes do processo de encapsulamento.

2.6.3 Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas

A resistência da célula livre (controle) e das células nas micropartículas foi avaliada de acordo com Zhang, Lin, & Zhong (2015). Um grama de amostra foi diluído em 9 ml de solução salina (0,85%) e, em seguida, a mistura foi submetida a condições térmicas de 63 °C por 30 minutos (tempo de recuperação: 4:07 min) e 72 °C por 15 s (tempo inicial: 2.38 min), seguido de resfriamento imediato até atingir a temperatura ambiente. A contagem de células viáveis foi realizada antes e após os tratamentos térmicos pelo método de contagem em placas descrito no item 2.6.1.

2.6.4 Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas em diferentes valores de pH

Duas soluções foram utilizadas para determinar a ruptura de micropartículas: solução tampão PBS (100 mM, pH 7,4) e solução salina (0,5% mv^{-1} , pH 2,0 ajustada com HCl 0,1 N) contendo 3 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ de pepsina. Para tanto, 0,1 g da amostra foi ressuspenso em 1 mL de cada solução, homogeneizado por vórtex e mantido em agitador a 150 rpm a 37 °C por 120 min (Rosolen et al., 2019). A contagem de células viáveis foi realizada pelo método de contagem em placas descrito no item 2.6.1.

2.7 Seleção da micropartícula

Após avaliação das micropartículas desenvolvidas, a que apresentou maior eficiência de encapsulação, boa resistência térmica e resistência ao pH foi selecionada para prosseguir para a caracterização e adição em geleia de pitaya.

2.8 Caracterização da micropartícula selecionada

2.8.1 Atividade de água

A atividade de água foi determinada usando um medidor de atividade de água (Aqualab 4TE, Decágono Devices, Pullman, Washington, EUA) a 25 °C.

2.8.2 Teor de água

O teor de água (% b.u.) das micropartículas foi determinado gravimetricamente com calor (AOAC, 2000). Foram pesadas 2 g das micropartículas e espalhadas uniformemente em cápsulas metálicas e secas a 105 °C (± 2 °C) até atingirem massa constante. O teor de água foi expresso em g de água para cada 100 g de amostra (%).

2.8.3 Higroscopicidade

A higroscopicidade das micropartículas foi medida segundo Cai & Corke (2000). Cerca de 1,0 g de micropartícula foi espalhado em uma placa de Petri e armazenado em um recipiente com solução saturada de NaCl (UR 75,29%) durante 7 dias. A higroscopicidade foi expressa em g de água absorvida por 100 g de amostra (%).

2.8.4 Solubilidade

Um grama de micropartículas foi transferido para um tubo Falcon contendo 100 mL de água destilada. A amostra foi dispersa e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferida para uma placa de alumínio seca e pré-pesada que foi

mantida a 105 °C (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, & Cal-Vidal, 2005). Em seguida, a solubilidade (%) foi calculada por diferença de peso.

2.8.5 Morfologia de tamanho de partícula

A morfologia das micropartículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (TM3000, HITACHI®), com aumento de 800x, sendo o tamanho médio das partículas determinado usando o software ImageJ 1.50i (Pitigraisorn, Srichaisupakit, Wongpadungkiat, & Wongsasulak, 2017).

2.8.6 Viabilidade do probiótico em micropartículas em diferentes temperaturas de armazenamento

As micropartículas foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C), sob refrigeração (8 °C) e sob congelamento (-18 °C) por 120 dias e as contagens de células viáveis foram realizadas aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento conforme item 2.6.1. e os resultados expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.8.7 Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais

A micropartícula selecionada foi avaliada segundo metodologia descrita por Bedani, Rossi e Saad (2013) para simular as 3 fases: gástrica, entérica I e entérica II.

Na fase gástrica, alíquotas de 10 mL da diluição 10^{-1} de micropartículas foram transferidas para frascos estéreis de 100 mL, onde o pH foi ajustado para 2,3–2,6 com HCl 1N. Posteriormente, pepsina (mucosa do estômago de suíno) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e lipase de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionadas na concentração de $3 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $0,9 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 2 h com agitação a 150 rpm em incubadora SOLAB (SL 222).

Na fase entérica I, o pH foi ajustado para 5,4–5,7, utilizando solução alcalina (pH12, NaOH 1 N e $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$), contendo também bile bovina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e pancreatina suína (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil) nas concentrações de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Os frascos foram reincubados a 37 °C por 2 h com agitação.

Na fase entérica II, o pH dos sistemas entéricos foi elevado para 6,8–7,2 usando a mesma solução alcalina. Bile bovina e pancreatina foram então adicionadas para atingirem novamente concentrações de $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ e $1 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, respectivamente. Os sistemas foram novamente incubados a 37 °C por 2 h com agitação, totalizando 6 h de teste.

A contagem das células sobreviventes após cada fase da simulação gastrointestinal foi realizada removendo-se alíquotas de 1 mL que foram diluídas em solução salina 0,85%. A contagem de bactérias probióticas foi realizada conforme descrito no item 2.6.1.

2.9 Aplicação da micropartícula em geleia de pitaya

O comportamento das micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG foi avaliado por meio da adição em uma geleia de pitaya vermelha (*Hylocereus polyrhizus*) produzida a partir da fruta liofilizada (Suncore Foods®, USA).

2.9.1 Elaboração da geleia de pitaya contendo *L. rhamnosus* GG

Para a produção da geleia, inicialmente elaborou-se o suco utilizando-se 12,5% de pitaya liofilizada em pó (Suncore Foods®, USA) que foram diluídos em água potável, a fim de obter um teor de sólidos solúveis em torno de 8 a 9 °Brix, característico da fruta *in natura*. O suco produzido foi submetido ao aquecimento sob agitação (Fisatom, Brazil, model 752A), adicionando-se 30% de açúcar cristal (Delta, Brazil) em relação ao volume total e a solução permaneceu sob agitação e aquecimento até atingir o teor de sólidos solúveis acima de 65 °Brix referente ao ponto da geleia. Em seguida, a geleia obtida foi dividida em porções de acordo com cada tratamento descrito a seguir:

- F25: 100 g de geleia; 1 g de célula livre de *L. rhamnosus* GG e armazenada a 25 °C;
- F8: 100 g de geleia; 1 g de célula livre de *L. rhamnosus* GG e armazenada a 8 °C;
- M25: 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG e armazenada a 25 °C;
- M8: 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG e armazenada a 8 °C;

Após resfriamento do produto, a 50 °C, foi realizada a adição do probiótico, na forma livre ou microencapsulada. Em seguida, as geleias foram envasadas em embalagens de vidro com tampa metálica, vertidas até resfriamento completo e armazenadas na temperatura definida de acordo com cada tratamento.

2.9.2 Caracterização da geleia de pitaya potencialmente probiótica

2.9.2.1 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG

As contagens de células viáveis foram avaliadas aos 0, 15, 30, 45 e 60 dias de armazenamento das geleias a 25 °C e 8 °C, conforme item 2.6.1. e os resultados foram expressos em log UFC·g⁻¹.

2.9.2.2 pH

As geleias produzidas e armazenadas em diferentes temperaturas foram avaliadas quanto ao pH seguindo metodologia descrita por AOAC (2016).

2.9.2.3 Comportamento reológico das geleias

Os ensaios reológicos foram realizados utilizando um reômetro rotacional de cilindros concêntricos (Brookfield, modelo R/S plus SST 2000, conectado ao software RHEOCALC V1.1) de acordo com os procedimentos descritos por Costa et al. (2020). As curvas de escoamento foram realizadas com um sensor CC14 com taxa de deformação variando de 0 a 300 s⁻¹, com três rampas de fluxo (subida, descida e subida) com duração de 2 minutos cada e com medições a cada 4 segundos para eliminar o efeito da tixotropia. Durante os experimentos, as amostras de geleia foram mantidas a 8 ou 25 °C ± 0,1. Os dados foram ajustados ao modelo de Ostwald-de-Waele (Lei de Potência, Equação 1) usando o software Curve Expert Professional 2.2.0). Os valores K e n foram usados para calcular a viscosidade aparente (η_{app} , Pa·s) das amostras na taxa de deformação de 50 s⁻¹.

$$\tau = K \cdot \dot{\gamma}^n \quad (\text{Eq. 2})$$

Em que τ é a tensão de cisalhamento (Pa), K é o índice de consistência (Pa·s ^{n}), $\dot{\gamma}$ é a taxa de deformação (s⁻¹) e n é o índice de comportamento ao escoamento (adimensional).

2.10 Análise estatística

O experimento foi organizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as análises foram realizadas em duplicata com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F seguido do teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5 % de significância. Para isso, foi utilizado o software RStudio®, versão 1.4.1717.

3. Resultados e discussão

3.1 Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas produzidas

3.1.1 Viabilidade e eficiência de encapsulamento (EE)

A viabilidade do probiótico foi avaliada antes e após a secagem. A eficiência da encapsulação (EE) foi calculada, sendo os resultados apresentados na Tabela 1. A EE, que

reflete a proporção de *L. rhamnosus* GG aprisionado nas micropartículas, foi influenciada pela combinação de material de parede utilizado ($p < 0,05$).

Observa-se que a micropartícula D constituída de 10% de maltodextrina, 8% de farinha de yacon e 2% de gelatina diferiu ($p < 0,05$) das demais micropartículas, com eficiência de encapsulação de 81,61%. As micropartículas B (12,5% de maltodextrina, 5% de farinha yacon e 2,5% de gelatina) e C (11,11% de maltodextrina, 6,67% de farinha de yacon e 2,22% de gelatina) não diferiram ($p > 0,05$) entre si, e a micropartícula A, contendo 16,67% de maltodextrina e 3,33% de gelatina, diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos, com a menor taxa de eficiência, cerca de 65%. Tais resultados evidenciam que a adição da farinha de yacon proporcionou uma maior proteção ao *L. rhamnosus* GG quando submetido ao processo de secagem, tanto que a micropartícula D contendo a maior quantidade da farinha de yacon (8%) foi a micropartícula com maior EE.

Tabela 1. Viabilidade de *L. rhamnosus* GG antes e após *spray drying* e eficiência de encapsulação (%).

Micropartícula	Antes da secagem (log UFC.g ⁻¹)	Depois da secagem (log UFC.g ⁻¹)	EE (%)
A	10,02 ± 0,08 ^{ab}	6,56 ± 0,06 ^c	65,47 ± 0,33 ^c
B	10,22 ± 0,56 ^{ab}	7,29 ± 0,12 ^b	71,44 ± 2,85 ^b
C	10,62 ± 0,03 ^a	7,42 ± 0,03 ^b	69,92 ± 0,52 ^b
D	9,55 ± 0,04 ^b	7,79 ± 0,05 ^a	81,61 ± 0,62 ^a

EE: eficiência de encapsulamento. *As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A: micropartícula contendo 16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B: micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de batata yacon e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; C: micropartícula contendo 11,11% de maltodextrina, 2,22% de gelatina e 6,67% de farinha de batata yacon e 5% de *L. rhamnosus* GG; D: micropartícula contendo 10% de maltodextrina, 2% de gelatina e 8% de farinha de batata yacon e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

No geral, houve uma redução da viabilidade do probiótico (Tabela 1) durante a secagem da solução encapsulante a 130 °C em relação a contagem inicial. O número de probióticos nas micropartículas foi de, aproximadamente, 6 a 7 Log UFC.g⁻¹ após a secagem, enquanto a solução apresentava cerca de 9 a 10 log UFC.ml⁻¹ antes da secagem. Essa redução na viabilidade pode acontecer devido a ocorrência de algumas lesões celulares como a desnaturação de DNA e RNA, desidratação, ruptura e colapso da membrana celular devido à remoção de água

(Behboudi-Jobbehdar, Soukoulis, Yonekura, & Fisk, 2013) por *spray drying*. Essa redução também foi observada por Neuenfeldt et al. (2022) ao microencapsular *L. rhamnosus* com diferentes concentrações de extrato de mirtilo e utilizando maltodextrina, goma arábica e inulina nas mesmas condições de secagem descritas nesse estudo.

Areppally, & Goswami (2019) avaliaram a microencapsulação por *spray drying* para proteger *Lactobacillus acidophilus* (NCDC 016) utilizando como material de parede maltodextrina (20%) e goma arábica (0, 2,5, 5, 7,5 e 10%) em diferentes temperaturas do ar de entrada (130, 140 e 150 °C). A eficiência da encapsulação das micropartículas obtidas variou de 65 a 89,15%. De acordo com os autores, materiais de parede que contém proteínas e fibras auxiliam na proteção dos microrganismos durante o processo de secagem em altas temperaturas. Isso ocorre, pois, a proteína presente, forma uma camada protetora de revestimento ao redor da parede celular do probiótico, já as fibras fornecem a substituição parcial das moléculas de água nas células durante a secagem e, assim, evitando a ruptura da membrana celular (Areppally; Goswami, 2019).

3.1.2 Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas

O tratamento térmico presente no processamento de alimentos é um fator crítico para a viabilidade do probiótico, por isso as micropartículas desenvolvidas foram avaliadas quanto a resistência de *L. rhamnosus* GG antes e após dois diferentes tratamentos térmicos (Figura 1). Inicialmente, antes da aplicação dos tratamentos térmicos, *L. rhamnosus* GG livre apresentou viabilidade de 12,09 log UFC.g⁻¹ e as micropartículas (devido a diluição do *pellet* concentrado na solução encapsulante e, posterior, secagem em alta temperatura) apresentaram contagens em torno de 6,56 a 7,79 log UFC.g⁻¹.

Na pasteurização rápida (72 °C/15 s), a temperatura elevada, mesmo que por um curto período de tempo, foi suficiente para reduzir a viabilidade do microrganismo livre para 5,45 log UFC.g⁻¹, com uma taxa de sobrevivência de 45,10%, sendo estatisticamente diferente de todas as micropartículas, apresentando menor taxa de sobrevivência. Dentre as micropartículas avaliadas, a micropartícula C contendo 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina e 6,67% farinha de batata yacon diferiu ($p < 0,05$) das micropartículas A, B, D e da célula livre apresentando taxa de sobrevivência de 78,49% após o tratamento térmico, com redução de apenas 1,59 unidades logarítmicas. A micropartícula D contendo 10% maltodextrina, 2% gelatina e 8% farinha de batata yacon ofereceu uma boa resistência térmica ao *L. rhamnosus* GG, que apresentou taxa de sobrevivência de 69,08%, diferindo-se ($p < 0,05$) das demais micropartículas e da célula livre.

Na pasteurização lenta (63 °C/30 min), as micropartículas C e D apresentaram diferença ($p < 0,05$) em relação a célula livre e as micropartículas A e B. A micropartícula C apresentou a maior taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG, com cerca de 64,84% das células probióticas viáveis, seguida pela micropartícula D que apresentou 57,70%. Em contrapartida, a micropartícula A contendo somente maltodextrina e gelatina apresentou 45,70% das células probióticas viáveis, taxa de sobrevivência menor que a do probiótico livre, isso pode ter ocorrido devido ao estresse em que *L. rhamnosus* GG já havia sido submetido durante o *spray drying*, e depois novamente no teste de resistência.

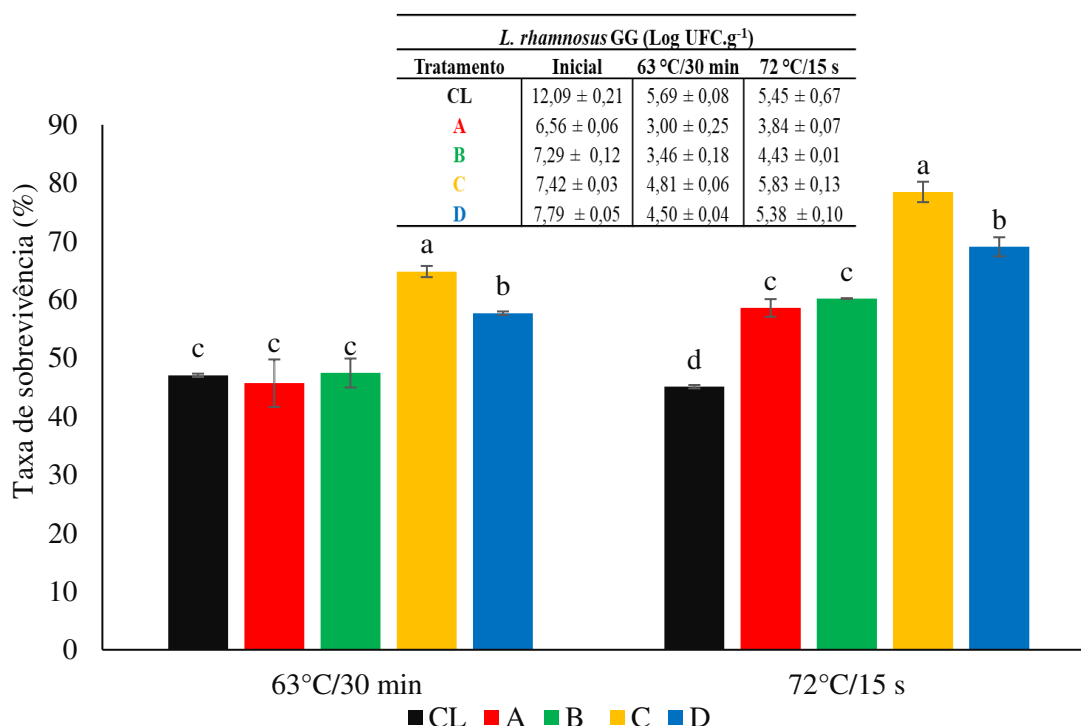


Figura 1. Resistência térmica de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG em diferentes tratamentos térmicos. *As médias seguidas da mesma letra na coluna (contagem de *L. rhamnosus* GG – log UFC.g⁻¹) ou no mesmo processo térmico (taxa de sobrevivência - %) não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Célula livre composta por 100% *pellet* de *L. rhamnosus* GG (■); A (■): micropartícula contendo 16,67% maltodextrina, 3,33% gelatina e 5% *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B (■): micropartícula contendo 12,5% maltodextrina, 2,5% gelatina, 5% farinha de batata yacon e 5% *pellet* de *L. rhamnosus* GG; C (■): micropartícula contendo 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina e 6,67% farinha de batata yacon e 5% *pellet* de *L. rhamnosus* GG; D (■): micropartícula contendo 10% maltodextrina, 2% gelatina e 8% farinha de batata yacon e 5% *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

Assim, observa-se que a técnica de microencapsulação foi eficiente para manter a viabilidade de *L. rhamnosus* GG quando exposto ao calor em comparação com o probiótico na forma livre. De acordo com Azarkhavarani, Ziaee, & Hosseini (2019), esse efeito protetor da microencapsulação pode ser atribuído a uma redução na taxa de migração de calor da água quente para o interior das micropartículas.

Acredita-se que a microencapsulação proporcionou maior estabilidade e sobrevivência de *L. rhamnosus* GG quando exposto ao calor em comparação com o probiótico livre devido à proteção térmica proporcionada pelas matrizes de encapsulamento. A utilização de um único material de parede pode não conferir todas as características desejadas, assim, uma combinação de diferentes materiais pode ser utilizada, permitindo o desenvolvimento de uma variedade de sistemas de entrega com propriedades aprimoradas (Razavi, Janfaza, Tasnim, Gibson, & Hoorfar, 2021).

De acordo com Zheng, Fu, Huang, Jeantet e Chen (2016), as células probióticas são protegidas por diferentes mecanismos que utilizam os materiais encapsulantes como um escudo físico durante a secagem por pulverização. Desse modo, o material utilizado protege os probióticos do ambiente externo e, conseqüentemente, minimiza os danos celulares ou estabiliza os componentes subcelulares das células.

Nesse caso, a proteção térmica também pode ser atribuída a presença de farinha de yacon nas matrizes de encapsulamento, uma vez que verificou-se que as micropartículas contendo maior quantidade de farinha de yacon (micropartícula C contendo 6,67% e D contendo 8,0%) apresentaram as maiores taxas de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em ambos os binômios temperatura x tempo avaliados. O yacon possui sabor doce e cerca de 70 a 80% do teor total de matéria seca desse tubérculo é composta por sacarídeos (Khajehei, Merkt, Claupein, & Graeff-Hoenninger, 2018) como frutose, glicose e sacarose. Portanto, os açúcares presentes na composição desse material de parede contribuíram para a sobrevivência do probiótico, pois são conhecidos por atuar como termoprotetores (Carvalho et al., 2003).

O efeito protetor dos açúcares se deve a sua atuação na integridade da membrana e das proteínas presentes nas células bacterianas desidratadas, em que se ligam aos resíduos polares de proteínas formando um vidro amorfo no estado seco; sendo importantes para preservar a função dos componentes biológicos durante e após a desidratação (Sun et al., 1996; Crowe et al., 1998). No estado vítreo, os movimentos de translação e relaxamento são severamente restritos e as reações químicas ou enzimáticas controladas por difusão são interrompidas (Schill et al., 2009).

3.1.3 Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas submetidas a diferentes valores de pH

A resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas submetidas a diferentes valores de pH foi avaliada em duas condições, sendo uma condição básica com pH 7,4 e uma condição ácida com pH 2,0 (Figura 2).

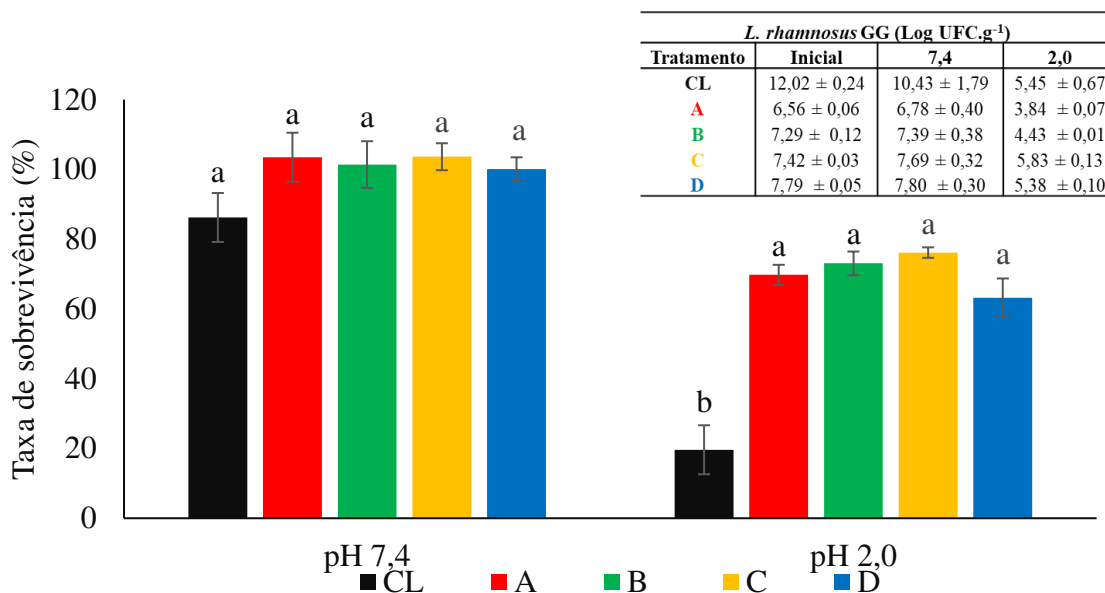


Figura 2. Resistência das micropartículas desenvolvidas em diferentes condições de pH. *As médias seguidas da mesma letra na coluna (contagem de *L. rhamnosus* GG – log UFC.g⁻¹) ou no mesmo pH de ruptura (taxa de sobrevivência - %) não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Célula livre composta por 100% *pellet* de *L. rhamnosus* GG (■); A (■): micropartícula contendo 16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B (■): micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de batata yacon e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; C (■): micropartícula contendo 11,11% de maltodextrina, 2,22% de gelatina e 6,67% de farinha de batata yacon e 5% de *L. rhamnosus* GG; D (■): micropartícula contendo 10% de maltodextrina, 2% de gelatina e 8% de farinha de batata yacon e 5% de *L. rhamnosus* GG.

Após duas horas em solução com pH 7,4, não foi observada diferença significativa ($p > 0,05$) entre as micropartículas quanto a taxa de sobrevivência. Isso pode ocorrer devido ao rompimento da parede protetora ao redor do núcleo e a liberação dos probióticos e, consequentemente, com aumento da viabilidade.

A redução da taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em pH 2,0 pode estar associada à entrada da solução ácida nas micropartículas sem a presença de solução tampão ou de uma

matriz alimentar para contribuir com a proteção do probiótico e neutralizar ou reduzir os efeitos adversos. Entretanto, a microencapsulação promoveu consideravelmente a proteção ao *L. rhamnosus* GG na condição de pH ácido e pepsina.

