

DANIELE DE ALMEIDA PAULA

**MICROENCAPSULAMENTO DE CÉLULAS PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus plantarum* POR DUPLA EMULSIFICAÇÃO COMBINADA À COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E APLICABILIDADE EM NÉCTAR MISTO DE CENOURA E ACEROLA**

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*.

VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2019

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

T

P324m  
2019 Paula, Daniele de Almeida, 1989-  
Microencapsulamento de células probióticas de  
*Lactobacillus plantarum* por dupla emulsificação combinada à  
coacervação complexa: estudo físico-químico e aplicabilidade  
em néctar misto de cenoura e acerola / Daniele de Almeida  
Paula. – Viçosa, MG, 2019.  
xiii, 79 f.: il.

Orientador: Afonso Mota Ramos.  
Tese (doutorado) - Universidade Federal de Viçosa,  
Departamento de Tecnologia de Alimentos, 2019.  
Inclui bibliografia.

1. Tecnologia de alimentos. 2. Probióticos.  
3. Microencapsulação. 4. Coacervação. 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. 664.07

DANIELE DE ALMEIDA PAULA

**MICROENCAPSULAMENTO DE CÉLULAS PROBIÓTICAS DE *Lactobacillus plantarum* POR DUPLA EMULSIFICAÇÃO COMBINADA À COACERVAÇÃO COMPLEXA: ESTUDO FÍSICO-QUÍMICO E APLICABILIDADE EM NÉCTAR MISTO DE CENOURA E ACEROLA**

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: 16 de abril de 2019.

---

Érica Nascif Rufino Vieira

---

Manoela Maciel dos Santos Dias

---

Eduardo Basilio de Oliveira  
(Coorientador)

---

Eliane Mauricio Furtado Martins  
(Coorientadora)

---

Afonso Mota Ramos  
(Orientador)

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a DEUS por ter me dado essa oportunidade de realizar mais um sonho e ter colocado pessoas tão especiais no meu caminho. Agradeço também por estar ao meu lado em todos os momentos e me mostrar o caminho certo nas horas incertas, sem ELE nada disso teria sentido

À Universidade Federal de Viçosa, pela oportunidade da realização do Curso de Doutorado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro.

Ao meu orientador, professor Afonso Mota Ramos, pelo apoio e confiança ao longo da condução deste trabalho. Agradeço também pelos conselhos, ensinamentos, amizade e compreensão em todos os momentos.

Aos meus coorientadores professores Eduardo e Eliane que acreditaram em meu potencial e estiveram ao meu lado durante todo este período sempre dispostos a ajudar. Obrigada por ouvirem minhas dúvidas e engrandecer ainda mais este trabalho

Às professoras Manoela e Érica, por terem aceitado fazer parte da banca e pelas contribuições realizadas a esse trabalho

Aos meus pais, Ananias e Maria do Carmo, que sempre me incentivaram a alcançar caminhos cada vez mais distantes.

Ao meu marido, Judylleno, pelo carinho, paciência, compreensão e apoio. Sempre ao meu lado me fazendo acreditar que posso mais que imagino. Compartilho a concretização deste sonho com você.

A equipe do laboratório LAFRUHTEC pelos momentos compartilhados.

As amigas Ariana, Paty e Nataly pelos momentos juntos e que tornaram mais leve meu trabalho. Obrigada por estarem ao meu lado e acreditarem tanto em mim.

Ao Núcleo de Microscopia e Microanálise, por ter me auxiliado nas análises microscópicas.

Enfim, a todas as pessoas que, de alguma forma, contribuíram para o meu crescimento profissional e pessoal. Sem os quais este trabalho dificilmente poderia ter sido realizado. Meu muito obrigada !!!!!!!

## SUMÁRIO

LISTA DE TABELAS .....	vii
LISTA DE FIGURAS .....	viii
RESUMO .....	x
ABSTRACT .....	xii
INTRODUÇÃO GERAL .....	1
OBJETIVOS .....	3
OBJETIVO GERAL .....	3
OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....	3
CAPÍTULO 1 .....	4
REFERENCIAL TEÓRICO .....	4
1. Alimentos funcionais .....	4
2. Probióticos .....	6
3. Microencapsulamento .....	11
4. Coacervação complexa.....	13
5. Emulsões .....	17
5.1. Emulsões duplas .....	18
6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	20
CAPÍTULO 2 .....	30
USE OF GELATIN AND GUM ARABIC FOR MICROENCAPSULATION OF PROBIOTIC CELLS FROM <i>Lactobacillus plantarum</i> BY A DUAL PROCESS COMBINING DOUBLE EMULSIFICATION FOLLOWED BY COMPLEX COACERVATION .....	30
ABSTRACT .....	31
1. INTRODUCTION .....	32
2. MATERIAL AND METHODS .....	33
2.1 Materials.....	33

2.2 Experimental design.....	34
2.3. Optimization of conditions for complex coacervation.....	34
2.3.1. Preparation of biopolymer dispersions.....	34
2.3.2. Complex coacervation between Gelatin and gum arabic.....	34
2.3.3. Zeta potential.....	35
2.3.4. Absorbance.....	35
2.3.5 Yield.....	35
2.4. Double emulsions.....	35
2.4.1. Bacterial strain, culture and harvest conditions.....	35
2.4.2. Preparation of dispersions.....	35
2.4.3. Preparation of double emulsions (W1/O/W2).....	36
2.4.4 Microstructure of the double emulsions (W1/O/W2).....	36
2.4.5 Counting of <i>L. plantarum</i> in double emulsions (W1/O/W2).....	37
2.5. Production of microcapsules by complex coacervation.....	37
2.6. Physicochemical characterization of the lyophilized microcapsules containing <i>L. plantarum</i> cells.....	37
2.6.1. Water activity ( $A_w$ ).....	37
2.6.2. Moisture content.....	37
2.6.3. Hygroscopicity.....	38
2.6.5. Morphology and mean particle size of the microcapsules.....	38
2.7. Evaluation of microencapsulated probiotic cells.....	38
2.7.1. Counting of <i>L. plantarum</i> .....	38
2.7.2. Efficiency of <i>L. plantarum</i> encapsulation.....	39
2.7.3. Evaluation of <i>L. plantarum</i> survival when submitted to <i>in vitro</i> gastrointestinal conditions.....	39
2.7.4 Viability of microencapsulated probiotic cultures stored at 25°C, 8°C or -18°C.....	40
3. RESULTS.....	40

3.1. Optimized conditions for complex coacervation .....	40
3.2 Microstructure of the double emulsions (W1/O/W2), primary emulsion (W1/O) and viability of <i>L. plantarum</i> in double emulsions .....	42
3.3 Morphological characterization of microcapsules containing <i>L. plantarum</i> cells .....	42
3.4 Physicochemical characterization of the lyophilized microcapsules containing <i>L. plantarum</i> cells .....	44
3.5 Evaluation of the viability of microencapsulated <i>L. plantarum</i> cells .....	46
3.6 Evaluation of microencapsulated <i>L. plantarum</i> cells survival under gastrointestinal conditions.....	47
3.7 Viability of microencapsulated probiotic cultures stored at 25°C, 8°C and -18°C.....	49
4. CONCLUSIONS.....	50
5. ACKNOWLEDGEMENTS .....	51
6. REFERENCES.....	51
CAPÍTULO 3 .....	57
ESTUDO DA VIABILIDADE DE <i>Lactobacillus plantarum</i> EM NÉCTAR MISTO DE CENOURA E ACEROLA: COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS LIVRES <i>versus</i> CÉLULAS MICROENCAPSULADAS .....	57
RESUMO .....	57
1. INTRODUÇÃO .....	58
2. MATERIAL E MÉTODOS .....	60
2.1 Materiais.....	60
2.3. Estirpe bacteriana, cultura e condições de cultivo .....	60
2.4. Preparação das dispersões de goma arábica e gelatina .....	60
2.5 Microencapsulamento de células de <i>L. plantarum</i> por dupla emulsificação seguida de coacervação complexa .....	61
2.6. Preparo e caracterização das polpas e do néctar .....	61
2.6.1. Preparação da polpa de cenoura e acerola.....	61

2.6.2. Preparação do néctar misto de cenoura e acerola e adição de <i>L. plantarum</i> .....	62
2.6.3. Análises de pH, acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis totais.....	62
2.6.4 Determinação de compostos fenólicos.....	62
2.6.5 Atividade sequestrante do radical livre DPPH• .....	63
2.6.6. Extração e determinação de β-caroteno .....	63
2.7. Determinação das características microbiológicas do néctar misto de cenoura e acerola	63
2.7.1. Determinação da qualidade microbiológica.....	64
2.7.2. Contagem de células viáveis de <i>L. plantarum</i> .....	64
2.7.3. Avaliação da sobrevivência de <i>L. plantarum</i> após simulação das condições gastrintestinais <i>in vitro</i> .....	64
2.8. Análise estatística.....	65
3. RESULTADOS E DISCUSSÃO .....	65
3.1 Avaliação das características químicas e físicas dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de <i>Lactobacillus plantarum</i> .....	65
3.2. Compostos fenólicos totais, carotenoides e capacidade antioxidante dos néctares de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de <i>L. plantarum</i> .....	67
3.3 Avaliação da qualidade microbiológica dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de <i>L. plantarum</i> .....	68
3.4. Contagem de células viáveis de <i>L. plantarum</i> nos néctares mistos de cenoura e acerola.	69
3.5. Avaliação da sobrevivência de <i>L. plantarum</i> às condições gastrointestinais simuladas <i>in vitro</i> .....	70
4. CONCLUSÕES.....	73
5. AGRADECIMENTOS.....	74
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
CONCLUSÃO GERAL .....	79

## LISTA DE TABELAS

### CAPÍTULO 1

<b>Tabela 1.</b> Micro-organismos usados como probiótico.....	7
<b>Tabela 2.</b> Exemplos de estudos recentes relacionados a formulação de bebidas probióticas de frutas vegetais.....	10
<b>Tabela 3.</b> Processo de dupla emulsão (A/O/A) seguido de coacervação complexa.....	16

### CAPÍTULO 3

<b>Tabela 1-</b> Teor de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e $\beta$ -caroteno dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células probióticas de <i>Lactobacillus plantarum</i> encapsuladas ou livres no tempo 0 e após 28 dias de armazenamento a 5°C.....	67
<b>Tabela 2.</b> Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C e contagem de micro-organismos psicotróficos em néctar misto de cenoura e acerola adicionados células de <i>L. plantarum</i> na forma livres ou encapsulados. ....	68

## LISTA DE FIGURAS

### CAPÍTULO 1

<b>Figura 1.</b> Alguns modelos de microcápsulas. (A): matriz (microesfera), que é o tipo produzido pela microencapsulamento por atomização; (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E) vários núcleos; (F): agrupamentos de microcápsulas .....	12
--	----

### CAPÍTULO 2

<b>Figure 1</b> - Conditions optimization to complex coacervation A) Zeta Potential values (mV) B) Yeild complex coacervate and C) Absorbance after complex coacervation.....	41
<b>Figure 2.</b> Light microscopy images of the primary emulsion (W1/O) (A) and double emulsions (W1/O/W2) (B). Scale bars represent 20 $\mu\text{m}$ and 5 $\mu\text{m}$ in 40 $\times$ magnifications. Red arrows indicate the cells of <i>L. plantarum</i> were detected inside the water droplets.....	42
<b>Figure. 3.</b> Photomicrographs obtained by light microscopy of the moist microcapsules (A) and by scanning electron microscopy of the lyophilized microcapsules (B). Red arrows indicate the microcapsules irregular, multinucleated and presented different sizes.....	43
<b>Figure 4.</b> Survival of encapsulated and unencapsulated <i>L. plantarum</i> in the in vitro GIT assay. Bars indicate viability of the strain before being exposed to gastric stress, followed by the gastric, enteric I and enteric II phases of the GIT.....	47
<b>Figure 5</b> - Viability of microencapsulated probiotic cells and storage at 25°C, 8°C and -18°C.....	50

### CAPÍTULO 3

<b>Figura 1-</b> Características físico-químicas de pH, acidez titulável, SST e $A_w$ dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de <i>L. plantarum</i> .....	66
---	----

**Figura 2** Viabilidade de células probióticas de *L. plantarum* adicionados em néctar de cenoura e acerola durante 28 dias de armazenamento a 5 ° C..... 69

**Figura 2** Sobrevivência de *L. plantarum* na forma livre ou encapsulada adicionado em néctar misto de cenoura e acerola e submetido a condições gastrointestinais simuladas *in vitro*..... 71

## RESUMO

PAULA, Daniele de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, abril de 2019, **Microencapsulamento de células probióticas de *Lactobacillus plantarum* por dupla emulsificação combinada a coacervação complexa: estudo físico-químico e aplicabilidade em néctar misto de cenoura e acerola**. Orientador: Afonso Mota Ramos. Coorientadores: Eduardo Basilio de Oliveira e Eliane Mauricio Furtado Martins.

O microencapsulamento é um dos métodos mais eficientes para proteger as células probióticas de condições adversas e controlar sua liberação. Dentre as técnicas utilizadas, a coacervação complexa tem se destacado e uma forma de otimizar a sua aplicação seria a associação com uma etapa de dupla emulsificação. Neste contexto, este estudo visou o microencapsulamento de células probióticas de *Lactobacillus plantarum* utilizando a dupla emulsificação combinada a coacervação complexa. Na primeira etapa, realizou-se a otimização das condições de coacervação complexa, a caracterização das microcápsulas, a avaliação do comportamento em simulações *in vitro* das condições gastrointestinais e análise da sobrevivência das células probióticas microencapsuladas durante 45 dias de armazenamento a 8 °C, 25 °C e -18 °C. Na segunda etapa, avaliou-se o efeito da microencapsulamento de *L. plantarum* após a adição das microcápsulas em néctar misto de cenoura e acerola, por meio da viabilidade celular, sobrevivência probiótica sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro* e propriedades físico-químicas e tecnológicas do néctar, durante 28 dias de armazenamento a 5°C. O néctar foi submetido à análises microbiológicas, físico-químicas, capacidade antioxidante, conteúdo de β-caroteno, compostos fenólicos para verificar a influência das microcápsulas contendo as células probióticas (*L. plantarum*) na qualidade do produto ao longo de 45 dias de armazenamento a 8 °C. As condições otimizadas para coacervação complexa consistiram de uma razão biopolímero 50:50 e pH = 4,0 e as microcápsulas obtidas apresentaram características de dispersibilidade, umidade, atividade de água, higroscopicidade e tamanho adequados para a aplicação em matrizes alimentares. O processo apresentou elevada eficiência (97,78%) para o encapsulamento de *L. plantarum* e contagem final de células de 8,6 log UFC.g<sup>microcápsulas</sup><sup>-1</sup>. As células microencapsuladas apresentaram elevada sobrevivência após a simulação das condições gastrointestinais (80,4%) em relação as células livres (25,0%) evidenciando que as microcápsulas ofereceram proteção contra as condições adversas e ao longo do armazenamento a 8 °C e a -18 °C, proporcionando a manutenção da viabilidade celular. O néctar misto de cenoura e acerola, adicionado das células de *L. plantarum* microencapsuladas, não apresentou alterações das características físico-químicas devido a adição das microcápsulas.

Verificou-se aumento significativo da viabilidade celular durante os 28 dias de armazenamento a 5 °C apresentando uma contagem final de células acima de 8,0 log UFC.g<sup>-1</sup>. Após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, no tempo 0, a viabilidade das células encapsuladas foi mantida em 93% enquanto apenas 58% para as células livres, no entanto, após 28 dias de armazenamento não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos. Portanto, a dupla emulsificação dupla combinada a coacervação complexa representa uma alternativa para o encapsulamento de células probióticas de *L. Plantarum* e a sua aplicação em uma matriz alimentar com o objetivo de veicular estes micro-organismos até o consumidor é tecnologicamente viável.

## ABSTRACT

PAULA, Daniele de Almeida, D.Sc., Universidade Federal de Viçosa, April 2019, **Microencapsulation of probiotic cells from *Lactobacillus plantarum* by double emulsification followed by complex coacervation: physico-chemical study and applicability in mixed juice of carrot and acerola**. Advisor: Afonso Mota Ramos. Co-advisors: Eduardo Basilio de Oliveira and Eliane Mauricio Furtado Martins.

Microencapsulation is one of the most efficient methods to protect probiotic cells from adverse conditions and to control its release. Among the techniques, the complex coacervation has been highlighted and a way to optimize your application would be the association with a double emulsification. In this context, this study aimed at microencapsulation of probiotic cells of *Lactobacillus plantarum* using a double emulsification followed by complex coacervation. In the first experimental part, the optimized conditions for complex coacervation were assessed, the characterization of the microcapsules; evaluation their behavior in simulated *in vitro* gastrointestinal conditions and evaluation the survival of microencapsulated probiotic cells during 45 days of storage at 8 °C, 25 °C and -18 °C. The second part, the microencapsulation of *L. plantarum* was evaluated after the addition of microcapsules in mixed juice of carrot and acerola, via cell viability, probiotic survival under simulated *in vitro* gastrointestinal conditions and physicochemical and technological properties of mixed juice over 28 days of storage at 5° C. The juice was submitted to microbiological, physical-chemical, antioxidant capacity, β-carotene content, phenolic compounds to verify the influence of the applied the microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) in product quality over 35 days of storage at 8 °C. The optimized conditions for complex coacervation consisted of a 50:50 biopolymer ratio and pH = 4.0 and the microcapsules obtained presented dispersibility, moisture, water activity, hygroscopicity and size characteristics suitable to be applied in development of functional foods. Viability of the encapsulated *L. plantarum* cells was 8.6 log CFU.g<sup>-1</sup><sub>microcapsules</sub> and the encapsulation efficiency was 97.78%. The microencapsulated cells apresented high survival after *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions (80.4%) in relation to free cells (25.0%). Probiotic cell viability was maintained during storage at 8 °C and -18 °C for 45 days. Thus, that the microcapsules offered protection against adverse conditions and during storage. The mixed juice of carrot and acerola, added the microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*), did not present changes in the physico-chemical characteristics due to the addition of the microcapsules. Significant increase in cell viability was observed during the 28 days of storage at 8øC with a final cell count above 8.0

log CFU.g<sup>-1</sup>. After in vitro simulation of gastrointestinal conditions, at time 0, the viability of the encapsulated cells was maintained at 93% while only 58% at the free cells. However, over the 28 day period no significant differences were observed. All results indicated that the technique (double emulsification and followed by complex coacervation) proposed in this work to microcapsulate *L. plantarum* cells is a useful, promising approach for encapsulation of this microorganism, thus representing a novel alternative to be applied in development of functional foods.

## INTRODUÇÃO GERAL

A Organização das Nações Unidas para a Agricultura e Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO) define probióticos como micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2001). Os probióticos mais comumente usados na indústria alimentícia pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. O gênero *Lactobacillus* é mais resistente ao pH baixo, possui parede celular mais espessa, menos vulnerável ao oxigênio e tecnologicamente adequado para aplicações alimentares (YAO et al., 2018).

Os efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos dependem da ingestão regular e diária recomendada, a fim de proporcionar a “dose” mínima de células viáveis. Sugere-se que o número de células no alimento contendo bactérias probióticas deve ser de  $10^8 - 10^9$  UFCg<sup>-1</sup> para assegurar que, após a sua ingestão, no mínimo  $10^6 - 10^7$  UFCg<sup>-1</sup> possa atingir o ponto específico de atuação (intestino delgado e/ou grosso) e exercer o efeito desejado (AHMAD et al., 2018). No entanto, métodos de transporte inadequados, variação na temperatura de armazenamento e a própria exposição às condições gastrointestinais estão entre os fatores que podem diminuir o número de células viáveis.

Assim, o microencapsulamento é uma das estratégias mais eficientes que tem sido considerada nos últimos anos para proteger as células probióticas de condições adversas mantendo-as em quantidades suficientes para exercerem seus efeitos benéficos (CALABUIG-JIMÉNEZ et al., 2019). O método consiste no aprisionamento das células, dentro de um material secundário, também conhecido como matriz ou reservatório, formando pequenas cápsulas. Diversas tecnologias de encapsulação, tais como emulsão, extrusão, secagem por atomização e coacervação, têm sido relatadas. Atualmente, a coacervação complexa representa um dos métodos de microencapsulamento mais estudados.

A coacervação complexa consiste na mistura de dois polímeros de cargas elétricas opostas em determinado pH, ocasionando uma separação de fases, onde uma é rica em solvente e outra em ambos os polímeros, formando os “coacervados complexos”. A coacervação complexa na encapsulação de ingredientes alimentares envolve principalmente o uso de proteínas e polissacarídeos, que podem formar um invólucro complexo envolvendo o material do núcleo (TIMILSENA et al., 2019). No entanto, esta técnica é mais eficaz para encapsular compostos hidrofóbicos. Para componentes hidrofílicos, são necessários ajustes, por exemplo, pela utilização de sistemas do tipo emulsão dupla água-em-óleo-em-água (A/O/A) (COMUNIAN et al., 2013).