Bhagwat, Bhushette, & Annapure (2020) avaliaram a microencapsulação de cepas probióticas de *Enterococcus* em solução encapsulante contendo maltodextrina, D-glicose e proteína de soro de leite. Os autores observaram os níveis de proteção oferecidos pelas micropartículas obtidas por *spray drying* às células de *Enterococcus* aprisionadas em seu interior, contra o meio ácido em pH 2,0 e 2,5. Em pH 2,0, o percentual de viabilidade reduziu de 9,23 log UFC/mL inicial para 7,56 log UFC/mL ao final de 4 h, indicando uma perda líquida de 1,67 logs UFC/mL na viabilidade celular. Em pH 2,5, a contagem foi de 8,49 log UFC/mL e a perda líquida foi de apenas 0,74 log UFC/mL. Tais resultados demonstraram a eficiência da técnica de microencapsulação por *spray dryer* para proteger os microorganismos probióticos.

3.2 Seleção da micropartícula

Após os testes de eficiência da encapsulação, resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas e ruptura em diferentes valores de pH, a micropartícula C contendo 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina, 6,67% farinha de batata yacon e 5% do *pellet* de *L. rhamnosus* GG foi selecionada para as próximas etapas.

3.2.1 Caracterização físico-química da micropartícula selecionada

A atividade de água e o teor de umidade são dois parâmetros importantes que influenciam a estabilidade dos probióticos microencapsulados durante as etapas de processamento de alimentos, principalmente durante o armazenamento (Razavi, Janfaza, Tasnim, Gibson, & Hoorfar, 2021). A micropartícula selecionada apresentou teor de umidade de $4,18\% \pm 0,12$ e atividade de água de $0,36 \pm 0,03$, resultados que sugerem um processo de secagem eficiente. Geralmente, alimentos com atividade de água abaixo de 0,6 são considerados microbiologicamente estáveis e se ocorrer alguma deterioração, ela é induzida por reações químicas e não por microrganismos (Quek, Chok, & Swedlund, 2007).

O teor de umidade do pó obtido influencia diretamente na estabilidade dessas micropartículas e, conseqüentemente, na viabilidade do probiótico (Ying et al., 2010; Guerin et al., 2017). Segundo Pinto, Kemp, Bermingham, Hartwig e Bisten (2014), as condições de atomização, o controle das temperaturas de entrada e saída do ar de secagem e as características das suspensões líquidas influenciam no teor de umidade final dos pós secos por pulverização.

Pós contendo um teor de umidade entre 4 e 7% são geralmente recomendados para garantir uma maior estabilidade durante o período de armazenamento (Ananta et al., 2005).

Da mesma forma, a atividade de água dos pós obtidos é um índice importante que influencia diretamente na estabilidade, segurança e crescimento microbiano nos alimentos (Damodaran & Parkin, 2017). Assim, o teor de umidade e a atividade de água da micropartícula avaliada ficou dentro dos limites aceitáveis de $< 4 \%$ e $< 0,30$, respectivamente (Dinkçi, Akdeniz, & Akalin, 2019).

A higroscopicidade é outro parâmetro importante para produtos alimentícios que foram secos em *spray dryer*, pois consiste na capacidade desse material de absorver vapor d'água da atmosfera. Valores elevados de higroscopicidade podem resultar em agregação do pó alterando, assim, suas propriedades (Chew et al., 2018). A micropartícula selecionada apresentou higroscopicidade de $8,43 \pm 0,22 \text{ g.100g}^{-1}$. Pós contendo maior concentração de maltodextrina tendem a ser menos higroscópicos, por isso, é um dos materiais de parede mais utilizados como carreador (Ross, 2010; Mosquera, Moraga, & Martínez-Navarrete, 2012).

Outro fator importante relacionado às características do pó, está relacionado a sua solubilidade em água. A micropartícula avaliada neste estudo apresentou solubilidade de $69,89\% \pm 0,87$. Quanto maior a solubilidade das microcápsulas, melhor seu atributo físico no processamento, ao contrário de micropartículas pouco solúveis, que podem causar dificuldades de processamento e perdas econômicas.

Resultados semelhantes foram encontrados por Kalita, Saikia, Gautam, Mukhopadhyay, Mahanta (2018) ao microencapsular *Lactiplantibacillus plantarum* por *spray drying* utilizando como materiais de parede maltodextrina, frutooligossacarídeo (FOS) e pectina em suco de lichia. As micropartículas produzidas apresentaram higroscopicidade variando de 62 a 68% e de acordo com os autores, o caráter higroscópico dos pós desenvolvidos foi devido à natureza higroscópica dos materiais de revestimento utilizados.

A quantidade de material de parede e as condições de secagem são parâmetros importantes para garantir micropartículas com boas características físico-químicas. Santos, Finkler, Finkler, (2014) microencapsularam *Lactocaseibacillus casei* por *spray drying* com temperatura de entrada de $120 \text{ }^\circ\text{C}$ e utilizando 8,75% de maltodextrina como material de parede. As micropartículas obtidas apresentaram 97% de solubilidade e $35,20 \text{ g.100g}^{-1}$ de higroscopicidade, resultando em um produto com características inadequadas, pois o material apresentou-se higroscópico e com tendência a aglomerar e aderir as paredes do equipamento, pois de acordo com Chávez e Ledebøer (2007), pós com alta higroscopicidade apresentam eficiência e estabilidade comprometidas.

3.2.2 Morfologia e tamanho médio de partícula das microcápsulas

As micrografias das micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG obtidas por *spray drying* são apresentadas na Figura 3. As micropartículas produzidas apresentaram formato esférico com ausência de rachaduras ou poros. Entretanto, a superfície das micropartículas exibiu concavidades corrugadas, o que pode ser atribuído à perda acentuada de água durante o processo de secagem rápida.

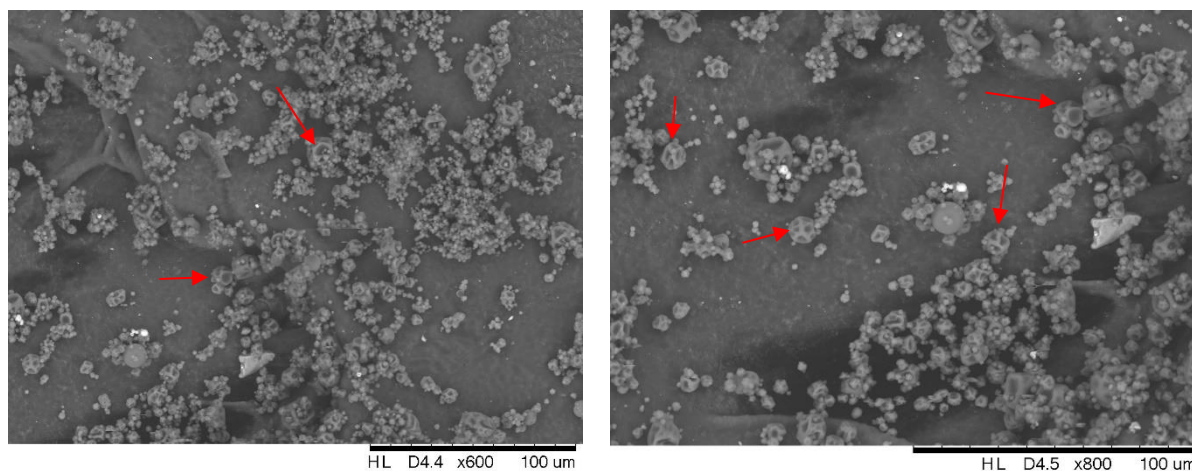


Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas contendo 11,11% de maltodextrina, 2,22% de gelatina, 6,67% de farinha de batata yacon e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

As microcápsulas apresentaram diâmetros entre 6,68 e 19,30 μm . De acordo com Souza et al. (2020), micropartículas maiores oferecem melhor proteção ao material bioativo, enquanto micropartículas menores são mais desejáveis para adição em formulações alimentícias, afim de garantir melhor homogeneidade e qualidade.

Behboudi-Jobbehdar, Soukoulis, Yonekura, Fisk, (2013) microencapsularam *Lactobacillus acidophilus* por *spray drying* utilizando maltodextrina, concentrado de proteína de soro de leite e D-glicose como materiais de parede na proporção 60:20:20. As micropartículas obtidas apresentaram tamanho médio em torno de 10,96 μm , o que é comparável aos valores (6–19 μm) relatados nesse estudo.

3.2.3 Viabilidade do probiótico na micropartícula selecionada em diferentes temperaturas de armazenamento

As micropartículas produzidas devem ser avaliadas em relação às diferentes condições de armazenamento por um determinado período de tempo para verificar a sua capacidade de

manter a viabilidade do probiótico. Além disso, essa avaliação é necessária para definir o tempo e a temperatura que os pós podem permanecer armazenados para uso posterior, visto que um processo de encapsulamento bem-sucedido depende de sua capacidade de preservar a viabilidade dos probióticos durante sua fabricação e armazenamento.

Nesse estudo, a capacidade de sobrevivência da bactéria probiótica microencapsulada durante o armazenamento em temperaturas de -18, 8 e 25 °C são mostradas na Figura 4. Os resultados indicam que a temperatura de armazenamento afetou a viabilidade do probiótico microencapsulado, sendo a sobrevivência de *L. rhamnosus* GG durante o período de armazenamento maior, quando as micropartículas foram armazenadas a -18°C, seguida da temperatura de 8°C. A temperatura de 25°C não se mostrou viável após 30 dias de armazenamento.

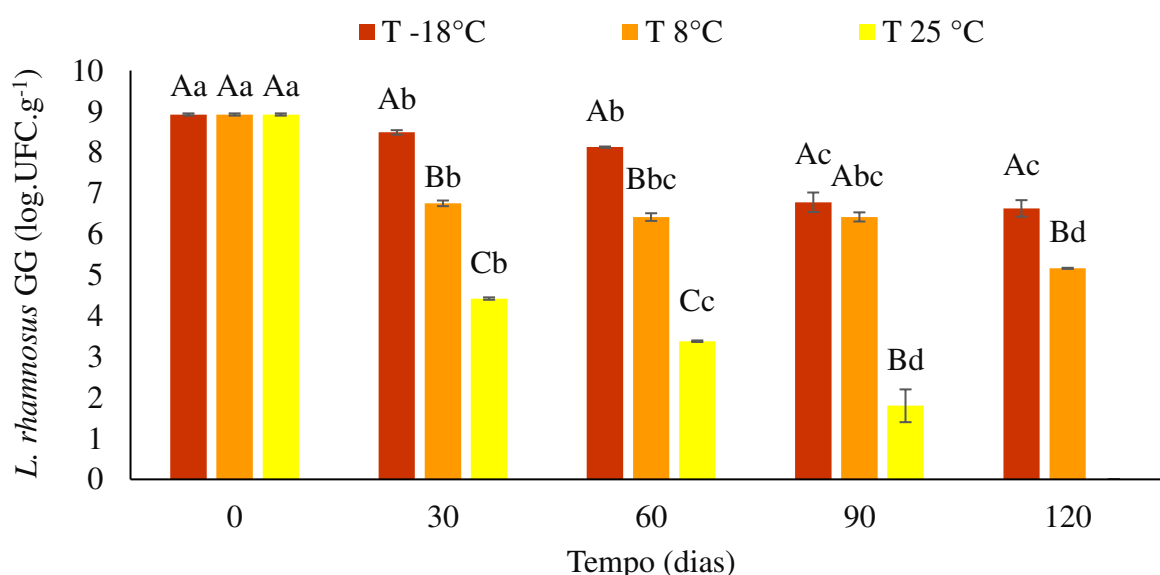


Figura 4. Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG em micropartículas armazenadas em diferentes temperaturas por 120 dias. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras ao mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

O período de estocagem de 120 dias afetou significativamente ($p < 0,05$) a viabilidade do probiótico quando as micropartículas foram armazenadas a -18 °C e 8 °C (Figura4). As micropartículas armazenadas a -18 °C alcançaram os 120 dias de armazenamento com cerca de 6,63 log UFC.g⁻¹. Já as micropartículas armazenadas a 8 °C, atingiram os 120 dias com contagem de *L. rhamnosus* GG de 5,16 UFC.g⁻¹. Porém, o maior desafio foi o armazenamento

a 25 °C, pois as micropartículas não mantiveram a estabilidade do probiótico. Após 30 dias de armazenamento, as micropartículas apresentaram contagens próximas de 4,42 log UFC.g⁻¹. Ao final do período de armazenamento, as micropartículas armazenadas a 25 °C já não apresentaram células viáveis de *L. rhamnosus* GG (Figura 4).

Alguns fatores como o teor de umidade e atividade de água das micropartículas em pó são pontos críticos que influenciam diretamente na viabilidade do microrganismo probiótico. Produtos em pó que apresentam atividade de água acima de 0,25 possibilitam a continuidade do metabolismo microbiano e, conseqüentemente, a redução da viabilidade (Fu & Chen, 2011). De acordo com Zavaleta et al. (2022), a atividade de água tem sido considerada um dos fatores mais importantes para o armazenamento a longo prazo de alimentos desidratados. Como a micropartícula avaliada nesse estudo apresentou atividade de água mais elevada, em torno de 0,36, esse fator pode ter influenciado a viabilidade do probiótico durante o armazenamento a 25 °C.

A inativação dos probióticos quando armazenado a 25 °C também pode ser explicado, devido ao fato dos microrganismos estarem metabolicamente ativos no interior das micropartículas, produzindo ácidos e o consumo de substratos (Pedroso et al., 2012). Já nas temperaturas de -18 e 8 °C, ocorre a redução do metabolismo microbiano tornando essas reações mais lentas e, conseqüentemente, prolongando a viabilidade desses microrganismos.

Avila-Reyes et al. (2014) avaliaram a sobrevivência de *L. rhamnosus* microencapsulado com diferentes materiais de parede como amido de arroz e inulina durante 32 dias de armazenamento sob refrigeração a 4 °C e em temperatura próxima a ambiente em 25 °C. De acordo com os autores, a maior redução de viabilidade foi observada em pós de ambos os materiais de parede armazenados a 25 °C, assim como no presente estudo. Para os autores, a atividade metabólica do microrganismo foi maior a 25 °C, exigindo maior quantidade de substratos para manter a viabilidade ao longo do tempo.

Bhagwat, Bhushette, Annapure (2020) também relataram que as temperaturas de armazenamento utilizadas podem ter um impacto na estabilidade dos probióticos por meio de um mecanismo que consiste no aumento da atividade metabólica das células durante o armazenamento envolvendo reações químicas ou enzimáticas, como por exemplo, a oxidação lipídica.

Abe, Miyauchi, Uchijima, Yaeshima e Iwatsuki (2009) observaram uma correlação negativa significativa entre atividade de água e a taxa de sobrevivência de *Bifidobacterium longum* ssp. *longum* BB536 quando armazenado em diferentes condições de Aw por 30 meses. Para os autores, o controle da higroscopicidade das micropartículas probióticas durante o

armazenamento é fundamental para manter a viabilidade. No entanto, boa parte dos materiais de parede utilizados para microencapsulação por *spray drying* são a base de proteínas hidrofílicas ou carboidratos e tais materiais dificultam o controle da higroscopicidade pois absorvem água durante o armazenamento (Khem, Bansal, Small, & May 2016).

Portanto, a combinação de diferentes materiais de parede nem sempre garante proteção adequada em determinadas temperaturas, assim, é necessário otimizar os materiais utilizados para carrear e proteger a viabilidade celular durante o período de armazenamento do produto. A preservação da alta viabilidade celular durante o processo de produção e o tempo de armazenamento representa um grande desafio na produção comercial de probióticos.

3.2.4 Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais na micropartícula selecionada

A sobrevivência de *L. rhamnosus* GG durante a passagem pelo sistema gastrointestinal (TGI) simulado *in vitro* com contagens na fase entérica II superior a 6 log UFC.g/ml é fundamental para promover efeitos benéficos à saúde do consumidor. Nesse estudo, constatou-se que a microencapsulação foi eficiente para realizar a entrega de, aproximadamente, 6,18 log UFC.g⁻¹ na fase entérica II, quantidade suficiente para promover os benefícios (Figura 5).

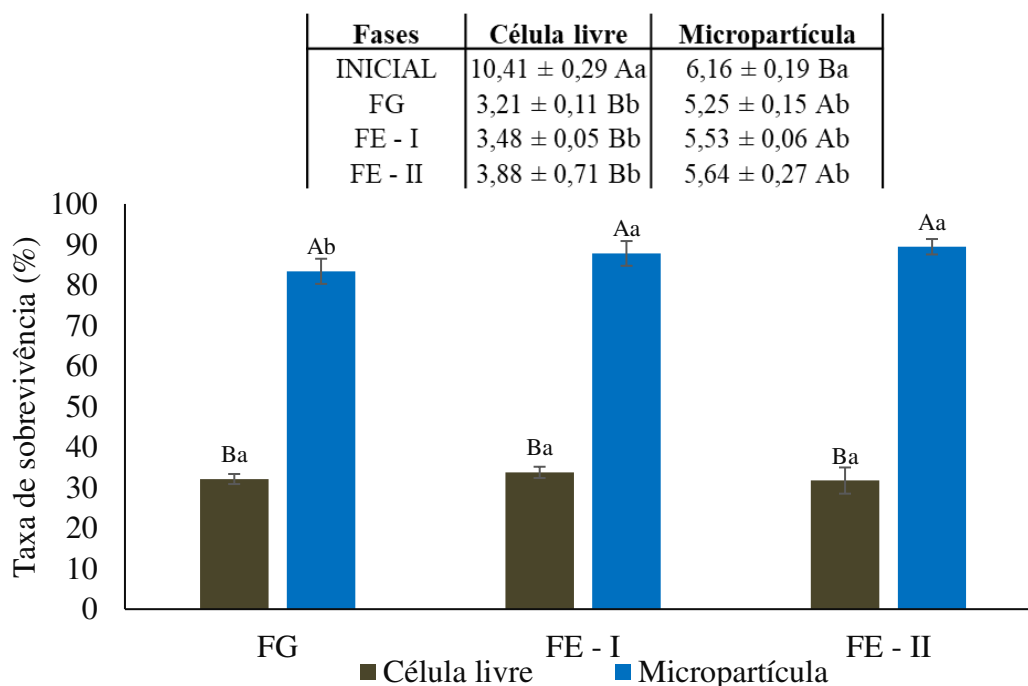


Figura 5. Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em condições gastrointestinais simuladas *in vitro*. Célula livre (■); Micropartícula (■): contendo 11,11% de maltodextrina, 2,22% de gelatina e 6,67% de farinha de batata yacon e 5% de *pellet* de *L. plantarum*. FG: fase gástrica; FE-I: fase entérica I; FE-II: fase entérica II; Letras maiúsculas

diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras na mesma fase. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo das fases.

A viabilidade das células livres de *L. rhamnosus* diferiu ($p < 0,05$) ao longo das fases do sistema gastrointestinal simulado. Na fase gástrica, simulando as condições do estômago com a presença das enzimas pepsina e lipase e pH ácido (< 2.5), houve uma redução de 6 unidades logarítmicas na contagem de células viáveis. Em contrapartida, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou redução de 1 unidade logarítmica e finalizou a passagem pela primeira fase com contagens de $6,19 \log \text{UFC.g}^{-1}$.

Na fase entérica I, que simula o intestino delgado, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou sobrevivência de $6,35 \log \text{UFC.g}^{-1}$ diferindo-se ($p < 0,05$) do probiótico livre que apresentou sobrevivência de $4,11 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Mesmo com a redução de mais de 6 ciclos log desde a fase inicial, *L. rhamnosus* livre ainda apresentou uma boa resistência durante a passagem pelas condições adversas do sistema gastrointestinal *in vitro*. Esse microrganismo probiótico tem demonstrado alta resistência ao estresse, principalmente a estirpe *L. rhamnosus* GG (Fu & Chen, 2011).

Após 6 horas de processo, na fase entérica II, o probiótico microencapsulado apresentou cerca $6,18 \log \text{UFC.g}^{-1}$ de células viáveis, enquanto o probiótico livre apresentou $4,08 \log \text{UFC.g}^{-1}$. Ao final do processo de simulação do TGI, o probiótico microencapsulado apresentou redução de $1,03 \log \text{UFC.g}^{-1}$, enquanto o probiótico livre reduziu cerca de $6,33 \log \text{UFC.g}^{-1}$, comprovando que a microencapsulação por *spray drying* foi uma técnica eficiente para manter a estabilidade e sobrevivência do microrganismo probiótico ao TGI simulado *in vitro*.

Além da resistência do microrganismo probiótico utilizado, é importante destacar que o material de parede empregado na microencapsulação também possui forte influência na resistência das micropartículas desenvolvidas. Por isso, o uso da combinação de probióticos com prebióticos é uma alternativa, afim de promover a sobrevivência dos probióticos e contribuir beneficentemente com a saúde do hospedeiro (Nazzaro et al., 2012).

Li et al. (2023) avaliaram a sobrevivência do probiótico *Limosilactobacillus fermentum* microencapsulado por *spray drying* utilizando produtos da reação de Maillard de gelatina e xilooligossacarídeos durante a simulação do trato gastrointestinal. *L. fermentum* livre reduziu cerca de $5,22 \log \text{UFC/mL}$, enquanto as células encapsuladas apresentaram ligeiras reduções nas contagens, em torno de $0,03$ a $0,59 \log \text{UFC/g}$. De acordo com os autores, a gelatina utilizada na elaboração da micropartícula também exerce função importante durante a passagem

pelo sistema gastrointestinal simulado *in vitro*, devido a sua biocompatibilidade, as propriedades de formação de filme e a tolerância desse material quando submetido à digestão gastrointestinal (Li et al., 2023).

Nesse estudo, o emprego da farinha de yacon como material de parede contribuiu com a sobrevivência do microrganismo diante das condições adversas de altas temperaturas, pH ácido e ação de enzimas. Os tubérculos de yacon armazenam grandes quantidades de carboidratos, principalmente frutooligossacarídeos (FOS) e inulina (Lachman et al., 2003; Ojansivu, Ferreira, & Salminen, 2011; Sales et al., 2023). Em sua composição contém mais de 70% de água e a maior parte da matéria seca consiste em frutooligossacarídeos (FOS) onde a concentração pode variar de 0,7% a 13,2% no yacon fresco e 6,4% a 70% na matéria seca, dependendo de fatores como cultivo, localização, época de colheita e temperatura pós-colheita (Delgado, Tamashiro, Pastore, 2013; Caetano et al., 2016). Produtos desidratados, como a farinha de yacon utilizada neste estudo, garantem a existência de alta concentração e estabilidade de FOS (Machado, Silva, Chaves, Alfenas, 2019).

FOS e a inulina são frutanos lineares de unidades de frutose ligadas a β -2,1 terminadas por um resíduo de glicose, que pode ser efetivamente hidrolisado em frutose fermentável (Yu et al., 2016). A inulina não é hidrolisada pelas enzimas digestivas e é fermentada no cólon pela microbiota, causando alterações específicas, por isso é considerada prebiótica (Nazzaro et al., 2012; Rodrigues, Cedran, & Garcia, 2018). Da mesma forma, o intestino delgado humano não possui enzimas para hidrolisar as ligações glicosídicas presente nos FOS, sendo, portanto, considerado indigerível (Hermann, Freire, & Pazos, 1998; Ojansivu, Ferreira, & Salminen, 2011).

Nesse contexto, Martino et al. (2020) avaliaram o efeito de extratos solúveis de farinha de yacon em populações bacterianas intestinais e observaram que o yacon aumentou ($p < 0,05$) a abundância de *Lactobacillus*. Os autores verificaram que o extrato solúvel da farinha de yacon demonstrou propriedades prebióticas potenciais por melhorar a funcionalidade intestinal e, portanto, auxiliar na absorção de minerais.

3.3 Aplicação da micropartícula em geleia de pitaya

Após a caracterização, a micropartícula C contendo 11,11% maltodextrina, 2,22% gelatina, 6,67% farinha de batata yacon e 5% do *pellet* de *L. rhamnosus* GG foi adicionada em geleia de pitaya para avaliação da micropartícula em uma matriz alimentar.

3.3.1 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG microencapsulado em geleia de pitaya

A viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado foi avaliada em geleia de pitaya durante 60 dias de armazenamento em diferentes temperaturas (25 e 8 °C) (Figura 6). Inicialmente, a viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre adicionado à geleia diferiu ($p < 0,05$) da viabilidade do probiótico microencapsulado. Tanto o tratamento F8 quanto o F25 apresentaram contagens mais elevadas, com cerca de 8,24 e 8,51 UFC.g⁻¹ das células viáveis, respectivamente. As geleias M8 e M25, contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado, apresentaram viabilidade inicial de 6,58 e 6,63 UFC.g⁻¹. Essa variação ocorreu devido a elevada concentração do probiótico livre presente no *pellet* utilizado nos tratamentos F (célula livre). Por outro lado, nos tratamentos M8 e M25, a concentração inicial já é menor porque o *pellet* adicionado foi diluído na solução encapsulante antes do *spray drying* para obtenção das micropartículas, e posteriormente, os pós obtidos foram solubilizados nas formulações das geleias.

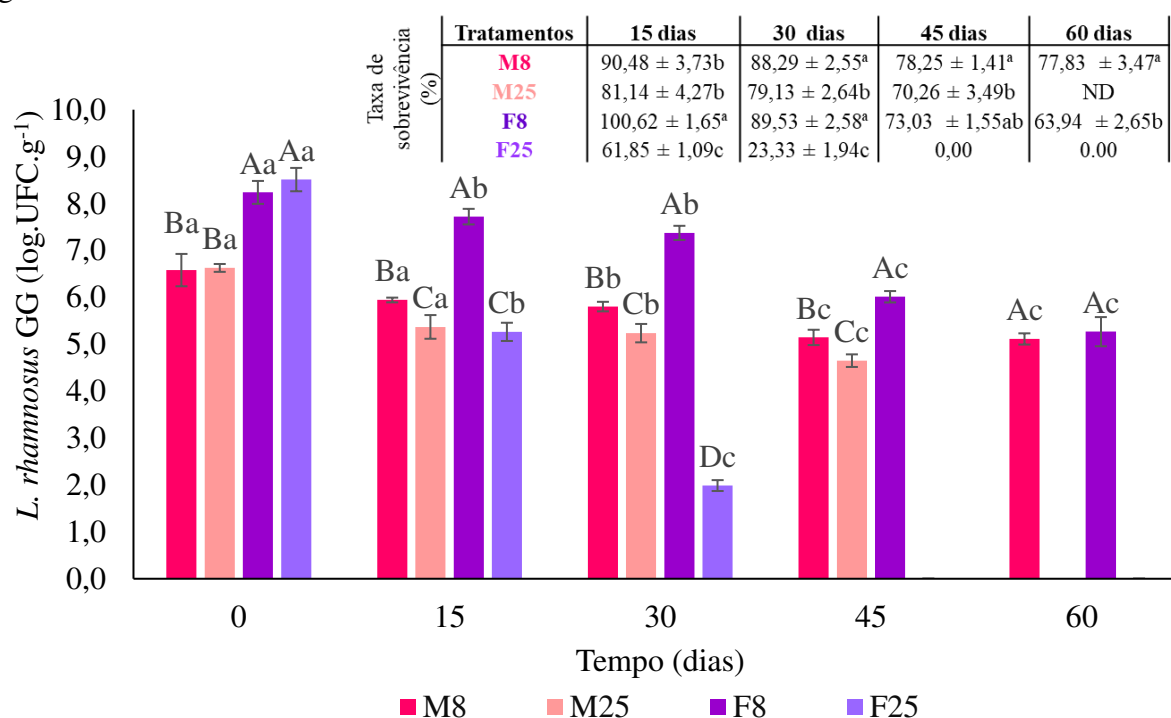


Figura 6. Viabilidade e taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em geleia de pitaya durante 60 dias de armazenamento a 8°C e 25 °C. M8 (■): 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG com armazenamento a 8°C; M25 (■): 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG com armazenamento a 25 °C; F8 (■): 100 g de geleia; 1 g de célula livre de *L. rhamnosus* GG com armazenamento a 8 °C; F25 (■): 100 g de geleia; 1 g de células livres de *L. rhamnosus* GG com armazenamento a 25 °C. ND: não determinado. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa

($p < 0,05$) entre amostras na mesma fase. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo das fases.

Após 15 dias de armazenamento, as geleias contendo probiótico livre (F25) e microencapsulado (M25) armazenados a 25 °C não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre si, com contagens de 5,26 e 5,37 UFC.g⁻¹ respectivamente. Entretanto, em relação a taxa de sobrevivência a geleia F8 com 100,62% das células viáveis diferiu ($p < 0,05$) das geleias M25 e M8 com 81,14% e 90,48%, respectivamente. A geleia F25 contendo probiótico livre e armazenada a 25 °C foi o produto que apresentou menor taxa de sobrevivência, com cerca de 61% das células viáveis. Tais resultados demonstram como a técnica de microencapsulação foi eficiente para estabilizar a viabilidade do probiótico durante o armazenamento mesmo em temperatura desfavorável, pois, a geleia F25 apresentou redução de 3,25 log UFC.g⁻¹, enquanto a geleia M25 apresentou redução de 1,26 UFC.g⁻¹.

Com 30 dias de armazenamento, as geleias contendo o probiótico microencapsulado armazenadas a 8 e 25 °C apresentaram contagens de 5,80 e 5,25 UFC.g⁻¹, respectivamente. Os tratamentos com *L. rhamnosus* GG livre apresentaram contagens de 7,37 e 1,99 UFC.g⁻¹ para F8 e F25 respectivamente. As células do probiótico livre nas geleias mantidas a 25 °C apresentaram redução de 6,52 log UFC.g⁻¹ devido à dificuldade de manter a viabilidade estável durante o armazenamento a 25 °C.

Após 45 dias de armazenamento, o tratamento F25 não apresentou mais contagens de células viáveis. Já a geleia F8 apresentou contagem de 6,01 UFC.g⁻¹, com redução de 2,21 UFC.g⁻¹ desde a contagem inicial. Os tratamentos M8 e M25, contendo o probiótico microencapsulado, apresentaram reduções de 1,43 e 1,98 UFC.g⁻¹ respectivamente. Ao final do armazenamento, o tratamento M8 não diferiu ($p > 0,05$) do tratamento F8, apresentando contagens de 5,11 e 5,27 UFC.g⁻¹. A geleia M25 apresentou contagens de 4,29 UFC.g⁻¹ após 60 dias de armazenamento.

Em relação a taxa de sobrevivência, observa-se que a geleia contendo *L. rhamnosus* GG livre armazenada a 8 °C diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos e apresentou a maior taxa de sobrevivência, com cerca de 100% das células iniciais viáveis. As geleias M8 e M25 não diferiram ($p > 0,05$) entre si, logo a temperatura de armazenamento não afetou a viabilidade do probiótico microencapsulado nesse período. Já a geleia contendo probiótico livre e armazenada a 25 °C diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos e apresentou a menor taxa de sobrevivência com cerca de 61% das células viáveis. Após 30 dias de armazenamento, as geleias F8 e M8 não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre os tratamentos, com taxas em torno de 89 e 88%. A

geleia M25 apresentou diferença ($p < 0,05$) com cerca de 79% das células viáveis em relação a geleia F25 com apenas 23% das células viáveis.

No tempo 45 dias, a geleia M8 diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos e apresentou a maior taxa de sobrevivência, com 78% das células viáveis. Já a geleia F25 não apresentou contagens de células viáveis. Aos 60 dias de armazenamento sob refrigeração (8 °C), a geleia contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado diferiu ($p < 0,05$) da geleia contendo o probiótico livre, com taxas de sobrevivência de 77 e 63%, respectivamente. A geleia M25 apresentou contaminação nas embalagens após o longo período de armazenamento.

Com base nesses resultados, é possível verificar que a adição do probiótico microencapsulado na geleia foi eficiente para manter sua viabilidade durante 60 dias de armazenamento. Dessa forma, ao consumir 10 g da geleia contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado contendo cerca de 6 log UFC.g⁻¹, os danos causados ao microrganismo durante a passagem pelo sistema gastrointestinal serão menores e o probiótico chegará no local de ação em quantidades suficientes para promover os benefícios à saúde.

3.3.2 Avaliação do pH das geleias durante o armazenamento

As geleias também foram avaliadas quanto as variações de pH durante o período de armazenamento (Tabela 2). Após o processamento das geleias, não houve diferença de pH ($p > 0,05$) entre os tratamentos. Porém, após 15 dias de armazenamento, a geleia F25 contendo *L. rhamnosus* GG livre e armazenada a 25 °C diferiu ($p < 0,05$) dos demais tratamentos e apresentou uma rápida redução do pH que, foi de 5,08 para 3,68. Resultados como esses, de diminuição do pH, podem ocorrer através da adição de microrganismos ao produto que utilizam os substratos presentes na matriz para atividades metabólicas e, assim, produzem ácidos orgânicos, como o ácido láctico (Costa et al., 2020; Campos et al., 2019; Nakkarach & Withayagiat, 2018).

Tabela 2. Avaliação do pH de geleias contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado, armazenadas em diferentes temperaturas.

Tratamentos	0 dia	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias
M8	5,02 ± 0,01Aa	4,77 ± 0,09Aa	4,64 ± 0,05Ab	4,68 ± 0,10Ab	4,45 ± 0,08Ac
M25	5,10 ± 0,04Aa	4,54 ± 0,07Ab	4,34 ± 0,25Bb	4,23 ± 0,26Bb	ND
F8	5,05 ± 0,01Aa	4,64 ± 0,08Ab	4,60 ± 0,06Ab	4,47 ± 0,13Ac	4,13 ± 0,17Bd
F25	5,08 ± 0,02Aa	3,68 ± 0,05Bb	3,49 ± 0,11Cb	3,29 ± 0,15Cc	3,02 ± 0,07Cd

*As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. M8: 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG e com armazenamento a 8°C; M25: 100 g de geleia; 10 g de micropartículas contendo *L. rhamnosus* GG e com armazenamento a 25 °C; F8: 100 g de geleia; 1 g de célula livre de *L. rhamnosus* GG e com armazenamento a 8 °C; F25: 100 g de geleia; 1 g de células livres de *L. rhamnosus* GG e com armazenamento a 25 °C. ND: não determinado. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras no mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo do tempo.

Por outro lado, a geleia M8 contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado e armazenada a 8 °C foi a que apresentou as menores alterações do pH e diferiu-se ($p < 0,05$) das geleias contendo *L. rhamnosus* GG livre (F8 e F25) após 60 dias de armazenamento. Esse resultado que confirma uma das finalidades da técnica de microencapsulação, que consiste em proteger o probiótico e evitar o contato do microrganismo com a matriz carreadora, evitando alterações das características físico-químicas e sensoriais do produto. Além disso, sob refrigeração ocorre a redução do metabolismo desses microrganismos que passam a se multiplicar e produzir ácidos de forma mais lenta. Logo, a adição de *L. rhamnosus* GG microencapsulado prolongou a conservação do produto e minimizou a redução do pH durante o período de armazenamento.

3.3.3 Comportamento reológico das geleias produzidas

As propriedades reológicas obtidos pelo modelo de Lei de Potência (Ostwald-de-Waele) e viscosidade aparente (η_{app} , $P_{a.s}$) das geleias contendo célula livre (FC) e célula microencapsulada (MC) de *L. rhamnosus* GG após a produção (tempo 0) e após 45 e 60 dias de armazenamento estão apresentados na Tabela 3.

Tabela 3. Parâmetros reológicos obtidos pelo modelo de Lei de Potência (Ostwald-de-Waele) e viscosidade aparente (η_{app} , Pa·s) de geleias contendo *L. rhamnosus* GG célula livre (FC) e célula microencapsulada (MC) após 0, 45 e 60 dias de armazenamento.

Amostra	T (°C)	Tempo (dias)	Modelo Ostwald-de-Waele			Viscosidade aparente
			K (Pa·s ⁿ)	n	R^2	(η_{app} - Pa·s) $\dot{\gamma} = 50 \text{ s}^{-1}$
Célula livre (FC)	8	0	2,1 ± 0,2 ^{cd}	0,94 ± 0,01 ^a	0,9998	1,65 ± 0,03 ^c
		45	5,0 ± 0,3 ^b	0,77 ± 0,04 ^b	0,9990	2,02 ± 0,17 ^b
		60	6,2 ± 1,5 ^b	0,77 ± 0,06 ^b	0,9988	2,38 ± 0,20 ^b
	25	0	1,6 ± 0,3 ^d	0,75 ± 0,04 ^b	0,9850	0,61 ± 0,03 ^f
		45	2,4 ± 0,5 ^{cd}	0,72 ± 0,01 ^b	0,9987	0,80 ± 0,12 ^e
		60	2,4 ± 0,6 ^{cd}	0,75 ± 0,05 ^b	0,9990	0,86 ± 0,06 ^e
Célula microencapsulada (MC)	8	0	2,9 ± 0,7 ^c	0,90 ± 0,04 ^a	0,9998	2,11 ± 0,18 ^b
		45	12,2 ± 1,9 ^a	0,75 ± 0,03 ^b	0,9997	4,49 ± 0,09 ^a
		60	13,5 ± 1,2 ^a	0,74 ± 0,02 ^b	0,9996	4,77 ± 0,10 ^a
	25	0	2,1 ± 0,7 ^{cd}	0,78 ± 0,06 ^b	0,9977	0,82 ± 0,01 ^e
		45	3,7 ± 1,0 ^{bc}	0,74 ± 0,06 ^b	0,9992	1,30 ± 0,09 ^d

*Diferentes letras minúsculas na coluna indicam diferença significativa entre as amostras de acordo com o teste de Tukey ($p < 0,05$).

As geleias apresentaram índice de comportamento ao escoamento ($n < 1$) que caracteriza um comportamento não newtoniano para todos os tempos e temperaturas de armazenamento avaliadas, e podem ser classificadas como pseudoplásticas ($n < 1$), uma vez que, esses fluidos em repouso apresentam um estado desordenado, e quando submetidos a uma tensão de cisalhamento suas moléculas tendem a se orientar na direção da força aplicada (Lima et al., 2019).

O coeficiente de consistência (K) está associado à viscosidade. O valor mais alto de K indica um produto mais viscoso. Embora não tenha sido observada diferença em termos de viscosidade nas geleias FC armazenadas a 8 e 25 °C no dia do processamento (0 dia), ao longo do tempo houve alteração. As geleias MC armazenadas a 25 °C não apresentaram diferença significativa ($p > 0,05$) quando comparada com as geleias FC a 8 e 25 °C. Entretanto, a geleia MC a 8 °C após 45 e 60 dias de armazenamento apresentou diferença ($p < 0,05$) com aumento

significativo do valor de K . Tais resultados evidenciam que as geleias de pitaya apresentaram maior viscosidade aparente com a adição das micropartículas e armazenamento sob refrigeração.

Os materiais de parede utilizados, mesmo em baixa concentração, podem ter influenciado na viscosidade aparente do produto quando armazenado a 8 °C. A adequação do modelo completo para o parâmetro do índice de consistência e índice de comportamento ao escoamento da análise de reologia das geleias de pitaya contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em diferentes temperaturas de armazenamento foi verificado e os dados foram bem ajustados ao modelo de Ostwald de Waele ($0,9850 \leq R^2 \leq 0,9998$) e as variações nos valores do índice de consistência (K) e do índice do comportamento do escoamento (n) foram estudadas (Tabela 3). Resultados semelhantes foram obtidos por Lima et al. (2019) ao avaliaram a influência de hidrocoloides como pectina de baixo metoxil, goma guar e carragenina nas características de geleias de laranja de baixo teor calórico.

Tensão de cisalhamento (τ , Pa) e a taxa de cisalhamento ($\dot{\gamma}$, s^{-1}) das geleias contendo célula livre (FC) e célula microencapsulada (MC) armazenadas a 8 e 25°C após a produção (0 dia), 45 e 60 dias de armazenamento estão apresentadas na Figura 7. A adição de *L. rhamnosus* GG microencapsulado não alterou as características das geleias (τ_0) após o processamento quando armazenadas a 8 °C e ao longo do período de armazenamento (0, 45, 60 dias) a 25 °C. No entanto, a geleia contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou maior valor de tensão de cisalhamento (τ , Pa) a 8 °C, enquanto os menores valores foram observados nas amostras de geleia contendo o probiótico livre e armazenadas a 25 °C durante os tempos 0, 45 e 60 dias.

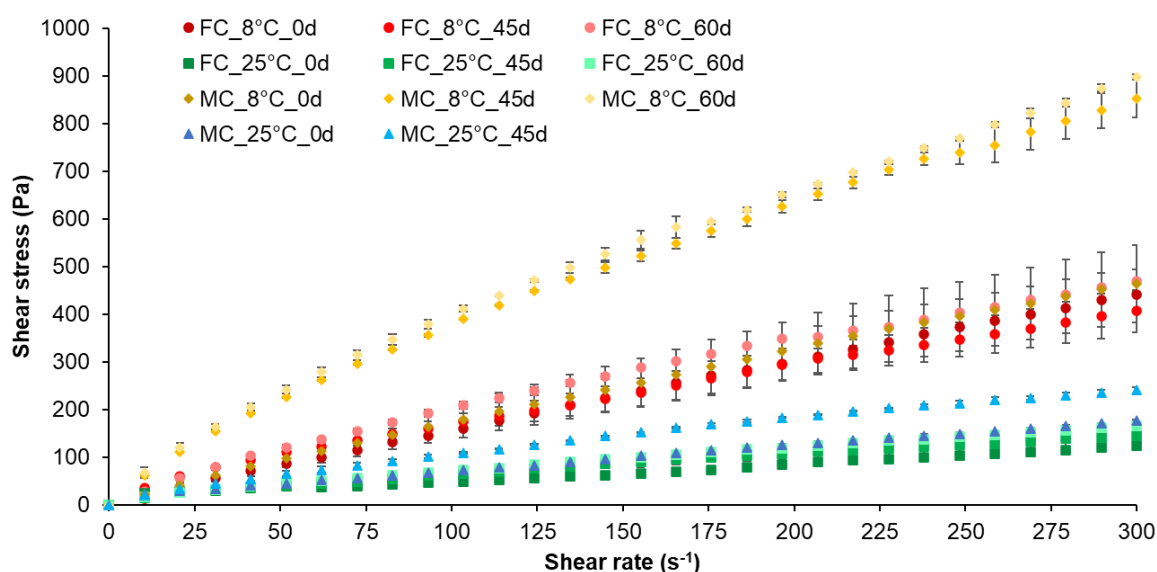


Figura 7. Tensão de cisalhamento (τ , Pa) versus taxa de deformação ($\dot{\gamma}$, s⁻¹) a 8 e 25 °C de células livres de *L. rhamnosus* GG (FC) e células microencapsuladas (MC) após produção (tempo 0), 45 e 60 dias de armazenamento.

4. Conclusão

A farinha de yacon foi aplicada como material de parede de micropartículas contendo probiótico pela primeira vez e, quando combinada com maltodextrina e gelatina, demonstrou-se como uma excelente alternativa para manter a viabilidade de *L. rhamnosus* GG. A micropartícula selecionada protegeu o microrganismo probiótico quando submetido ao tratamento térmico e às variações de pH, apresentando características físico-químicas aceitáveis e mantendo a viabilidade do probiótico a -18 e 8 °C durante 120 dias de armazenamento. Quando submetida às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, a micropartícula apresentou cerca de 6 log UFC.g⁻¹ durante todas as fases avaliadas: gástrica, entérica I e entérica II. Quando adicionada a geleia, a micropartícula contendo *L. rhamnosus* GG apresentou células viáveis por 45 dias quando armazenadas a 25 °C e por 60 dias quando armazenadas a 8 °C. Dessa forma, a farinha de yacon representa uma alternativa promissora como material de parede de baixo custo, alta disponibilidade e com características prebióticas podendo ser utilizada na microencapsulação de probióticos por *spray drying*, principalmente, quando combinada com outros materiais como maltodextrina e gelatina, sendo uma ferramenta para desenvolvimento de produtos probióticos à partir de matrizes vegetais.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro a este estudo.

6. Referências bibliográficas

Abbas, M.S., Saeed, F., Afzaal, M., Jianfeng, L., Hussain, M., Ikram, A., Jabeen, A. (2022).

Recent trends in encapsulation of probiotics in dairy and beverage: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, v.46, n.7, e16689. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16689>

Abe, F., Miyauchi, H., Uchijima, A., Yaeshima, T., Iwatsuki, K. (2009). Effects of storage temperature and water activity on the survival of bifidobacteria in powder form. *International journal of dairy technology*, 62(2), 234-239. <https://doi.org/10.1111/j.1471-0307.2009.00464.x>

Ananta, E., Volkert, M., Knorr, D. (2005). Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. *International dairy journal*, v.15, n.4, 399-409. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2004.08.004>

Annan, N.T., Borza, A.D., Hansen, L.T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, v. 41, p. 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.001>

AOAC. (2000). Official Method 991.36. In *Official Methods Analysis of the AOAC* (17th ed.). AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC. (2016). Association of official analytical chemists. In *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (Vol. 20). Washington, D. C.

Arepally, D., Goswami, T.K. (2019). Effect of inlet air temperature and gum Arabic concentration on encapsulation of probiotics by spray drying. *LWT-Food Science and Technology*, v. 99, p. 583-593. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.022>

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* with different wall materials by Spray Drying. *LWT-Food Science and Technology*, v. 63, p. 685-690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>

Avila-Reyes, S.V., Garcia-Suarez, F.J., Jiménez, M.T., San Martín-Gonzalez, M.F., Bello-Perez, L.A. (2014). Protection of *L. rhamnosus* by spray-drying using two prebiotics colloids to enhance the viability. *Carbohydrate polymers*, v. 102, p. 423-430. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.11.033>

Azarkhavarani, P.R., Ziaee, E., Hosseini, S.M.H. (2019). Effect of encapsulation on the stability and survivability of *Enterococcus faecium* in a non-dairy probiotic beverage. *Food Science and Technology International*, v. 25, n. 3, p. 233-242.

Bedani, R., Rossi, E.A., Isay Saad, S.M. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 34, p. 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.012>

Behboudi-Jobbehdar, S., Soukoulis, C., Yonekura, L., Fisk, I. (2013). Optimization of spray-drying process conditions for the production of maximally viable microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. *Drying technology*, v. 31, n. 11, p. 1274-1283. <https://doi.org/10.1080/07373937.2013.788509>

Bhagwat, A., Bhushette, P., Annapure, U. S. (2020). Spray drying studies of probiotic *Enterococcus strains* encapsulated with whey protein and maltodextrin. *Beni-Suef University Journal of Basic and Applied Sciences*, v. 9, n. 1, 1-8.

Braber, N.V., Vergara, L.D., Rossi, Y.E., Aminahuel, C.A., Mauri, A.N., Cavaglieri, L.R., Montenegro, M.A. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 118, p. 108844. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844>

Caetano, B.F., De Moura, N.A., Almeida, A.P., Dias, M.C., Sivieri, K., Barbisan, L.F. (2016). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) as a food supplement: Health-promoting benefits of fructooligosaccharides. *Nutrients*, 8(7), 436. <https://doi.org/10.3390/nu8070436>

Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of Spray-Dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>

Campos, D., Betalleluz-Pallardel, I., Chirinos, R., Aguilar-Galvez, A., Noratto, G., Pedreschi, R. (2012). Prebiotic effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl), a source of fructooligosaccharides and phenolic compounds with antioxidant activity. *Food chemistry*, v. 135, n. 3, p. 1592-1599. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.05.088>

Campos, R.C.D.A.B., Martins, E.M.F., de Andrade Pires, B., Peluzio, M.D.C.G., da Rocha Campos, A.N., Ramos, A.M., Leite Júnior, B.R.C., Martins, A.D.O., Silva, R.R., Martins, M.L. (2019). *In vitro* and *in vivo* resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG carried by a mixed

pineapple (*Ananas comosus* L. Merrill) and jussara (*Euterpe edulis* Martius) juice to the gastrointestinal tract. *Food Research International*, 116, 1247-1257.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.012>

Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J. (2005). 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, p. 420-428.

<https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>

Carvalho, A.S., Silva, J., Ho, P., Teixeira, P., Malcata, F.X., Gibbs, P. (2003). Effects of Addition of Sucrose and Salt, and of Starvation upon Thermotolerance and Survival During Storage of Freeze-dried *Lactobacillus delbrueckii* ssp *bulgaricus*. *Journal of Food Science*, v. 68, p. 2538 – 2541. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2003.tb07057.x>

Chávez, B. E., Ledebøer, A. M. (2007). Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. *Drying Technology*, v. 25, p. 1193–201.

<https://doi.org/10.1080/07373930701438576>

Chew, S.C., Tan, C.P., Nyam, K.L. (2018). Microencapsulation of refined kenaf (*Hibiscus cannabinus* L.) seed oil by spray drying using β -cyclodextrin/gum arabic/sodium caseinate. *Journal of food engineering*, v. 237, p. 78-85.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.016>

Costa, N. A., Paula, D. A., Brêda, J. D., Vieira, É. N. R., Martins, E. M. F., Ramos, A. M. (2020). A symbiotic dessert composed of yam (*Dioscorea* sp.) and Ubá mango pulp (*Mangifera*

indica L.). *LWT-Food Science and Technology*, 133, 110074.