Os sistemas de emulsões duplas também são conhecidos como “emulsão de emulsões”, pois existem simultaneamente dois tipos de emulsões simples (A/O e O/A). Devido às suas propriedades e estrutura físico-químicas, estudos têm sido realizados objetivando a redução do teor de gordura e sódio, melhorar as propriedades sensoriais dos produtos ou controlar a liberação e proteção de substâncias e micro-organismos (incluindo o encapsulamento de probióticos), visando manter a sua viabilidade durante a produção, armazenamento e digestão gastrointestinal (EL; MANTZOURIDOU; GKATZIONIS, 2018; PAULA et al., 2018; ESLAMI; DAVARPANAH; VAHABZADEH, 2017; FLORES-ANDRADE et al., 2017; GIROUX; ROBITAILLE; BRITTEN, 2016). Apesar das vantagens destas duas técnicas descritas acima, de acordo com o nosso conhecimento, não foram encontrados estudos que avaliem a associação da coacervação complexa e dupla emulsificação visando melhorar a viabilidade das células probióticas.

Os alimentos probióticos mais comuns no mercado são os de base láctea, no entanto, devido à problemas como intolerância e alergias aos derivados lácteos, diferentes produtos à base de cereais, frutas, soja e aveia, têm sido desenvolvidos (TRIPATHI; GIRI, 2014). Sucos e néctares de frutas e outros vegetais têm mostrado ser matrizes estratégicas para a adição de bactérias probióticas devido ao conteúdo de nutrientes, não possuem culturas iniciais que competem com as culturas probióticas e seu apelo a um nicho de consumidores que se preocupam com hábitos mais saudáveis (GRANATO et al., 2019). O néctar misto de cenoura e acerola poderia ser uma potencial alternativa de bebida probiótica para tais consumidores pois a cenoura representa fonte natural de componentes funcionais, como vitaminas, minerais, fibras e carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno e a acerola é conhecida como uma excelente fonte de vitamina C e também de fitoquímicos, como carotenoides e polifenóis.

Dessa forma, pode-se verificar que os desafios desse setor da indústria alimentícia nessa área são muitos, em especial sobre a viabilidade dos probióticos. Portanto, o microencapsulamento pela técnica de dupla emulsificação combinada a coacervação complexa pode representar uma possibilidade para veicular células probióticas em alimentos visando aumentar a resistência desses micro-organismos contra condições adversas.

## OBJETIVOS

### OBJETIVO GERAL

Avaliar o microencapsulamento de células probióticas de *Lactobacillus plantarum* utilizando dupla emulsificação seguida de coacervação complexa, bem como a aplicabilidade das microcápsulas em néctar misto de cenoura e acerola.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- ✓ Otimizar as condições de coacervação complexa utilizando diferentes proporções de gelatina e goma arábica (100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 e 0:100) em diferentes valores de pH (3,5;4,0;4,5 e 5,0) por meio do potencial zeta, absorvância e rendimento dos coacervados complexos;
- ✓ Criar um veículo para o carreamento e estabilização de células probióticas aplicando técnicas de coacervação complexa e dupla emulsificação (A/O/A);
- ✓ Caracterizar as microcápsulas quanto a distribuição de tamanho de partícula, teor de umidade, atividade de água, higroscopicidade, morfologia e microestrutura;
- ✓ Avaliar a viabilidade de *L. plantarum* nas microcápsulas por contagem de células viáveis utilizando a técnica “*pour plate*” e ensaios *in vitro* de resistência às condições gastrointestinais;
- ✓ Formular néctar misto de acerola e cenoura, pasteurizado, adicionado das microcápsulas contendo as células probióticas, obtidas nas condições de pH e diferentes proporções de polímeros previamente otimizados;
- ✓ Avaliar as características físico-químicas (pH, acidez total titulável, sólidos solúveis, cor instrumental) do néctar misto de cenoura e acerola bem como sua qualidade microbiológica [coliformes (30 °C e 45 °C) e psicrotóxicos];
- ✓ Determinar o conteúdo de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e teor de  $\beta$ -caroteno do néctar misto de cenoura e acerola durante 28 dias de armazenamento a 5°C;
- ✓ Avaliar a viabilidade das células probióticas, presentes nas microcápsulas, nos néctares após o processo de fabricação em comparação com células não-encapsuladas por contagem de células viáveis utilizando a técnica “*pour plate*” e ensaios *in vitro*, simulando condições gastrointestinais

# CAPÍTULO 1

## REFERENCIAL TEÓRICO

### 1. Alimentos funcionais

O termo "alimentos funcionais" foi utilizado pela primeira vez no Japão, na década de 1980, para os produtos alimentícios enriquecidos com componentes que possuíam efeitos fisiológicos benéficos (STANTON et al., 2005). Essa concepção tinha por objetivo desenvolver alimentos saudáveis para uma população que envelhecia e que apresentava maior expectativa de vida (ANJO, 2004). Em decorrência disso, em 1991, esses alimentos foram regulamentados, pela legislação japonesa, com a denominação de Alimentos para Uso Específico na Saúde (*Foods for Specified Health Use - FOSHU*) (STANTON et al., 2005), cujo equivalente no Brasil é "alimentos funcionais" (COSTA; ROSA, 2010).

Autoridades nacionais, instituições acadêmicas e setores da indústria propuseram definições para alimentos funcionais (BIGLIARDI; GALATI, 2013), cujos termos ainda não são universalmente aceitos (STANTON et al., 2005). Na maioria dos países, estabelecer uma fronteira entre alimentos convencionais e funcionais, é um desafio até mesmo para especialistas. Uma das definições mais aceitas por sua completude descreve o alimento funcional como sendo aquele capaz de produzir efeitos metabólicos e/ou fisiológicos e benéficos à saúde, além da nutrição básica, de forma relevante, devendo ser seguro para consumo sem supervisão médica e fazendo parte de uma dieta regular (DOYON; LABRECQUE, 2008). No Brasil, criou-se a denominação "alegação de propriedade funcional" que, segundo as Resoluções nº 18 e 19, de abril de 1999, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), é aquela relativa ao papel metabólico ou fisiológico que o nutriente ou não nutriente tem no crescimento, desenvolvimento, manutenção e outras funções normais do organismo humano (BRASIL, 1999a; BRASIL, 1999b).

O alimento funcional pode ser composto por um macronutriente detentor de efeitos fisiológicos específicos (por exemplo, o amido resistente ou ácidos graxos), um micronutriente essencial, consumido acima da sua recomendação diária, ou um componente que, apesar de algum valor nutritivo, não é essencial (por exemplo, alguns oligossacarídeos), ou até mesmo de nenhum valor nutritivo (por exemplo, micro-organismos vivos) (ROBERFROID, 2000). Subdivide-se em alimento natural ou processado, adicionado de componentes bioativos, em quantidades adequadas, como os probióticos, prebióticos, simbióticos, fibras vegetais, fitoquímicos, compostos com

capacidade antioxidante, vitaminas, minerais, ácidos graxos poli-insaturados (ômega 3 e 6), dentre outros (VIZZOTO; KROLOW; TEIXEIRA, 2010).

O maior segmento destes produtos compreende aqueles que contêm probióticos, prebióticos e simbióticos. Os primeiros são definidos como "micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro" (VIEIRA DA SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016). Constituem uma das categorias mais rentáveis no mercado de alimentos funcionais, sendo o leite fermentado o veículo mais popular (AL-SHERAJI et al., 2013). Os prebióticos são ingredientes alimentares, não digeríveis, que afetam benéficamente o hospedeiro ao estimular o crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon, melhorando sua saúde (VIEIRA DA SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016). A inulina e oligofrutose estão entre os mais estudados (GIBSON, 2004). Já o termo simbiótico é utilizado para o produto com prebiótico e probiótico associados.

Os alimentos funcionais são uma das categorias mais dinâmicas e inovadoras na indústria alimentícia, com aumentos anuais nas vendas. O crescimento desse mercado decorre, principalmente, da conscientização da população em relação à saúde, que tem preferido alimentos mais saudáveis e de elevado valor nutricional, aptos a diminuir o risco de doenças (BIGLIARDI; GALATI, 2013). Diante dessas novas demandas, inovar e reformular os produtos com o objetivo de melhorar a sua funcionalidade fisiológica, é prioridade. Porém, um dos problemas enfrentados é a manutenção dos ingredientes funcionais ativos e biodisponíveis, após o processamento e armazenamento dos alimentos (VIEIRA DA SILVA; BARREIRA; OLIVEIRA, 2016).

## 2. Probióticos

A palavra "probiótico" é derivada do termo grego "pro bios", que significa "para a vida" (BAGCHI, 2014) e foi usada pela primeira vez em 1954 para descrever substâncias necessárias para uma vida saudável (BINNS, 2013). Segundo a Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação e Organização Mundial da Saúde, probióticos são micro-organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001) e são amplamente utilizados como suplemento alimentar microbiano vivo atuando no equilíbrio intestinal (SANDERS, 2003). Os micro-organismos utilizados como probióticos estão listados na Tabela 1.

Os efeitos benéficos dos probióticos dependem da ingestão regular e diária recomendada, a fim de proporcionar a "dose" mínima de células vivas. Sugere-se que o número de células no alimento contendo bactérias probióticas deve ser de  $10^8 - 10^9$  UFCg<sup>-1</sup> para assegurar que, após a sua ingestão no mínimo  $10^6 - 10^7$  UFCg<sup>-1</sup> possa atingir o ponto específico de atuação, intestino delgado ou intestino grosso e exercer o efeito desejado (NAZZARO et al., 2009).

Os benefícios à saúde do hospedeiro atribuídos à ingestão de culturas probióticas que mais se destacam são: melhoria da função de barreira epitelial intestinal, controle da infecção gastrointestinal, melhoria da resposta imune do hospedeiro; diminuição da população de patógenos devido a produção de ácidos acético e lático, de bacteriocinas e de outros compostos antimicrobianos; digestão da lactose em indivíduos intolerantes à lactose; estimulação do sistema imune; alívio da constipação; aumento da absorção de minerais e produção de vitaminas. Outros efeitos atribuídos a essas culturas são a diminuição do risco de câncer de cólon e de doença cardiovascular. São sugeridos, também, a diminuição das concentrações plasmáticas de colesterol, efeitos anti-hipertensivos, redução da atividade ulcerativa de *Helicobacter pylori*, prevenção de infecções urogenitais, além de efeitos inibitórios sobre a mutagenicidade (JENSEN et al., 2012; BERMUDEZ-BRITO et al., 2012; KUMAR et al., 2013; LUNA; FOSTER, 2015; ZHANG; WU; FEI, 2016; KERRY et al., 2018; EREJUWA; SULAIMAN; WAHAB, 2014).

Tabela 1. Micro-organismos usados como probiótico

<b>Gênero</b>	<b>Espécie</b>
<i>Lactobacillus</i>	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> , <i>Lactobacillus delbrueckii</i> ssp. <i>bulgaricus</i> , <i>Lactobacillus fermentum</i> , <i>Lactobacillus johnsonii</i> , <i>Lactobacillus crispatus</i> , <i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus bifidus</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> , <i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus helveticus</i> , <i>Lactobacillus casei</i> subsp. <i>rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus gallinarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i> , <i>Lactobacillus gasseri</i> , <i>Lactobacillus cellebiosus</i> , <i>Lactobacillus vitulinus</i> , <i>Lactobacillus collinoides</i> , <i>Lactobacillus cremoris</i> , <i>Lactobacillus rumines</i> , <i>Lactobacillus dextranicum</i> , <i>Lactobacillus lactis</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Lactobacillus curvatus</i> , <i>Lactobacillus faecium</i> , <i>Lactobacillus paracasei</i>
<i>Bifidobacterium</i>	<i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium adolescentis</i> , <i>Bifidobacterium brevis</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Bifidobacterium animalis</i> , <i>Bifidobacterium infantis</i> , <i>Bifidobacterium thermophilum</i> , <i>Bifidobacterium breve</i> , <i>Bifidobacterium essencis</i> e <i>Bifidobacterium lactis</i>
<i>Bacillus</i>	<i>Bacillus coagulans</i> (GanedenBC30), <i>Bacillus lactis</i> DR10, <i>Bacillus licheniformis</i> , <i>Bacillus subtilis</i> R0179, <i>Bacillus subtilis</i> ( <i>natto</i> ) OUV23481
<i>Pediococcus</i>	<i>Pediococcus acidilactici</i> , <i>Pediococcus pentosaceus</i> , <i>Pediococcus halophilus</i>
<i>Lactococcus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i> e <i>cremoris</i>
<i>Leuconostoc</i>	<i>Leuconostoc mesenteroides</i> subsp. <i>dextranum</i> , <i>paramesenteroides</i> ou <i>lactis</i>
<i>Streptococcus</i>	<i>Streptococcus diacetilactis</i> , <i>Streptococcus cremoris</i> , <i>Streptococcus lactis</i> , <i>salivarius</i> subsp. <i>thermophilus</i> , <i>Streptococcus faecium</i> , <i>Streptococcus equinus</i>
<i>Weissella</i>	<i>Weissella cibaria</i> e <i>confusa</i>

Fonte: BULTOSA, 2016

Alguns critérios devem ser considerados para que um micro-organismo seja classificado como probiótico, como resistência à passagem através do trato gastrointestinal; capacidade de sobreviver no ambiente intestinal (GIRAFFA; CHANISHVILI; WIDYASTUTI, 2010); tolerância ao ácido e a bile; aderência às superfícies epiteliais; atividade antagônica para patógenos intestinais; não apresentar patogenicidade; entre outros (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008). Embora várias estirpes de bactérias do ácido láctico tenham sido descritas como probióticas, poucas

atendem os padrões das Nações Unidas em relação à documentação de ensaios clínicos, além de serem muito sensíveis à acidez intensa e à presença de sais biliares (HEKMAT; REID, 2006).

A maior parte das estirpes bacterianas utilizadas são representadas por espécies do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (LEFEVRE et al., 2017) que compõem um grupo de micro-organismos heterogêneos, com aumento da tolerância à acidez e produtores de ácido lático, como resultado da fermentação de carboidratos (SAEZ-LARA et al., 2015). Além dessas, algumas leveduras, como *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii*, e alguns fungos filamentosos, como *Aspergillus oryzae*, *Scytalidium acidophilum* também são considerados micro-organismos probióticos (BULTOSA, 2016).

A maioria dos pesquisadores sugere que são necessárias concentrações de células vivas acima de  $10^6$  UFC.mL<sup>-1</sup> para promover o efeito benéfico desejado. No entanto, vários fatores são apontados como responsáveis por essa redução da viabilidade dos probióticos como a acidez e o pH, a pós-acidificação, o nível de oxigênio, a permeação de oxigênio através da embalagem e a sensibilidade aos antimicrobianos produzidos por outras bactérias (DAVE; SHAH, 1997). Desta forma, as estirpes probióticas selecionadas devem ser adequadas para produção industrial em larga escala com a capacidade de sobreviver e manter a sua funcionalidade durante a produção e armazenagem como culturas congeladas ou secas e sobreviver durante as operações de processamento e armazenamento dos produtos formulados (TRIPATHI; GIRI, 2014).

A utilização de probióticos está associada a alguns outros problemas, como a baixa taxa de sobrevivência durante a exposição a condições adversas do trato gastrointestinal humano (GIT) e o baixo tempo de permanência no intestino (ROSS et al., 2005; GANDOMI et al., 2016). Caso a estirpe ingerida não sobreviva a digestão, o probiótico será incapaz de chegar viável ao intestino, reduzindo a sua funcionalidade. Essas adversidades representam um desafio do ponto de vista tecnológico. Portanto, diferentes técnicas para aumentar a resistência desses micro-organismos, incluindo a seleção adequada de estirpes bacterianas, o uso de duas fases fermentativas, a adaptação ao estresse, a incorporação de micronutrientes, como peptídeos e aminoácidos, e a microencapsulamento (QUEIROZ et al., 2013; RAMOS et al., 2016), se fazem necessárias.

Segundo Vinderola et al. (2017), a indústria de laticínios, especialmente aqueles dedicados à fabricação de alimentos fermentados, foi a primeira a comercializar com sucesso cepas específicas de bactérias probióticas em alimentos, como iogurtes, leites fermentados, queijos e outras sobremesas. No entanto, devido a restrições nutricionais (intolerância à lactose ou colesterol total elevado), filosofia (veganismo ou vegetarianismo) e/ou requisitos de sabor (ARSLAN-

TONTUL; ERBAS, 2017), diferentes produtos probióticos não lácteos à base de cereais, frutas, hortaliças, soja e aveia, têm sido desenvolvidos nos últimos anos (CAMPOS et al., 2019; ROBERTS et al., 2018; NAKKARACH; WITHAYAGIAT, 2018; MOREIRA et al., 2017). De acordo com Panghal et al. (2018) o primeiro alimento probiótico isento de leite ou constituintes do leite foi formulado e fabricado em 1994 na Suécia. O produto era constituído de um mingau de aveia fermentado por *Lactobacillus plantarum* adicionado de cevada maltada. Após a fermentação era misturado com diferentes bebidas de fruta, por exemplo, groselha preta, morango, mirtilo na concentração de 5% para fornecer sabor frutado. As bactérias eram resistentes a pH baixo (pH < 2,8-3,4) e eram viáveis por mais de um mês em armazenamento refrigerado. O produto possuía aproximadamente  $5.10^{10}$  UFC.L<sup>-1</sup> de *Lactobacillus plantarum*.

Sucos de frutas e outros vegetais têm mostrado ser matrizes interessantes para a adição de bactérias probióticas devido ao seu conteúdo essencial de nutrientes, não possuem culturas iniciais que competem por nutrientes com as culturas probióticas e seu apelo a um nicho de consumidores que se preocupam com hábitos mais saudáveis (GRANATO et al., 2019). Estudos recentes relacionados a formulação de bebidas probióticas de frutas e outros vegetais estão listados na Tabela 2

Luiz et al. (2019) avaliaram o suco de cacau fermentado como veículo para *Lactobacillus casei* e o efeito da sucralose como substituto do açúcar durante o armazenamento refrigerado por 42 dias. As condições ótimas para a produção de suco probiótico foram pH inicial 6,2, 33°C e 12 h de fermentação. A adição de sucralose manteve a viabilidade dentro dos limites desejáveis de contagem por 42 dias ( $7,05 \pm 0,04$  log UFC.mL<sup>-1</sup>). Desta forma, o suco de cacau apresentou-se como uma matriz viável para o transporte das células probióticas. Campos et al. (2019) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* GG (LGG) e sua resistência *in vitro* e *in vivo* ao trato gastrointestinal (TGI) quando transportado por um suco misto fermentado de abacaxi e jussara. A viabilidade de LGG no suco foi superior a 7,2 log UFC. mL<sup>-1</sup> ao longo de 28 dias a 8 ° C e de acordo com os resultados para a resistência *in vitro* e *in vivo* ao trato gastrointestinal o suco formulado foi considerado uma excelente matriz transportadora para LGG além de ter contribuído para a redução nos níveis da fração LDL (lipoproteína de baixa densidade).

Tabela 2. Exemplos de estudos recentes sobre a formulação de bebidas probióticas de frutas e hortaliças.

<b>Matriz alimentar</b>	<b>Micro-organismo</b>	<b>Referências</b>
Suco de cereja	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus paracasei</i> <i>Lactobacillus rhamnosus</i>	Nematollahi et al., (2016)
Suco de mirtilo e cenoura	<i>Lactobacillus reuteri</i> LR92	Saori et al., (2016)
Cupuaçu	<i>Lactobacillus casei</i>	Lúcia et al. (2017)
Suco de laranja	<i>Lactobacillus paracasei</i>	Costa et al. (2017)
Suco de limão	<i>Lactobacillus plantarum</i> LS5	Mohammad et al.,(2017)
Suco de beterraba	<i>Lactobacillus plantarum</i> <i>Lactobacillus delbrueckii sb</i>	Panghal;Virkar; Kumar (2017)
Polpa de maracujá	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> ATCC 7469	Santos; Andrade; Gouveia (2017)
Água de coco	<i>Lactobacillus plantarum</i> DW12	Kantachote et al., (2017)
Suco de romã	<i>Lactobacillus bulgaricus</i> <i>Lactobacillus. plantarum</i>	Thakur; Sharma (2017)
Suco de melão	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	Rúa et al. (2018)
Suco de laranja	<i>Lactobacillus casei</i>	Miranda et al. (2019)
Suco de maçã	<i>Lactobacillus plantarum</i> NCIMB	

Moreira et al. (2017) avaliaram o desenvolvimento de suco misto de manga ubá e jussara pasteurizado e submetido a alta pressão isostática (API) com adição de *Lactobacillus rhamnosus* GG. Os níveis de *L. rhamnosus* acima de  $10^8$  UFC.mL<sup>-1</sup> durante os 30 dias de armazenamento a 4 °C, demonstraram sua viabilidade neste produto, que é potencialmente probiótico. Os sucos probióticos pasteurizados e processado por API tiveram uma boa aceitação sendo o suco processado pelo HIP com maiores escores. Freire et al. (2017) desenvolveram uma bebida fermentada a partir de uma mistura de mandioca e de arroz, com a adição de *Lactobacillus plantarum* CCMA 0743, *L. acidophilus* LAC-04 e de levedura (*Torulaspora delbrueckii* CCMA 0235). Após o processo de fermentação, a viabilidade dos micro-organismos probióticos era de 8 log UFC. mL<sup>-1</sup> e a bebida apresentava teor alcoólico inferior a 0,5% (p/v) e baixa capacidade antioxidante *in vitro* medida pelos ensaios de DPPH e ABTS. Martins et. al. (2016) avaliaram a viabilidade de *Lactobacillus rhamnosus* HN001 em saladas de frutas e as propriedades físico-

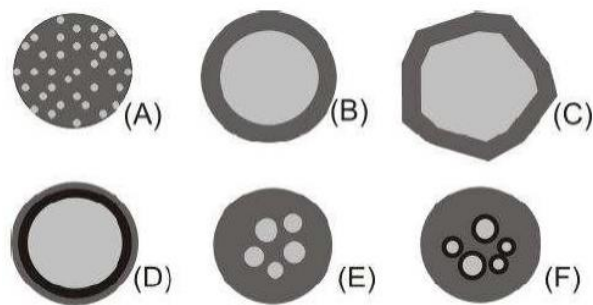
químicas, microbiológicas e sensoriais deste alimento. Os autores observaram que a viabilidade de *L. rhamnosus* em saladas de frutas foi de 8,49 log UFC. g<sup>-1</sup> após 120 horas e que a adição de *L. rhamnosus* não alterou a textura dos frutos ( $p > 0,05$ ). A salada de frutas foi bem aceita pelos consumidores podendo então ser uma alternativa ao consumo de produto probiótico de base não láctea.

### 3. Microencapsulamento

Os primeiros registros de tentativas de utilização de técnicas de encapsulamento datam dos anos 1930 (ref). Na área de alimentos, os estudos foram iniciados em 1960 pelo Instituto de Pesquisas Southwest, nos Estados Unidos, com microencapsulamento de óleos essenciais para prevenir a oxidação, perda de substâncias voláteis e controlar a liberação do aroma (ref). Nos últimos anos, o uso da microencapsulamento ampliou-se devido às novas necessidades da indústria alimentícia (ZARDO, 2014).

Todd (1970) definiu microencapsulamento como a tecnologia de empacotamento com finas coberturas poliméricas aplicáveis em sólidos, gotículas de líquidos ou material gasoso, formando partículas denominadas microcápsulas, que podem liberar seu conteúdo sob velocidade e condições específicas. Por sua vez, Arshady (1993) descreveu as microcápsulas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo (Figura 1).

No processo de encapsulação o material revestido é chamado de núcleo, material ativo, fase interna ou carga, e o revestimento é denominado de material de parede, casca, transportador, encapsulante, matriz ou fase externa (XIAO et al., 2014). As microcápsulas formadas podem ser divididas em mononuclear e multinucleadas. Nas primeiras o núcleo é nitidamente concentrado na região central, circundado por um filme definido e contínuo do material de parede, enquanto as multinucleadas são agregados de cápsulas mononucleadas (FERREIRA; TRIERWEILER, 2009; XIAO et al., 2014). As mononucleares podem ser obtidas utilizando uma velocidade de homogeneização mais baixa e as multinucleadas com alta velocidade (FERREIRA; TRIERWEILER, 2009; YEO et al., 2005). Em relação a liberação do núcleo as microcápsulas menores possuem maior área superficial e membrana mais fina, por conseguinte, o material encapsulado consegue difundir mais facilmente para o meio (LEE; ROSENBERG, 1999).



Fonte: (ARSHADY, 1993)

Figura 1. Alguns modelos de microcápsulas. (A): matriz (microesfera), que é o tipo produzido pela microencapsulamento por atomização; (B): microcápsula simples; (C): simples, irregular; (D): duas paredes; (E) vários núcleos; (F): agrupamentos de microcápsulas.

Um dos principais fatores que influenciam a estabilidade dos compostos encapsulados é a natureza da matriz encapsulante (XIAO et al., 2014) que para ser considerada adequada deve atender várias características, dentre elas, fácil manipulação durante o processo; baixa higroscopicidade; baixa viscosidade a altas concentrações de sólidos; habilidade para dispersar ou emulsificar e estabilizar o material do núcleo; boas propriedades de formação de filme; liberação completa do solvente ou outros materiais utilizados durante o processo de encapsulação; máxima proteção do núcleo contra condições adversas (luz, pH e oxigênio); solubilidade em solventes comumente utilizados; ausência de sabor ou odor desagradável e baixo custo (DAYTON; BARRET, 2013).

De forma geral, o encapsulamento pode ser usado para muitas aplicações na indústria alimentícia, por exemplo, para proteger compostos sensíveis em face de agentes externos (temperatura, teor de água, oxigênio, radiação ultravioleta) e/ou liberá-los de forma controlada, mascarar sabores, cores ou odores indesejáveis, estender a vida útil e diminuir a perda nutricional (ANAL; SINGH, 2007; AIZPURUA-OLAIZOLA et al., 2016). Uma breve descrição das técnicas de microencapsulamento para micro-organismos probióticos é apresentada na Tabela 3.

#### 4. Coacervação complexa

Desde que Tiebackx (1911) relatou pela primeira vez o fenômeno da separação de fases de hidrocolóides de cargas opostas a coacervação complexa vem sendo estudada. Resumidamente, é um processo espontâneo, dividido em simples e complexa, onde uma dispersão coloidal separa-se em duas fases líquidas imiscíveis: uma contendo elevada concentração do coloide e outra diluída. A coacervação simples utiliza um tipo de macromolécula e pode ser induzida por adição de álcoois, sais ou por aumento da temperatura. Já a complexa envolve, pelo menos, dois tipos de compostos de carga oposta e é induzida principalmente por interações eletrostáticas (ZHAO; WANG, 2016).

Bungenberg de Jong e Kruyt (1929) foram os primeiros a investigar o processo de coacervação complexa utilizando goma arábica e gelatina. A interação de biopolímeros foi basicamente de natureza eletrostática e a coacervação foi fortemente dependente da densidade de carga molecular, pH e força iônica. No entanto, o uso pela indústria começou na década de 50 e a técnica foi utilizada para a microencapsulamento de corantes no sistema de gelatina e goma arábica para a fabricação de papel de cópia sem carbono. Desde então, um grande número de trabalhos sobre microencapsulamento de variedades de agentes ativos, utilizando coacervação complexa, foi estudado nas últimas décadas.

Na coacervação complexa, em um determinado pH, as moléculas com cargas opostas irão interagir eletrostaticamente resultando na formação dos complexos coacervados, ocasionando uma separação de fases, em que uma é rica em solvente e outra em ambos os polímeros ou biopolímeros utilizados (XIAO et al., 2014; YANG et al., 2015; EGHBAL et al., 2016). A força motriz envolvida neste processo é a interação eletrostática (EGHBAL et al., 2016), no entanto, sob condições em que essa é suprimida (por exemplo, elevado teor de sal) as ligações de hidrogênio e interações hidrofóbicas, dentre outras, podem contribuir para a formação dos coacervados (TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007), resultando na redução da energia livre do sistema.

A estabilidade dos coacervados irá depender de um conjunto de condições, tais como pH, carga sobre os polímeros ou biopolímeros, a concentração de coloide, a força iônica do meio, temperatura, etc (JAIN et al., 2016). A proporção em massa das moléculas utilizadas e o pH são fatores críticos que afetam a atração e conseqüentemente a complexação (XIAO et al., 2014). Esses parâmetros normalmente são otimizados para alcançar o maior rendimento e funcionalidade dos complexos coacervados. Para isso, são utilizadas análises de potencial zeta, absorvância e rendimento dos coacervados desidratados (WANG; ADHIKARI; BARROW, 2014; TIMILSENA et al., 2015). Segundo Wang; Adhikari; Barrow (2014) o rendimento e a

turbidez são os parâmetros mais confiáveis para otimização do processo de coacervação complexa.

Geralmente no processo de coacervação complexa utiliza-se uma proteína carregada positivamente e um polissacarídeo carregado negativamente, mas muitas combinações têm sido descritas na literatura (GOMEZ-ESTACA et al., 2016). Dentre os polímeros utilizados, destacam-se a gelatina, goma arábica, alginato, albumina, caseína, ágar, gomas, pectinas e quitosano (ANAL; SINGH, 2007; FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008; RUTZ et al., 2017). A gelatina, uma proteína solúvel em água e a goma arábica, um polímero de cadeia longa, ambos com elevado peso molecular constituem o primeiro par utilizado e, provavelmente, o mais estudado (XIAO et al., 2014). Porém, a gelatina é bastante viscosa, mesmo em baixas concentrações, o que leva ao problema da agregação e aglutinação no processo de preparação das microcápsulas (XU et al., 2012). A goma arábica é um complexo polissacarídeo-proteína arabinogalactano aniônico composto por três frações distintas com teores de proteína variáveis, bem como pesos moleculares (RANDALL; PHILLIPS; WILLIAMS, 1989). Essa composição confere uma propriedade de superfície eficiente, além de possuir solubilidade a frio, devido à presença de grupos carregados residuais e de fragmentos peptídicos (PHILLIPS; TAKIGAMI; TAKIGAMI, 1996).

No processo de coacervação complexa os coacervados ou microcápsulas, quando se tem o encapsulamento de algum composto, possuem excelentes características de liberação controlada, e elevada eficiência de encapsulação (YANG et al., 2014). Uma das desvantagens é a baixa resistência mecânica e térmica devido à natureza iônica das interações sendo necessário fortalecer esta estrutura, podendo ser realizada a reticulação das cadeias dos polímeros (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014; KOUPANTSIS; PAVLIDOU; PARASKEVOPOULOU, 2016). No entanto, a maior parte dos agentes de reticulação químicos citados na literatura, tal como formaldeído, glutaraldeído, glioxal, diisocianato, epicloro-hidrina possuem suas aplicações limitadas devido à toxicidade e dificuldade de remoção completa com um solvente adequado para atingir a aceitação biológica (BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014).

A introdução de ligações cruzadas por via enzimática pode ser uma alternativa (BABIN; DICKINSON, 2001). Estudos avaliam o uso da enzima transglutaminase (TG) apesar de ser facilmente removida do sistema após a reticulação, por ser hidrofílica (GEE et al., 2016; YUAN et al., 2017) e a sua aplicação é limitada devido ao elevado custo (CONTO et al., 2013; PENG et al., 2014). Outros compostos têm sido pesquisados, tais como, genipina (PENG et al., 2014), iridóides (XIAO; GU; TAN, 2014), glicerol, tripolifosfato de sódio (NaTPF) (ZHANG et al., 2012; BUTSTRAEN; SALAÜN, 2014).

A coacervação complexa é mais adequada para encapsular compostos hidrofóbicos, sendo esta uma limitação da técnica. Para componentes hidrofílicos é necessário ajustes na técnica, por exemplo, pela inclusão de um processo de emulsão dupla do tipo água-em-óleo-em-água (A/O/A) (COMUNIAN et al., 2013) (Tabela 3). Souza et al. (2019) avaliaram a formação de microcápsulas contendo lactase por emulsões A/O/A seguido de coacervação complexa. Os impactos do encapsulamento sobre as propriedades da enzima ( $\beta$ -galactosidase de diferentes fontes) foram avaliados em função de diferentes valores de pH, temperaturas e tempos de armazenamento à temperatura ambiente. Além disso, a cinética de liberação da lactase durante a digestão *in vitro* também foi avaliada. Os resultados obtidos demonstraram que o encapsulamento representou uma tecnologia promissora para proteger e fornecer proteínas bioativas durante o armazenamento e entrega no trato gastrointestinal. Shaddel et al. (2018) relataram alta retenção de antocianinas microencapsuladas empregando o processo de dupla emulsão antes da coacervação complexa utilizando os biopolímeros gelatina e goma arábica como materiais de parede, após 2 meses de armazenamento a  $37 \pm 2$  °C. Santos et al. (2015b) desenvolveram e caracterizaram microcápsulas de xilitol para uso em alimentos, a fim de prolongar o efeito adocicado e refrescante proporcionado por este ingrediente. A coacervação complexa foi empregada como método de microencapsulamento utilizando um passo preliminar de emulsão dupla devido ao caráter hidrofílico do xilitol. A eficiência de encapsulação variou de 31% a 71%, sendo maior nos tratamentos com maiores concentrações de polímeros. A liberação de mais de 70% do xilitol microencapsulado em saliva artificial ocorreu em 20 min. SANTOS et al. (2014) co-encapsularam o xilitol e o mentol utilizando o método de dupla emulsão seguido de coacervação complexa com o objetivo de intensificar a sensação de refrescância e controlar a liberação desses componentes. As microcápsulas apresentaram formato esférico com núcleo completamente encapsulado e alta eficiência de encapsulação, demonstrando o sucesso da técnica. As microcápsulas em gomas de mascar foram capazes de promover a liberação gradual de xilitol e mentol, prolongando o efeito de resfriamento.

Tabela 3. Processo de dupla emulsão (A/O/A) seguido de coacervação complexa

Combinações de polímero		Ingrediente ativo	pH	Eficiência de encapsulamento (%)	Método de secagem	Referências
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	$\beta$ -galactosidase de <i>Kluyveromyces lactis</i> $\beta$ -galactosidase de <i>Aspergillus oryzae</i>	4,4	97-99	Liofilização	SOUZA et al., 2019
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Antocianinas	4,0	81	Liofilização	SHADDEL et al., 2018
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Xilitol	4,0	31-71	Liofilização	SANTOS et al., 2015
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Xilitol e mentol	4,0	45-100	Liofilização	SANTOS et al., 2014
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Aspartame	4,0	45-71	Liofilização	ROCHA-SELMÍ et al., 2013a
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Ácido ascórbico	4,4	98-99	Liofilização	COMUNIAN et al., 2013
<b>Gelatina</b>	Goma arábica	Sucralose	4,0	43-89	Liofilização	ROCHA-SELMÍ et al., 2013b
<b>SPI</b>	Pectina	Hidrolisado de caseína	4,4	78-91	Liofilização	MENDANHA et al., 2009

## 5. Emulsões

Emulsões são sistemas heterogêneos, termodinamicamente instáveis, definidos como a mistura de dois líquidos imiscíveis, onde um deles está disperso no outro na forma de gotículas (DICKINSON, 2011). As emulsões simples são classificadas de acordo com a natureza de sua fase dispersa. Se o óleo é a fase dispersa, a emulsão é dita óleo em água (O/A); se a água é a fase dispersa, a emulsão é dita água em óleo (A/O). Na indústria alimentícia produtos como leite, creme de leite, molhos para salada, maionese, sopas, iogurtes, molhos, queijo, sorvete, manteiga e margarina são exemplos de emulsões simples. Existem sistemas mais complexos, denominados de emulsões duplas (FLAIZ et al., 2016) e as formas mais comuns são, água em óleo em água ( $A_1/O/A_2$ ) e óleo em água em óleo ( $O_1/A/O_2$ ) (PAWLIK; NORTON, 2014), sendo a primeira mais estudada.

Para que ocorra a formação das emulsões é necessário um considerável aporte de energia, geralmente mecânica (LEAL-CALDERON; THIVILLIERS; SCHMITT, 2007). No processamento de alimentos utiliza-se misturadores de alta velocidade, moinhos coloidais, homogeneizadores de alta pressão, ultra-som, rotores e sistemas de membranas. Por ser um processo termodinamicamente desfavorável as emulsões não se formam espontaneamente e possuem elevada instabilidade (ARAÚJO, 2011). Desta maneira, utiliza-se um terceiro componente ou combinação de diversos agentes ativos de superfície, denominados de emulsificantes (DICKINSON, 2011; YAMANAKA et al., 2017).

Os emulsificantes são moléculas anfifílicas, ou seja, apresentam um segmento com propriedades hidrofílicas e outro lipofílico, também conhecidos como surfactantes ou tensoativos (ARAÚJO, 2011). O papel principal do emulsificante é de adsorver na interface entre o óleo e a água, das gotículas recém-formadas, reduzindo a tensão interfacial e a energia necessária para a formação da emulsão. Além disso, pode ocorrer a formação de um filme, ao redor das gotículas, com propriedades estéricas e eletrostáticas prevenindo a ocorrência de fenômenos de instabilidade que poderiam causar a separação de fases do sistema. Segundo Dickinson (2011) os emulsificantes mais utilizados na indústria alimentícia são proteínas, fosfolípidos e, em certos casos, polissacarídeos (hidrocolóides).

## 5.1. Emulsões duplas

Emulsões duplas são sistemas complexos de dispersão, também conhecidos como "emulsões de emulsões", existindo simultaneamente os dois tipos de emulsões simples (O/A e A/O) e, devido às suas propriedades e estrutura diferentes, são de especial interesse. As formas mais comuns dessas emulsões são, água em óleo em água ( $A_1/O/A_2$ ) e óleo em água em óleo ( $O_1/A/O_2$ ) (PAWLIK; NORTON, 2014), sendo a primeira mais estudada.

Nesse tipo de emulsão ( $A_1/O/A_2$ ) existem simultaneamente gotículas de água ( $A_1$ ) no interior de glóbulos de gordura (O) e dispersos numa fase aquosa contínua ( $A_2$ ) (BOUYER et.al., 2012). Por serem constituídas de três fases distintas e duas interfaces óleo-água, em comparação com as duas fases e uma interface água-óleo de uma emulsão simples, se faz necessário a utilização de dois agentes emulsionantes com diferentes valores de equilíbrio hidrofílico-lipofílico (HLB), um para estabilizar as gotículas da emulsão interna (o principal) e outro para estabilizar as gotículas da emulsão externa (o secundário) (DICKINSON, 2011; ESLAMI; DAVARPANAH; VAHABZADEH, 2017).

Os sistemas de emulsões duplas, na maioria dos casos, são preparados em duas etapas. A primeira consiste na elaboração de uma emulsão primária A/O ou O/A, utilizando um emulsificante lipofílico ou hidrofílico, respectivamente. A segunda opera a reemulsificação da emulsão primária pela adição à outra fase aquosa ou oleosa contendo tensoativos hidrofílicos ou lipofílicos, respectivamente, formando emulsões do tipo A/O/A ou O/A/O (DICKINSON, 2011). No primeiro momento utiliza-se forças de cisalhamento elevadas, por meio da adição de alta energia (de alta pressão, ultra-turrax ou ultra-sons) (MUSCHIOLIK, 2007). Posteriormente, a segunda etapa ocorre sob condições de cisalhamento moderadas evitando desestabilidade do sistema (DICKINSON, 2011).

A composição das emulsões duplas e suas propriedades permite a aplicação desses sistemas em diversas áreas, por exemplo, em cosméticos, fármacos, agroquímicos, produtos químicos industriais, etc (SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012). Para a indústria alimentícia pesquisas tem sido realizadas com o objetivo de reduzir o teor de gordura, mascarar sabores, melhorar as propriedades sensoriais de produtos, ou controlar a liberação e proteção de substâncias, incluindo o encapsulamento de vitaminas / minerais, de bactérias probióticas, a fim de preservá-los em uma forma viável durante a produção, armazenamento e digestão gastrointestinal (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; SHIMA et al., 2006; GARCÍA-ALMEND; PIMENTEL-GONZ; LUDE, 2014; SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012; CHOI; DECKER; MCCLEMENTS, 2009; ESLAMI; DAVARPANAH; VAHABZADEH, 2017;

GIROUX et al., 2013; GIROUX; ROBITAILLE; BRITTEN, 2016; MUTALIYEVA et al., 2016).

Pimentel-González et al. (2009) avaliaram a viabilidade de células probióticas de *Lactobacillus rhamnosus* inclusas na fase aquosa interna de uma emulsão dupla de água em óleo em água (A/O/A) em relação com a de células na fase aquosa externa da emulsão dupla (controle) quando expostas a condições de baixo pH e na presença de sais biliares. A viabilidade das células controle diminuiu significativamente sob condições de baixo pH e sal biliar, e sua sobrevivência foi de 71% e 89%, respectivamente. A sobrevivência das células aprisionadas aumentou significativamente sob condições de baixo pH e sal biliar, e sua sobrevivência foi de 108% e 128%, respectivamente. Os pesquisadores concluíram que a fase interna das emulsões duplas forneceu às bactérias um ambiente apropriado para o crescimento, aumentando sua viabilidade em comparação com a viabilidade de células livres contidas na fase aquosa externa da emulsão dupla.

García-almend et al. (2014) avaliaram a inclusão de células de *Lactobacillus plantarum* na fase aquosa interna, constituídas por aguamiel ou soro doce, em emulsões duplas (O/A/O) e incorporadas durante a fabricação do queijo de Oaxaca. Os resultados obtidos indicaram que a inclusão de *L. plantarum* em emulsões duplas forneceram proteção às células probióticas sob as condições de processamento mais severas do queijo Oaxaca e também em relação as condições gastrointestinais, atingindo os locais de colonização em números suficientemente altos para proporcionar benefícios à saúde de seus hospedeiros.

El; Mantzouridou; Gkatzionis (2018) estudaram a inclusão de *Lactobacillus paracasei* na fase aquosa interna de emulsões A/O/A e a incorporação em iogurte, além das culturas iniciadoras *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Os resultados demonstraram a possibilidade de utilização de emulsões A/O/A proporcionando um ambiente compartimentado permitindo a fortificação de iogurte com culturas não iniciadoras, ou seja, probióticos, sem interferir com a cultura inicial e fermentação.

Flores-Andrade et al. (2017) estudaram a impregnação de células probióticas de *L. rhamnosus* inclusas na fase aquosa interna de emulsão dupla utilizando os métodos de desidratação osmótica (DO) e a desidratação osmótica a vácuo (VOD) e avaliaram a transferência de massa durante a impregnação em fatias de maçã da variedade “Granny Smith”. Como resultados os autores concluíram que as emulsões duplas protegem os micro-organismos dentro das células da maçã e ambos os processos OD e VOD produziram fatias de maçã com conteúdo microbiano acima de  $1,64 \times 10^7$  UFC.g<sup>-1</sup> correspondente aos encontrados em produtos probióticos comerciais.