<https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110074>

Crowe, J.H., Carpenter, J.F., Crowe, L.M. (1998). The role of vitrification in anhydrobiosis. *Annual review of physiology*, 60(1), 73-103.

Damodaran, S., Parkin, K.L. Amino acids, peptides, and proteins. In: *Fennema's food chemistry*. CRC Press, 2017. p. 235-356.

Delgado, G.T.C., Tamashiro, W.M.S.C., Maróstica Junior, M.R., Pastore, G.M. (2013). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*): a functional food. *Plant Foods for Human Nutrition*, v. 68, p. 222-228.

Dinkçi, N., Akdeniz, V., Akalin, A. S. (2019). Survival of probiotics in functional foods during shelf life. In *Food quality and shelf life* (pp. 201-233). Academic Press.

<https://doi.org/10.1016/B978-0-12-817190-5.00006-9>

Dos Santos, R. C. S., Finkler, L., & Finkler, C. L. L. (2014). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* by spray drying. *Journal of Microencapsulation*, 31(8), 759-767.

<https://doi.org/10.3109/02652048.2014.932026>

Dwivedi, S., Sahrawat, K., Puppala, N., Ortiz, R. (2014). Plant prebiotics and human health: Biotechnology to breed prebiotic-rich nutritious food crops. *Electronic Journal of Biotechnology*, v. 17, n. 5, p. 238-245. <https://doi.org/10.1016/j.ejbt.2014.07.004>

Feng, T., Wang, J. (2020). Oxidative stress tolerance and antioxidant capacity of lactic acid bacteria as probiotic: A systematic review. *Gut Microbes*, 12(1), 1801944. <https://doi.org/10.1080/19490976.2020.1801944>

Fernández, E.C., Rajchl, A., Lachman, J., Čížková, H., Kvasnička, F., Kotíková, Z., Milella L., Voldřich, M. (2013). Impact of yacon landraces cultivated in the Czech Republic and their ploidy on the short-and long-chain fructooligosaccharides content in tuberous roots. *LWT-Food Science and Technology*, v. 54, n. 1, p. 80-86. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.05.013>

Fiocco, D., Longo, A., Arena, M. P., Russo, P., Spano, G., Capozzi, V. (2020). How probiotics face food stress: They get by with a little help. *Critical reviews in food science and nutrition*, v. 60, n. 9, p. 1552-1580. <https://doi.org/10.1080/10408398.2019.1580673>

Fu, N., Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, v. 44, n. 5, p. 1127-1149. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.03.053>

Genta, S., Cabrera, W., Habib, N., Pons, J., Carillo, I.M., Grau, A., Sánchez, S. (2009). Yacon syrup: beneficial effects on obesity and insulin resistance in humans. *Clinical nutrition*, v. 28, n. 2, p. 182-187. <https://doi.org/10.1016/j.clnu.2009.01.013>

Gibson, G.R., Hutkins, R., Sanders, M.E., Prescott, S.L., Reimer, R.A., Salminen, S.J., Scott, K., Stanton, C., Swanson, K. S., Cani, P.D., Verbeke, K., Reid, G. (2017). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*, 14(8), 491-502.

Guerin, J., Petit, J., Burgain, J., Borges, F., Bhandari, B., Perroud, C., Desobry, S., Scher, J. Gaiani, C. (2017). *Lactobacillus rhamnosus* GG encapsulation by spray-drying: Milk proteins clotting control to produce innovative matrices. *Journal of Food Engineering*, v. 193, p. 10-19.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.08.008>

Hermann, M., Freire, I., Pazos, C. (1998). Compositional Diversity of the Yacon Storage Root; Program Report 1997–1998. *International Potato Center, Lima*.

Hill, C., Guarner, F., Reid, G., Gibson, G. R., Merenstein, D. J., Pot, B., Morelli, L., Canani, R.B., Flint, H.J., Salminen, S., Calder, P.C., Sanders, M. E. (2014). Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. *Nature reviews Gastroenterology & hepatology*.

Jamekhorshid, A., Sadrameli, S. M., Farid, M. (2014). A review of microencapsulation methods of phase change materials (PCMs) as a thermal energy storage (TES) medium. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, v. 31, p. 531-542. <https://doi.org/10.1016/j.rser.2013.12.033>

Kalita, D., Saikia, S., Gautam, G., Mukhopadhyay, R., Mahanta, C. L. (2018). Characteristics of synbiotic spray dried powder of litchi juice with *Lactobacillus plantarum* and different carrier materials. *LWT*, v. 87, 351-360. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2017.08.092>

Khajehei, F., Merkt, N., Claupein, W., Graeff-Hoenninger, S. (2018). Yacon (*Smallanthus sonchifolius* Poepp. & Endl.) as a novel source of health promoting compounds: antioxidant activity, phytochemicals and sugar content in flesh, peel, and whole tubers of seven cultivars. *Molecules*, v. 23, n. 2, 278. <https://doi.org/10.3390/molecules23020278>

Khem, S., Bansal, V., Small, D.M., May, B.K. (2016). Comparative influence of pH and heat on whey protein isolate in protecting *Lactobacillus plantarum* A17 during spray drying. *Food Hydrocolloids*, 54, 162-169. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2015.09.029>

Lachman, J., Fernández, E. C., Orsák, M. (2003). Yacon [*Smallanthus sonchifolia* (Poepp. et Endl.) H. Robinson] chemical composition and use-a review. *Plant soil and environment*, v. 49, n. 6, p. 283-290.

Li, H., Peng, F., Lin, J.X., Xiong, T., Huang, T. (2023). Preparation of probiotic microcapsules using gelatin-xylooligosaccharides conjugates by spray drying: Physicochemical properties, survival, digestion resistance and colonization. *Food Bioscience*, v. 52, 102462. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2023.102462>

Lima, M. B., Domingos, F. M., de Jesus Lima, J. J. F., de Souza Monteiro, R., dos Santos, O. D. H., & Pereira, P. A. P. (2019). Characterization and influence of hydrocolloids on low caloric orange jellies. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 07-15. <https://doi.org/10.9755/ejfa.2019.v31.i1.1894>

Machado, A.M., da Silva, N.B., Chaves, J.B. P., Alfenas, R. C. G. (2019). Consumption of yacon flour improves body composition and intestinal function in overweight adults: A randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial. *Clinical nutrition ESPEN*, v. 29, p. 22-29. <https://doi.org/10.1016/j.clnesp.2018.12.082>

Martino, H.S.D., Kolba, N., Tako, E. (2020). Yacon (*Smallanthus sonchifolius*) flour soluble extract improve intestinal bacterial populations, brush border membrane functionality and

morphology in vivo (*Gallus gallus*). *Food Research International*, 137, 109705.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2020.109705>

Mosquera, L.H., Moraga, G., Martínez-Navarrete, N. (2012). Critical water activity and critical water content of freeze-dried strawberry powder as affected by maltodextrin and arabic gum. *Food Research International*, v. 47, n. 2, p. 201-206.

<https://doi.org/10.1016/j.foodres.2011.05.019>

Nakkarach, A., Withayagiat, U. (2018). Comparison of synbiotic beverages produced from riceberry malt extract using selected free and encapsulated probiotic lactic acid bacteria. *Agriculture and Natural Resources*, 52(5), 467-476.

<https://doi.org/10.1016/j.anres.2018.11.013>

Nazzaro, F., Orlando, P., Fratianni, F., Coppola, R. (2012). Microencapsulation in food science and biotechnology. *Current opinion in biotechnology*, v. 23, n. 2, p. 182-186.

<https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.10.001>

Neuenfeldt, N.H., Farias, C.A.A., de Oliveira Mello, R., Robalo, S.S., Barin, J.S., da Silva, L.P., Muller, E.I., Flores, E.M.M., Barcia, M.T., de Menezes, C.R. (2022). Effects of blueberry extract co-microencapsulation on the survival of *Lactobacillus rhamnosus*. *LWT-Food Science and Technology*, v. 155, 112886. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112886>

Núñez-Ramírez, D.M., López-Martínez, A., Medina-Torres, L., Calderas, F., Martínez-Prado, M.A., Lara, R.H., Herrera-Valencia, E.E., Anguiano-Veja, G.A., Manero, O. (2021). Microencapsulation of *Acidithiobacillus thiooxidans* by spray drying using biopolymers as wall

materials: A potential alternative for its application in the mining industry. *Minerals Engineering*, v. 166, 106882. <https://doi.org/10.1016/j.mineng.2021.106882>

Ojansivu, I., Ferreira, C.L., Salminen, S. (2011). Yacon, a new source of prebiotic oligosaccharides with a history of safe use. *Trends in Food Science & Technology*, v. 22, n. 1, p. 40-46. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.11.005>

Paula, D.A., Martins, E.M.F., Costa, N.A., de Oliveira, P. M., de Oliveira, E.B., Ramos, A.M. (2019). Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, 133, 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.110>

Pedroso, D.L., Thomazini, M., Heinemann, R.J.B., Favaro-Trindade, C.S. (2012). Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. *International Dairy Journal*, 26(2), 127-132. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2012.04.008>

Peredo, A.G., Beristain, C.I., Pascual, L.A., Azuara, E., Jimenez, M. (2016). The effect of prebiotics on the viability of encapsulated probiotic bacteria. *LWT-Food Science and Technology*, 73, 191-196. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2016.06.021>

Pinto, M., Kemp, I., Bermingham, S., Hartwig, T., Bisten, A. (2014). Development of an axisymmetric population balance model for spray drying and validation against experimental data and CFD simulations. *Chemical Engineering Research and Design*, 92(4), 619-634. <https://doi.org/10.1016/j.cherd.2013.12.019>

Pitigraisorn, P., Srichaisupakit, K., Wongpadungkiat, N., Wongsasulak, S. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules. *Journal of Food Engineering*, v. 192, p. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.022>

Quek, S.Y., Chok, N.K., Swedlund, P. (2007). The physicochemical properties of spray-dried watermelon powders. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 46(5), 386-392. <https://doi.org/10.1016/j.cep.2006.06.020>

Raddatz, G. C., da Fonseca, B. D. S., Poletto, G., Jacob-Lopes, E., Cichoski, A. J., Muller, E. I., Flores, E. M. M., Silva, C. B., Menezes, C. R. (2020). Influence of the prebiotics hi-maize, inulin and rice bran on the viability of pectin microparticles containing *Lactobacillus acidophilus* LA-5 obtained by internal gelation/emulsification. *Powder Technology*, 362, 409-415. <https://doi.org/10.1016/j.powtec.2019.11.114>

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D.L., Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, 120, 106882. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>

Reis, F.R., Marques, C., de Moraes, A.C.S., Masson, M. L. (2021). Effect of processing methods on yacon roots health-promoting compounds and related properties. *Trends in Food Science & Technology*, 113, 346-354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.05.010>

Richter, R.L., Vedamuthu, E.R. (2001). Milk and milk products. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, v. 4, p. 483-505.

Rodrigues, F.J., Cedran, M.F., Garcia, S. (2018). Influence of linseed mucilage incorporated into an alginate-base edible coating containing probiotic bacteria on shelf-life of fresh-cut yacon (*Smallanthus sonchifolius*). *Food and Bioprocess Technology*, 11, 1605-1614.

Rosolen, M.D., Bordini, F.W., DE Oliveira, P.D., Conceição, F.R., Pohndorf, R.S., Fiorentini, Â.M., Da Silva, W.P., Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by Spray Drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 115, p. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

Roos, Y. H. (2010). Glass transition temperature and its relevance in food processing. *Annual review of food science and technology*, 1, 469-496. <https://doi.org/10.1146/annurev.food.102308.124139>

Saeed, F., Afzaal, M., Ahmad, A., Aamir, M., Aziz, M., Aslam, S., Ateeq, H., Hussain, M. (2022). Enhanced viability of microencapsulated lyophilized probiotics under in vitro simulated gastrointestinal conditions. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(5), e16543. <https://doi.org/10.1111/jfpp.16543>

Sales, S.S., Dionísio, A.P., Adriano, L.S., de Melo, B.R.C., de Abreu, F.A.P., Sampaio, H.A.C., Silva, I.D.C.G., Carioca, A.A.F. (2023). Previous gut microbiota has an effect on postprandial insulin response after intervention with yacon syrup as a source of fructooligosaccharides: a randomized, crossover, double-blind clinical trial. *Nutrition*, 109, 111948. <https://doi.org/10.1016/j.nut.2022.111948>

Salinas, J.G., Alvarado, J.A., Bergenståhl, B., Tornberg, E. (2018). The influence of convection drying on the physicochemical properties of yacón (*Smallanthus sonchifolius*). *Heat and Mass Transfer*, 54(10), 2951-2961.

Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S.R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S., Jafari, S.M. (2021). Green biopolymers from by-products as wall materials for spray drying microencapsulation of phytochemicals. *Trends in Food Science & Technology*, 108, 297-325.
<https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.008>

Schill, R.O., Mali, B., Dandekar, T., Schnölzer, M., Reuter, D., Frohme, M. (2009). Molecular mechanisms of tolerance in tardigrades: new perspectives for preservation and stabilization of biological material. *Biotechnology Advances*, 27(4), 348-352.
<https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2009.01.011>

Simanca-Sotelo, M., De Paula, C., Domínguez-Anaya, Y., Pastrana-Puche, Y., Álvarez-Badel, B. (2021). Physico-chemical and sensory characterization of sweet biscuits made with Yacon flour (*Smallanthus sonchifolius*). *NFS Journal*, v. 22, p. 14-19.
<https://doi.org/10.1016/j.nfs.2020.12.001>

Souza, M., Mesquita, A., Veríssimo, C., Grosso, C., Converti, A., & Maciel, M. I. (2020). Microencapsulation by spray drying of a functional product with mixed juice of acerola and ciriguela fruits containing three probiotic lactobacilli. *Drying Technology*, 40(6), 1185-1195.
<https://doi.org/10.1080/07373937.2020.1862182>

Sun, W. Q., Leopold, A. C., Crowe, L. M., & Crowe, J. H. (1996). Stability of dry liposomes in sugar glasses. *Biophysical Journal*, 70(4), 1769-1776. [https://doi.org/10.1016/S0006-3495\(96\)79740-0](https://doi.org/10.1016/S0006-3495(96)79740-0)

WHO/FAO, Guidelines for the evaluation of probiotics in food. www.who.int/foodsafety/fs_management/en/probiotic_guidelines.pdf, 2002; (accessed 2021 June).

Ying, D.Y., Phoon, M.C., Sanguansri, L., Weerakkody, R., Burgar, I., Augustin, M.A. (2010). Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. *Journal of Food Science*, 75(9), E588-E595. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01838.x>

Yu, A.Q., Li, L. (2016). The potential role of probiotics in cancer prevention and treatment. *Nutrition and cancer*, 68(4), 535-544. <https://doi.org/10.1080/01635581.2016.1158300>

Yuan, C., Hu, R., He, L., Hu, J., Liu, H. (2023). Extraction and prebiotic potential of β -glucan from highland barley and its application in probiotic microcapsules. *Food Hydrocolloids*, 108520. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2023.108520>

Zavaleta, E.B., Coavichi, L.L., Rodríguez, L.V., Andrade, E.F., García, H.S., Díaz, M.R. (2022). Co-microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* and krill oil by spray-drying. *Food Bioscience*, 50, 102133. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102133>

Zhang, Y., Lin, J., Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, v. 71, p. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>

Zheng, X., Fu, N., Huang, S., Jeantet, R., Chen, X. D. (2016). Exploring the protective effects of calcium-containing carrier against drying-induced cellular injuries of probiotics using single droplet drying technique. *Food Research International*, 90, 226-234. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.034>

CAPÍTULO 4

Maltodextrina, farinha de banana verde e gelatina como materiais de parede para microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG: sobrevivência do probiótico, caracterização da micropartícula e aplicação em doce de banana

Trabalho escrito nas normas da revista *Food Research International* para posterior submissão.

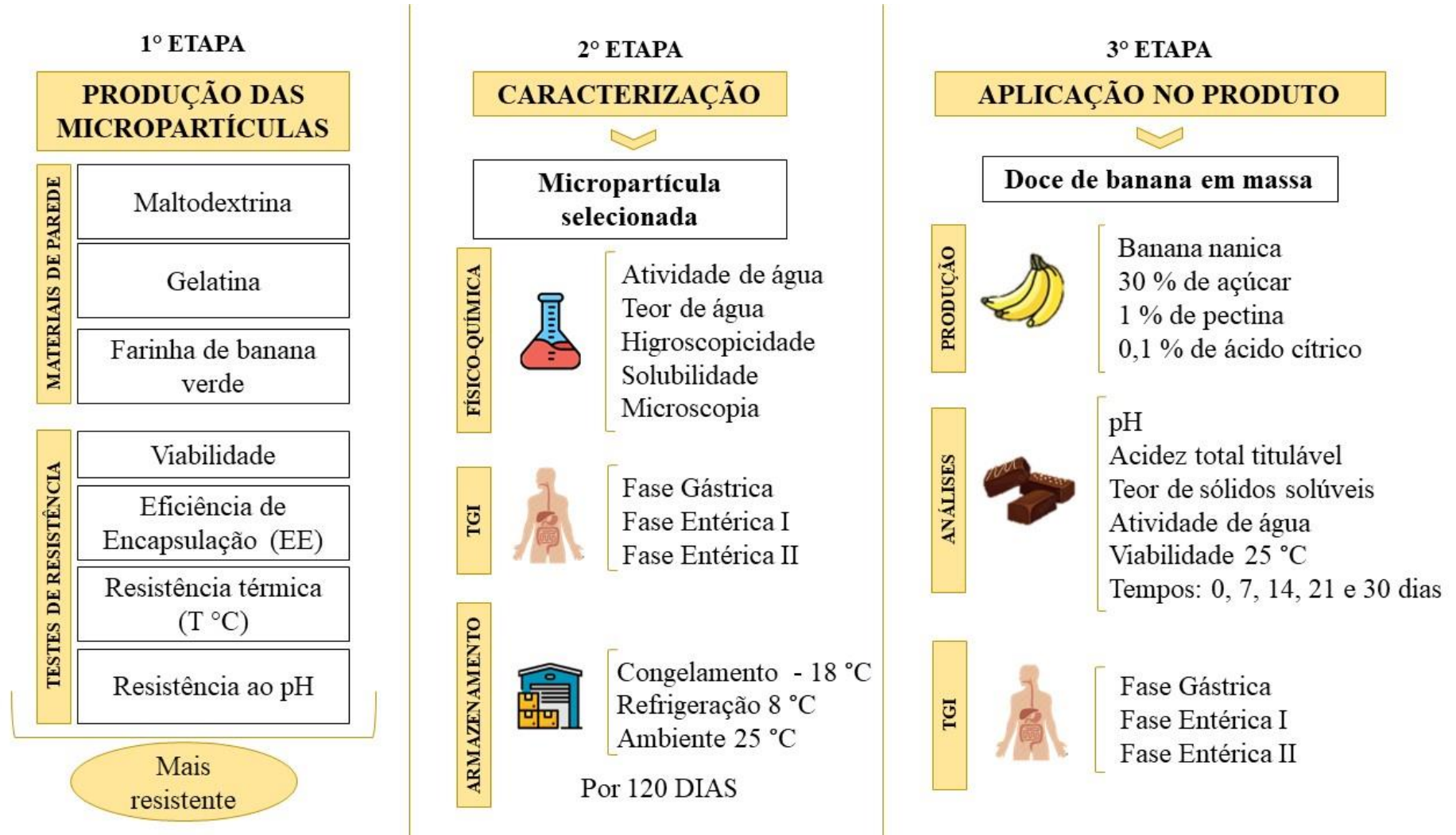
CAPÍTULO 4

Maltodextrina, farinha de banana verde e gelatina como materiais de parede para microencapsulação de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG: sobrevivência do probiótico, caracterização da micropartícula e aplicação em doce de banana

Resumo

Diferentes materiais de parede são aplicados na microencapsulação de probióticos por *spray drying* a fim de proteger esses microrganismos de condições adversas, tais como variações de temperatura, de pH e condições de armazenamento. Com isso, a busca por materiais de parede eficientes, de baixo custo, com alta disponibilidade e provenientes de fontes naturais é cada vez maior. No presente estudo, foram desenvolvidas micropartículas através da técnica de *spray drying* utilizando farinha de banana verde combinada com materiais convencionais como maltodextrina e gelatina para microencapsular *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG. As micropartículas produzidas foram avaliadas em relação a eficiência da encapsulação, resistência térmica do probiótico e às variações de pH. Posteriormente, a micropartícula que proporcionou maior resistência ao probiótico foi caracterizada e avaliada quanto a viabilidade do mesmo durante 120 dias em diferentes condições de armazenamento (-18, 8 e 25 °C), sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e viabilidade do probiótico quando adicionada em doce de banana. Dentre os tratamentos avaliados, a micropartícula contendo 12,5% maltodextrina, 2,5% gelatina e 5% farinha de banana verde apresentou eficiência de encapsulação de > 80%, alta resistência térmica do probiótico (> 77%) e sobrevivência em pH ácido (> 74%). Além disso, *L. rhamnosus* GG permaneceu viável com contagens de 7,24 log UFC.g⁻¹ quando armazenado a 8 °C e 7,97 log UFC.g⁻¹ quando armazenado a -18 °C. *L. rhamnosus* GG resistiu à simulação gastrointestinal *in vitro* com cerca de 5,53 log UFC.g⁻¹ das células viáveis. Quando as micropartículas foram adicionadas ao doce de banana, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou maior viabilidade em relação ao probiótico livre armazenados a 25 °C. Dessa forma, a micropartícula desenvolvida utilizando maltodextrina, farinha de banana verde e gelatina pode ser considerada como uma boa matriz prebiótica carreadora e eficiente para proteger microrganismos probióticos no desenvolvimento de alimentos potencialmente simbióticos.

Palavras-chaves: desenvolvimento de produtos, doce em massa, matriz vegetal, probiótico, prebiótico.



1. Introdução

Os alimentos funcionais são alimentos ou ingredientes que quando consumidos na dieta habitual produzem efeitos benéficos à saúde além de atender às necessidades nutricionais básicas, com a capacidade de prevenir e tratar doenças crônicas (Fu et al., 2022; Küster-Boluda, & Vidal-Capilla, 2017; Goetzke, Nitzko, Spiller, 2014). Esses alimentos podem conter substâncias como fibras, microrganismos probióticos, ácidos graxos como ômega-3, compostos fenólicos e carotenóides (Coelho et al., 2019).

Os probióticos correspondem ao setor de maior crescimento das indústrias farmacêutica, nutracêutica e de alimentos funcionais (Ruiz Rodríguez et al., 2019). Dentre os probióticos, *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG, também conhecido como *Lactobacillus rhamnosus* GG antes da reclassificação por Zheng et al. (2020) é uma das cepas probióticas mais estudadas pela comunidade científica e vem apresentando resultados satisfatórios quando adicionados em matrizes alimentares (Kara, Volkan, & Erten, 2019; Xavier-Santos, Scharlack, Lima Pena, & Antunes, 2022; Sireswar, Dey, & Biswas, 2021; Chan, Toh, & Liu, 2021; Vesterlund, Salminen, & Salminen, 2012). *L. rhamnosus* GG possui algumas características específicas, como alta adesão a superfície das mucosas, resistência a ácidos e atividade imunológica (Capurso, 2019).

O consumo regular de alimentos contendo probióticos é capaz de proporcionar alguns benefícios ao hospedeiro para manutenção da saúde. Dentre eles, o bom funcionamento do sistema intestinal, alívio da constipação, melhoria da resposta do sistema imunológico, redução dos níveis de colesterol sérico, melhoria dos níveis de tolerância à lactose e proteção contra câncer de cólon (Galdeano, Cazorla, Dumit, Vélez, & Perdigón, 2019; El-Naggar, Soliman, Morsy, & Abdel-Aziz, 2020; Infusino et al., 2020; Mrityunjaya et al., 2020).

No entanto, a capacidade de proporcionar esses benefícios é reduzida devido a sensibilidade desses microrganismos a condições ácidas, exposição a temperaturas elevadas, toxicidade do oxigênio, estado físico da matriz alimentar, condições de armazenamento do alimento e a passagem pelo sistema gastrointestinal (Farnworth, & Champagne, 2010; Vivek et al., 2023), sendo os danos causados a estes microrganismos minimizados pela utilização da técnica de microencapsulação.