## 6. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHMAD, B.; GANI, A.; GANI, A.; SHAH, A.; AHMAD, F. 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, 2018.
- AIZPURUA-OLAIZOLA, O.; NAVARRO, P.; VALLEJO, A.; OLIVARES, M.; ETXEBARRIA, N.; USOBIAGA, A. Microencapsulation and storage stability of polyphenols from *Vitis vinifera* grape wastes. **Food Chemistry**, v. 190, p. 614–621, 2016.
- AL-SHERAJI, S. H.; ISMAIL, A.; MANAP, M. Y.; MUSTAFA, S.; YUSOF, R. M.; HASSAN, F. A. Prebiotics as functional foods: A review. **Journal of Functional Foods**, v. 5, n. 4, p. 1542–1553, 2013.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science and Technology**, v. 18, n. 5, p. 240–251, 2007.
- ANJO, D. F. C. Alimentos funcionais em angiologia e cirurgia vascular. **Douglas Faria Corrêa Anjo**, v. 3, n. 2, p. 145–154, 2004.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M. LWT - Food Science and Technology Single and double layered microencapsulation of probiotics by spray drying and spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 81, p. 160–169, 2017.
- ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v.10, p.413-435, 1993.
- BABIN, Á.; DICKINSON, E. Influence of transglutaminase treatment on the thermoreversible gelation of gelatin. **Food Hydrocolloids**, v. 15, p. 271–276, 2001.
- BAGCHI, T. Traditional food & modern lifestyle: Impact of probiotics. **Indian Journal of Medical Research**, v. 140, p. 333-335, 2014.
- BERMUDEZ-BRITO, M.; PLAZA-DÍAZ, J.; MUÑOZ-QUEZADA, S.; GÓMEZ-LLORENTE, C.; GIL, A. Probiotic mechanisms of action. **Annals of Nutrition and Metabolism**, v. 61, p. 160-174, 2012.
- BIGLIARDI, B.; GALATI, F. Innovation trends in the food industry: The case of functional foods. **Trends in Food Science and Technology**, v. 31, n. 2, p. 118–129, 2013.
- BINNS, N. Probióticos, prebióticos e a microbiota intestinal. Belgica: ILSI Europe. 2013. 42p.
- BOUYER, E.; MEKHLOUFI, G.; ROSILIO, V.; GROSSIORD, J.-L.; AGNELY, F. Proteins, polysaccharides, and their complexes used as stabilizers for emulsions: alternatives to synthetic surfactants in the pharmaceutical field? **International journal of pharmaceutics**, v. 436, n. 1–2, p. 359–78, 15 out. 2012.
- BRASIL. 1999a. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 18, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico que estabelece

as diretrizes básicas para análise e comprovação de propriedades funcionais e ou de saúde alegadas em rotulagem de alimentos, constante do anexo desta portaria. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Brasília, DF, 03 maio, 1999.

BRASIL. 1999b. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução no 19, de 30 de abril de 1999. Aprova o Regulamento Técnico de procedimentos para registro de alimento com alegação de propriedades funcionais e ou de saúde em sua rotulagem. **Diário Oficial da União**, Poder executivo, Brasília, DF, 03 maio, 1999.

BUNGENBERG de JONG, H.G., KRUYT, H.R., Coacervation (partial miscibility in colloid systems) Proceedings of the Koninklijke Nederlandse Akademie van Wetenschappen, 32 (1929), pp. 849-856

BUTSTRAEN, C.; SALAÜN, F. Preparation of microcapsules by complex coacervation of gum Arabic and chitosan. **Carbohydrate Polymers**, v. 99, p. 608–616, 2014.

CALABUIG-JIMÉNEZ, L.; BETORET, E.; BETORET, N.; PATRIGNANI, F.; BARRERA, C.; SEGUÍ, L.; LANCIOTTI, R.; DALLA, M. 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, 2019.

CAMPOS, R. C. A. B.; MARTINS, E. M. F.; PIRES, B. A.; PELUZIO, M. C. G.; CAMPOS, A. N.; ROCHA; RAMOS, A. M.; JÚNIOR, B. R. C. L.; MARTINS, A. D. O.; SILVA, R. R.; MARTINS, M. L. 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**, v. 116, n. November 2017, p. 1247–1257, 2019.

CHOI, S. J.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Impact of iron encapsulation within the interior aqueous phase of water-in-oil-in-water emulsions on lipid oxidation. **Food Chemistry**, v. 116, n. 1, p. 271–276, set. 2009.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013.

CONTO, L. C. De; RAIMUNDO, C.; GROSSO, F.; APARECIDA, L.; GONÇALVES, G. Chemometry as applied to the production of omega-3 microcapsules by complex coacervation with soy protein isolate and gum Arabic. **LWT - Food Science and Technology**, v. 53, n. 1, p. 218–224, 2013.

DA COSTA, G. M.; DE CARVALHO SILVA, J. V.; MINGOTTI, J. D.; BARÃO, C. E.; KLOSOSKI, S. J.; PIMENTEL, T. C. Effect of ascorbic acid or oligofructose supplementation on *L. paracasei* viability, physicochemical characteristics and acceptance of probiotic orange juice. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 195–201, 2017.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Viability of Yoghurt and Probiotic Bacteria in Yoghurts Made from Commercial Starter Cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DAYTON, D.; BARRET, K. A microencapsulamento a serviço da indústria de alimentos. p. 1–4, 2013.

DICKINSON, E. Double Emulsions Stabilized by Food Biopolymers. **Food Biophysics**, v. 6, pp 1–11, 2011.

DONG, Z.; MA, Y.; HAYAT, K.; JIA, C.; XIA, S.; ZHANG, X. Morphology and release profile of microcapsules encapsulating peppermint oil by complex coacervation. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 3, p. 455–460, 2011.

DOYON, M.; LABRECQUE, Functional foods: a conceptual definition. **British Food Journal**, v. 110, n. 11, p. 1133–1149, 2008.

EGHBAL, N.; YARMAND, M. S.; MOUSAVI, M.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N.; GHARSALLAOUI, A. Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 947–956, 2016.

KADRI, EL. H.; LALOU, L.; MANTZOURIDOU, F.; GKATZIONIS, K. Utilisation of water-in-oil-water ( $W_1/O/W_2$ ) double emulsion in a set-type yogurt model for the delivery of probiotic *Lactobacillus paracasei*. **Food Research International**, v. 107, p. 325–336, 2018.

ESLAMI, P.; DAVARPANAH, L.; VAHABZADEH, F. Encapsulating role of b - cyclodextrin in formation of pickering water- in-oil-in-water (  $W_1/O/W_2$ ) double emulsions containing *Lactobacillus dellbrueckii*. **Food hydrocolloids**, v. 64, p. 133–148, 2017.

EREJUWA, O. O.; SULAIMAN, S. A.; WAHAB, M. S. A. Modulation of Gut Microbiota in the Management of Metabolic Disorders: The Prospects and Challenges. **International Journal of Molecular Science**, v. 15, n. 3, p. 4158-4188, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. De; ROCHA, G. A. Revisão : Microencapsulamento de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.

FERREIRA, L. S.; TRIERWEILER, J. O. Modeling and simulation of the polymeric nanocapsule formation process. **IFAC Proceedings Volumes (IFAC-PapersOnline)**, v. 7, n. PART 1, p. 405–410, 2009.

FLAIZ, L.; FREIRE, M.; COFRADES, S.; MATEOS, R.; WEISS, J.; JIM??NEZ-COLMENERO, F.; BOU, R. Comparison of simple, double and gelled double emulsions as hydroxytyrosol and n-3 fatty acid delivery systems. **Food Chemistry**, v. 213, p. 49–57, 2016.

FLORES-ANDRADE, E.; PASCUAL-PINEDA, L. A.; ALARCÓN-ELVIRA, F. G.; RASCÓN-DÍAZ, M. P.; PIMENTEL-GONZÓLEZ, D. J.; BERISTAIN, C. I. Effect of vacuum on the impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* microcapsules in apple slices using double emulsion. **Journal of Food Engineering**, v. 202, p. 18–24, 2017.

FREIRE, A. L.; RAMOS, C. L.; NIRLANE, P.; GUILHERME, M.; CARDOSO, B.; SCHWAN, R. F. Nondairy beverage produced by controlled fermentation with potential probiotic starter cultures of lactic acid bacteria and yeast. **International Journal of Food Microbiology**, v. 248, p. 39–46, 2017.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG

during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 365–371, 2016.

GEE, P.; GUPTA, R.; TIMILSENA, Y. P.; ADHIKARI, B. Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan. **Journal of Food Engineering**, v. 191, p. 58–66, 2016.

GIBSON, G. R. From Probiotics to Prebiotics Food Microbiology and Safety. **Future Aspects of Probiotics in Health: 12th World Congress of Food Science and Technology**, v. 69, n. 5, p. 141–143, 2004.

GIROUX, H. J.; CONSTANTINEAU, S.; FUSTIER, P.; CHAMPAGNE, C. P.; ST-GELAIS, D.; LACROIX, M.; BRITTEN, M. Cheese fortification using water-in-oil-in-water double emulsions as carrier for water soluble nutrients. **International Dairy Journal**, v. 29, n. 2, p. 107–114, 2013.

GIRAFFA, G.; CHANISHVILI, N.; WIDYASTUTI, Y. Importance of lactobacilli in food and feed biotechnology. **Research in Microbiology**, v. 161, p. 480–487, 2010.

GIROUX, H. J.; ROBITAILLE, G.; BRITTEN, M. Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 225–232, 2016.

GOMEZ-ESTACA, J.; COMUNIAN, T. A.; MONTERO, P.; FERRO-FURTADO, R.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin-cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155–162, 2016.

GRANATO, D.; NAZZARO, F.; COLOMBO, T.; ALMEIDA, E.; GOMES, A. **Probiotic Food Development: An Updated Review Based on Technological Advancement**, Encyclopedia of Food Security and Sustainability, v.1, p. 422-428, 2019.

HEKMAT, S.; REID, G. Sensory properties of probiotic yogurt is comparable to standard yogurt. **Nutrition Research**, v. 26, p. 163–166, 2006.

ZARDO, Ivanor. **Extração e microencapsulação de compostos antocianicos de bagaço de mirtilo (*Vaccinium corymbosum L.*)**. Dissertação (Mestrado) em Eng. Química, UFRGS, Porto Alegre, 118p. 2014

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria, **International Journal of Food Microbiology**, v. 153, p. 216-222, 2012

KANTACHOTE, D.; RATANABUREE, A.; HAYISAMA-AE, W.; SUKHOOM, A. The use of potential probiotic *Lactobacillus plantarum* DW12 for producing a novel functional beverage from mature coconut water. **Journal of Functional Foods**, v. 32, p. 401–408, 2017.

KERRY, R. G.; PATRA, J. K.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H. S.; DAS, G. Benefaction of probiotics for human health: A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927-939, 2018.

- KOMATSU, T. R.; BURITI, F. C. A.; SAAD, S. M. I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 44, n. 3, p. 329-347, 2008.
- KOUPANTISIS, T.; PAVLIDOU, E.; PARASKEVOPOULOU, A. Food Hydrocolloids Glycerol and tannic acid as applied in the preparation of milk proteins e CMC complex coacervates for flavour encapsulation. **Food hydrocolloids**, v. 57, p. 62–71, 2016.
- KUMAR, M.; NAGPAL, R.; VERMA, V.; KUMAR, A.; KAUR, N.; HEMALATHA, R.; GAUTAM, S. K.; SINGH, B. Probiotic metabolites as epigenetic targets in the revention of colon cancer. **Nutrition Reviews**, v. 71, n. 1, p. 23-34, 2013.
- LEAL-CALDERON, F.; THIVILLIERS, F.; SCHMITT, V. Structured emulsions. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, p. 206–212, 2007.
- LEE, S. J.; ROSENBERG, M. Preparation and properties of glutaraldehyde cross-linked whey protein-based microcapsules containing theophylline. **Journal of Controlled Release**, v. 61, n. 1–2, p. 123–136, 1999.
- LEFEVRE, M.; RACEDO, S. M.; DENAYROLLES, M.; RIPERT, G.; DESFOUGÈRES, T.; LOBACH, A. R.; SIMON, R.; PÉLERIN, F.; JÜSTEN, P.; URDACI, M. C. Safety assessment of *Bacillus subtilis* CU1 for use as a probiotic in humans. **Regulatory Toxicology and Pharmacology**, v. 83, p. 54–65, 2017.
- LÚCIA, A.; PEREIRA, F.; CORRÊA, S.; KELLY, V.; ABREU, G.; OLIVEIRA, T. De; FARIA, W.; NARAIN, N.; RODRIGUES, S. Impact of fermentation conditions on the quality and sensory properties of a probiotic cupuassu (*Theobroma grandiflorum*) beverage. **Food Research International**, v. 100, n. May, p. 603–611, 2017.
- LUNA, R. A.; FOSTER, J. A. Gut brain axis: diet microbiota interactions and implications for modulation of anxiety and depression. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 32, p. 35-41, 2015.
- LUIZ, A.; VELOSO, H.; RODRIGUES, S.; KELLY, V.; ABREU, G.; OLIVEIRA, T. De; FARIA, W.; NARAIN, N.; LÚCIA, A.; PEREIRA, F. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, n. July 2018, p. 371–378, 2019.
- MARTINS, E. M. F.; RAMOS, A. M.; MARTINS, M. L.; RICARDO, B.; LEITE, D. C. Fruit salad as a new vehicle for probiotic bacteria. **Food Science and Technology**, v. 36, n. 3, p. 540–548, 2016.
- MENDANHA, D. V.; ORTIZ, S. E. M.; FAVARO-TRINDADE, C.; MONTERREY-QUINTERO, E. S.; THOMAZINI, M. Microencapsulation of casein hydrolysate by complex coacervation with SPI/pectin. **Food Research International**, v. 42, p. 1099-1104, 2009.
- MIRANDA, R. F. De; PAULA, M. M. De; MAMEDE, G.; BARÃO, C. E.; CAROLINA, A.; SANTANA, R.; RAICES, L.; GOMES, R. G.; PIMENTEL, T. C. Orange juice added with *L. casei*: is there an impact of the probiotic addition methodology on the quality parameters? **LWT - Food Science and Technology**, v. 106, p.186-193, 2019.
- MOHAMMAD, S.; HASHEMI, B.; MOUSAVI, A.; BARBA, F. J.; NEMATI, Z. Fermented

sweet lemon juice (*Citrus limetta*) using *Lactobacillus plantarum* LS5 : Chemical composition , antioxidant and antibacterial activities. **Journal of Functional Foods**, v. 38, p. 409–414, 2017.

MOREIRA, R.; LOPES, M.; RICARDO, B.; LEITE, D. C.; MAURÍCIO, E.; MARTINS, F.; PAULO, C.; CABRAL, D.; OLIVEIRA, D.; CUNHA, D.; PEREIRA, D. S. Development of a juçara and Uba *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, p. 259-268, 2017.

MUSCHIOLIK, G. Multiple emulsions for food use. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 213–220, out. 2007.

MUTALIYEVA, B.; GRIGORIEV, D.; MADYBEKOVA, G.; SHARIPOVA, A.; AIDAROVA, S.; SAPARBEKOVA, A.; MILLER, R. Microencapsulation of insulin and its release using W/O/W double emulsion method. **Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects**, v. 521 , p. 147-152, 2016.

NAKKARACH, A.; WITHAYAGIAT, U. Comparison of synbiotic beverages produced from riceberry malt extract using selected free and encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 5, p. 467–476, 2018.

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.

NEMATOLLAHI, A.; SOHRABVANDI, S.; MORTAZAVIAN, A. M.; JAZAERI, S. Viability of probiotic bacteria and some chemical and sensory characteristics in cornelian cherry juice during cold storage. **Electronic Journal of Biotechnology**, v. 21, p. 49–53, 2016.

NIVA, M. “All foods affect health”: Understandings of functional foods and healthy eating among health-oriented Finns. **Appetite**, v. 48, n. 3, p. 384–393, 2007.

PANGHAL, A.; JANGHU, S.; VIRKAR, K.; GAT, Y.; KUMAR, V.; CHHIKARA, N. Food Bioscience Potential non-dairy probiotic products – A healthy approach. **Food Bioscience**, v. 21, p. 80–89, 2018.

PANGHAL, A.; VIRKAR, K.; KUMAR, V. Development of Probiotic Beetroot Drink. **Current Research in Nutrition and Food Science** .v. 5, n. 3, p. 1–6, 2017.

PAULA, D. D. A.; OLIVEIRA, D.; VIANNA, A.; CARVALHO, N. De. Double emulsions (W/O/W): physical characteristics and perceived intensity of salty taste. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 53, p. 475–483, 2018.

PAWLIK, A. K.; NORTON, I. T. Bridging benchtop research and industrial processed foods: Structuring of model food emulsions. **Food Structure**, v. 1, n. 1, p. 24–38, 2014.

PENG, C.; ZHAO, S.; ZHANG, J.; HUANG, G.; CHEN, L.; ZHAO, F. Chemical composition , antimicrobial property and microencapsulation of Mustard ( *Sinapis alba* ) seed essential oil by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 165, p. 560–568, 2014.

PHILLIPS, G. O.; TAKIGAMI, S.; TAKIGAMI, M. Hydration characteristics of the gum

exudate from *Acacia senegal*. **Food Hydrocolloids**, v. 10, n. 1, p. 11–19, 1996.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 292–297, 2009.

QUEIROZ, L.; EDUARDO, Z. I.; LUCY, J. I. L.; FRIES, M.; I, N. N. T. Microencapsulamento de probióticos : avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, p. 1–8, 2013.

RAMOS, P. E.; ABRUNHOSA, L.; PINHEIRO, A.; CERQUEIRA, M. A.; MOTTA, C.; CASTANHEIRA, I.; CHANDRA-HIOE, M. V.; ARCOT, J.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation. **Food Research International**, v. 90, p. 25–32, 2016.

RANDALL, R. C.; PHILLIPS, G. O.; WILLIAMS, P. A. Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*. **Food Hydrocolloids**, v. 3, p. 65–75, 1989.

ROBERFROID, M. B. Concepts and strategy of functional food science: the European perspective. **Am J Clin Nutr**, v. 71, n. 6, p. 1660S–1664, 2000.

ROBERTS, D.; REYES, V.; BONILLA, F.; DZANDU, B.; LIU, C.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, p. 144–150, 2018.

ROCHA-SELMÍ, G. A.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; BOLINI, H. M. A.; FÁVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness. **Food Chemistry**, v. 139, p. 72–78, 2013a.

ROCHA-SELMÍ, G. A.; THEODORO, A. C.; THOMAZINI, M.; BOLINI, H. M. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 1, p. 28–32, 2013b.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; ESTRADA-FERNÁNDEZ, A. G.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; LUDEÑA-URQUIZO, F.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J. Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 768–773, 2014.

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

RÚA, J.; LÓPEZ-RODRÍGUEZ, I.; SANZ, J.; GARCÍA-FERNÁNDEZ, M. C.; PILAR, M.; GARCÍA-ARMESTO, M. R. LWT - Food Science and Technology Improving functional properties of “ Piel de Sapo ” melon juice by addition of a *Lippia citriodora* natural extract and probiotic-type lactic acid bacteria. **LWT - Food Science and Technology**, v. 96, p. 75–81, 2018.

RUTZ, J. K.; BORGES, C. D.; ZAMBIAZI, R. C.; CRIZEL-CARDOZO, M. M.; KUCK, L.

- S.; NOREÑA, C. P. Z. Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems. **Food Chemistry**, v. 220, p. 59–66, 2017.
- SAEZ-LARA, M. J.; GOMEZ-LLORENTE, C.; PLAZA-DIAZ, J.; GIL, A. The Role of Probiotic Lactic Acid Bacteria and Bifidobacteria in the Prevention and Treatment of Inflammatory Bowel Disease and Other Related Diseases : A Systematic Review of Randomized Human Clinical Trials. **BioMed Research International** v. 2015, 15 p, 2015.
- SANDERS, M. E.; PH, D. Probiotics : Considerations for Human Health. **Nutrition Reviews**, v. 61, Pages 91–99, 2003.
- SANTOS, E.; ANDRADE, R.; GOUVEIA, E. Utilization of the pectin and pulp of the passion fruit from Caatinga as probiotic food carriers. **Food Bioscience**, v. 20, p. 56–61, 2017.
- SANTOS, M. G.; BOZZA, F. T.; THOMAZINI, M.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32–39, 2015.
- SANTOS, M. G.; CARPINTEIRO, D. A.; THOMAZINI, M.; ROCHA-SELMÍ, G. A.; DA CRUZ, A. G.; RODRIGUES, C. E. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum. **Food Research International**, v. 66, p. 454–462, 2014.
- SAORI, C.; MAURO, I.; GUERGOLETTO, K. B.; GARCIA, S. Development of Blueberry and Carrot Juice Blend Fermented by *Lactobacillus reuteri* LR92. **Beverages** v. 37, 11 p., 2016.
- SAPEL, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 316–323, 2012.
- SHADDEL, R.; HESARI, J.; AZADMARD-DAMIRCHI, S.; HAMISHEHKAR, H. Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 107, p. 1800–1810, 2018.
- SHAH, N. P.; ALI, J. F.; RAVULA, R. R. Populations of *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium spp.*, and *Lactobacillus casei* in Commercial Fermented Milk Products. **Bioscience and Microflora**, v. 19, n. 1, p. 35–39, 2000.
- SHIMA, M.; MORITA, Y.; YAMASHITA, M.; ADACHI, S. Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion. **Food Hydrocolloids**, v. 20, p. 1164–1169, 2006.
- SOUZA, C. J. F.; COMUNIAN, T. A.; KASEMODEL, M. G. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of lactase by W/O/W emulsion followed by complex coacervation: Effects of enzyme source, addition of potassium and core to shell ratio on encapsulation efficiency, stability and kinetics of release. **Food Research International**, In Press, 2019.
- STANTON, C.; ROSS, R. P.; FITZGERALD, G. F.; VAN SINDEREN, D. Fermented functional foods based on probiotics and their biogenic metabolites. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 16, n. 2, p. 198–203, 2005.

- THAKUR, M.; SHARMA, R. K. Development of Probiotic Pomegranate Beverage and Its Physico-Chemical and Microbial Characterization. **International Journal of Pure & Applied Bioscience**, v. 5, n. 1, p. 35–41, 2017.
- TIEBACKX, F.W. Gleichzeitige Ausflockung zweier Kolloide. **Zeitschrift für Chemie und Industrie der Kolloide**, v. 8, pp. 198 – 201, 1911.
- TIMILSENA, Y. P.; AKANBI, T. O.; KHALID, N.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 121, p. 1276–1286, 2019.
- TIMILSENA, Y. P.; WANG, B.; ADHIKARI, R.; ADHIKARI, B. Preparation and characterization of chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 52, p. 554–563, 2015.
- TOOD, R.D. Microencapsulation and the flavor industry. **Flavor Industry**, v.1, p.768, 1970
- TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.
- TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein-polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v. 12, n. 4–5, p. 166–178, 2007.
- VIEIRA DA SILVA, B.; BARREIRA, J. C. M.; OLIVEIRA, M. B. P. P. Natural phytochemicals and probiotics as bioactive ingredients for functional foods: Extraction, biochemistry and protected-delivery technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 50, p. 144–158, 2016.
- WANG, B.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin – sodium hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 158, p. 358–365, 2014.
- XIAO, Q.; GU, X.; TAN, S. Drying process of sodium alginate films studied by two-dimensional correlation ATR-FTIR spectroscopy. **Food Chemistry**, v. 164, p. 179–184, 2014
- XIAO, Z.; LIU, W.; ZHU, G.; ZHOU, R.; NIU, Y. A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 94, p. 1482–1494, 2014.
- XU, J.; LI, T.; TANG, X.; QIAO, C.; JIANG, Q. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces Effect of aggregation behavior of gelatin in aqueous solution on the grafting density of gelatin modified with glycidol. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 95, p. 201–207, 2012.
- YAMANAKA, Y.; KOBAYASHI, I.; NEVES, M. A.; ICHIKAWA, S.; UEMURA, K.; NAKAJIMA, M. Formulation of W/O/W emulsions loaded with short-chain fatty acid and their stability improvement by layer-by-layer deposition using dietary fibers. **LWT - Food Science and Technology**, v. 76, p. 344–350, 2017.
- YANG, X.; GAO, N.; HU, L.; LI, J.; SUN, Y. Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation. **Journal of Food**

**Engineering**, v. 161, p. 87–93, 2015.

YANG, Z.; PENG, Z.; LI, J.; LI, S.; KONG, L.; LI, P.; WANG, Q. Development and evaluation of novel flavour microcapsules containing vanilla oil using complex coacervation approach. **Food Chemistry**, v. 145, p. 272–277, 2014.

YAO, M.; LI, B.; YE, H.; HUANG, W.; LUO, Q.; XIAO, H.; MCCLEMENTS, D. J.; LI, L. Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 83, p. 246–252, 2018.

YEO, Y.; BELLAS, E.; FIRESTONE, W.; LANGER, R.; KOHANE, D. S. Complex coacervates for thermally sensitive controlled release of flavor compounds. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 53, n. 19, p. 7518–7525, 2005.

YUAN, Y.; KONG, Z.; SUN, Y.; ZENG, Q.; YANG, X. Complex coacervation of soy protein with chitosan : Constructing antioxidant microcapsule for algal oil delivery. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 171–179, 2017.

ZHANG, K.; ZHANG, H.; HU, X.; BAO, S.; HUANG, H. Synthesis and release studies of microalgal oil-containing microcapsules prepared by complex coacervation. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 89, n. 1, p. 61–66, 2012.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index: a systematic review and meta-analysis of randomized, controlled trials. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, p. 571-580, 2016.

ZHAO, W.; WANG, Y. Coacervation with surfactants: From single-chain surfactants to gemini surfactants. **Advances in Colloid and Interface Science**, 2016.

## CAPÍTULO 2

### 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

Trabalho aceito para publicação na revista **International Journal of Biological Macromolecules**, Paula; D. A.; Martins, E. M. F.; Costa, N. A.; Oliveira, P. M.; Oliveira, E. B.; Ramos, A. M. 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

## CAPÍTULO 2

### 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

#### ABSTRACT

The objectives of this study were *i*) to microencapsulate probiotic cells of *Lactobacillus plantarum* through a dual process consisting of emulsification followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic, *ii*) to characterize the lyophilized microcapsules, *iii*) to evaluate their behavior in simulated *in vitro* gastrointestinal conditions and *iv*) to evaluate the survival of microencapsulated probiotic cells during 45 days of storage at 8 °C, 25 °C and -18°C. The optimized conditions for complex coacervation consisted of a 50:50 biopolymer ratio and pH = 4.0. Emulsification was followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic. The microcapsules presented dispersibility of  $0.183 \pm 0.17 \text{ g.mL}^{-1}$ , moisture content of 4.5%, water activity of  $0.34 \pm 0.03$  and hygroscopicity of  $9.20 \pm 0.43 \text{ g}$  of absorbed water per 100 g. Their size ranged from  $66.07 \pm 3.04 \mu\text{m}$  to  $105.66 \pm 3.24 \mu\text{m}$ . Viability of the encapsulated *L. plantarum* cells was 8.6 log CFU.g<sup>-1</sup> and the encapsulation efficiency was 97.78%. After *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions, viability of the encapsulated cells was 80.4% whereas it was only 25.0% for the free cells at 37 °C. Probiotic cell viability was maintained during storage at 8 °C and -18 °C for 45 days.

## 1. INTRODUCTION

Over the last two decades consumers have increasingly prioritized the intake of healthier foods and those with greater nutritional value. Given this new reality, the functional food sector has gained prominence, representing one of the most dynamic and innovative categories in the food industry [1]. These foods not only contribute to basic nutrition, but also contain physiologically active components, of which one of the major segments is represented by probiotics. The Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations and the World Health Organization (WHO) define probiotics as live microorganisms that, when administered in adequate amounts, confer benefits to consumer health (FAO/WHO, 2001). However, there are many challenges in this food industry sector, especially regarding the viability of these microorganisms during processing and product storage [2], low survival rates in the human gastrointestinal tract (GIT), and low permanence in the intestine [3]. Aiming to overcome these limitations, different techniques have been evaluated including adequate selection of bacterial strains, adaptation to stress, incorporation of micronutrients such as peptides and amino acids, and microencapsulation [[4] [5]].

Microencapsulation consists of entrapping the probiotic cells within a secondary material, also called the “matrix” or “reservoir”, forming small capsules. These capsules can protect probiotic cells from adverse conditions and are able to maintain sufficient quantities so they can exert their expected beneficial effects. Currently, complex coacervation represents one of the most widely used microencapsulation methods [6] [7]. This process is based on the attractive interaction between two biopolymers with opposing electrical charges at a given pH, leading to a phase separation in the system and thus resulting in the formation of coacervate complexes. When this occurs, one of the phases of the system becomes considerably richer in the solvent, whereas the other phase is richer in both biopolymers used [7]. Among the biopolymers most used in the complex coacervation process, gelatin, gum arabic, alginate, albumin, casein, agar, pectins and chitosan are those more frequently found in literature reports [8][9][10]. In particular, gelatin/gum arabic constitute the first system used, and it is probably the most studied [11]. Gelatin (GE), a biodegradable protein material derived from the partial collagen hydrolysis, is still the primary commercial choice as a wall material due to its excellent water solubility, emulsifying and thickening capacity, and high crosslinking activity due to the presence of primary amino groups [12]. Gum arabic is a arabinogalactan polysaccharide-protein anionic complex composed of three distinct fractions with varying protein levels (2-4 %) and molecular weights [13]. This composition

results in an efficient surface activity, in addition to cold solubility, mainly due to the presence of residual charged groups and peptide fragments [14].

Microencapsulation by complex coacervation has been reported as more effective for hydrophobic compounds, such as turmeric oleoresin [15],  $\beta$ -carotene [16] [17] and lycopene [18] [17]. For hydrophilic components adjustments are required to the technique, for example the production of double emulsion systems (W/O/W) [19] [20] [21]. Such systems are also known as “emulsion of emulsions”, because two simple emulsion types exist simultaneously (O/W and W/O). Because of their physicochemical properties and structure, studies have been performed with the intent of reducing fat content, masking flavors, improving sensorial properties of products, or controlling the release and protection of substances and microorganisms, which includes the encapsulation of vitamins, minerals or probiotic bacteria to maintain their viability during production, storage and gastrointestinal digestion [22][23][24][25]. Despite the advantages of these two techniques described above, to the best of our knowledge there are no other studies available in literature which seek to combine the complex coacervation and double emulsification techniques to improve the viability of probiotic cells. Therefore, the present study sought to microencapsulate probiotic cells of *L. plantarum* in double emulsions, and then to submit the resulting systems to complex coacervation using gelatin and gum arabic as matrixes. The lyophilized microcapsules were then characterized in terms of moisture content, water activity, hygroscopicity, solubility, morphology and mean particle size. Moreover, the survival of probiotic cells was evaluated during *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions, as well as after 45 days of storage at 8 °C, 25 °C and -18 °C.

## 2. MATERIAL AND METHODS

### 2.1 Materials

The culture of *Lactobacillus plantarum* was bought from Digestive Care (Jasmine, Canada). Corn oil was purchased at a local supermarket (Brazil). The emulsifier polyglycerol poliricinoleate (PGPR) was kindly provided by Dhaymer's (Ind. and Com. of chemical products, São Paulo, Brazil). Other chemicals and enzymes used were: sucrose (Neon, São Paulo, Brazil), glucose (Êxodo Científica, São Paulo, Brazil), gelatin (B type), guar gum, NaOH and  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  (Synth, São Paulo Brazil), HCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), NaCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil),  $\text{CaCO}_3$  (Qeel, São Paulo, Brazil), Swine gastric mucosa pepsin (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), *Penicillium camemberti* lipase (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brazil), Porcine pancreas pancreatin (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), and bromocresol purple (Êxodo Científica, São Paulo, Brazil).

## **2.2 Experimental design**

In the first experimental part, the optimized conditions for complex coacervation were assessed. Initially, different proportions of the biopolymers (100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 and 0:100 of Gelatin : Gum arabic) and pH (3.5, 4.0, 4.5 or 5.0) of the mixtures were adjusted. The experiment was arranged in a completely randomized design (CRD) and the analyses were performed in duplicate with 3 repetitions.

The second part consisted of probiotic cell encapsulation in the double emulsion (W1/O/W2) followed by complex coacervation. The lyophilized microcapsules were characterized in terms of moisture content, water activity, hygroscopicity, solubility, morphology and mean particle size. Moreover, survival of the probiotic cells was evaluated during *in vitro* simulation of gastrointestinal conditions, as well as after 45 days of storage at 8 °C, 25 °C and -18 °C.

## **2.3. Optimization of conditions for complex coacervation**

### **2.3.1. Preparation of biopolymer dispersions**

Gelatin (1%) was hydrated in distilled water for 30 minutes followed by stirring at 50 °C/25 min [26]. The temperature was maintained below 60 °C to avoid hydrolysis of the gelatin chains [27]. For dispersion of gum arabic (1%), it was added to distilled water followed by stirring at 40 °C/30 min.

### **2.3.2. Complex coacervation between Gelatin and gum arabic**

The gelatin dispersion was slowly added to the gum arabic dispersion at 40 °C followed by magnetic stirring to obtain the following proportions by weight: 100:0, 80:20, 60:40, 50:50, 40:60, 20:80 and 0:100. This was followed by adjusting the pH value to 3.5, 4 or 4.5 at 40 °C to promote complex coacervation by means of HCl (1N) with constant magnetic stirring. The resulting system was then cooled to 10 °C in an ice bath, still under stirring. This cooled material was then stored at 7°C for 2h.

### 2.3.3. Zeta potential

The system obtained in section 2.3.2 was diluted to 0.001% and analyzed in a Malvern Zetasizer Nano ZS equipment (Malvern Instruments Ltd. Malvern, Worcestershire, UK) equipped with a He-Ne laser (633 nm) and using a 173 ° detection angle.

### 2.3.4. Absorbance

The system obtained in section 2.3.2 was stored at 7°C for 2h. The absorbance reading of the supernatant was acquired at 600 nm using a UV spectrophotometer (Model UV-2001, Hitachi). Results were used to plot absorbance curves as a function of the polymer concentration [37]. Lower absorbance values indicated lower biopolymer concentrations in suspension, i.e., a greater quantity of complex coacervates were formed and precipitated.

### 2.3.5 Yield

After the coacervation process the precipitated complex coacervates were recovered by centrifugation and dried at 105 ° C until constant weight [28]. The yield was calculated using Eq. (1) [29]

$$Y = \frac{m_i}{m_0} \times 100\% \quad (1)$$

where:

- Y: Yield of complex coacervates (%);
- $m_i$  Mass of complex coacervates dried.
- $m_0$ : Mass of biopolymers used.

## 2.4. Double emulsions

### 2.4.1. Bacterial strain, culture and harvest conditions

The lyophilized culture of *Lactobacillus plantarum* (Jamieson, Canada) was cultivated twice in MRS broth. It was initially incubated at 37 °C for 24 h, and again grown in MRS broth for 24 h. Afterwards, the system was centrifuged at 5 °C and 7000g for 15 minutes. The supernatant of the culture medium was discarded and the pellet of probiotic cells was resuspended twice in a sterile saline solution (0.85%, w/v), followed by centrifugation at 5 °C and 7000g for 15 minutes.

### 2.4.2. Preparation of dispersions

For preparing the aqueous dispersions used to form the inner phase of the double emulsions ( $W_1$ ), approximately 1 gram of the probiotic cell pellet was aseptically resuspended in 10 mL of sterile water enriched with 10 g.L<sup>-1</sup> sucrose, 4.6 g.L<sup>-1</sup> glucose and 6.7 g L<sup>-1</sup> gelatin [30] [31] in order to obtain at least 10<sup>10</sup> cells·mL<sup>-1</sup>. To confirm this concentration, the pour plate method was

used to count the probiotic microorganisms, with 1 mL of each dilution placed in a Petri dish with a small amount of Man-Rogosa-sharpe (Mrs Agar), and the Petri dishes were then incubated in anaerobic jars at 37 °C for 72 h [32]. For cell counts the petri dishes containing 25 to 250 colonies were selected. Results were expressed in number of CFU (colony forming units) per milliliter of water (CFU.mL<sup>-1</sup>). The oil dispersion (O) was prepared by dispersing the surfactant PGPR (3 %, w/w) in corn oil, followed by mixing at 65 °C for 25 min [33] using a magnetic stirrer (model 752A/6, Fisatom, St. Paulo, Brazil). The aqueous dispersions used to form the outer aqueous phase (W<sub>2</sub>) were composed of gelatin (6 % w/v). This concentration was determined by preliminary tests, in which the kinetic stability of the emulsions and size of oil droplets were evaluated. Gelatin was hydrated for 30 min, followed by magnetic stirring at 50 °C for 25 min [26].

#### **2.4.3. Preparation of double emulsions (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>)**

Double emulsions were prepared via a two-step procedure: in the first step a primary emulsion (W<sub>1</sub>/O) was prepared, and in the second step this primary emulsion was incorporated within a second aqueous dispersion (W<sub>2</sub>) [34]. The primary emulsion (W<sub>1</sub>/O) was prepared by adding 6.5 g of the inner aqueous dispersion (W<sub>1</sub>) to 8.5 g of the oil/PGPR dispersion (O) under vigorous stirring (6000 rpm for 60 seconds) using an Ultra-Turrax homogenizer (model T18 Basic, IKA Works Inc., Wilmington, NC, USA). Then, to prepare the double emulsion 13 g of the primary emulsion (W<sub>1</sub>/O) were slowly added to 100 g of the outer aqueous dispersion (W<sub>2</sub>), while mixing at 5500 rpm for 90 seconds using the same Ultra-Turrax equipment.

The viability of probiotic cells depends on both the size of the internal water droplets and the oil droplets [32]. As a result, the gelatin ratio, velocity and spinning time during homogenization were determined by pre-tests in order to obtain inner aqueous droplets with a mean particle size exceeding ~ 1.58 µm in the primary emulsion, and W<sub>1</sub>/O droplets larger than ~ 11 µm in the double emulsions. The stipulated values are based on those of García-Almend; Pimentel-Gonz; Lude (2014), who considered these adequate to accommodate bacteria with size of ~ 1 µm.

#### **2.4.4 Microstructure of the double emulsions (W<sub>1</sub>/O/W<sub>2</sub>)**

Light microscopy (Olympus BX-60) with 40× magnification was used to visualize the microstructure of the double emulsions. The 10-fold diluted samples were placed on microscope slides, carefully covered with a glass coverslip, visualized and photographed (Canon, Poxer Shot A620).

#### **2.4.5 Counting of *L. plantarum* in double emulsions (W1/O/W2)**

The double emulsions containing *L. plantarum* cells (25 g) were homogenized in a saline solution (0.85% NaCl) to obtain the dilution  $10^{-1}$ , followed by serial dilutions. The pour plate method was used to enumerate the probiotic microorganisms, with 1 mL of each dilution placed on a Petri dish with a small amount of Man-Rogosa-sharpe (Mrs Agar). The Petri dishes were incubated in anaerobic jars at 37 °C for 72 h [32], and for cell counts the petri dishes containing 25 to 250 colonies were selected. The results were expressed in number of CFU (colony forming units) per milliliter of emulsion (CFU.mL<sup>-1</sup>).

### **2.5. Production of microcapsules by complex coacervation**

#### **2.5.1. Complex coacervation between gelatin-arabic gum**

The complex coacervation process was performed according to Shaddel et. al. [35], with slightly modifications. In summary, 100 mL of the double emulsions (W1/O/W2) were slowly added to 100 mL of the gum arabic solution (6%, 40 °C), using a 1:1 ratio of biopolymers (gelatin: gum arabic). Next, 200 mL of sterilized water were carefully added to this mixture, and the pH was adjusted to 4.0 (HCl 0.1 N) under stirring at 40°C. The resulting system was cooled to 10 °C in an ice bath, still under stirring. The resulting cold material was stored at 7°C for 2h so the microcapsules settled, facilitating removal of the aqueous phase. Thereafter, the remaining solid material containing the microcapsules was dehydrated by freeze-drying.

### **2.6. Physicochemical characterization of the lyophilized microcapsules containing *L. plantarum* cells**

#### **2.6.1. Water activity (A<sub>w</sub>)**

Water activity was measured using a water activity meter (Aqualab, Decagon. Model 3TE, Pullman, Washington, USA) at 25 °C.

#### **2.6.2. Moisture content**

Moisture content of the microcapsules was determined gravimetrically with heat as described in the Analytical Standards of the Adolfo Lutz Institute (2004). For this analysis, 2 g of the microcapsules were weighted (Bel, São Paulo, Brazil) and then uniformly spread in pre-dried metal capsules and dried ( $105 \pm 2$  °C) (Quimis, Q819V2, São Paulo, Brazil) until reaching constant mass.

### 2.6.3. Hygroscopicity

Hygroscopicity of the samples was measured according to the method described by Cai; Corke (2000). About 1.0 g of freeze-dried microcapsules 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 (%).

### 2.6.4. Dispersibility

To measure solubility of the samples, 0.5 g of microcapsules were weighed into a conical flask containing 50 mL of distilled water. Homogenization of the resulting mixture was conducted by magnetic stirring (Fisatom, 752A, São Paulo, Brazil) at 100 rpm for 30 min (25 °C). After centrifugation at 3500 rpm for 5 min, a 25 mL aliquot of the supernatant was transferred into a dried and pre-weighed aluminum dish which was maintained at 105 °C to remove moisture. Dispersibility of the microcapsules was determined by considering the mass of the empty dish and the dish containing the dried sample [36].

$$D = \frac{m_i}{m_0} \times 200\%$$

where:

D: Dispersibility (%);

$m_i$  Mass of dry microcapsules.

$m_0$ : Mass of microcapsules used.