O método mais comumente utilizado para microencapsular bactérias probióticas na indústria de alimentos é o *spray drying*, que consiste em formar uma suspensão contendo os probióticos e os agentes de revestimento, sendo essa solução encapsulante posteriormente atomizada na forma de gotículas em uma câmara de secagem contendo ar quente, na qual ocorre uma rápida evaporação do solvente, com a obtenção das micropartículas em pó (Encina,

Vergara, Giménez, Oyarzún-Ampuero, & Robert, 2016; Gharsallaoui, Rouaut, Chambin, Voilley, & Saurel, 2007; Di Pretoro, Manenti, Di Pretoro, & Manenti, 2020).

Uma variedade de materiais de parede pode ser utilizada na microencapsulação de probióticos a fim de proteger esses microrganismos das condições adversas e manter a viabilidade durante as etapas de processamento, armazenamento prolongado e passagem pelo TGI (Razavi, Janfaza, Tasnim, Gibson, & Hoorfar, 2021). Entretanto, encontrar materiais de parede naturais, eficientes e de baixo custo para a microencapsulação de probióticos por *spray drying* é outro grande desafio. Nos últimos anos, o desejo dos pesquisadores de utilizar materiais alternativos aos materiais convencionais, levou a aplicação de novos grupos, que podem ser categorizados como materiais de parede “verdes” (Samborska et al., 2021; Nishad, Mir, Walia, 2019; Kaderides, Goula, 2019).

As frutas verdes, como a banana verde (*Musa paradisiaca* L.), são ricas em grânulos de amido resistente e podem ser consideradas como fonte não convencional de fibras alimentares, pois são indigeríveis. Especificamente, essas frutas contêm cerca de 73,6% a 79,4% de amido, dos quais 47,3% a 54,2% são considerados amido resistente (Alvarado-Jasso et al., 2020). O amido de banana apresenta potencial competitivo e características funcionais em termos de bem-estar humano podendo oferecer uma ampla gama de adequações para muitos aspectos comerciais (Kaur, Dhull, Kumar, & Singh, 2020). Devido ao seu alto teor de amilose e sua resistência a hidrólise, o amido de banana verde fornece maior proteção durante a passagem pelo estômago e oferece liberação diante das condições intestinais (SANCHEZ et al., 2022).

Nesse sentido, devido a falta de estudos utilizando a farinha de banana verde como material de parede na microencapsulação de probióticos por *spray drying*, o presente estudo teve como objetivo avaliar materiais de parede convencionais como maltodextrina e gelatina combinados com a farinha de banana verde orgânica, um material não convencional, para microencapsulação de *Lactobacillus rhamnosus* GG por *spray drying* e incorporar a micropartícula desenvolvida em doce de banana em massa avaliando, assim, o potencial de uma nova matriz para carrear microrganismos probióticos.

2. Material e métodos

2.1 Material

Foram usadas cultura de *Lactobacillus rhamnosus* GG ATCC53103 adquirida da Culturelle® (EUA), farinha de banana verde orgânica adquirida da QEBanana Organic (Piau, MG, Brasil), maltodextrina adquirida da Growth Supplements (Brasil) e gelatina adquirida da Gelita (Alemanha). Outros produtos químicos e enzimas utilizados foram: NaOH e NaH₂PO₄

· 2H₂O (Synth, São Paulo, Brasil), HCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), NaCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), Ca₃CO (QEEL, São Paulo, Brasil), pepsina isolada de mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), lipase de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), pancreatina de pâncreas de suíno (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), bile bovina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), meio de cultura Man Rogosa Sharpe (MRS; Kasvi, São Paulo, Brasil), caldo MRS (TM Media, São Paulo, Brasil), carbonato de cálcio (QEEL, São Paulo, Brasil) e púrpura de bromocresol (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil). Para o preparo do doce em massa de banana foi utilizado açúcar (Delta, Brasil), ácido cítrico (Adicel, Belo Horizonte, Brasil) e pectina (Palazzo do Diet Light, São Paulo, Brasil).

2.2 Cultivo do microrganismo probiótico e condições de crescimento

Uma cápsula de *L. rhamnosus* GG ATCC53103 (Culturelle®) foi ativada em caldo MRS de acordo com Paula et al. (2019) com modificações. O *pellet* obtido foi lavado duas vezes em solução salina estéril (0,85%), centrifugado a 5.000 rpm por 10 minutos e armazenado sob refrigeração até o momento de sua utilização.

2.3 Desenvolvimento das micropartículas

Inicialmente, definiu-se os tratamentos como:

- Micropartícula A: 16,67% maltodextrina, 3,33% gelatina;
- Micropartícula B: 12,5% maltodextrina, 2,5% gelatina e 5% farinha de banana verde;
- Micropartícula C: 15% maltodextrina, 1% gelatina e 4% farinha de banana verde;
- Micropartícula D: 15% maltodextrina, 2% gelatina e 3% farinha de banana verde.

Os materiais foram dissolvidos em água destilada e homogeneizados por 1 hora a 25 °C, sendo as soluções encapsulantes filtradas e autoclavadas a 121°C por 15 minutos. Após o resfriamento, a suspensão de células de *L. rhamnosus* GG na concentração de 5% em relação a quantidade de material da parede foi adicionada à solução de encapsulamento e homogeneizada por 10 minutos em agitador magnético (Fisatom® 752 A) a 25 °C.

2.4 Microencapsulação de *L. rhamnosus* GG por *spray drying*

Para a produção das micropartículas contendo probiótico, as soluções encapsulantes foram secas em um *Spray Dryer* de bancada (BÜCHI® B-290) seguindo metodologia descrita por Braber et al. (2020) com modificações. A temperatura de entrada utilizada foi 130 °C e temperatura de saída de 73 °C, com vazão de alimentação de 0,25 L/h⁻¹ e vazão de ar de secagem de 3,00 m³/min⁻¹. As micropartículas em pó foram fracionadas de acordo com as análises a

serem realizadas e armazenadas sob refrigeração 8 °C em frascos de vidro estéreis com tampa de vedação por pressão e envolvida por plástico PVC para uso posterior.

2.5 Avaliação da resistência do probiótico nas micropartículas produzidas

2.5.1 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas

Um grama de micropartículas foi reconstituído em 9 mL de solução salina (0,85%), obtendo-se a diluição de 10^{-1} . Em seguida, a diluição foi mantida por 5 minutos a 25 °C sob agitação em um misturador vórtex (KASVI® basic K45-2810) para liberar as células probióticas (Arslan, Erbas, Tontul, & Topuz, 2015). A viabilidade foi determinada pela contagem de bactérias ácido-láticas, de acordo com Richter e Vedamuthu (2001).

2.5.2 Eficiência da encapsulação (EE)

A eficiência de encapsulação (EE) foi calculada conforme a Eq. (1), seguindo Annan; Borza; Hansen (2008):

$$EE(\%) = \frac{N}{N_0} \times 100 \quad \text{Eq. (1)}$$

Em que:

N: número de células viáveis (Log UFC.g⁻¹) liberadas das micropartículas;

No: número de células livres viáveis (Log UFC.g⁻¹) na solução de alimentação antes do processo de encapsulamento.

2.5.3 Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas

A resistência da célula livre de *L. rhamnosus* GG (controle) e das mesmas nas micropartículas produzidas foi avaliada de acordo com Zhang, Lin, & Zhong (2015). Um grama de amostra foi diluído em 9 ml de solução salina (0,85 %) e, em seguida, submetida a condições térmicas de 63 °C por 30 minutos (tempo necessário: 4,07 min) e 72 °C por 15 s (tempo necessário: 2,38 min), seguido de resfriamento imediato até atingir a temperatura ambiente (25 °C). A contagem de células viáveis foi realizada pelo método de contagem em placas descrito no item 2.5.1.

2.5.4 Resistência de *L. rhamnosus* GG em diferentes valores de pH

A avaliação da ocorrência de ruptura das micropartículas produzidas foi avaliada em solução com diferentes valores de pH, sendo estes 7,4 e 2,0. Para preparo dessas soluções

utilizou-se solução tampão PBS 100 mM para obtenção de pH 7,4 e solução salina 0,5% (mv⁻¹), pH 2,0 ajustado com HCl 0,1N contendo 3 mg.mL⁻¹ de pepsina. Para tanto, 0,1 g da microcápsula a ser analisada foi ressuspensa em 1 mL de cada solução, misturado por vórtex e mantido em agitador a 150 rpm a 37 °C por 120 min (Rosolen et al., 2019). A contagem de células viáveis foi realizada pelo método de contagem em placas descrito no item 2.5.1.

2.6 Seleção da micropartícula

Após avaliação das micropartículas desenvolvidas, a micropartícula que apresentou maior eficiência de encapsulação, boa resistência térmica e resistência de *L. rhamnosus* GG ao pH foi selecionada para seguir para as próximas etapas de caracterização e aplicação no produto.

2.7 Caracterização físico-química da micropartícula selecionada

2.7.1 Atividade de água

A atividade de água foi determinada usando um medidor de atividade de água. (Aqualab 4TE, Decágonos Devices, Pullman, Washington, EUA) a 25 °C.

2.7.2 Teor de água

O teor de água (% b.u.) das micropartículas foi determinado gravimetricamente com calor (AOAC, 2000), 2 g das micropartículas foram pesadas e espalhadas uniformemente em cápsulas metálicas secas e secas a 105 °C (± 2 °C) até atingirem massa constante.

2.7.3 Higroscopicidade

A higroscopicidade das amostras foi medida segundo Cai & Corke (2000). Um grama de micropartícula foi espalhado em uma placa de Petri e armazenado em um recipiente com solução saturada de NaCl (UR 75,29 %) durante 7 dias a 25 °C. A higroscopicidade foi expressa em g de água absorvida por 100 g de amostra (%).

2.7.4 Solubilidade

Um grama de micropartículas foi transferido para um tubo Falcon contendo 100 mL de água destilada. A homogeneização foi realizada em mesa agitadora a 100 rpm por 30 min a temperatura de 25 °C. A amostra foi dispersa e centrifugada a 3000 rpm por 5 min. Uma alíquota de 25 mL do sobrenadante foi transferida para uma placa de alumínio seca e pré-pesada

que foi mantida a 105 °C (Cano-Chauca, Stringheta, Ramos, & Cal-Vidal, 2005). Em seguida, a solubilidade (%) foi calculada por diferença de peso.

2.7.5 Morfologia e tamanho médio

A morfologia das micropartículas foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (TM3000, HITACHI®), com aumento de 800 x. O tamanho médio das partículas foi determinado usando o software ImageJ 1.50i (Pitigraisorn, Srichaisupakit, Wongpadungkiat, & Wongsasulak, 2017).

2.7.6 Viabilidade do probiótico microencapsulado em diferentes temperaturas de armazenamento

As micropartículas foram armazenadas em temperatura ambiente (25 °C), sob refrigeração (8 °C) e sob congelamento (-18 °C) por 120 dias. As contagens de células viáveis foram avaliadas aos 0, 30, 60, 90 e 120 dias de armazenamento conforme item 2.5.1. e os resultados foram expressos em log UFC·g⁻¹.

2.7.7 Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais

A micropartícula selecionada foi avaliada segundo metodologia descrita por Bedani, Rossi e Saad (2013) para simular as 3 fases: gástrica, entérica I e entérica II.

Na fase gástrica, alíquotas de 10 mL da diluição 10⁻¹ de micropartículas foram transferidas para frascos estéreis de 100 mL, onde o pH foi ajustado para 2,3–2,6 com HCl 1 N. Posteriormente, pepsina (mucosa do estômago de suíno) (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e lipase de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) foram adicionados na concentração de 3 g·L⁻¹ e 0,9 mg·L⁻¹, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C por 2 h com agitação a 150 rpm em incubadora SOLAB (SL 222).

Na fase entérica I, o pH foi ajustado para 5,4–5,7, utilizando solução alcalina (pH12, NaOH 1 N e NaH₂PO₄·2H₂O), contendo também bile bovina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) e pancreatina pancreática suína (Sigma- Aldrich, São Paulo, Brasil) nas concentrações de 10 g·L⁻¹ e 1 g·L⁻¹, respectivamente. Os frascos foram reincubados a 37 °C por 2 h com agitação.

Na fase entérica II, o pH dos sistemas entéricos foi elevado para 6,8–7,2 usando a mesma solução alcalina. Bile bovina e pancreatina foram então adicionadas para atingirem novamente concentrações de 10 g·L⁻¹ e 1 g·L⁻¹, respectivamente. Os sistemas foram novamente incubados a 37 °C por 2 h com agitação, totalizando 6 h de teste.

A contagem das células sobreviventes após cada fase da simulação gastrointestinal foi realizada removendo-se alíquotas de 1 mL que foram diluídas em solução salina 0,85 %. A contagem de bactérias probióticas foi realizada conforme descrito no item 2.5.1.

2.8 Aplicação da micropartícula selecionada em doce de banana

O comportamento da micropartícula selecionada contendo *L. rhamnosus* GG foi avaliado em doce de banana em massa, elaborado conforme Resolução Normativa nº 9, de 1978 (BRASIL, 1978).

2.8.1 Elaboração do doce de banana contendo *L. rhamnosus* GG

Para a produção do doce de banana, foi utilizada banana nanica (*Musa acuminata* 'Dwarf Cavendish') selecionada de acordo com o ponto de maturação 7 (amarela com pequenas manchas de cor marrom) de acordo com a escala de Von Loesecke (PBMH & PIF, 2006), onde o fruto tem teor mínimo de amido e máximo de açúcar. Inicialmente, as frutas foram lavadas em água corrente para eliminação das sujidades superficiais, sanitizadas em solução de 150 mg.L⁻¹ de cloro ativo durante 10 minutos para eliminação de microrganismos contaminantes e enxaguadas em água potável contendo 10 mg.L⁻¹ de cloro ativo. Posteriormente, as bananas foram descascadas manualmente e trituradas em liquidificador industrial (Tron® capacidade de 5 litros) por 5 minutos para obtenção de uma massa homogênea. Adicionou-se 0,1% de ácido cítrico à polpa de banana para evitar o escurecimento. A polpa de banana foi transferida para o tacho aberto sob aquecimento, adicionando-se 30% de açúcar e 1% de pectina cítrica em relação a quantidade de polpa de banana. Os ingredientes foram homogeneizados com auxílio do agitador acoplado ao tacho aberto e iniciou-se a etapa de concentração até atingir o teor de sólidos solúveis de 78 °Brix. O doce obtido foi resfriado até 50 °C e fracionado da seguinte forma:

-Tratamento CL: 2 Kg de doce em massa de banana; 10 g de *L. rhamnosus* GG livre (*pellet*) contendo 12 Log UFC.g⁻¹.

-Tratamento M: 2 Kg de doce em massa de banana; 100 g de *L. rhamnosus* microencapsulado contendo 10 Log UFC.g⁻¹.

Tanto o pellet de células quanto o pó contendo as micropartículas foram adicionados, homogeneizados aos doces e transferidos para formas de aço inoxidável (45x25x2cm) para resfriamento. Após resfriamento, os doces foram cortados com auxílio de facas de aço

inoxidável em formato retangular com, aproximadamente, 50 g cada pedaço e embalados em plástico celofane (polipropileno biorientado BOPP) seguido de embalagem de polipropileno e lacrados em seladora a vácuo (Selovac modelo Jumbo PLUS). Os doces foram codificados de acordo com o tratamento (CL e M) e com o tempo de análise (0, 7, 14, 21 e 30 dias) e armazenados a 25 °C.

2.8.2 Viabilidade

A viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado adicionado no doce de banana foi avaliada nos tempos 0, 7, 14, 21 e 30 dias de armazenamento seguindo metodologia descrita no item 2.5.1. e os resultados foram expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.8.3 Determinação das características físico-químicas do doce de banana em massa

Os valores de pH, acidez titulável (g ácido cítrico/100 g de produto) e sólidos solúveis totais (SST) foram determinados de acordo com a AOAC (2016). A atividade de água foi avaliada em um analisador de atividade de água (Aqualab 4 TE, Decágono Devices, Pullman, Washington, EUA) a uma temperatura de 25 °C. As análises foram realizadas ao longo do período de armazenamento, nos tempos 0, 7, 14, 21 e 30 dias.

2.8.4 Simulação *in vitro* das condições gastrointestinais

L. rhamnosus GG livre e microencapsulado adicionados ao doce de banana foram avaliados quanto a sobrevivência durante a simulação gastrointestinal *in vitro* após a produção (tempo 0 dia) de acordo com Bedani, Rossi e Saad (2013) seguindo metodologia descrita no item 2.6.7 e os resultados foram expressos em $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$.

2.9 Análise estatística

O experimento foi organizado em um delineamento inteiramente casualizado (DIC) e as análises foram realizadas em duplicata com 3 repetições. Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) por meio do teste F seguido do teste de comparação de médias de Tukey ao nível de 5% de significância. Para isso, foi utilizado o software RStudio[®], versão 1.4.1717.

3. Resultados e discussão

3.1 Eficiência da encapsulação (EE %)

A viabilidade do probiótico foi avaliada antes e após o *spray drying*, sendo a eficiência da encapsulação (EE %) calculada (Tabela 1).

Tabela 1. Contagem de *Lacticaseibacillus rhamnosus* GG e eficiência de encapsulação (%).

Tratamentos	Antes da secagem (log UFC.g ⁻¹)	Depois da secagem (log UFC.g ⁻¹)	EE (%)
A	8,44 ± 0,21a	7,62 ± 0,25b	90,29 ± 1,61b
B	8,86 ± 0,07a	7,17 ± 0,05b	80,94 ± 0,27c
C	9,21 ± 0,09a	8,53 ± 0,28a	92,61 ± 3,16a
D	8,85 ± 0,05a	7,70 ± 0,05b	87,06 ± 0,77b

EE: eficiência de encapsulamento. *As médias seguidas da mesma letra na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. A: micropartícula contendo 16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B: micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; C: micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 1% de gelatina e 4% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; D: micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 2% de gelatina e 3% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

As micropartículas desenvolvidas diferiram ($p < 0,05$) em relação a eficiência da encapsulação (EE %). A micropartícula C, contendo 15% de maltodextrina, 1% de gelatina e 4% de farinha de banana verde, apresentou maior taxa de encapsulação e diferiu-se dos demais tratamentos. As micropartículas A (16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina) e D (15% de maltodextrina, 2% de gelatina e 3% de farinha de banana verde) não diferiram entre si e apresentaram eficiência de encapsulação de 90,29% e 87,06%, respectivamente.

A micropartícula B (12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde) apresentou eficiência de encapsulação em torno de 80% diferindo-se dos demais tratamentos. Essa menor eficiência de encapsulação pode ter ocorrido devido à presença de um elevado teor de farinha de banana verde (5%) nesse tratamento, ocasionando dificuldades durante a secagem como entupimento do bico atomizador e escoamento da solução encapsulante dentro da câmara de secagem.

De acordo com Obradović, Volić, Nedović, Rakin, & Bugarski (2022), as maiores perdas após o processo de *spray drying* são consequências da adesão do material de alimentação à parede da câmara durante o processo. Além das perdas, devido a maior viscosidade desse

material, o pó produzido fica mais tempo exposto a temperatura elevada da câmara de secagem, reduzindo, assim, a viabilidade do microrganismo probiótico.

Temperaturas de secagem muito elevadas ou mantidas por maior tempo podem resultar em aumento da inativação das células durante o processo devido ao estresse térmico e à desidratação causada aos microrganismos probióticos. Isso ocorre devido a remoção de moléculas de água ao redor da bicamada fosfolipídica das células, causando perdas nas funções e fluidez da membrana celular. Além disso, também é capaz de danificar componentes celulares como DNA, RNA, ribossomos e proteínas (Arepally, Reddy, & Goswami, 2020).

Dessa forma, a aplicação de materiais de parede eficientes pode reduzir o estresse causado pela secagem. O tipo de material de parede utilizado e a concentração de sólidos da solução encapsulante são fatores que influenciam na eficiência da encapsulação. Para microencapsulação por *spray drying*, a solução de alimentação com concentração de sólidos em torno de 20 a 30% é geralmente considerada ótima para garantir alta viabilidade de células bacterianas (Jantzen, Göpel, Beermann, 2013).

Assim, verificou-se que as concentrações de materiais de parede utilizadas neste estudo promoveram efeitos diferentes na sobrevivência de *L. rhamnosus* GG e, mesmo com a concentração final de sólidos de 20% para todos os tratamentos, a eficiência de encapsulação de todas as micropartículas desenvolvidas apresentaram bons resultados, com viabilidade dos probióticos $> 7 \log \text{UFC.g}^{-1}$ após exposição a temperatura de 130 °C.

Barajas-Alvarez, Gonzalez-Avila, & Espinosa-Andrews (2022) avaliaram a eficiência da encapsulação de *L. rhamnosus* HN001 por *spray drying* utilizando como materiais de parede goma arábica combinada com frutanos de agave, maltodextrina, inulina e trealose com concentração final de sólidos de 10% e as micropartículas obtidas apresentaram eficiência de encapsulação semelhantes aos resultados obtidos neste estudo, com variações de 84 a 93% dependendo da combinação de material utilizada.

3.2 Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas

Uma das principais funções da microencapsulação é proteger o composto de interesse de condições adversas durante o processamento de alimentos, principalmente durante o tratamento térmico. Nesse estudo, as micropartículas desenvolvidas contendo *L. rhamnosus* GG e as células livres deste microrganismo foram avaliadas quanto a resistência térmica nos binômios temperatura/tempo de 72 °C por 15 segundos e 63 °C por 30 minutos e os resultados estão apresentados na Figura 1.

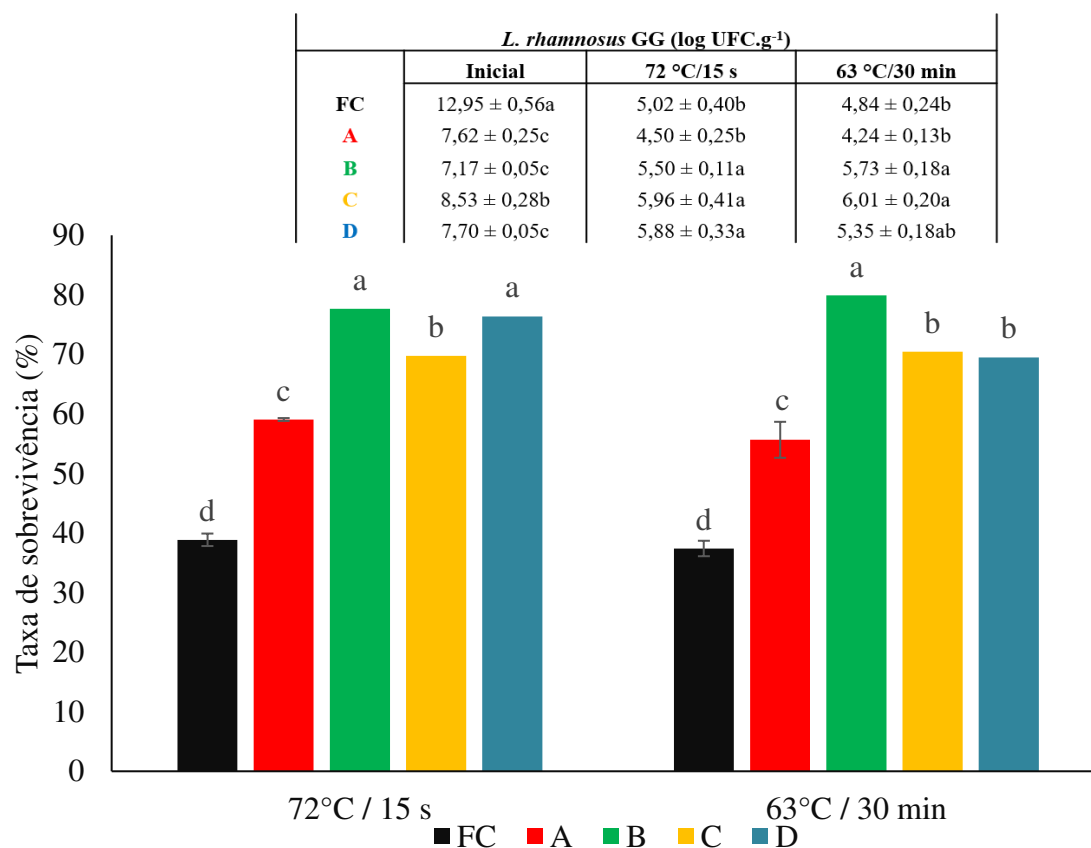


Figura 1. Resistência térmica de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas em diferentes tratamentos térmicos. *As médias seguidas da mesma letra na coluna (contagem de *L. rhamnosus* GG – Log UFC.g⁻¹) ou no mesmo tratamento térmico (Taxa de sobrevivência - %) não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Célula livre composta por 100% *pellet* de *L. rhamnosus* GG (■); A (■): micropartícula contendo 16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B (■): micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; C (■): micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 1% de gelatina e 4% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; D (■): micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 2% de gelatina e 3% de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

Quando submetidas ao tratamento térmico de 72 °C/15 s, a micropartícula B constituída de 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e a micropartícula D com 15% de maltodextrina, 2% de gelatina e 3% de banana verde apresentaram as maiores taxas de sobrevivência, sendo 77,63% e 76,38%, diferindo-se ($p < 0,05$) das micropartículas A, C e da célula livre que apresentou 38,87% de células viáveis. Quanto as contagens de *L. rhamnosus* GG, as micropartículas B, C e D contendo diferentes concentrações de farinha de

banana verde apresentaram diferença ($p < 0,05$) em relação a micropartícula A contendo 16,67% de maltodextrina e 3,33% de gelatina.

Comportamento semelhante ocorreu quando as micropartículas foram submetidas ao tratamento térmico de 63 °C/30 min. A micropartícula B apresentou taxa de sobrevivência de 79,89 % das células de *L. rhamnosus* GG viáveis e diferiu ($p < 0,05$) das micropartículas A, C e D e também da célula livre que apresentou sobrevivência de 37,41 % após exposição ao tratamento térmico. Quanto a contagem das células, as micropartículas B e C diferiram ($p < 0,05$) da micropartícula A e da célula livre.

Assim, constatou-se que as micropartículas desenvolvidas foram eficientes para proteger o microrganismo probiótico dos danos causados por temperaturas elevadas. Observa-se quando expostas a 72 °C/15 s, que as micropartículas apresentaram reduções variando cerca de 1,6 a 3,1 ciclos log UFC.g⁻¹ e, quando expostas a 63 °C/ 30 min apresentaram reduções de 1,4 a 3,3 ciclos log UFC.g⁻¹. Por outro lado, as células livres de *L. rhamnosus* GG apresentaram reduções de 7,9 ciclos log UFC.g⁻¹ quando expostas a 72 °C/ 15 s e cerca de 8,1 ciclos log UFC.g⁻¹ quando expostas a 63 °C/30 min. Em relação a taxa de sobrevivência de *L. rhamnosus* GG, as micropartículas apresentaram resistência térmica dessa bactéria acima de 59% e acima de 55% quando submetidas aos tratamentos de 72 °C/15 s e 63 °C/30 min, respectivamente.

Tais resultados podem ser justificados devido a presença de maltodextrina em maior quantidade combinada com outros materiais. Alguns materiais de parede utilizados na microencapsulação para transportar probióticos como a maltodextrina funcionam como um protetor térmico, sendo capaz de suportar temperaturas elevadas por um período de tempo e, assim, proteger os probióticos dos efeitos térmicos (Yonekura, Sun, Soukoulis, & Fisk, 2014).

A maltodextrina é um dos materiais de parede mais utilizados na técnica de *spray drying* devido à sua eficiência, baixo custo, alta solubilidade e por proporcionar resistência térmica, estabilidade ao congelamento, estabilidade em condições ácidas e proteção física as micropartículas formadas (Shepherd, Robertson, & Ofman, 2000; O'Regan & Mulvihill, 2010; Fioramonti, Arzeni, Pilosof, Rubiolo, & Santiago, 2015; Silva et al., 2019).

Segundo Wu et al. (2021), os açúcares como a maltodextrina quando utilizados como material de parede envolvem os grupos hidroxila presentes nas moléculas de açúcar, que substituem as moléculas de água e interagem com as proteínas na membrana celular formando ligações de hidrogênio e, assim, reduzem a exposição de resíduos polares e apolares na superfície da proteína impedindo sua desnaturação.

Entretanto, a utilização isolada de maltodextrina como carreador de probióticos pode ocasionar na liberação descontrolada do componente ativo ao entrar em contato com a matriz

hidrofílica (Francisco et al., 2018). Por isso, seu uso combinado com outros materiais é recomendado, como foi realizado neste estudo. A viabilidade dos probióticos encapsulados após a exposição a um processo térmico depende de muitos fatores cruciais, dentre eles, o uso da técnica de encapsulamento adequada, a estrutura das micropartículas produzidas e a seleção dos materiais de parede adequados (Pitigraisorn, Srichaisupakit, Wongpadungkiat, & Wongsasulak, 2017).

3.3 Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas em diferentes valores de pH

As micropartículas desenvolvidas foram avaliadas quanto a ruptura em diferentes condições de pH e os resultados estão apresentados na Figura 2. Observa-se que em pH ácido (pH 2,0 + 3 mg.mL⁻¹ de pepsina), as micropartículas B e D não diferiram ($p > 0,05$) entre si e apresentaram contagens de 5,35 e 5,52 Log UFC.g⁻¹, respectivamente. A micropartícula C, não diferiu ($p > 0,05$) da micropartícula B apresentando cerca de 5,21 Log UFC.g⁻¹, entretanto, quando comparada com a contagem inicial, apresentou redução de 3,3 ciclos Log. A micropartícula A contendo 16,67 % de maltodextrina e 3,33 % de gelatina apresentou cerca de 4,67 Log UFC.g⁻¹, com redução de aproximadamente 2,9 ciclo Logs da contagem inicial. A célula livre apresentou cerca de 3,82 Log UFC.g⁻¹ e redução de 9 ciclos log em relação a contagem inicial (Figura 2).

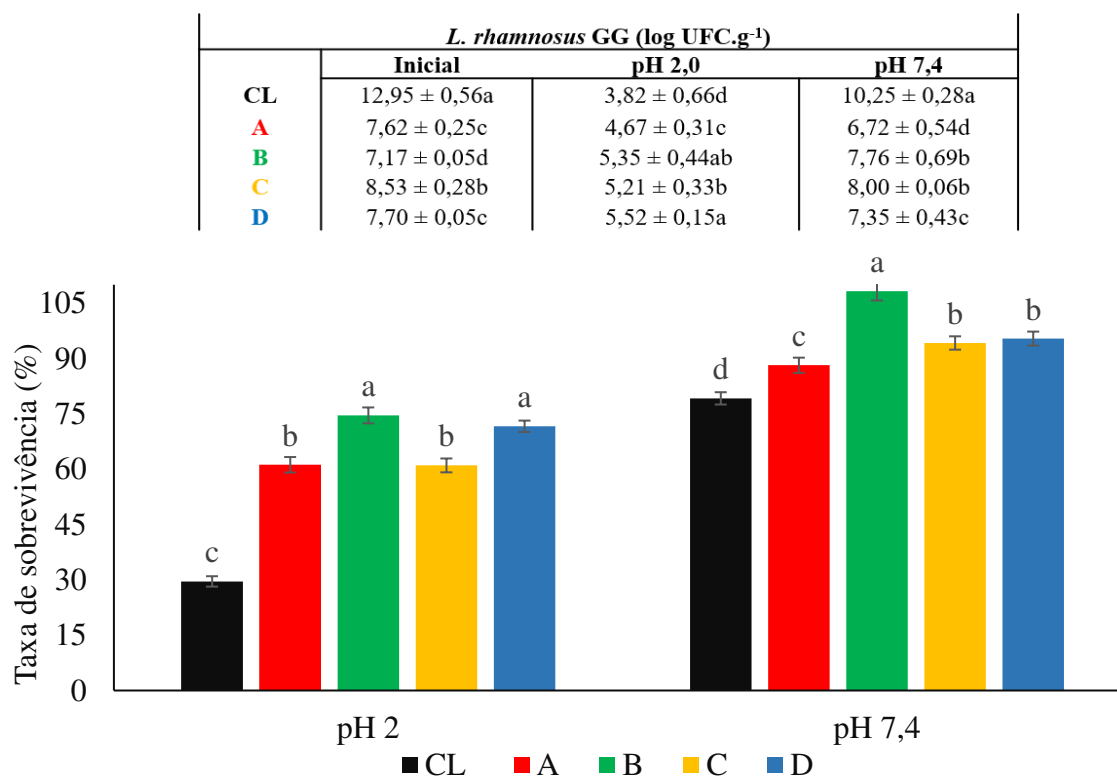


Figura 2. Resistência de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas desenvolvidas em diferentes condições de pH. *As médias seguidas da mesma letra na coluna (contagem de *L. rhamnosus* GG – Log UFC.g⁻¹) ou no mesmo pH de ruptura (Taxa de sobrevivência - %) não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Célula livre composta por 100% *pellet* de *L. rhamnosus* GG (■); A (■): micropartícula contendo 16,67% de maltodextrina, 3,33% de gelatina e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; B (■): micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG ; C (■): micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 1% de gelatina e 4% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG; D (■): micropartícula contendo 15% de maltodextrina, 2% de gelatina e 3% de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

Diferentes estudos indicam que a farinha de banana verde contém cerca de 52 a 75% de amido resistente (Faisant, Gallant, Bouchet, & Champ, 1995; Tribess et al., 2009; Menezes et al., 2011; Gomes, Ferreira, & Pimentel, 2016; Batista et al., 2017). O amido resistente pode conferir um efeito protetor às culturas probióticas, uma vez que se disponibiliza como substrato para esses microrganismos, servindo como fonte de carbono e, assim, auxiliando na manutenção celular e prevenindo os probióticos de possíveis injúrias causadas pela acidez (Batista et al., 2017).

As micropartículas B e D apresentaram as maiores taxas de sobrevivência com 74,59% e 71,63%, respectivamente, diferindo-se das micropartículas A e C que apresentaram taxas

inferiores a 62% das células de *L. rhamnosus* GG viáveis quando mantidos em pH 2,0. As micropartículas foram eficientes para proteger o microrganismo probiótico das condições ácidas, pois quando expostos de forma livre a essas condições, *L. rhamnosus* GG apresentou sobrevivência de apenas 29,58% das células.

Já nas condições de pH 7,4, a micropartícula B diferiu ($p < 0,05$) das demais micropartículas avaliadas, apresentando taxa de sobrevivência acima de 100% evidenciando que *L. rhamnosus* GG foi liberado e ainda aumentou sua viabilidade, provavelmente, utilizando os materiais de parede como substrato. As micropartículas C e D não diferiram ($p > 0,05$) entre si, com taxa de sobrevivência de 94,22% e 95,41% respectivamente. Nessa condição, as micropartículas desenvolvidas apresentaram taxas de sobrevivência acima de 88%, tais resultados evidenciam que os materiais de parede que foram utilizados para microencapsular o probiótico, quando em condições básicas, consegue se romper e liberar o microrganismo.

3.4 Caracterização da micropartícula selecionada

Após a realização dos testes de resistência, a micropartícula B contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG foi selecionada para estudo. Esta micropartícula demonstrou a menor eficiência de encapsulação quando comparada com os demais tratamentos, com cerca de 80,94% de *L. rhamnosus* GG encapsulados. Entretanto, foi a micropartícula que apresentou a maior resistência térmica (>77%), maior estabilidade ao pH 2,0 com sobrevivência acima de 74% das células e sobrevivência de 108% das células quando submetidas ao pH 7,4.

3.4.1 Caracterização físico-química

A micropartícula selecionada apresentou teor de água de $3,48 \pm 0,17\%$ e atividade de água de $0,22 \pm 0,01$, considerados fatores críticos que influenciam diretamente na estabilidade dessas bactérias. Segundo Vesterlund, Salminen, & Salminen (2012), recomenda-se um teor de água abaixo de 7 % e atividade de água abaixo de 0,25 durante o armazenamento a longo prazo, a fim de prolongar a viabilidade dessas células. Com isso, observa-se que a micropartícula selecionada encontra-se dentro do esperado para produtos em pó.

Além disso, de acordo com as normas do Codex, um nível de umidade inferior a 5% é considerado microbiologicamente estável para o acondicionamento e armazenamento de pós (CODEX, 2011). Liu, Chen, & Chen (2022) avaliaram micropartículas contendo *Bifidobacterium adolescentis* obtidas por *spray drying* utilizando maltodextrina e isomalto-

oligossacarídeos como materiais de parede. As micropartículas desenvolvidas apresentaram teor de água de $5,00 \pm 0,14\%$ e atividade de água de $0,21 \pm 0,05$ quando obtidas em condições de secagem semelhantes ao presente estudo, com temperatura de entrada de $130\text{ }^{\circ}\text{C}$ e saída em torno de $75\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Em relação a solubilidade, a micropartícula B apresentou cerca de $75,52\% \pm 0,49$, que é uma das propriedades cruciais para avaliação de produtos comerciais em pó e, principalmente, para aqueles prontos para reconstituição. Segundo Chaturvedi & Chakraborty (2022), micropartículas que apresentam baixa solubilidade ($< 75\%$) indicam alta densidade aparente do pó obtido, com a presença de partículas mais porosas que reduzem a área de superfície total e, assim apresentam solubilidade reduzida. Nesse caso, a micropartícula desenvolvida atende ao indicado com solubilidade acima de 75% .

A higroscopicidade, ou seja, a absorção de água, são capazes de afetar o teor de água residual e a atividade de água dos produtos em pó (Xu, Grizzard, Sismour, Bhardwaj, & Li, 2013). A micropartícula selecionada apresentou cerca de $8,21 \pm 0,37\text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$. Os valores de higroscopicidade variam de acordo com a composição, tipo e concentração do material de parede utilizado no encapsulamento (Arepally, Reddy, Goswami, 2020). Tanto o teor de água quanto a higroscopicidade fornecem características importantes sobre as partículas secas, principalmente no que diz respeito à conservação e manutenção da viabilidade desses produtos (Santos, Machado, 2021).

Resultados semelhantes foram encontrados por Agudelo-Chaparro, Ciro-Velásquez, Sepúlveda-Valencia, & Pérez-Monterroza (2022) quando avaliaram as micropartículas contendo *L. rhamnosus* utilizando *whey protein*, maltodextrina e trealose como materiais de parede e os pós obtidos apresentaram higroscopicidade variando de 8 a $14\text{ g}\cdot 100\text{g}^{-1}$ ao longo do período de armazenamento.

3.5 Morfologia e tamanho de partícula

Por meio da avaliação da microestrutura e a morfologia da superfície da micropartícula selecionada (Figura 3), observou-se que a micropartícula obtida apresentou formato esférico com algumas regiões corrugadas devido a desidratação durante o *spray drying*, o que ocorrem quando uma maior quantidade de água é removida das gotas líquidas durante a secagem, resultando em maior encolhimento das gotas e a formação de rugas (Jinapong, Suphantharika, & Jamnong 2008). Gul (2017) também relatou a formação de concavidades na superfície das

partículas atomizadas que ocorre devido ao encolhimento das partículas durante o processo de secagem devido à rápida evaporação das gotas de líquido.

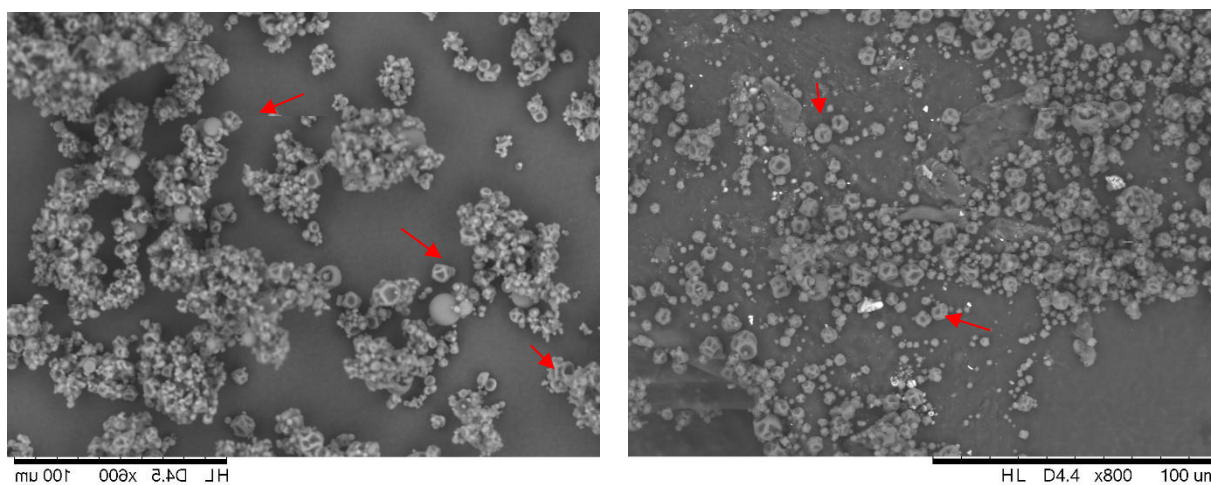


Figura 3. Imagens de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) das micropartículas contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG.

A utilização dos materiais encapsulantes (~20%) e as condições do equipamento de secagem resultaram em micropartículas com tamanho variando de 8,53 a $19,41 \pm 0,78 \mu\text{m}$. Resultados semelhantes foram encontrados por Muhammad, Ramzan, Huo, Tian, Bian, (2017) quando avaliaram diferentes materiais de parede como alginato de potássio, pectina e amido resistente de batata, combinados com protetores térmicos como maltodextrina, isolado de proteína de soro de leite e D-manose para microencapsular *L. plantarum* por *spray drying*. As micropartículas produzidas apresentaram tamanho médio de partícula variando de 15 a 21 μm , sendo que a micropartícula utilizando amido de batata apresentou tamanho médio $21,24 \pm 0,09 \mu\text{m}$. De acordo com os autores, o uso de fibras dietéticas com maior viscosidade, como amido resistente de batata e alginato de potássio, acarretam na formação de pós com maior tamanho médio de partículas.

3.6 Viabilidade durante o armazenamento

A micropartícula selecionada foi avaliada em diferentes temperaturas (-18, 8 e 25 °C) a cada 30 dias, durante 120 dias de armazenamento e os resultados estão apresentados na Figura 4. Verificou-se que após 30 dias de armazenamento, as temperaturas utilizadas influenciaram de forma significativa ($p < 0,05$) a viabilidade de *L. rhamnosus* GG nas micropartículas armazenadas a 25 °C apresentaram redução de cerca de 1,85 $\log \text{UFC} \cdot \text{g}^{-1}$, enquanto aquelas

micropartículas armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram reduções de 0,15 e 0,60 log UFC.g⁻¹, respectivamente.

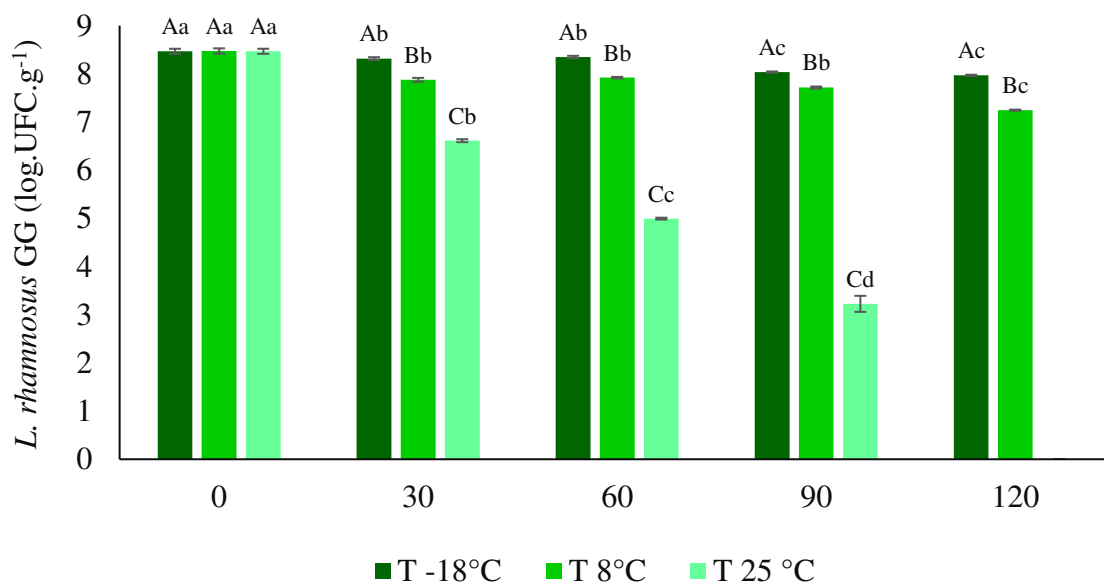


Figura 4. Sobrevivência de *L. rhamnosus* GG microencapsulado em diferentes condições de armazenamento. Micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras ao mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Ao longo de 90 dias de armazenamento, as micropartículas armazenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram redução de cerca 5 ciclos log na viabilidade do probiótico e apresentaram contagens de 3,23 log UFC.g⁻¹. Já aquelas armazenadas a -18 e $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram contagens de 8,03 e 7,72 log UFC.g⁻¹. Após 120 dias, as micropartículas armazenadas a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ não apresentaram células viáveis, enquanto as micropartículas armazenadas a $-18\text{ }^{\circ}\text{C}$ ainda continham cerca de 7,97 log UFC.g⁻¹ com redução de apenas 0,5 ciclo log desde o início do período de armazenamento, e as armazenadas a $8\text{ }^{\circ}\text{C}$ apresentaram contagem de 7,24 log UFC.g⁻¹ após 120 dias, com redução de 1,23 ciclos log em relação ao tempo inicial.

Ainda que a micropartícula armazenada a $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ tenha apresentando redução acentuada ao longo dos 120 dias, esses resultados são satisfatórios. Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, as micropartículas desenvolvidas contendo *Lactiplantibacillus plantarum* apresentam um declínio acentuado na viabilidade celular logo após o 9º dia de armazenamento, com viabilidade abaixo de 6 log UFC.g⁻¹ e após 27 dias não apresentaram células viáveis (Costa

et al., 2023). Nesse estudo, se o produto desenvolvido for para consumo em curto prazo, a adição da micropartículas desenvolvida será eficiente com entrega de, aproximadamente, $7 \log$ UFC/g⁻¹ até 60 dias de armazenamento do pó.

Alguns fatores como o controle do teor de água, da atividade de água, da temperatura, da entrada de oxigênio e a mobilidade molecular são fatores que influenciam a estabilidade dos probióticos durante o período de armazenamento de produtos secos (Santivarangkna, Kulozik, & Foerst, 2008; Rajam e Anandharamakrishnan, 2015). De acordo com Fu & Chen (2011), micropartículas que apresentam valores de atividade de água acima de 0,25 apresentam redução da viabilidade durante armazenamento em temperatura ambiente (25 °C) devido às condições favoráveis para a continuidade do metabolismo bacteriano.

Ainda que em constante redução, a micropartícula avaliada neste estudo conseguiu manter células viáveis a 25 °C até 90 dias de armazenamento, o que pode ser explicado pela capacidade da matriz carreadora utilizada proteger *L. rhamnosus* GG. Além disso, a temperatura de saída mais elevada produzindo um pó com atividade de água > 0,25 e a embalagem de vidro com vedação que foi utilizada para o armazenamento dos pós, a menor porosidade da embalagem pode ter reduzido o nível de permeação do oxigênio e, assim, contribuindo com a estabilidade do probiótico durante armazenamento (Xu, Grizzard, Sismour, Bhardwaj, & Li, 2013).

Os microrganismos probióticos como os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* spp. são microaerófilos e anaeróbios, respectivamente. Assim, espécies reativadas do oxigênio, como o ânion superóxido (O₂⁻), o radical hidroxila (OH⁻) e o peróxido de hidrogênio (H₂O₂), quando se acumulam, podem levar à morte celular (Vasiljevic & Shah, 2008). Dessa forma, a concentração de oxigênio durante o armazenamento deve ser a mais baixa possível, a fim de evitar toxicidade e morte dos microrganismos probióticos e consequente perda de funcionalidade do produto (Cruz et al., 2009). O nível de oxigênio dissolvido no produto está relacionado com o tipo de embalagem utilizada e a sua permeabilidade, sendo considerada o fator crítico para os altos níveis de oxigênio presentes. O polietileno presente nas embalagens plásticas é permeável a gases e permite a difusão de oxigênio nos produtos durante o armazenamento (Talwalkar & Kailasapathy, 2004). Em contraste, o vidro tem permeabilidade extremamente baixa (Cruz et al., 2007).

Muhammad, Ramzan, Huo, Tian, Bian (2017) avaliaram micropartículas contendo *Lactiplantibacillus plantarum* obtidas por *spray drying* utilizando como materiais de parede alginato de potássio, pectina e amido resistente de batata juntamente com protetores térmicos como maltodextrina, isolado de proteína de soro de leite e D-manose em relação a sobrevivência

do probiótico durante período de armazenamento por 42 dias a 25 °C. Os autores observaram que o processo de microencapsulação foi eficiente para proteger as células durante o armazenamento e as micropartículas utilizando amido de batata como material de parede apresentaram a maior resistência, assim como constatado no presente estudo.