### 2.6.5. Morphology and mean particle size of the microcapsules

Morphology of the microcapsules was assessed by Scanning Electron Microscopy (SEM) (Leo, 1430VP) according to Silveira (1989). The microcapsules were metalized using the Sputter Coater equipment (model FDU 010, Bal-Tec, Balzers, Liechtenstein). Subsequently, the material was observed under a Scanning Electron Microscope LEO 1430 VP, with increases between 500 and 2000  $\mu\text{m}$ . The average particle size of approximately 100 microcapsules was determined using the ImageJ 1.50i software [37].

## 2.7. Evaluation of microencapsulated probiotic cells

### 2.7.1. Counting of *L. plantarum*

The freeze-dried microcapsules were homogenized in saline solution (0.85%) to obtain the dilution  $10^{-1}$  followed by serial dilutions. This suspension was then maintained at 25°C for 30 minutes under magnetic stirring for liberation of probiotic cells [38]. The cell count was determined

according to the procedure in section 2.2.5. Results were expressed in number of CFU (colony forming units) per gram of microcapsules (CFU.g<sup>-1</sup>).

### 2.7.2. Efficiency of *L. plantarum* encapsulation

The encapsulation efficiency (EE) was defined as the number of viable cell in the microcapsules compared to the initial number in the double emulsion, as presented in Eq. (4) according to Martin et al. (2013)

$$EE (\%) = \frac{N}{N_0} \times 100\% \quad (4)$$

Where:

N: Number of viable cells (log CFU.g<sup>-1</sup>) in the microcapsules

N<sub>0</sub>: Number of viable cells (log UFC.mL<sup>-1</sup>) in the double emulsion.

### 2.7.3. Evaluation of *L. plantarum* survival when submitted to *in vitro* gastrointestinal conditions

This analysis was carried out using an *in vitro* model, based on the simulation of gastric and enteric juices and enzymes of the gastrointestinal tract (gastric phase, enteric phase I, and enteric phase II), according to the methodology proposed by Bedani et. al. [40] and Campos et. al. [41]. Free and encapsulated probiotic cells were exposed to these conditions to assess their survival rates:

- Gastric phase: aliquots of 10 mL from the 10<sup>-1</sup> dilution of microcapsules were transferred to 3 sterile 100 mL schott flasks and the pH was adjusted to 2.3-2.6 by dropping a 1 N HCl solution. Then, Swine stomach mucosa pepsin and *Penicillium camemberti* lipase were added until reaching the concentrations of 3 g L<sup>-1</sup> and 0.9 mg L<sup>-1</sup>, respectively. The flasks were incubated at 37 °C for 2 hours under shaking at 150 rpm in a SOLAB shaker incubator (SL 222).
- Enteric I phase: the pH of the systems from the gastric phase was increased to 5.4-5.7 by dropping an alkaline solution (pH 12, NaOH 1N and NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), also containing bovine bile and porcine pancreas pancreatin at the concentrations of 10 g·L<sup>-1</sup> and 1 g·L<sup>-1</sup>, respectively. The vials were reincubated at 37 °C for 2 hours under stirring.
- Enteric II phase: the pH of the systems from the enteric I phase was raised to 6.8-7.2 by dropping the same alkaline solution. Bovine bile and pancreatin were then added at concentrations of 10 g L<sup>-1</sup> and 1 g L<sup>-1</sup>, respectively. The systems were again incubated at 37 °C for 2 hours under stirring, totaling 6 hours of assay.

Enumeration of surviving cells at the gastrointestinal conditions was performed after the completion of each phase (i.e., after 2, 4 and 6 h). Aliquots of 1 mL were withdrawn and serially diluted in saline solution. The count of probiotic bacteria was performed as described in item 2.2.5.

#### **2.7.4 Viability of microencapsulated probiotic cultures stored at 25°C, 8°C or -18°C**

The freeze-dried microcapsules were stored at room temperature (25 °C), under refrigeration (7 °C) and freezing (-18 °C), for 45 days. The viable cell count was assessed according to item 2.2.5, and the results were expressed in log CFU.mL<sup>-1</sup>.

#### **2.8. Statistical analyses**

For data analysis and interpretation an ANOVA was applied, and when there was significant difference the averages were compared by the Tukey test at 5% probability. The program used for this purpose was Statistical Analysis Systems (SAS) (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, USA) version 9.2, licensed by the Federal University of Viçosa.

### **3. RESULTS**

#### **3.1. Optimized conditions for complex coacervation**

Figure 1A shows the zeta potential values of the coacervates obtained using different proportions of biopolymers (Gelatine: Gum arabica) at different pH values. When pH 5.0 was utilized it was observed that the biopolymers had a negative electric charge and no coacervation. As a result, absorbance and yield values were not related for this condition. The negative zeta potential values could provide repulsive interaction between particles and prohibit aggregation, indicating good physical stability of the system [35]. The wall materials used in this work contain carboxylic ( $\text{COOH} \rightleftharpoons \text{COO}^- + \text{H}^+$ ) and amine groups ( $\text{NH}_3^+ \rightleftharpoons \text{NH}_2 + \text{H}^+$ ) as ionizable groups. High negative zeta potential values are due to the presence of GA carboxylic groups at pH 4.0 because GA possesses a negative charge from pH 11.8–2.0 and a pKa near pH 2.0, while GE Type A has a pI at pH around 7.0–9.0, and therefore is positively charged below its pI (pH = 4.0) [42].

It was verified that at pH 3.5, 4.0 and 4.5, values near neutrality were found for the concentrations 60:40 (4.0 mV pH = 3.5 and -4.9 mV pH = 4.0), 50:50 (2.2 mV pH = 3.5 and -6.9 mV pH = 4.0) and 80:20 (3.7 mV pH = 4.0 and -2.8 mV pH = 4.5). Thus, the biopolymers were more complexed with each other, and consequently the coacervate complexes were formed. The decrease in negative values of the zeta potential is due to the charge compensation which occurs

between biopolymers [17][44]. According to Jain et. al. [18], the charge densities might be stoichiometrically balanced and this may be the Electrical Equivalence Point (EEP) of the biopolymer arrangement. According to Eghbal et al [43], the main force involved in the coacervation process is electrostatic interaction, however some short-range interactions may be secondarily involved, such as hydrophobic interaction, hydrogen bonding and van der Waals forces [46].

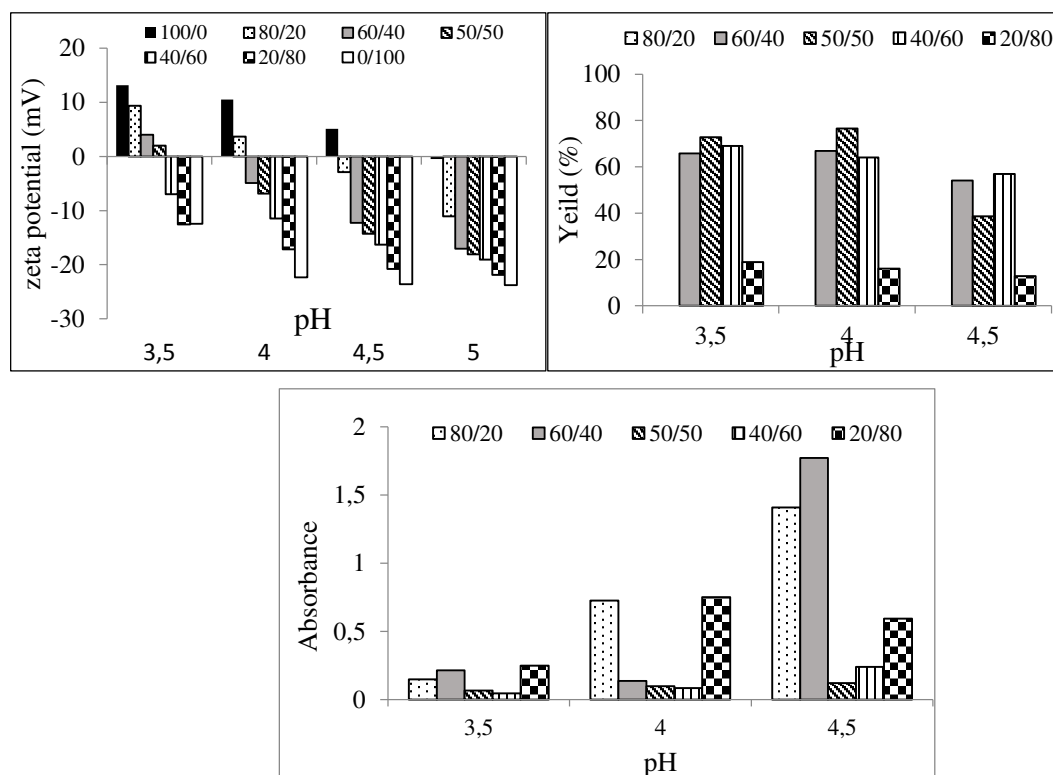


Figure 1 - Conditions optimization to complex coacervation A) Zeta Potential values (mV) B) Yield complex coacervate and C) Absorbance after complex coacervation

It was verified that the highest yields and lowest absorbance values were obtained when the 50:50 biopolymer concentration (Gelatin: Gum Arabic) at pH values of 3.5 and 4.0 was used (Figure 1B and 1C). Therefore, the samples presented light opalescence due to the formation of insoluble complexes (Mekhloufi et al., 2005). At pH 4.5 the biopolymer ratios of 60:40 and 80:20 showed a white color due to the formation of soluble complexes, presenting high turbidity. The results obtained are similar to those reported by Shaddel [22], who determined the wall material ratio of 1:1 (gelatin: gum arabic) as the most suitable for microencapsulation of anthocyanins at pH 4.0.

Thus, at the optimized conditions, specifically where the zeta potential value was close to zero, lower absorbance and higher yields were obtained using the 50:50 biopolymer concentration at pH 3.5 and pH 4.0. Afterwards, preliminary tests were performed using the coacervation process associated with double emulsification (data not shown), and the pH value of 4.0 was established for continuation of the experiment.

### 3.2 Microstructure of the double emulsions (W1/O/W2), primary emulsion (W1/O) and viability of *L. plantarum* in double emulsions

From the photomicrographs (Figure 2B) one can note that the internal water droplets ( $W_1$ ) were densely grouped and distributed inside the oil droplets (O). The latter were dispersed in the external aqueous phase ( $W_2$ ), thus presenting the characteristic structure of double emulsions. Regarding viability of *Lactobacillus plantarum* cells, the value of  $7.93 \pm 0.2 \log \text{CFU.mL}^{-1}$  was obtained. From the images obtained by optical microscopy, cells of *L. plantarum* were detected inside the water droplets of the primary emulsion (W1/O) (Figure 2A) and then incorporated and dispersed in the oil droplets of the double emulsions (W1/O/W2) (Figure 2B).

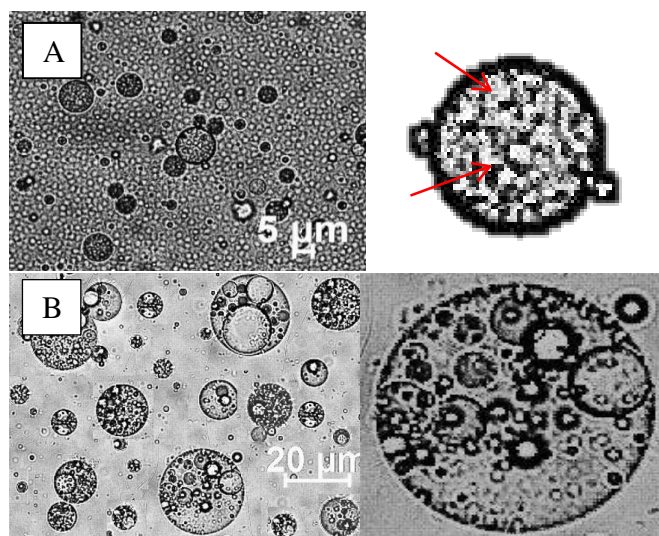


Figure 2. Light microscopy images of the primary emulsion (W1/O) (A) and double emulsions (W1/O/W2) (B). Scale bars represent 20 µm and 5 µm in 40 × magnifications. Red arrows indicate the cells of *L. plantarum* were detected inside the water droplets.

### 3.3 Morphological characterization of microcapsules containing *L. plantarum* cells

The microcapsules (Figure 3A and 3B) were irregular, multinucleated and presented different sizes. The nucleus was encapsulated by the wall material, hence providing greater

protection to the probiotic cells. Similar morphological characteristics were also observed by Calderón-Oliver et. al [44] when applying complex coacervation to microencapsulate a mixture of nisin (an antimicrobial macropeptide) and an antioxidant extract of avocado peel, using the two matrix-wall systems (collagen/alginate and collagen/pectin). Dulcel et. al. [45] obtained small spherical microcapsules with average size of about 10  $\mu\text{m}$  at pH 3.5 using the biopolymers pea globulins/gum arabic and alpha gliadins/gum arabic at a concentration of 1  $\text{g L}^{-1}$ . However, at the same pH but for a polymer concentration of 10  $\text{g L}^{-1}$  these authors found that the size of the coacervates was greater than 50  $\mu\text{m}$ , and some particles agglomerated and coalesced, resulting in various shapes. Results from the present study, along with these examples from literature, indicate that the morphology of coacervates is strongly dependent on pH as well as the type and concentration of biopolymers chosen to be used as wall materials.

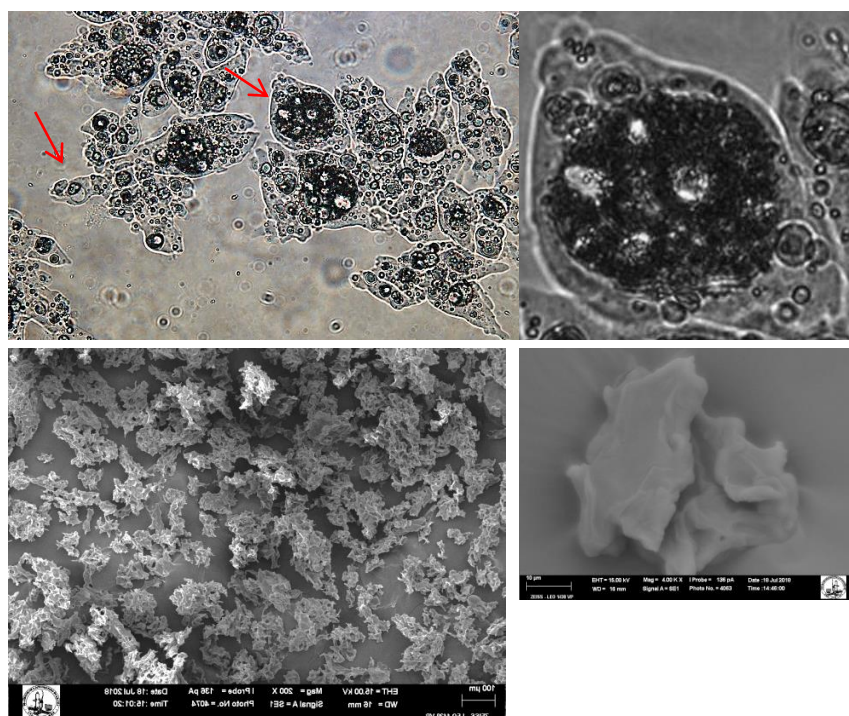


Figure. 3- Photomicrographs obtained by light microscopy of the moist microcapsules (A) and by scanning electron microscopy of the lyophilized microcapsules (B). Red arrows indicate the microcapsules irregular, multinucleated and presented different sizes.

From the images obtained by scanning electron microscopy, one can note that the microcapsules were connected to each other by solid bonds, presumably caused by the freezing process followed by freeze-drying [46]. However, this may facilitate the penetration of water

during dissolution/dispersion, due to the presence of capillaries inside the agglomerates [47]. Furthermore, there were no bacterial cells on the surface of the lyophilized microcapsules, indicating that *L. plantarum* cells were rather immobilized in the nucleus of the supramolecular biopolymer structures, which formed reservoir-like microcapsules. Eratte et. al. [48] also obtained similar results when encapsulating omega-3 and probiotic bacteria in a single microcapsule via complex coacervation, using whey protein and gum arabic at pH 3.5. Reservoir capsules are believed to provide greater protection to probiotic cells compared to matrix capsules. In the former, probiotics are immobilized in the core region and protected by a biopolymer wall, while in the matrix-type capsules cells are spread throughout the particle bulk, thus being more susceptible to environmental stresses [49].

### **3.4 Physicochemical characterization of the lyophilized microcapsules containing *L. plantarum* cells**

The microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) presented dispersibility of  $0.183 \pm 0.17 \text{ g.mL}^{-1}$  in distilled water. Low dispersibility values are characteristic of microcapsules produced by complex coacervation, because at a given pH molecules with opposite charges interact electrostatically which results in phase splitting, separating them from the aqueous phase [50][7]. On the other hand, this characteristic may be desirable considering that it provides excellent controlled release of the encapsulated material, triggered by mechanical stress, temperature changes or pH variations [51][46][35]. Similar results were obtained by Rocha-Selmi et al [46] to microencapsulate sucralose by double emulsion followed by complex coacervation when using a 5.0% solution of gelatin and gum arabic and 100% of core material. In this study, the authors found a dispersibility of approximately  $0.1995 \text{ g.mL}^{-1}$  for the microcapsules.

The moisture content of the microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) was  $4.5 \pm 0.04 \%$ , which is within the range of 3% to 5% often reported as optimal for both microbial and chemical stability [51] [46]. According to Silva et. al. [18], low moisture content is important to ensure the prevention of agglomeration, as it reduces the retention of encapsulated material and hinders the dispersion of microcapsules during applications in food products [52]. Furthermore, low moisture content limits molecular mobility, reducing the diffusion rate of external compounds which may reach the structure core and affect the encapsulated material [20] [53].

Water activity of the microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) was  $0.34 \pm 0.03$ . Similar results were obtained by other authors who applied complex coacervation to encapsulate technologically relevant compounds. For instance, Rocha-Selmi et. al [46]

microencapsulated sucralose using gelatin/gum arabic in pH 4.0; Comunian et. al. [54] microencapsulated ascorbic acid using gelatin/gum arabic in pH 4.4 at 40 °C; Rascón et. al. [55], after impregnating probiotic cells of *Lactobacillus rhamnosus* within banana slices and submitting them to lyophilization, verified that microorganism viability was maintained during storage for 20-28 days, for water activities between 0.115 and 0.327. According to Silva et. al [49],  $A_w \sim 0.3$  is considered satisfactory for lyophilized biopolymer microcapsules, since conditions with  $A_w < 0.2$  may favor lipid oxidation and consequently reduce the number of viable cells. On the other hand, when  $A_w > 0.4$  the absorption of water is favored, which may accelerate deterioration of the system by other microorganisms.

The hygroscopicity of microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) was  $9.20 \pm 0.43$ g of water absorbed per 100 g of sample. Rocha-Selmi et al. [51] obtained hygroscopicity values between 5.16 and 16.11 g of water absorbed per 100 g for gelatin/gum arabic microcapsules obtained by complex coacervation at pH 4.0 containing aspartame. Silva et al. [18] found, for lycopene microcapsules obtained by coacervation of gelatin and pectin at pH 8.0 and 40°C, hygroscopicity values ranging between  $33.4 \pm 0.8$  g and  $36.8 \pm 1.4$  g of water absorbed per 100 g. Nori et al. [56] also reported hygroscopicity between  $33.46 \pm 0.66$  and  $34.10$  g of absorbed water per 100 g for propolis microcapsules obtained by complex coacervation of soy protein isolate and pectin at pH 8.0. A comparison of these results indicated that the gelatin/gum arabic pair led to less hygroscopic materials compared to the other biopolymer pairs analyzed.

Finally, the average size of the microcapsules containing probiotic cells (*L. plantarum*) ranged from  $66.07 \pm 3.24$   $\mu\text{m}$  to  $105.66 \pm 3.24$   $\mu\text{m}$ . These values are quite larger than those reported in similar studies. For example, Mendanha et al. (2009) obtained values between 16 and 24  $\mu\text{m}$  for casein hydrolyzate microcapsules produced by double emulsification followed by complex coacervation when using pectin and soy protein isolates as wall materials at pH 4.4. Alvim and Grosso (2010) reported sizes between 43.7 and 96.4  $\mu\text{m}$  for paprika oleoresin microcapsules produced by complex coacervation of gelatin and gum arabic as encapsulating agents at pH 4.0. In fact, many factors have been indicated in literature as impacting the size of particles produced by complex coacervation, such as agitation, time, cooling rate, drying process, nature, concentration and proportion of the biopolymers [54] [57]. There is no “ideal particle size”, but instead the desirable average size depends on the specific application intended, and in foods it may range from a few micrometers (less than 500  $\mu\text{m}$ ) to a few millimeters (up to 3 mm) [49]. However, it should be noted that larger particles may have limited applications in food products because they often

have undesirable effects on the texture properties, which is an important challenge in food product development [20]. Nevertheless, millimeter-scale particles may find application in fluid or semisolid foods such as yogurt and ice cream [58].

### **3.5 Evaluation of the viability of microencapsulated *L. plantarum* cells**

The viability of *L. plantarum* cells microencapsulated by the dual process combining double emulsification followed by complex coacervation using gelatin and gum arabic (pH =4.0) was  $8.6 \pm 1.2 \log \text{CFU.g}^{-1}$ , representing an encapsulation efficiency of 97.8%. This notably elevated efficiency may be related to inclusion of the double emulsification step prior to coacervation itself. In this case, the cells were initially retained within the water droplets and dispersed in the oil droplets, which were then coated with the gelatin-gum arabic mixture, providing an additional protective barrier to bacteria from external stresses (agitation, rapid heating/cooling cycle, and lyophilization). Furthermore, the presence of cells inside the inner aqueous droplets may have contributed to limit their migration to outside the capsule: they first have to cross the water/oil interface, then diffuse in the oil phase, migrate through the coating wall (gelatin-gum arabic) and finally reach the outside.

No other studies were found which addressed the incorporation of a double emulsification step prior to complex coacervation, specifically applied to the encapsulation of probiotic cells. Therefore, comparison of the results obtained was done only with studies that used encapsulation by complex coacervation. Silva et. al. [59] obtained an encapsulation efficiency of 86% in their study that addressed the microencapsulation of *Bifidobacterium lactis* by complex coacervation, using gelatin and gum arabic at pH 4.0. Eratte et. al. [48] microencapsulated omega-3 and probiotic bacteria in a single microcapsule by complex coacervation using whey protein (WPI) and gum arabic at pH 3.75. In this case, the authors reported a microorganism survival rate of 84.95%. More generally, coacervation is a highly promising encapsulation technology because it often leads to high encapsulation efficiency and permits controlled release of the nucleus material (probiotic cells or specific bioactive compounds), which may be triggered by mechanical stress, temperature changes or pH variations. Also important is the fact that this technology uses mild operation conditions and does not require toxic organic solvents, thus making it both eco-friendly and suitable for food applications [60] [61].

### 3.6 Evaluation of microencapsulated *L. plantarum* cells survival under gastrointestinal conditions

The *in vitro* assay was performed by simulating three phases (gastric, enteric I and enteric II), and the results, in terms of survival of encapsulated and unencapsulated *L. plantarum*, are represented in Figure 4. Free and encapsulated probiotic cells were exposed to these conditions to assess their survival rates [62]. A significant reduction ( $p < 0.05$ ) in the cellular viability of both treatments was observed after the gastric phase. For the encapsulated cells the viability reached 80.4% (reduction of 1.6 log CFU.g<sup>-1</sup>), whereas only 25.0% viability was observed for free cells (reduction of 5.86 log CFU.g<sup>-1</sup>).

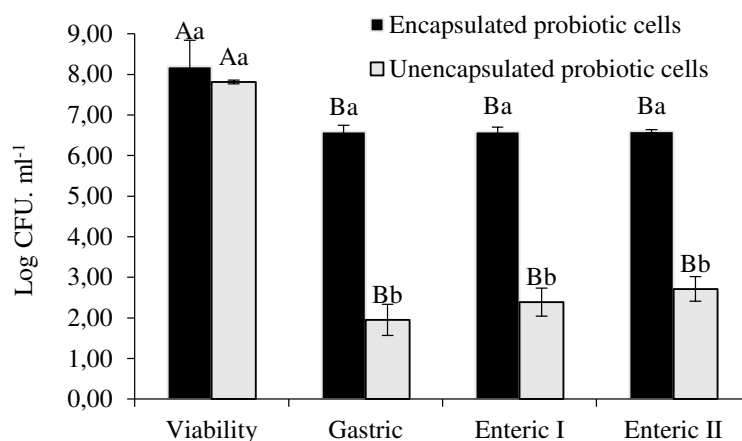


Figure 4. Survival of encapsulated and unencapsulated *L. plantarum* in the *in vitro* GIT assay. Bars indicate viability of the strain before being exposed to gastric stress, followed by the gastric, enteric I and enteric II phases of the GIT. Upper-case letters reflect comparisons between the phases of the *in vitro* assay for the same treatment. Lower-case letters refer to comparisons between each treatment for the same phase of the *in vitro* assay. Means followed by the same letter do not differ according to the Tukey test at 5% probability.

Similar results were reported by other authors who found marked losses in viability of free cells during gastrointestinal simulations, as a consequence of the low pH of the medium [63] [59] [64]. For instance, Bosnea et al. [65] observed reductions of 2.5 and 5 log CFU.g<sup>-1</sup> for *L. paracasei* and *L. plantarum*, respectively, in microcapsules produced from whey protein isolate and gum arabic by complex coacervation. Silva et al. [59] found a reduction of 1.92 log CFU.g<sup>-1</sup> of viable *Bifidobacterium* Bb-12 cells microencapsulated by complex coacervation using gelatin and gum

arabic followed by lyophilization. Our results, along with these literature examples, indicated that microencapsulation can improve cell survival under the severe acidic conditions of simulated gastric juice. Probiotic cells are typically very sensitive to the highly acidic conditions of the human stomach [66]. According to Bosnea et. al. [65], many bacteria have proton pumps in their plasma membrane as a defense mechanism to maintain the cytoplasm close to their physiological pH. However, if these regulatory systems are unable to function correctly, intracellular acidification will occur and cause a loss of viability, as observed in free cells. In the case of encapsulated cells, excess protons may not substantially affect the cell cytoplasm pH because they interact with the acidic and alkaline groups of biopolymers surrounding the encapsulated cells, participating in protonation equilibrium. In low pH media, the side chain amino groups of the proteins are protonated and the percentage of carboxylic groups dissociated from the polysaccharides is diminished. Therefore, electrostatic interactions between these biopolymers are strengthened so the cells are less likely to be severely affected by the ambient pH. In addition, the microcapsule wall material provides a physical barrier against gastric fluids, increasing protection of the cells against adverse conditions [62]. For this reason it should be emphasized that microparticles should not be dispersible in aqueous media in order to maintain their structural integrity in the food matrix and especially in the upper gastrointestinal tract (gastric phase) [66]. According to results previously presented (section 3.3) the coacervate microcapsules presented  $0.183 \text{ g.mL}^{-1}$  solubility, and therefore the probiotic cells associated with this fraction may have had some exposure to the gastric fluids, which explains the observed reduction in their viability.

In the enteric I and II phases, which simulate the small and large intestine, respectively, the viability of the probiotic culture did not differ ( $p > 0.05$ ) from the viability of the gastric phase after incubation periods of 4 and 6 hours, respectively. Microcapsules formed due to attractive interactions between gelatine and gum arabic can be disrupted. At these pH conditions ( $\text{pH} > 5$ ), both biopolymers have predominantly negative electric charges, favoring repulsion between them and consequent rupture of the microcapsule structure and release of the probiotic content. As indicated by Cook et. al. [67], microencapsulation should confer a degree of targeted release by depositing the probiotic cells in the small and large intestines, so that they can colonize the intestinal tract and provide health benefits to the host. According to Madureira et al. [68], at least  $10^6$  to  $10^7 \text{ CFU.g}^{-1}$  or  $\text{mL}^{-1}$  of viable probiotic cells should reach the intestinal colon for the food to have a therapeutic effect. At the end of both the enteric I and II phases of the present study, a mean count of  $\sim 6.4 \text{ log CFU.g}^{-1}$  was obtained, in accordance with the requirements for probiotics

to exert their beneficial effects. Therefore, ingestion of 1 g of the microcapsules containing the microencapsulated *L. plantarum* is expected to provide consumers with at least 6.4 log CFU per day. In contrast, for the free cells a count of  $\sim 2.8 \text{ log CFU.g}^{-1}$  was observed, reinforcing that microcapsules have been effective in protecting probiotic cells. In addition to the formation of protein-polysaccharide coacervates (microcapsules themselves), the presence of an internal lipid fraction (corn oil) may also have contributed to this increase in cell viability in relation to free cells, as previously discussed. Silva et. al [49] used the coextrusion process and immobilized *Lactobacillus acidophilus* LA3 cells in sunflower oil which was subsequently covered with alginate or a mixture of alginate-shellac, providing an additional barrier to protect probiotics from environmental conditions. Lahtinen et. al. [69] reported that diffusion of acid ( $\text{H}^+$  ions) and oxygen into lipid-containing capsules is restricted and therefore may provide additional protection to the probiotic. In corroboration with this data from literature, images obtained by SEM (Figure 3B) showed that aggregation of the oil droplets and their coating with the coacervates (gelatin-gum arabic) formed reservoir-type microcapsules, since the cells were retained in the aqueous droplets dispersed in the oil. Thus, lower exposure of *L. plantarum* cells to the high stress environment caused by the simulated gastrointestinal conditions may have occurred, explaining the improved cell viability.

### **3.7 Viability of microencapsulated probiotic cultures stored at 25°C, 8°C and -18°C**

As presented in Figure 5, there was no significant reduction in microencapsulated cell viability after 45 days of storage at 8°C and -18°C, with a cell count of 7.6 log CFU.g<sup>-1</sup>. This may be attributed to the formation of capsules that effectively protected cells under environmental stress, such as oxygen and moisture, and also limited the internal heat diffusion. At room temperature (25 °C) there was a 2.52 log CFU.g<sup>-1</sup> reduction in the viability of *L. plantarum* after 45 days of storage.

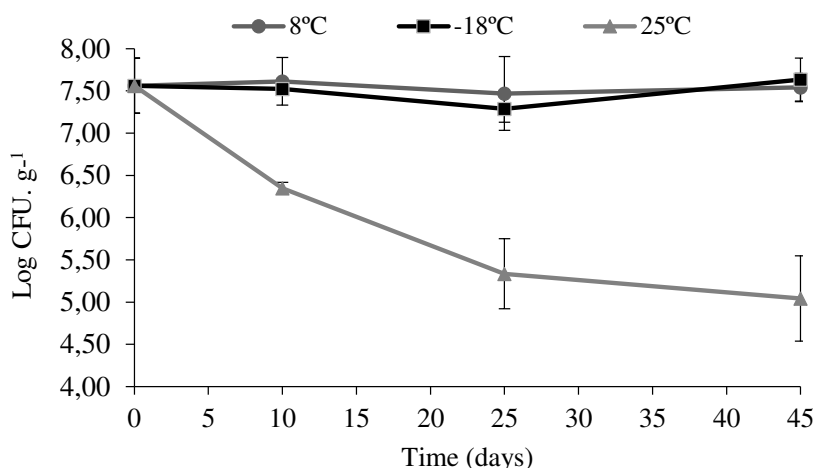


Figure 5 - Viability of microencapsulated probiotic cells and storage at 25°C, 8°C and -18°C

Oliveira et al. (2007) produced probiotic microparticles by complex coacervation, with casein and pectin as encapsulants, followed by jet-spouted bed drying. After 60 days of storage at 37 °C, *Bifidobacterium lactis* and *L. acidophilus* viabilities were reduced by 2.7 and 4.7 log CFU.g<sup>-1</sup>, respectively, while probiotics in microcapsules stored at 7 °C showed greater viability. These results reinforce the fact that the storage temperature also plays a role in probiotic viability, even if the particles have been previously dried. Alves et al. (2015) encapsulated *Lactobacillus plantarum* by extrusion, using alginate and corn starch as wall materials, and found that storage at room temperature led to a significant reduction of more than 2 log after 30 days. Their results were attributed to the metabolic activity of the microorganisms at 25 °C, with the production of various metabolites and bacteriocin compounds and/or absence of substrates that can lead to the inactivation of probiotic bacteria [70][71].

#### 4. CONCLUSIONS

By using the double emulsification process associated with complex coacervation, microcapsules were developed with characteristics suitable for application in foods, as they presented high efficiency for the encapsulation of *Lactobacillus plantarum* and high cell viability after *in vitro* simulation of the gastrointestinal conditions compared to free cells. The inclusion of probiotic cells within the water droplets of the double emulsion (W/O/W) may have limited the migration of cells to the exterior of the encapsulating matrix. Consequently, it increased the encapsulation efficiency, favored the incorporation of cells within the encapsulating matrix, and reduced the exposure of *L. plantarum* cells to adverse conditions of the external media. The formed microcapsules maintained the viability of *L. plantarum* cells during storage for 45 days at 8°C and

-18°C. All results indicated that the dual process (double emulsification and followed by complex coacervation) proposed in this work to microcapsulate *L. plantarum* cells is a useful, promising approach for encapsulation of this microorganism, thus representing a novel alternative to be applied in development of biofunctional foods.

## 5. ACKNOWLEDGEMENTS

We thank the Brazilian National Council for Scientific and Technological Development (CNPq) for their financial support of this study.

## 6. REFERENCES

- [1] A. Oliveira, A.L. Amaro, M. Pintado, Impact of food matrix components on nutritional and functional properties of fruit-based products, *Curr. Opin. Food Sci.* 22 (2018) 153–159. doi:10.1016/j.cofs.2018.04.002.
- [2] M.K. Tripathi, S.K. Giri, Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage, *J. Funct. Foods.* 9 (2014) 225–241. doi:10.1016/j.jff.2014.04.030.
- [3] H. Gandomi, S. Abbaszadeh, A. Misaghi, S. Bokaie, N. Noori, Effect of chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions, *LWT - Food Sci. Technol.* 69 (2016) 365–371. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.064.
- [4] L. Queiroz, Z.I. Eduardo, J.I.L. Lucy, M. Fries, N.N.T. I, Microencapsulamento de probióticos: avanços e perspectivas, *Ciência Rural.* (2013) 1–8. doi:10.1590/S0103-84782013005000084.
- [5] P.E. Ramos, L. Abrunhosa, A. Pinheiro, M.A. Cerqueira, C. Motta, I. Castanheira, M. V. Chandra-Hioe, J. Arcot, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation, *Food Res. Int.* 90 (2016) 25–32. doi:10.1016/j.foodres.2016.10.036.
- [6] Y.P. Timilsena, T.O. Akanbi, N. Khalid, B. Adhikari, C.J. Barrow, Complex coacervation: Principles, mechanisms and applications in microencapsulation, *Int. J. Biol. Macromol.* 121 (2019) 1276–1286. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.10.144.
- [7] N. Eghbal, M.S. Yarmand, M. Mousavi, P. Degraeve, N. Oulahal, A. Gharsallaoui, Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate, *Carbohydr. Polym.* 151 (2016) 947–956. doi:10.1016/j.carbpol.2016.06.052.
- [8] A.K. Anal, H. Singh, Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery, *Trends Food Sci. Technol.* 18 (2007) 240–251. doi:10.1016/j.tifs.2007.01.004.
- [9] C.S. Favaro-trindade, S.C. De Pinho, G.A. Rocha, Revisão: Microencapsulamento de ingredientes alimentícios, *Brazilian J. Food Technol.* 11 (2008) 103–112. doi:10.18406/2316-1817v1n32009223.
- [10] J.K. Rutz, C.D. Borges, R.C. Zambiasi, M.M. Crizel-Cardozo, L.S. Kuck, C.P.Z. Noreña, Microencapsulation of palm oil by complex coacervation for application in food systems, *Food Chem.* 220 (2017) 59–66. doi:10.1016/j.foodchem.2016.09.194.
- [11] Z. Xiao, W. Liu, G. Zhu, R. Zhou, Y. Niu, A review of the preparation and application of flavour and essential oils microcapsules based on complex coacervation technology, *J. Sci.*

- Food Agric. 94 (2014) 1482–1494. doi:10.1002/jsfa.6491.
- [12] B. Shu, W. Yu, Y. Zhao, X. Liu, Study on microencapsulation of lycopene by spray-drying, *J. Food Eng.* 76 (2006) 664–669. doi:10.1016/j.jfoodeng.2005.05.062.
- [13] R.C. Randall, G.O. Phillips, P.A. Williams, Fractionation and characterization of gum from *Acacia senegal*, *Food Hydrocoll.* 3 (1989) 65–75. doi:10.1016/S0268-005X(89)80034-7.
- [14] G.O. Phillips, S. Takigami, M. Takigami, Hydration characteristics of the gum exudate from *Acacia senegal*, *Food Hydrocoll.* 10 (1996) 11–19. doi:10.1016/S0268-005X(96)80048-8.
- [15] L.A.C. ZUANON, C.R. MALACRIDA, V.R.N. TELIX, Production of turmeric oleoresin microcapsules by complex coacervation with gelatin – gum arabic, *J. Food Process Eng.* 36 (2013) 364–373. doi:10.1111/jfpe.12003.
- [16] J.K. Rutz, C.D. Borges, R.C. Zambiasi, G. Cleonice, M. Médelin, Elaboration of microparticles of carotenoids from natural and synthetic sources for applications in food, *Food Chem.* 202 (2016) 324–333. doi:10.1016/j.foodchem.2016.01.140.
- [17] D. Thakur, A. Jain, G. Ghoshal, U.S. Shivhare, O.P. Katare, Microencapsulation of  $\beta$ -Carotene Based on Casein/Guar Gum Blend Using Zeta Potential-Yield Stress Phenomenon: an Approach to Enhance Photo-stability and Retention of Functionality, *AAPS PharmSciTech.* 18 (2017) 1447–1459.
- [18] A. Jain, D. Thakur, G. Ghoshal, O.P. Katare, B. Singh, U.S. Shivhare, Formation and functional attributes of electrostatic complexes involving casein and anionic polysaccharides : An approach to enhance oral absorption of lycopene in rats in vivo, *Int. J. Biol. Macromol.* 93 (2016) 746–756.
- [19] M.G. Santos, F.T. Bozza, M. Thomazini, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation, *Food Chem.* 171 (2015) 32–39. doi:10.1016/j.foodchem.2014.08.093.
- [20] R. Shaddel, J. Hesari, S. Azadmard-Damirchi, H. Hamishehkar, B. Fathi-Achachlouei, Q. Huang, Double emulsion followed by complex coacervation as a promising method for protection of black raspberry anthocyanins, *Food Hydrocoll.* 77 (2018) 803–816. doi:10.1016/j.foodhyd.2017.11.024.
- [21] R. Shaddel, J. Hesari, S. Azadmard-damirchi, H. Hamishehkar, B. Fathi-Achachlouei, Q. Huang, Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1800–1810. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044.
- [22] P. Eslami, L. Davarpanah, F. Vahabzadeh, Encapsulating role of  $\beta$ -cyclodextrin in formation of pickering water- in-oil-in-water (  $W_1/O/W_2$  ) double emulsions containing *Lactobacillus dellbrueckii*, *Food Hydrocoll.* 64 (2017) 133–148. doi:10.1016/j.foodhyd.2016.10.035.
- [23] H.J. Giroux, G. Robitaille, M. Britten, Controlled release of casein-derived peptides in the gastrointestinal environment by encapsulation in water-in-oil-in-water double emulsions, *LWT - Food Sci. Technol.* 69 (2016) 225–232. doi:10.1016/j.lwt.2016.01.050.
- [24] B. Mutaliyeva, D. Grigoriev, G. Madybekova, A. Sharipova, S. Aidarova, Aspects Microencapsulation of insulin and its release using w/o/w double emulsion method, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 521 (2017) 147–152. doi:10.1016/j.colsurfa.2016.10.041.
- [25] D. de Almeida Paula, A. Mota Ramos, E. Basílio de Oliveira, E. Maurício Furtado Martins, F. Augusto Ribeiro de Barros, M. Cristina Teixeira Ribeiro Vidigal, N. de Almeida Costa, C. Tatagiba da Rocha, Increased thermal stability of anthocyanins at pH 4.0 by guar gum in aqueous dispersions and in double emulsions W/O/W, *Int. J. Biol. Macromol.* 117 (2018) 665–672. doi:10.1016/j.ijbiomac.2018.05.219.

- [26] B. Wang, B. Adhikari, C.J. Barrow, Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin – sodium hexametaphosphate using complex coacervation, *Food Chem.* 158 (2014) 358–365. doi:10.1016/j.foodchem.2014.02.135.
- [27] L. Wang, Y. Cao, K. Zhang, Y. Fang, K. Nishinari, G.O. Phillips, Hydrogen bonding enhances the electrostatic complex coacervation between k-carrageenan and gelatin, *Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp.* 482 (2015) 604–610. doi:10.1016/j.colsurfa.2015.07.011.
- [28] P. Gee, R. Gupta, Y.P. Timilsena, B. Adhikari, Optimisation of the complex coacervation between canola protein isolate and chitosan, *J. Food Eng.* 191 (2016) 58–66. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.07.008.
- [29] G.Q. Huang, Y.T. Sun, J.X. Xiao, J. Yang, Complex coacervation of soybean protein isolate and chitosan, *Food Chem.* 135 (2012) 534–539. doi:10.1016/j.foodchem.2012.04.140.
- [30] P. Wessman, D. Mahlin, S. Akhtar, S. Rubino, K. Leifer, V. Kessler, S. Håkansson, Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria, *J Sci Food Agric.* (2011) 2518–2528. doi:10.1002/jsfa.4343.
- [31] M.E. Rodríguez-Huezo, A.G. Estrada-Fernández, B.E. García-Almendárez, F. Ludeña-Urquizo, R.G. Campos-Montiel, D.J. Pimentel-González, Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture, melting and simulated intestinal conditions, *LWT - Food Sci. Technol.* 59 (2014) 768–773. doi:10.1016/j.lwt.2014.07.004.
- [32] M. Shima, Y. Morita, M. Yamashita, S. Adachi, Protection of *Lactobacillus acidophilus* from the low pH of a model gastric juice by incorporation in a W/O/W emulsion, *Food Hydrocoll.* 20 (2006) 1164–1169. doi:10.1016/j.foodhyd.2006.01.001.
- [33] L. Sapei, M.A. Naqvi, D. Rousseau, Stability and release properties of double emulsions for food applications, *Food Hydrocoll.* 27 (2012) 316–323. doi:10.1016/j.foodhyd.2011.10.008.
- [34] D.D.A. Paula, E.B. de Oliveira, A.V.N. de C. Teixeira, A. de S. Soares, A.M. Ramos, Double emulsions ( W/O/W ): physical characteristics and perceived intensity of salty taste, *Int. J. Food Sci. Technol.* 53 (2018) 475–483. doi:10.1111/ijfs.13606.
- [35] R. Shaddel, J. Hesari, S. Azadmard-damirchi, H. Hamishehkar, Use of gelatin and gum Arabic for encapsulation of black raspberry anthocyanins by complex coacervation, *Int. J. Biol. Macromol.* 107 (2018) 1800–1810. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.10.044.
- [36] M. Cano-Chauca, P.C. Stringheta, A.M. Ramos, J. Cal-Vidal, Effect of the carriers on the microstructure of mango powder obtained by spray drying and its functional characterization, *Innov. Food Sci. Emerg. Technol.* 6 (2005) 420–428. doi:10.1016/j.ifset.2005.05.003.
- [37] P. Pitigraisorn, K. Srichaisupakit, N. Wongpadungkiat, S. Wongsasulak, Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules, *J. Food Eng.* 192 (2017) 11–18. doi:10.1016/j.jfoodeng.2016.07.022.
- [38] S. Arslan, M. Erbas, I. Tontul, A. Topuz, Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var: Boulardii with different wall materials by spray drying, *LWT - Food Sci. Technol.* 63 (2015) 685–690. doi:10.1016/j.lwt.2015.03.034.
- [39] M.J. Martin, F. Lara-Villoslada, M.A. Ruiz, M.E. Morales, Effect of unmodified starch on viability of alginate-encapsulated *Lactobacillus fermentum* CECT5716, *LWT - Food Sci. Technol.* 53 (2013) 480–486. doi:10.1016/j.lwt.2013.03.019.
- [40] R. Bedani, E.A. Rossi, S.M.I. Saad, 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 Microbiol.* 34 (2013) 382–389. doi:10.1016/j.fm.2013.01.012.