Dessa forma, a micropartícula desenvolvida neste estudo contendo *L.rhamnosus* GG quando não for utilizada imediatamente após a secagem, deve ser armazenada sob congelamento (- 18 °C) ou sob refrigeração (8 °C) para uso posterior, afim de garantir a viabilidade dos probióticos. Tais condições são semelhantes a forma de uso dos microrganismos probióticos comerciais disponíveis.

3.7 Sobrevivência de *L. rhamanosus* GG livre e microencapsulado durante a simulação gastrointestinal *in vitro*

O estresse causado aos probióticos em ambientes gastrointestinais tem início no momento que o alimento contendo esses microrganismos é consumido. Logo, a capacidade dos probióticos de resistir durante a passagem pelo sistema gastrointestinal é fundamental para promover os efeitos benéficos à saúde. A taxa de sobrevivência (%) de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado quando submetidos as condições gastrointestinais simuladas *in vitro* estão apresentadas na Figura 5.

Na fase gástrica, após 2 horas em pH ácido (2,0-2,5), *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou sobrevivência de 81,17%, diferindo-se ($p < 0,05$) do probiótico livre com taxa de sobrevivência de 46,33% e redução de 5,19 ciclos log em relação a contagem inicial. Após 4 horas, ao final da fase entérica I que representa a simulação do intestino delgado, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou sobrevivência de 99,73% das células, diferindo-se ($p < 0,05$) de *L. rhamnosus* GG livre que apresentou sobrevivência de 52,05% das células.

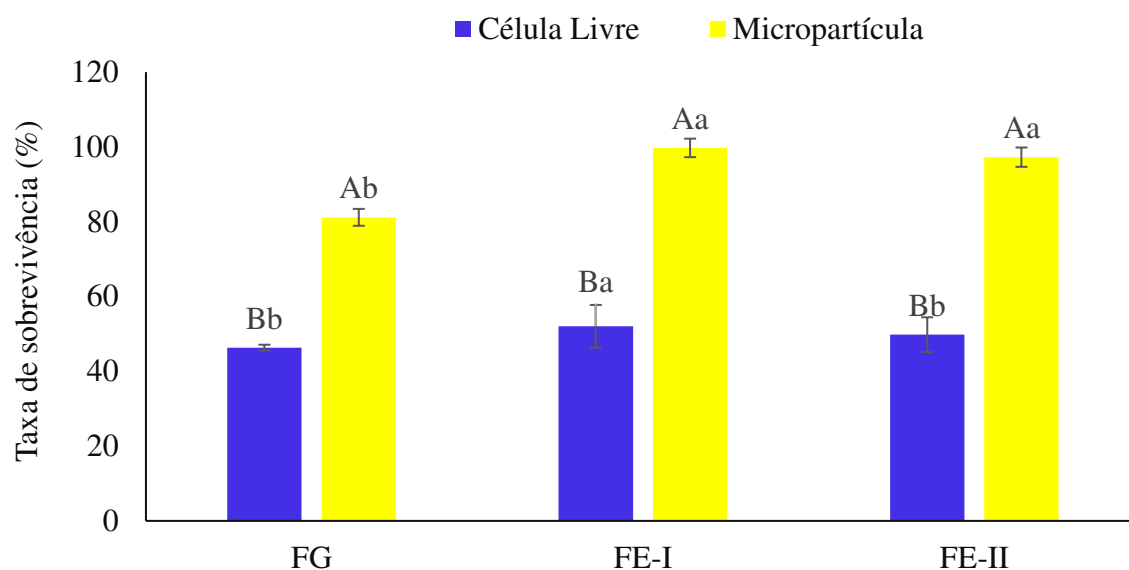


Figura 5. Taxa de sobrevivência (%) de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado durante simulação gastrointestinal *in vitro*. *Célula livre (■); Micropartícula (■): contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG. FG: fase gástrica; FE-I: fase entérica I; FE-II: fase entérica II; Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras na mesma fase. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo das fases.

Ao término da simulação gastrointestinal, na fase entérica II que representa o intestino grosso, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou sobrevivência de 97,26% das células probióticas e diferiu ($p < 0,05$) das células livres que apresentaram taxa de sobrevivência de 49,77% ao final das 6 horas de processo.

Tais resultados demonstram a importância da técnica de microencapsulação e a proteção fornecida pelos materiais de parede utilizados para manter a viabilidade dos probióticos. Muhammad, Ramzan, Zhang, Zhang (2021) avaliaram amidos resistentes de batata, milho e arroz com D-manose, maltodextrina e concentrado de proteína de soro de leite como material de parede para a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* KLDS 1.1003 por *spray drying* e verificaram que o probiótico microencapsulado também demonstrou maior viabilidade em relação ao microrganismo livre quando submetido às condições gástricas simuladas.

A sobrevivência de *L. rhamnosus* GG microencapsulado durante a passagem pelo TGI *in vitro* no presente estudo está relacionado à presença da farinha de banana verde na composição dos materiais de parede utilizados. De acordo com Chang et al. (2022), a farinha de banana possui alguns grânulos de amido contendo superfícies lisas e compactas, e com uma

longa cadeia ramificada e estável. Assim, durante a digestão, essas características dificultam o contato com as enzimas digestivas e a sua entrada para o interior dos grânulos de amido através dos poros promovendo maior resistência à digestão. Logo, o elevado teor de amido resistente presente nesse material de parede é capaz de aprisionar e proteger os probióticos durante o processamento, armazenamento e passagem pelo sistema gastrointestinal (Ashwar, Gani, Gani, Ahmad, & Shah, 2021). Além do amido resistente, a farinha de banana verde também possui baixo índice glicêmico (IG) e polissacarídeos não amiláceos como fibras alimentares, antioxidantes, polifenóis, minerais essenciais como o potássio, algumas vitaminas como: provitamina A, carotenóides, B1, B2, C, que são importantes para a saúde humana (Türker et al., 2016; Khoozani et al., 2019; Lin et al., 2020).

3.8 Aplicação da micropartícula desenvolvida em doce de banana

Após a caracterização, a micropartícula B contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG foi adicionada em doce de banana em massa para avaliação da micropartícula em uma matriz alimentar.

3.8.1 Caracterização físico-química de doce de banana em massa

Os doces contendo células livres e microencapsuladas não diferiram ($p > 0,05$) em relação ao pH no tempo 0 dia. Já após 7 dias, o doce contendo *L. rhamnosus* GG livre diferiu ($p < 0,05$) daquele contendo as micropartículas, o que era esperado pois os microrganismos estavam livres para utilizar os açúcares presente como substrato, ocorrendo a redução do pH e, conseqüentemente, alterações nas características do produto (Tabela 2). Os microrganismos probióticos podem ter metabolizado os açúcares presentes no doce, resultando na produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos (Shah et al., 2010; Sohail et al., 2012). Por outro lado, o produto contendo probiótico microencapsulado conseguiu manter o pH estável durante período de armazenamento, apresentando diferença ($p < 0,05$) somente com 7 dias de armazenamento (Tabela 2).

Tabela 2. Avaliação físico-química de doces de banana em massa contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado durante período de armazenamento.

Tratamentos	Tempo (dias)	pH	ATT	STT	aW
CL	0	4,70 ± 0,01 Aa	0,52 ± 0,23 Ab	84,65 ± 0,03 Ba	0,54 ± 0,08 Ab
	7	4,15 ± 0,01 Bc	0,59 ± 0,31 Aa	83,34 ± 0,05 Bb	0,55 ± 0,06 Ab
	14	4,24 ± 0,02 Bb	0,61 ± 0,19 Aa	83,17 ± 0,04 Ab	0,56 ± 0,02 Aa
	21	4,18 ± 0,01 Bc	0,59 ± 0,22 Aa	83,07 ± 0,02 Bb	0,56 ± 0,06 Ba
	30	4,31 ± 0,03 Bb	0,60 ± 0,25 Aa	83,03 ± 0,03 Bb	0,58 ± 0,06 Aa
M	0	4,73 ± 0,03 Aa	0,54 ± 0,21 Aa	85,55 ± 0,04 Aa	0,54 ± 0,05 Ab
	7	4,69 ± 0,02 Ab	0,51 ± 0,27 Aa	84,26 ± 0,06 Ab	0,54 ± 0,05 Ab
	14	4,71 ± 0,01 Aa	0,50 ± 0,16 Ba	83,87 ± 0,06 Ab	0,57 ± 0,07 Aa
	21	4,77 ± 0,01 Aa	0,55 ± 0,11 Aa	85,10 ± 0,02 Aa	0,59 ± 0,09 Aa
	30	4,76 ± 0,01 Aa	0,51 ± 0,09 Ba	84,63 ± 0,07 Ab	0,59 ± 0,11 Aa

*As médias seguidas de letras iguais na coluna não diferem pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Micropartícula contendo 12,5% de maltodextrina, 2,5% de gelatina, 5% de farinha de banana verde e 5% de *pellet* de *L. rhamnosus* GG. Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre as amostras no mesmo tempo. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) ao longo do tempo para cada amostra.

Quanto a acidez total titulável, os doces contendo *L. rhamnosus* GG livre apresentaram acidez de 0,52 a 0,61 g de ácido cítrico por cada 100 g de doce e o tratamento contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou acidez de 0,50 a 0,55 g de ácido cítrico por cada 100 g de doce, não diferindo ($p > 0,05$) ao longo do período de armazenamento.

De acordo com a Resolução Normativa n. 9 de 1978, o teor mínimo de sólidos solúveis totais para doce em massa deve ser de 65%, logo os doces contendo *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado atendem aos padrões estabelecidos (BRASIL, 1978). Em relação a atividade de água, ambos os tratamentos apresentaram variações de 0,54 a 0,59 ao longo do período de armazenamento e não apresentaram diferença ($p > 0,05$) entre si. Entretanto, os doces apresentaram diferença ($p < 0,05$) ao longo dos 30 dias de armazenamento a 25 °C com um ligeiro aumento na atividade de água ao longo do tempo, que pode ocorrer devido a absorção de água pelo produto e, conseqüentemente, o aumento da água livre.

3.8.2 Viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em doce de banana em massa durante armazenamento

Inicialmente, os doces contendo células livres e microencapsuladas não apresentaram diferença ($p > 0,05$) em relação a contagem de células viáveis do probiótico, apresentando 9,28 log UFC.g⁻¹ e 8,85 log UFC.g⁻¹, respectivamente (Figura 6).

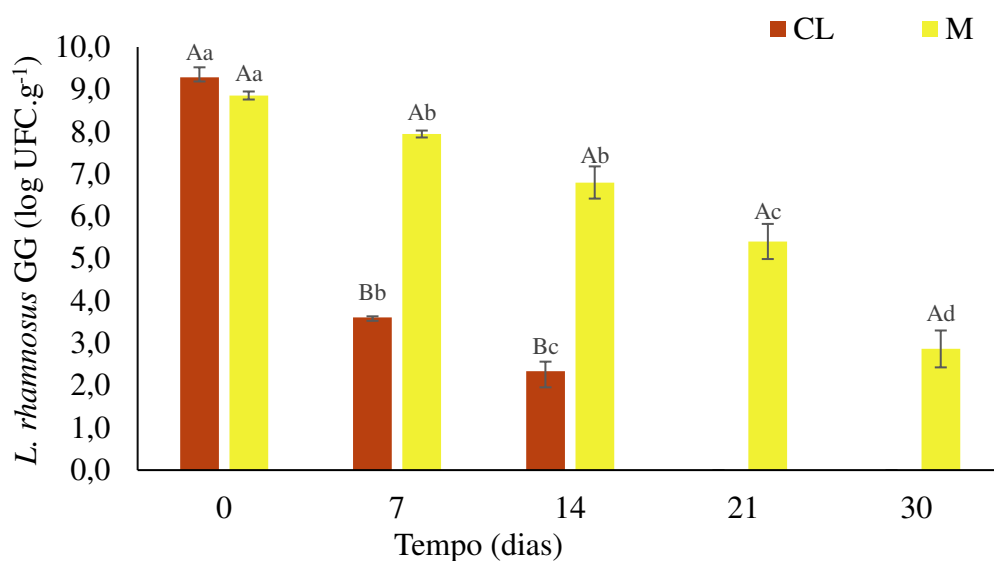


Figura 6. Viabilidade de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado adicionado em doce de banana em massa. CL (■): doce de banana em massa contendo *L. rhamnosus* GG livre; M (■): doce de banana em massa contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado. Inicial: antes da simulação; FG: fase gástrica; FE-I: fase entérica I; FE-II: fase entérica II; Letras maiúsculas diferentes indicam uma diferença significativa ($p < 0,05$) entre amostras na mesma fase. Letras minúsculas diferentes indicam diferença significativa ($p < 0,05$) para a mesma amostra ao longo das fases.

Entretanto, após 7 dias de armazenamento, o doce contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou contagem de 7,94 log UFC.g⁻¹ e diferiu ($p < 0,05$) do tratamento contendo célula livre que apresentou contagem de 3,61 log UFC.g⁻¹, com redução de cerca de 5,61 ciclos log em relação ao tempo inicial. Com 14 dias, o produto contendo *L. rhamnosus* GG livre apresentou 2,34 log UFC.g⁻¹ de células viáveis, enquanto o tratamento contendo probiótico microencapsulado apresentou cerca de 6,80 log UFC.g⁻¹.

Nos tempos 21 e 30 dias de armazenamento, o doce contendo *L. rhamnosus* GG livre não apresentou células viáveis e o tratamento contendo o probiótico microencapsulado apresentou contagens de 5,40 e 2,86 log UFC.g⁻¹, respectivamente. Tais resultados evidenciam o importante papel da microencapsulação para inserção de probióticos em diferentes produtos não lácteos. Apesar da redução ao longo do armazenamento, *L. rhamnosus* GG microencapsulado conseguiu manter-se em quantidades viáveis por mais tempo.

De acordo com os resultados apresentados no presente estudo, a micropartícula desenvolvida contendo *L. rhamnosus* GG representa uma alternativa eficiente para

incorporação de microrganismos probióticos em matrizes de base não láctea como os doces de frutas. Além disso, o doce de banana em massa pode ser considerado como uma matriz apropriada para manter a estabilidade do probiótico em quantidades suficientes para garantir benefícios à saúde do hospedeiro. Para atingir a quantidade recomendada de probióticos viáveis, a porção de 50 g de doce de banana deve ser consumida até os 21 dias de armazenamento para promover os benefícios ao organismo.

3.8.3 Avaliação da sobrevivência às condições gastrointestinais simuladas *in vitro* de *L. rhamnosus* GG livre e microencapsulado em doce de banana em massa

A dosagem de probióticos é um critério importante para obter os benefícios pretendidos para a saúde. Segundo o FDA (EUA), o mínimo estipulado é de 10^6 UFC por mL ou g do produto, para alcançar a ação probiótica no intestino humano (Boylston, Vinderola, Ghodduzi, Reinheimer, 2004). Em geral, é possível verificar que as células probióticas microencapsuladas adicionadas no doce de banana em massa apresentaram as menores reduções (aproximadamente 1,96 ciclo log) na população de *L. rhamnosus* GG ao longo das condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, entretanto no doce contendo células livres, as reduções da viabilidade foram significativas ($p < 0,05$) e as amostras foram estatisticamente diferentes ($p < 0,05$) (Figura 7).

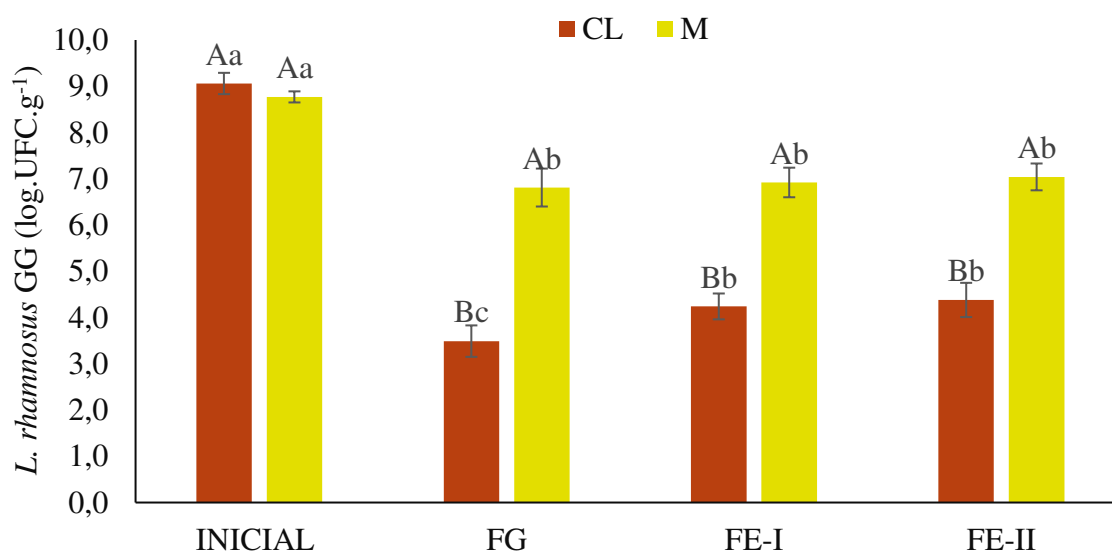


Figura 7. Sobrevivência de *L. rhamonosus* GG livre e microencapsulado em doce de banana em massa durante a simulação gastrointestinal *in vitro* no tempo 0 dia.

Na fase inicial, o doce de banana em massa contendo a célula livre não diferiu ($p > 0,05$) do tratamento contendo o probiótico microencapsulado com contagens de 9,06 e 8,77 Log UFC.g⁻¹, respectivamente. Na fase gástrica, com pH em 2,0 a 2,5, o tratamento contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado diferiu-se ($p < 0,05$) do tratamento contendo o probiótico livre. No doce com probiótico microencapsulado, as reduções da viabilidade foram em torno de 1,9 ciclo log, enquanto no produto contendo a célula livre, as reduções foram 5,5 ciclo log (Figura 7).

Na fase entérica I, após 4 horas de incubação *in vitro*, as menores reduções em relação à população inicial ocorreram para o doce contendo o probiótico microencapsulado, com cerca de 1,8 ciclo log, enquanto o doce com células livres apresentou redução de 4,2 ciclos log. Na fase entérica II, após 6 horas, o doce contendo probiótico microencapsulado apresentou redução de 1,7 ciclo log em relação a contagem inicial diferindo-se ($p < 0,05$) do doce contendo a célula livre com redução de 4,6 ciclo log.

Resultados semelhantes foram encontrados por Santos et al. (2019) ao avaliarem a microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* La-5 por *spray drying* utilizando inulina como material de parede e aplicação das micropartículas em uma mousse dietética simbiótica. A menor redução das contagens de células, após 6 h dos ensaios *in vitro*, ocorreu para mousse com probiótico microencapsulado com redução de apenas 1,3 ciclos log, seguido pela mousse contendo células livres com redução de 3,0 ciclos log.

Neste estudo, *L. rhamnosus* GG microencapsulado e aplicado em doce de banana em massa apresentou elevada sobrevivência quando submetido às condições gastrointestinais *in vitro*, e isso ocorreu devido à estabilidade promovida pelas micropartículas aos probióticos. A combinação de ingredientes prebióticos com os materiais de parede utilizados na micropartícula contribuiu para a sobrevivência do microrganismo, pois a estabilidade dos probióticos durante a digestão é essencial para atingir o local de ação em quantidades suficientes para promover os benefícios à saúde.

A utilização de material de parede prebiótico, como a farinha de banana verde, pode ter contribuído com a resistência desses microrganismos durante a passagem pelo trato gastrointestinal simulado *in vitro*. Afinal, os ingredientes prebióticos atingem o intestino intactos para posterior fermentação pelos microrganismos probióticos. Além disso, esses materiais são resistentes ao pH ácido do sistema gástrico e não são hidrolisados por enzimas digestivas ou absorvidos ao longo do trato gastrointestinal (Davani-Davari et al., 2019).

A incorporação de probióticos, prebióticos e simbióticos em alimentos requer diversos desafios em relação as etapas de processamento e armazenamento do produto. Técnicas de

microencapsulação são alternativas importantes para manter a estabilidade desses compostos durante o desenvolvimento de alimentos até o consumo final. A tendência crescente de produtos vegetarianos e veganos nos últimos dez anos, juntamente com o aumento de consumidores intolerantes à lactose, levou à busca de novos carreadores probióticos e as fontes vegetais são matrizes de origem não láctea e adequadas para administração de probióticos, uma vez que estes são mantidos acima dos intervalos recomendados. Garantir a viabilidade e estabilidade dos probióticos durante o prazo de validade de produtos não lácteos é de extrema importância, uma vez que esses microrganismos estão expostos a vários fatores de estresse que afetam sua viabilidade. Portanto, frutas e hortaliças são matrizes de origem não láctea com grande potencial para preservar a viabilidade probiótica, seja por sua morfologia ou por atuarem como substratos ou prebióticos (Lillo-Pérez et al., 2021).

4. Conclusão

Neste estudo, a farinha de banana verde foi aplicada como material de parede para microencapsular *L. rhamnosus* GG pela primeira vez e, quando combinada com maltodextrina e gelatina, demonstrou-se como uma boa alternativa para manter a viabilidade do microrganismo avaliado. A micropartícula selecionada protegeu o microrganismo probiótico quando submetido ao tratamento térmico e às diferentes condições de pH, e apresentou características físico-químicas aceitáveis, mantendo a viabilidade do probiótico por 120 dias de armazenamento, sob congelamento e refrigeração. Quando submetida às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, a micropartícula apresentou cerca 5 log UFC.g⁻¹ do probiótico. No doce de banana em massa, *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou células viáveis por 30 dias armazenadas a 25 °C. O doce desenvolvido apresentou características físico-químicas adequadas. Quando submetido às condições gastrointestinais simuladas *in vitro*, o doce contendo *L. rhamnosus* GG microencapsulado apresentou maior sobrevivência do mesmo quando comparado aquele contendo as células livres. Com isso, materiais de parede não convencionais como a farinha de banana verde quando combinado com materiais convencionais como maltodextrina e gelatina podem contribuir com a estabilidade dos microrganismos probióticos microencapsulados.

A microencapsulação de probióticos por *spray drying* possibilita o desenvolvimento de novos produtos probióticos em quantidades suficientes para promover os benefícios à saúde. Além disso, a microencapsulação possibilita maior estabilidade aos probióticos durante as etapas de processamento, tratamento térmico e ao longo do período de armazenamento.

5. Agradecimentos

Os autores agradecem à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq pelo apoio financeiro a este estudo.

6. Referências bibliográficas

Agudelo-Chaparro, J., Ciro-Velásquez, H. J., Sepúlveda-Valencia, J. U., & Pérez-Monterroza, E. J. (2022). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* ATCC 7469 by spray drying using maltodextrin, whey protein concentrate and trehalose. *Food Science and Technology International*, 28(6), 476-488.

Alimentarius, C. (1999). Codex standard for milk powders and cream powder. *Codex Standard*, 207.

Alvarado-Jasso, G. M., Camacho-Díaz, B. H., Ocampo, M. L. A., Jiménez-Ferrer, J. E., Mora-Escobedo, R., & Osorio-Díaz, P. (2020). Prebiotic effects of a mixture of agavins and green banana flour in a mouse model of obesity. *Journal of Functional Foods*, v. 64, 103685. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103685>

Amini Khoozani, A., Birch, J., & Bekhit, A. E. D. A. (2019). Production, application and health effects of banana pulp and peel flour in the food industry. *Journal of Food Science and Technology*, v. 56, p. 548-559.

Annan, N.T., Borza, A.D., Hansen, L.T. (2008). Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. *Food Research International*, v. 41, p. 184-193. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.11.001>

AOAC. (2000). Official Method 991.36. In *Official Methods Analysis of the AOAC* (17th ed.). AOAC, Gaithersburg, MD, USA.

AOAC. (2016). Association of official analytical chemists. In *Official methods of analysis of the association of official analytical chemists* (Vol. 20). Washington, D. C.

Arepally, D., Reddy, R. S., & Goswami, T. K. (2020). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCDC 016 cells by *spray drying*: characterization, survival after *in vitro* digestion, and storage stability. *Food & function*, v. 11, n. 10, p. 8694-8706. <https://doi.org/10.1039/D0FO01394C>

Arslan, S., Erbas, M., Tontul, I., Topuz, A. (2015). Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* Var. *Boulardii* with different wall materials by *Spray Drying*. *LWT-Food Science and Technology*, v. 63, p. 685-690. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2015.03.034>

Ashwar, B. A., Gani, A., Gani, A., Ahmad, M., & Shah, A. (2021). Encapsulating probiotics in novel resistant starch wall material for production of rice flour extrudates. *LWT-Food Science and Technology*, v. 140, 110839. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2020.110839>

Barajas-Alvarez, P., Gonzalez-Avila, M., & Espinosa-Andrews, H. (2022). Microencapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* HN001 by *spray drying* and its evaluation under gastrointestinal and storage conditions. *LWT-Food Science and Technology*, v. 153, 112485. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112485>

Batista, A. L. D., Silva, R., Cappato, L. P., Ferreira, M. V. S., Nascimento, K. O., Schmiele, M., Esmerino, E. A., Balthazar, C. F., Silva, H. L. A., Moraes, J., Pimentel, T. C., Freitas, M.

Q., Raízes, R. S. L., Silva, M. C., & Cruz, A. G. (2017). Developing a synbiotic fermented milk using probiotic bacteria and organic green banana flour. *Journal of functional foods*, v. 38, 242-250. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2017.09.037>

Bedani, R., Rossi, E.A., Isay Saad, S.M. (2013). Impact of inulin and okara on *Lactobacillus acidophilus* La-5 and *Bifidobacterium animalis* Bb-12 viability in a fermented soy product and probiotic survival under *in vitro* simulated gastrointestinal conditions. *Food Microbiology*, v. 34, p. 382–389. <https://doi.org/10.1016/j.fm.2013.01.012>

Boylston, T. D., Vinderola, C. G., Ghoddusi, H. B., & Reinheimer, J. A. (2004). Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. *International Dairy Journal*, v. 14, n. 5, p. 375-387. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2003.08.008>

Braber, N.V., Vergara, L.D., Rossi, Y.E., Aminahuel, C.A., Mauri, A.N., Cavaglieri, L.R., Montenegro, M.A. (2020). Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. *LWT - Food Science and Technology*, v. 118, p. 108844. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108844>

BRASIL. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução Normativa nº 9 de 11/12/1978. Resolução normativa sobre os padrões para doce de frutas. Diário Oficial da República Federativa do Brasil, Brasília, 11/12/1978.

Cai, Y.Z., Corke, H. (2000). Production and properties of Spray-Dried *Amaranthus* Betacyanin Pigments. *Journal of Food Science*, v. 65, p. 1248–1252. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2621.2000.tb10273.x>

Cano-Chauca, M., Stringheta, P.C., Ramos, A.M., Cal-Vidal, J. (2005). 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, p. 420-428. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2005.05.003>

Capurso, L. (2019). Thirty years of *Lactobacillus rhamnosus* GG: a review. *Journal of clinical gastroenterology*, 53, S1-S41.

Chan, M. Z. A., Toh, M., & Liu, S. Q. (2021). Growth, survival, and metabolic activities of probiotics *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* CNCM-I745 in fermented coffee brews. *International Journal of Food Microbiology*, v. 350, 109229. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2021.109229>

Chang, L., Yang, M., Zhao, N., Xie, F., Zheng, P., Simbo, J., Yu, X., Du, S. K. (2022). Structural, physicochemical, antioxidant and *in vitro* digestibility properties of banana flours from different banana varieties (*Musa* spp.). *Food Bioscience*, v. 47, 101624. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.101624>

Chaturvedi, S., & Chakraborty, S. (2022). Comparative analysis of *spray drying* microencapsulation of *Lactocaseibacillus casei* in synbiotic legume-based beverages. *Food Bioscience*, v. 50, 102139. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2022.102139>

Coelho, S. R., Lima, Í. A., Martins, M. L., Júnior, A. A. B., de Almeida Torres Filho, R., Ramos, A. D. L. S., & Ramos, E. M. (2019). Application of *Lactobacillus paracasei* LPC02 and lactulose as a potential symbiotic system in the manufacture of dry-fermented sausage. *LWT-Food Science and Technology*, v. 102, p. 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.12.045>

Costa, N. A., Silveira, L. R., Amaral, E. P., Pereira, G. C., Paula, D. P., Vieira, É. N. R., Martins, E. M. F., Stringheta, P. C., Leite Júnior, B. R. C. & Ramos, A. M. (2023). Use of maltodextrin, sweet potato flour, pectin and gelatin as wall material for microencapsulating *Lactiplantibacillus plantarum* by spray drying: Thermal resistance, *in vitro* release behavior, storage stability and physicochemical properties. *Food Research International*, 112367. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.112367>

Da Cruz, A. G., Buriti, F. C. A., de Souza, C. H. B., Faria, J. A. F., & Saad, S. M. I. (2009). Probiotic cheese: health benefits, technological and stability aspects. *Trends in Food Science & Technology*, 20(8), 344-354. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2009.05.001>

Da Cruz, A. G., Faria, J. A. F., & Van Dender, A. G. (2007). Packaging system and probiotic dairy foods. *Food research international*, 40(8), 951-956. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.05.003>

Davani-Davari, D., Negahdaripour, M., Karimzadeh, I., Seifan, M., Mohkam, M., Masoumi, S. J., Berenjian, A., & Ghasemi, Y. (2019). Prebiotics: definition, types, sources, mechanisms, and clinical applications. *Foods*, v. 8, n. 3, 92. <https://doi.org/10.3390/foods8030092>

Di Pretoro, A., Manenti, F., Di Pretoro, A., & Manenti, F. (2020). Spray drying. *Non-conventional Unit Operations: Solving Practical Issues*, p. 65-74.

El-Naggar, M. E., Soliman, R. A., Morsy, O. M., & Abdel-Aziz, M. S. (2020). Nanoemulsion of Capsicum fruit extract as an eco-friendly antimicrobial agent for production of medical bandages. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, v. 23, 101516. <https://doi.org/10.1016/j.bcab.2020.101516>

Encina, C., Vergara, C., Giménez, B., Oyarzún-Ampuero, F., & Robert, P. (2016). Conventional spray-drying and future trends for the microencapsulation of fish oil. *Trends in food science & technology*, v. 56, p. 46-60. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2016.07.014>

Faisant, N., Gallant, D. J., Bouchet, B., & Champ, M. (1995). Banana starch breakdown in the human small intestine studied by electron microscopy. *European Journal of Clinical Nutrition*, v. 49, n. 2, p. 98-104.

Farnworth, E. R., & Champagne, C. (2010). Production of probiotic cultures and their incorporation into foods. In *Bioactive foods in promoting health* (pp. 3-17). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374938-3.00001-3>

Fioramonti, S. A., Arzeni, C., Pilosof, A. M., Rubiolo, A. C., & Santiago, L. G. (2015). Influence of freezing temperature and maltodextrin concentration on stability of linseed oil-in-water multilayer emulsions. *Journal of Food Engineering*, v. 156, p. 31-38. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.01.013>

Francisco, C. R., Heleno, S. A., Fernandes, I. P., Barreira, J. C., Calhelha, R. C., Barros, L., Gonçalves, O. H., Ferreira, I. C. F. R., Barreiro, M. F. (2018). Functionalization of yogurts with *Agaricus bisporus* extracts encapsulated in spray-dried maltodextrin crosslinked with citric acid. *Food chemistry*, v. 245, p. 845-853. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2017.11.098>

Fu, J., Zhang, L. L., Li, W., Zhang, Y., Zhang, Y., Liu, F., & Zou, L. (2022). Application of metabolomics for revealing the interventional effects of functional foods on metabolic diseases. *Food Chemistry*, n. 367, 130697. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.130697>

Fu, N., & Chen, X. D. (2011). Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. *Food Research International*, v. 44, n. 5, p. 1127-1149.

Galdeano, C. M., Cazorla, S. I., Dumit, J. M. L., Vélez, E., & Perdígón, G. (2019). Beneficial effects of probiotic consumption on the immune system. *Annals of Nutrition and Metabolism*, n. 74, v. 2, p. 115-124. <https://doi.org/10.1159/000496426>

Gharsallaoui, A., Roudaut, G., Chambin, O., Voilley, A., & Saurel, R. (2007). Applications of *spray drying* in microencapsulation of food ingredients: An overview. *Food research international*, v. 40, n. 9, p. 1107-1121. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2007.07.004>

Gill, H. S., & Guarner, F. (2004). Probiotics and human health: a clinical perspective. *Postgraduate Medical Journal*, v. 80, n. 947, p. 516-526.

Goetzke, B., Nitzko, S., & Spiller, A. (2014). Consumption of organic and functional food. A matter of well-being and health?. *Appetite*, v. 77, p. 96-105. <https://doi.org/10.1016/j.appet.2014.02.012>

Gomes, A. A. B., Ferreira, M. E., & Pimentel, T. C. (2016). Bread with flour obtained from green banana with its peel as partial substitute for wheat flour: Physical, chemical and microbiological characteristics and acceptance. *International Food Research Journal*, v. 23, n. 5.

Gul, O. (2017). Microencapsulation of *Lactobacillus casei* Shirota by spray drying using different combinations of wall materials and application for probiotic dairy dessert. *Journal of Food Processing and Preservation*, v. 41, p. 5, e13198. <https://doi.org/10.1111/jfpp.13198>

Infusino, F., Marazzato, M., Mancone, M., Fedele, F., Mastroianni, C. M., Severino, P., Ceccarelli, G., Santinelli, L., Cavarretta, E., Marullo, A. G. M., Miraldi, F., Carnevale, R., Nocella, C., Biondi-Zoccai, G., Pagnini, C., Schiavon, S., Pugliese, F., Frati, G., d'Ettorre, G. (2020). Diet supplementation, probiotics, and nutraceuticals in SARS-CoV-2 infection: a scoping review. *Nutrients*, v. 12, n. 6, 1718. <https://doi.org/10.3390/nu12061718>

Jantzen, M., Göpel, A., & Beermann, C. (2013). Direct *spray drying* and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. *Journal of Applied Microbiology*, v. 115, n. 4, p. 1029-1036. <https://doi.org/10.1111/jam.12293>

Jinapong, N., Suphantharika, M., & Jamnong, P. (2008). Production of instant soymilk powders by ultrafiltration, *spray drying* and fluidized bed agglomeration. *Journal of food engineering*, v. 84, n. 2, p. 194-205. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2007.04.032>

Kaderides, K., & Goula, A. M. (2019). Encapsulation of pomegranate peel extract with a new carrier material from orange juice by-products. *Journal of Food Engineering*, v. 253, p. 1-13.

<https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2019.02.019>

Kara, S. S., Volkan, B., & Erten, I. (2019). *Lactobacillus rhamnosus* GG can protect malnourished children. *Beneficial microbes*, v. 10, n. 3, p. 237-244.

<https://doi.org/10.3920/BM2018.0071>

Kaur, L., Dhull, S. B., Kumar, P., & Singh, A. (2020). Banana starch: Properties, description, and modified variations-A review. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 165, p. 2096-2102. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2020.10.058>

Küster-Boluda, I., & Vidal-Capilla, I. (2017). Consumer attitudes in the election of functional foods. *Spanish Journal of Marketing-ESIC*, v. 21, p. 65-79.

<https://doi.org/10.1016/j.sjme.2017.05.002>

Lillo-Pérez, S., Guerra-Valle, M., Orellana-Palma, P., & Petzold, G. (2021). Probiotics in fruit and vegetable matrices: Opportunities for nondairy consumers. *LWT-Food Science and Technology*, v. 151, 112106. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2021.112106>

Lin, L. Y., Peng, C. C., Chen, K. C., Wang, H. E., Wang, C. S., Shen, K. H., & Peng, R. Y. (2020). Manufacturing technology of banana-assorted breads: The fermentative characteristics affected by different banana cultivars. *Food Science & Nutrition*, v. 8, n. 6, p. 2627-2641.

<https://doi.org/10.1002/fsn3.1539>

Liu, S. L., Chen, C. Y., & Chen, Y. S. (2022). Characteristic properties of spray-drying *Bifidobacterium adolescentis* microcapsules with biosurfactant. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, v. 133, n. 3, p. 250-257. <https://doi.org/10.1016/j.jbiosc.2021.12.002>

Menezes, E. W., Tadini, C. C., Tribess, T. B., Zuleta, A., Binaghi, J., Pak, N., Vera, G., Dan, M. C. T., Bertolini, A. C., Cordenunsi, B. R., & Lajolo, F. M. (2011). Chemical composition and nutritional value of unripe banana flour (*Musa acuminata*, var. Nanicão). *Plant foods for human nutrition*, 66, 231-237.

Mrityunjaya, M., Pavithra, V., Neelam, R., Janhavi, P., Halami, P. M., & Ravindra, P. V. (2020). Immune-boosting, antioxidant and anti-inflammatory food supplements targeting pathogenesis of COVID-19. *Frontiers in immunology*, 2337. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.570122>

Muhammad, Z., Ramzan, R., Zhang, R., & Zhang, M. (2021). Resistant starch-based edible coating composites for spray-dried microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus*, comparative assessment of thermal protection, in vitro digestion and physicochemical characteristics. *Coatings*, v. 11, n. 5, 587. <https://doi.org/10.3390/coatings11050587>

Muhammad, Z., Ramzan, R., Huo, G. C., Tian, H., & Bian, X. (2017). Integration of polysaccharide-thermoprotectant formulations for microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*, appraisal of survivability and physico-biochemical properties during storage of spray dried powders. *Food hydrocolloids*, 66, 286-295. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.11.040>

Nishad, J., Mir, S. A., & Walia, K. (2019). Optimization of *spray drying* technology for sugarcane juice using natural and synthetic encapsulating agents. *Sugar Tech*, v. 21, p. 749-755.

O'Regan, J., & Mulvihill, D. M. (2010). Heat stability and freeze–thaw stability of oil-in-water emulsions stabilised by sodium caseinate–maltodextrin conjugates. *Food chemistry*, v. 119, n. 1, p. 182-190. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2009.06.019>

Obradović, N., Volić, M., Nedović, V., Rakin, M., & Bugarski, B. (2022). Microencapsulation of probiotic starter culture in protein–carbohydrate carriers using spray and freeze-drying processes: Implementation in whey-based beverages. *Journal of Food Engineering*, v. 321, 110948. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2022.110948>

Oguntoye, M. A., Ezekiel, O. O., & Oridupa, O. A. (2021). Viability of *Lactobacillus rhamnosus* GG in provitamin A cassava hydrolysate during fermentation, storage, in vitro and in vivo gastrointestinal conditions. *Food Bioscience*, v. 40, 100845. <https://doi.org/10.1016/j.fbio.2020.100845>

Paula, D.A., Martins, E.M.F., Costa, N.A., de Oliveira, P. M., de Oliveira, E.B., Ramos, A.M. (2019). Use of gelatin and gum arabic for microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by a dual process combining double emulsification followed by complex coacervation. *International Journal of Biological Macromolecules*, v. 133, p. 722-731. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.04.110>

PBMH & PIF - PROGRAMA BRASILEIRO PARA A MODERNIZAÇÃO DA HORTICULTURA & PRODUÇÃO INTEGRADA DE FRUTAS. Normas de Classificação de Banana. São Paulo: CEAGESP, 2006. (Documentos, 29).

Pitigraisorn, P., Srichaisupakit, K., Wongpadungkiat, N., & Wongsasulak, S. (2017). Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules. *Journal of Food Engineering*, v. 192, p. 11-18. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2016.07.022>

Rajam, R., & Anandharamakrishnan, C. (2015). 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. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2014.09.062>

Razavi, S., Janfaza, S., Tasnim, N., Gibson, D. L., & Hoorfar, M. (2021). Microencapsulating polymers for probiotics delivery systems: Preparation, characterization, and applications. *Food Hydrocolloids*, v. 120, 106882. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2021.106882>

Richter, R.L., Vedamuthu, E.R. (2001). Milk and milk products. *Compendium of methods for the microbiological examination of foods*, v. 4, p. 483-505.

Rosolen, M.D., Bordini, F.W., DE Oliveira, P.D., Conceição, F.R., Pohndorf, R.S., Fiorentini, Â.M., Da Silva, W.P., Pieniz, S. (2019). Symbiotic microencapsulation of *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* R7 using whey and inulin by Spray Drying. *LWT - Food Science and Technology*, v. 115, p. 1-7. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2019.108411>

Ruiz Rodríguez, L. G., Mohamed, F., Bleckwedel, J., Medina, R., De Vuyst, L., Hebert, E. M., & Mozzi, F. (2019). Diversity and functional properties of lactic acid bacteria isolated from wild fruits and flowers present in Northern Argentina. *Frontiers in microbiology*, v. 10, 1091. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.01091>

Samborska, K., Boostani, S., Geranpour, M., Hosseini, H., Dima, C., Khoshnoudi-Nia, S., Rostamabadi, H., Falsafi, S. R., Shaddel, R., Akbari-Alavijeh, S., & Jafari, S. M. (2021). Green biopolymers from by-products as wall materials for *spray drying* microencapsulation of phytochemicals. *Trends in Food Science & Technology*, v. 108, p. 297-325. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2021.01.008>

Sanchez, L. T., Pinzon, M. I., & Villa, C. C. (2022). Development of active edible films made from banana starch and curcumin-loaded nanoemulsions. *Food Chemistry*, 371, 131121. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2021.131121>

Santivarangkna, C., Kulozik, U., & Foerst, P. (2008). Inactivation mechanisms of lactic acid starter cultures preserved by drying processes. *Journal of applied microbiology*, v. 105, n. 1, p. 1-13. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03744.x>

Santos, D. X., Casazza, A. A., Aliakbarian, B., Bedani, R., Saad, S. M. I., & Perego, P. (2019). Improved probiotic survival to *in vitro* gastrointestinal stress in a mousse containing *Lactobacillus acidophilus* La-5 microencapsulated with inulin by *spray drying*. *LWT - Food Science and Technology*, v. 99, p. 404-410. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.10.010>

Santos, M. A., & Machado, M. T. (2021). Coated alginate–chitosan particles to improve the stability of probiotic yeast. *International Journal of Food Science & Technology*, v. 56, n. 5, p. 2122-2131. <https://doi.org/10.1111/ijfs.14829>

Shah, N. P., Ding, W. K., Fallourd, M. J., & Leyer, G. (2010). Improving the stability of probiotic bacteria in model fruit juices using vitamins and antioxidants. *Journal of food science*, 75(5), M278-M282. <https://doi.org/10.1111/j.1750-3841.2010.01628.x>

Shepherd, R., Robertson, A., & Ofman, D. (2000). Dairy glycoconjugate emulsifiers: casein–maltodextrins. *Food Hydrocolloids*, v. 14, n. 4, p. 281-286. [https://doi.org/10.1016/S0268-005X\(99\)00067-3](https://doi.org/10.1016/S0268-005X(99)00067-3)

Silva, S. C., Fernandes, I. P., Barros, L., Fernandes, Â., Alves, M. J., Calhelha, R. C., Pereira, C., Barreira, J. C. M., Manrique, Y., Colla, E., Ferreira, I. C. F. R., & Barreiro, M. F. (2019). *Spray dried Spirulina platensis* as an effective ingredient to improve yogurt formulations: Testing different encapsulating solutions. *Journal of Functional Foods*, v. 60, 103427. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2019.103427>

Sireswar, S., Dey, G., & Biswas, S. (2021). Influence of fruit-based beverages on efficacy of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG (*Lactobacillus rhamnosus* GG) against DSS-induced intestinal inflammation. *Food Research International*, v. 149, 110661. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2021.110661>

Sohail, A., Turner, M. S., Prabawati, E. K., Coombes, A. G., & Bhandari, B. (2012). Evaluation of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* NCFM encapsulated using a

novel impinging aerosol method in fruit food products. *International Journal of Food Microbiology*, 157(2), 162-166. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.04.025>

Talwalkar, A., & Kailasapathy, K. (2004). The role of oxygen in the viability of probiotic bacteria with reference to *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. *Current issues in intestinal microbiology*, 5(1), 1-8.

Tribess, T. B., Hernández-Uribe, J. P., Méndez-Montevalvo, M. G. C., Menezes, E. W. D., Bello-Perez, L. A., & Tadini, C. C. (2009). Thermal properties and resistant starch content of green banana flour (*Musa cavendishii*) produced at different drying conditions. *LWT-Food Science and Technology*, v. 42, n. 5, p. 1022-1025. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2008.12.017>

Türker, B., Savlak, N., & Kaşıkçı, M. B. (2016). Effect of green banana peel flour substitution on physical characteristics of gluten-free cakes. *Current Research in Nutrition and Food Science Journal*, v. 4 (Special Issue Nutrition in Conference October 2016), p. 197-204. <https://dx.doi.org/10.12944/CRNFSJ.4.Special-Issue-October.25>

Vasiljevic, T., & Shah, N. P. (2008). Probiotics—from Metchnikoff to bioactives. *International Dairy Journal*, 18(7), 714-728. <https://doi.org/10.1016/j.idairyj.2008.03.004>

Vesterlund, S., Salminen, K., & Salminen, S. (2012). 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. 319-321. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2012.05.016>

Vivek, K., Mishra, S., Pradhan, R. C., Nagarajan, M., Kumar, P. K., Singh, S. S., Manvi, D., & Gowda, N. N. (2022). A Comprehensive Review on Microencapsulation of probiotics: Technology, Carriers and Current trends. *Applied Food Research*, 100248. <https://doi.org/10.1016/j.afres.2022.100248>

Wu, C. H., Liu, Y. C., Ou, S. F., Chen, S. T., Kuo, J. M., & Hsueh, Y. H. (2021). Improving acid resistance and characteristics of microencapsulated *Lactobacillus brevis* RK03 using top fluid bed drying technology. *Process Biochemistry*, v. 110, p. 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2021.07.010>

Xavier-Santos, D., Scharlack, N. K., de Lima Pena, F., & Antunes, A. E. C. (2022). Effects of *Lactocaseibacillus rhamnosus* GG supplementation, via food and non-food matrices, on children's health promotion: A scoping review. *Food Research International*, 111518. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2022.111518>

Xiao, Z., Xia, J., Zhao, Q., Niu, Y., & Zhao, D. (2022). Maltodextrin as wall material for microcapsules: A review. *Carbohydrate Polymers*, 120113. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2022.120113>

Xu, Y., Grizzard, C., Sismour, E. N., Bhardwaj, H. L., & Li, Z. (2013). Resistant starch content, molecular structure and physicochemical properties of starches in Virginia-grown corn, potato and mungbean. *Journal of Cereals and Oilseeds*, v. 4, n.1. <https://doi.org/10-18.10.5897/JCO2012.0097>

Yonekura, L., Sun, H., Soukoulis, C., & Fisk, I. (2014). 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, p. 205-214. <https://doi.org/10.1016/j.jff.2013.10.008>

Zhang, Y., Lin, J., Zhong, Q. (2015). The increased viability of probiotic *Lactobacillus salivarius* NRRL B-30514 encapsulated in emulsions with multiple lipid-protein-pectin layers. *Food Research International*, v. 71, p. 9-15. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2015.02.017>

Zheng, J., Wittouck, S., Salvetti, E., Franz, C. M., Harris, H. M., Mattarelli, P., O'Toole, P. W., Pot, B., Vandamme, P., Walter, J., Watanabe, K., Wuyts, S., Felis, G. E., Ganzle, M. G., Lebeer, S. (2020). A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. *International journal of systematic and evolutionary microbiology*, v. 70, n. 4, 2782-2858. <https://doi.org/10.1099/ijsem.0.004107>

CONCLUSÃO GERAL

A farinha de batata-doce, farinha de batata yacon e farinha de banana verde foram utilizadas pela primeira vez como material de parede no presente estudo e, quando combinados com os materiais convencionais, foram consideradas como alternativas eficientes para a microencapsulação de probióticos por *spray drying*.

As micropartículas desenvolvidas contendo as farinhas vegetais apresentaram boa resistência térmica dos probióticos, resistência dos mesmos ao pH ácido e sobrevivência após a simulação gastrointestinal *in vitro*. Quanto a estabilidade ao armazenamento, as micropartículas contendo farinha de yacon e farinha de banana verde apresentaram maior estabilidade ao longo do tempo nas diferentes temperaturas avaliadas.

Em relação a aplicação nos produtos avaliados, as micropartículas contendo farinha de yacon foram eficientes para proteger *L. rhamnosus* GG quando adicionado em geleia de pitaya ao longo do período de armazenamento e a micropartícula utilizando a farinha de banana verde também manteve a viabilidade do probiótico quando adicionado em doce de banana em massa.

A aplicação dos novos materiais de parede “verdes” é simples e demonstrou resultados significativos em relação a sobrevivência dos microrganismos probióticos. Além disso, possuem baixo custo, alta disponibilidade e com propriedades prebióticas sendo uma alternativa para o emprego a nível industrial para o desenvolvimento de novos produtos contendo probióticos e provenientes de base vegetal.