- [41] R.C. de A.B. Campos, E.M.F. Martins, B. de A. Pires, M. do C.G. Peluzio, A.N. da Campos, Rocha, A.M. Ramos, B.R. de C.L. Júnior, A.D. de O. Martins, R.R. da Silva, M.L. Martins, 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 Res. Int. 116 (2019) 1247–1257. doi:10.1016/j.foodres.2018.10.012.
- [42] E. da S. Gulão, C.J.F. de Souza, C.T. Andrade, E.E. Garcia-Rojas, Complex coacervates obtained from peptide leucine and gum arabic : Formation and characterization, Food Chem. 194 (2016) 680–686. doi:10.1016/j.foodchem.2015.08.062.
- [43] N. Eghbal, R. Choudhary, Complex coacervation : Encapsulation and controlled release of active agents in food systems, LWT - Food Sci. Technol. 90 (2018) 254–264. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.036.
- [44] M. Calderón-Oliver, R. Pedroza-Islas, H.B. Escalona-Buendía, J. Pedraza-Chaverri, E. Ponce-Alquicira, Comparative study of the microencapsulation by complex coacervation of nisin in combination with an avocado antioxidant extract, Food Hydrocoll. 62 (2017) 49–57. doi:http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.07.028.
- [45] V. Ducel, J. Richard, P. Saulnier, Y. Popineau, F. Boury, Evidence and characterization of complex coacervates containing plant proteins: Application to the microencapsulation of oil droplets, Colloids Surfaces A Physicochem. Eng. Asp. 232 (2004) 239–247. doi:10.1016/j.colsurfa.2003.11.001.
- [46] G.A. Rocha-Selmi, A.C. Theodoro, M. Thomazini, H.M.A. Bolini, C.S. Favaro-Trindade, Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose, J. Food Eng. 119 (2013) 28–32. doi:10.1016/j.jfoodeng.2013.05.002.
- [47] M.G. Santos, D.A. Carpinteiro, M. Thomazini, G.A. Rocha-Selmi, A.G. da Cruz, C.E.C. Rodrigues, C.S. Favaro-Trindade, Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by complex coacervation and microcapsule application in chewing gum, Food Res. Int. 66 (2014) 454–462. doi:10.1016/j.foodres.2014.10.010.
- [48] D. Eratte, S. McKnight, T.R. Gengenbach, K. Dowling, C.J. Barrow, B.P. Adhikari, Co-encapsulation and characterisation of omega-3 fatty acids and probiotic bacteria in whey protein isolate-gum Arabic complex coacervates, J. Funct. Foods. 19 (2015) 882–892. doi:10.1016/j.jff.2015.01.037.
- [49] M.P. Silva, F.L. Tulini, E. Martins, M. Penning, C.S. Fávoro-Trindade, D. Poncelet, Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids, LWT - Food Sci. Technol. 89 (2018) 392–399. doi:10.1016/j.lwt.2017.11.008.
- [50] X. Yang, N. Gao, L. Hu, J. Li, Y. Sun, Development and evaluation of novel microcapsules containing poppy-seed oil using complex coacervation, J. Food Eng. 161 (2015) 87–93. doi:10.1016/j.jfoodeng.2015.03.027.
- [51] G.A. Rocha-Selmi, F.T. Bozza, M. Thomazini, H.M.A. Bolini, C.S. Fávoro-Trindade, Microencapsulation of aspartame by double emulsion followed by complex coacervation to provide protection and prolong sweetness, Food Chem. 139 (2013) 72–78. doi:10.1016/j.foodchem.2013.01.114.
- [52] J. Barbosa, S. Borges, M. Amorim, M.J. Pereira, A. Oliveira, M.E. Pintado, P. Teixeira, Comparison of spray drying, freeze drying and convective hot air drying for the production of a probiotic orange powder, J. Funct. Foods. 17 (2015) 340–351. doi:10.1016/j.jff.2015.06.001.
- [53] C.C. Ferrari, S.P.M. Germer, I.D. Alvim, F.Z. Vissotto, J.M. de Aguirre, Influence of carrier agents on the physicochemical properties of blackberry powder produced by spray drying,

- Int. J. Food Sci. Technol. 47 (2012) 1237–1245. doi:10.1111/j.1365-2621.2012.02964.x.
- [54] T.A. Comunian, M. Thomazini, A.J.G. Alves, F.E. de Matos Junior, J.C. de Carvalho Balieiro, C.S. Favaro-Trindade, Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release, *Food Res. Int.* 52 (2013) 373–379. doi:10.1016/j.foodres.2013.03.028.
- [55] M.P. Rascón, K. Huerta-Vera, L.A. Pascual-Pineda, A. Contreras-Oliva, E. Flores-Andrade, M. Castillo-Morales, E. Bonilla, I. González-Morales, Osmotic dehydration assisted impregnation of *Lactobacillus rhamnosus* in banana and effect of water activity on the storage stability of probiotic in the freeze-dried product, *LWT - Food Sci. Technol.* 92 (2018) 490–496. doi:10.1016/j.lwt.2018.02.074.
- [56] M.P. Nori, C.S. Favaro-Trindade, S. Matias de Alencar, M. Thomazini, J.C. de Camargo Balieiro, C.J. Contreras Castillo, Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation, *LWT - Food Sci. Technol.* 44 (2011) 429–435. doi:10.1016/j.lwt.2010.09.010.
- [57] K. Nakagawa, S. Iwamoto, M. Nakajima, A. Shono, K. Satoh, Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation, *J. Colloid Interface Sci.* 278 (2004) 198–205. doi:10.1016/j.jcis.2004.05.031.
- [58] C.P. Champagne, R.P. Ross, M. Saarela, K.F. Hansen, D. Charalampopoulos, Recommendations for the viability assessment of probiotics as concentrated cultures and in food matrices, *Int. J. Food Microbiol.* 149 (2011) 185–193. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2011.07.005.
- [59] T. Marques da Silva, E. Jacob Lopes, C.F. Codevilla, A.J. Cichoski, É.M. de M. Flores, M.H. Motta, C. de B. da Silva, C.R.F. Grosso, C.R. de Menezes, Development and characterization of microcapsules containing *Bifidobacterium* Bb-12 produced by complex coacervation followed by freeze drying, *LWT - Food Sci. Technol.* 90 (2018) 412–417. doi:10.1016/j.lwt.2017.12.057.
- [60] D. Eratte, K. Dowling, C.J. Barrow, B. Adhikari, Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review, *Trends Food Sci. Technol.* 71 (2018) 121–131. doi:10.1016/j.tifs.2017.10.014.
- [61] V. Đorđević, B. Balanč, A. Belščak-Cvitanović, S. Lević, K. Trifković, A. Kalušević, I. Kostić, D. Komes, B. Bugarski, V. Nedović, Trends in Encapsulation Technologies for Delivery of Food Bioactive Compounds, *Food Engineering Reviews*, 2014. doi:10.1007/s12393-014-9106-7.
- [62] M. Yao, B. Li, H. Ye, W. Huang, Q. Luo, H. Xiao, D.J. McClements, L. Li, Enhanced viability of probiotics (*Pediococcus pentosaceus* Li05) by encapsulation in microgels doped with inorganic nanoparticles, *Food Hydrocoll.* 83 (2018) 246–252. doi:10.1016/j.foodhyd.2018.05.024.
- [63] P.E. Ramos, L. Abrunhosa, A. Pinheiro, M.A. Cerqueira, C. Motta, I. Castanheira, M. V. Chandra-Hioe, J. Arcot, J.A. Teixeira, A.A. Vicente, Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation, *Food Res. Int.* 90 (2016) 25–32. doi:10.1016/j.foodres.2016.10.036.
- [64] A. Sohail, M.S. Turner, A. Coombes, T. Bostrom, B. Bhandari, Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method, *Int. J. Food Microbiol.* 145 (2011) 162–168. doi:10.1016/j.ijfoodmicro.2010.12.007.
- [65] L.A. Bosnea, T. Moschakis, Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses, *Food Bioprocess Technol.* (2014) 2767–2781. doi:10.1007/s11947-014-1317-7.
- [66] F. Nazzaro, P. Orlando, F. Fratianni, R. Coppola, Microencapsulation in food science and biotechnology, *Curr. Opin. Biotechnol.* 23 (2012) 182–186.

doi:10.1016/j.copbio.2011.10.001.

- [67] M.T. Cook, G. Tzortzis, D. Charalampopoulos, V. V. Khutoryanskiy, Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery, *J. Control. Release.* 162 (2012) 56–67. doi:10.1016/j.jconrel.2012.06.003.
- [68] A.R. Madureira, M. Amorim, A.M. Gomes, M.E. Pintado, F.X. Malcata, Protective effect of whey cheese matrix on probiotic strains exposed to simulated gastrointestinal conditions, *Food Res. Int.* 44 (2011) 465–470. doi:10.1016/j.foodres.2010.09.010.
- [69] S.J. Lahtinen, A.C. Ouwehand, S.J. Salminen, P. Forssell, P. Myllärinen, Effect of starch- and lipid-based encapsulation on the culturability of two *Bifidobacterium longum* strains, *Lett. Appl. Microbiol.* 44 (2007) 500–505. doi:10.1111/j.1472-765X.2007.02110.x.
- [70] L.P. Soto, L.S. Frizzo, E. Avataneo, M. V Zbrun, E. Bertozzi, G. Sequeira, M.L. Signorini, M.R. Rosmini, Design of macrocapsules to improve bacterial viability and supplementation with a probiotic for young calves, *Anim. Feed Sci. Technol.* 165 (2011) 176–183. doi:10.1016/j.anifeedsci.2011.03.001.
- [71] H.P. Castro, P.M. Teixeira, R. Kirby, Evidence of membrane damage in *Lactobacillus bulgaricus* following freeze drying, *Journal of Applied Microbiology*, 82 (1997) 87–94.

## CAPÍTULO 3

### ESTUDO DA VIABILIDADE DE *Lactobacillus plantarum* EM NÉCTAR MISTO DE CENOURA E ACEROLA: COMPARAÇÃO ENTRE CÉLULAS LIVRES *versus* CÉLULAS MICROENCAPSULADAS

#### RESUMO

Bebidas à base de vegetais estão cada vez mais sendo propostas como alternativas contendo probióticos. No entanto, além das células probióticas estarem viáveis no produto devem sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal para assegurar que no mínimo  $10^6$  -  $10^7$  UFCg<sup>-1</sup> possa atingir o ponto específico de atuação. Neste contexto, este estudo visou avaliar o comportamento de *Lactobacillus plantarum*, na forma livre ou encapsulada pela técnica de dupla emulsificação seguida de coacervação complexa, adicionado em néctar misto de cenoura e acerola, comparando-os em relação: i) características físico-químicas e conteúdo de compostos bioativos do néctar; ii) viabilidade durante o armazenamento e iii) viabilidade em ambiente gastrointestinal simulado *in vitro*. As amostras de néctar contendo as células probióticas (livre ou encapsuladas) foram armazenadas a 5 °C por 28 dias, e pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais (SST), compostos fenólicos, capacidade antioxidante, β-caroteno, viabilidade e sobrevivência celular dos probióticos após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais foram analisadas. Observou-se aumento na acidez titulável, bem como diminuição do pH e nos conteúdos de SST em ambos os tratamentos ( $p \leq 0,05$ ) e manutenção dos valores de capacidade antioxidante e conteúdo fenólico, ao longo da estocagem. Verificou-se aumento significativo da viabilidade celular durante os 28 dias de armazenamento a 5 °C, em ambos os tratamentos que apresentaram uma contagem final superior a  $8,0 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ . Após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, no tempo 0, a viabilidade das células encapsuladas foi de  $7,20 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  enquanto a das células livres foi de  $4,07 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ . No entanto, após 28 dias não se observou diferença significativa o que pode ser atribuído a adaptação celular às condições adversas. Desta forma, o encapsulamento das células de *L. plantarum* pela técnica de dupla emulsificação seguida de coacervação complexa pode ser considerado viável para aplicação de células probióticas em néctar misto de cenoura e acerola durante armazenamento por 28 dias a 5°C

**Palavras-Chave:** néctar probiótico; encapsulamento; emulsão dupla

## 1. INTRODUÇÃO

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (FAO/WHO, 2001) os micro-organismos probióticos são definidos como micro-organismos vivos que, quando consumidos em quantidades adequadas, são benéficos para a saúde do hospedeiro. Estes efeitos promotores da saúde incluem o controle das infecções intestinais, a estimulação do sistema imunológico, a diminuição dos sintomas de intolerância à lactose e atividade anticancerígena (ROUXINOL-DIAS et al., 2016; ZHANG; WU; FEI, 2016; KERRY et al., 2018).

O uso de culturas probióticas em produtos lácteos é amplamente realizada pela indústria em produtos como, leites fermentados, sorvetes, queijos, sobremesas, dentre outros (SIDIRA et al., 2017). Segundo Vinderola et al. (2017) a indústria de laticínios foi a primeira a comercializar com sucesso cepas específicas de bactérias probióticas em alimentos. No entanto, devido ao aumento do número de indivíduos com intolerância à lactose, alergias à proteínas do leite ou com dietas veganas e vegetarianas com restrição, produtos probióticos não lácteos à base de cereais, frutas, soja e aveia têm sido desenvolvidos (CAMPOS et al., 2019; FURTADO et al., 2019; NAKKARACH; WITHAYAGIAT, 2018; MOREIRA et al., 2017; MARTINS et al., 2016) representando também outra opção de produto para os consumidores em geral. Néctares e sucos de vegetais, por exemplo, são veículos promissores de probióticos devido ao seu conteúdo de nutrientes, não possuem culturas iniciais que competem com as culturas probióticas e ao seu apelo a um nicho de consumidores que se preocupam com hábitos de vida mais saudáveis (COSTA et al. 2013; SILVA et al., 2018).

A cenoura representa fonte natural de componentes funcionais, como vitaminas, minerais, fibras e carotenoides, principalmente  $\beta$ -caroteno. Além disso, as fibras em sua composição poderiam proteger fisicamente as células probióticas durante a passagem pelo trato intestinal (KOURKOUTAS; KANELLAKI; KOUTINAS, 2006; SAARELA et al, 2006). A acerola é nativa da América Central e muito bem adaptada ao cultivo no Brasil conhecida como uma excelente fonte alimentar de vitamina C e também de fitoquímicos, como carotenoides e polifenóis. Por outro lado, a vitamina C por promover um ambiente anaeróbico mais favorável contribui para o crescimento dos probióticos durante a estocagem pois esses microorganismos são microaerofílicos (DAVE; SHAH, 1997). Portanto, o néctar misto de cenoura e acerola poderia ser uma potencial alternativa de bebida probiótica não láctea.

Deve-se ressaltar que os efeitos benéficos proporcionados pelos probióticos dependem da ingestão regular e diária recomendada, a fim de proporcionar a “dose” mínima de células vivas.

Sugere-se que o número de células no alimento contendo bactérias probióticas deve ser de  $10^8$  -  $10^9$  UFCg<sup>-1</sup> para assegurar que, após a sua ingestão no mínimo  $10^6$  -  $10^7$  UFCg<sup>-1</sup> possa atingir o ponto específico de atuação (AHMAD et al., 2018). Com isso, diferentes técnicas têm sido avaliadas, dentre elas, a seleção adequada de estirpes bacterianas, a adaptação ao estresse, a incorporação de micronutrientes e a microencapsulamento (QUEIROZ et al., 2013; RAMOS et al., 2016) visando aumentar a viabilidade das células probióticas.

A microencapsulamento é um processo no qual as células probióticas são incorporadas em uma matriz ou membrana de encapsulamento podendo protegê-las em relação às condições adversas e mantendo-as em quantidades suficientes para exercerem seus efeitos benéficos (REDDY; MIN; WEE, 2015; ARSLAN-TONTUL; ERBAS, 2017). Entre os métodos de microencapsulamento mais utilizados destaca-se a coacervação complexa consistindo na interação eletrostática de dois polímeros com cargas elétricas opostas, resultando na separação de fases do sistema, onde uma é rica em solvente e outra em ambos os polímeros utilizados (EGHBAL et al., 2016). Porém, a técnica de coacervação complexa é mais eficaz para compostos hidrofóbicos. Para componentes hidrofílicos, são necessários ajustes, por exemplo, pela utilização de sistemas do tipo emulsão dupla (A/O/A) (COMUNIAN et al., 2013) também conhecidos como "emulsões de emulsões", existindo simultaneamente os dois tipos de emulsões simples (O/A e A/O).

No entanto, apesar das vantagens destas duas técnicas descritas acima, de acordo com o nosso conhecimento, não existem outros estudos na literatura que procurem combinar as técnicas de coacervação complexas e dupla emulsificação visando melhorar a viabilidade das células durante armazenamento e sob condições gastrointestinais simuladas *in vitro* em uma matriz alimentícia. Desta forma, o objetivo desta pesquisa foi determinar o efeito da microencapsulamento de *L. plantarum*, utilizando um processo combinado de dupla emulsificação associado a coacervação complexa, quando incorporado ao néctar misto de cenoura e acerola, durante 28 dias de armazenamento a 5 °C.

## 2. MATERIAL E MÉTODOS

### 2.1 Materiais

A cultura de *Lactobacillus plantarum* foi adquirida da Digestive Care (Jasmine, Canada). O óleo de milho foi adquirido em um supermercado local (Sinhá, Brasil) e o poliricinoleato poliglicerol emulsificante (PGPR) foi gentilmente cedido pela Dhaymer's (Ind. e Com. de produtos químicos, São Paulo, Brasil). Outros reagentes e enzimas utilizadas foram: sacarose (Neon, São Paulo, Brasil), glicose (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil), gelatina (tipo B, Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), goma guar, NaOH e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O (Synth, São Paulo, Brasil). HCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), NaCl (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), CaCO<sub>3</sub> (Qeel, São Paulo, Brasil), Pepsina da mucosa gástrica suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), lipase de *Penicillium camemberti* (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), pancreatina suína (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil), bile bovina (Sigma-Aldrich, São Paulo, Brasil) meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe (MRS; Kasvi, São Paulo, Brasil), MRS Broth (TM Media, São Paulo, Brasil) e púrpura bromocresol (Êxodo Científica, São Paulo, Brasil).

### 2.3. Estirpe bacteriana, cultura e condições de cultivo

A cultura liofilizada de *Lactobacillus plantarum* foi ativada segundo Beristain-Bauza et al. (2016), com modificações. Inicialmente, a cultura foi inoculada em caldo MRS e incubada a 37 °C durante 24 h e novamente cultivada em caldo MRS durante 24 h. Em seguida, o sistema foi centrifugado a 5 °C por 10 minutos a 7000 g. O sobrenadante foi descartado e o sedimento de células probióticas foi ressuspensão duas vezes em solução salina estéril (0,85%, p/v) e centrifugado a 5 °C por 10 minutos a 7000 g.

### 2.4. Preparação das dispersões de goma arábica e gelatina

Para o preparo da dispersão aquosa utilizada na fase interna das emulsões duplas (A<sub>1</sub>) aproximadamente 1 grama do pellet de células probióticas foi ressuspensão assepticamente em 10 mL de água estéril com 10 g.L<sup>-1</sup> de sacarose, 4,6 g.L<sup>-1</sup> de glicose e 6,7 g.L<sup>-1</sup> de gelatina (RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2014; WESSMAN et al., 2011) para a obtenção de pelo menos 10,0 log UFC mL<sup>-1</sup> de células, determinada previamente. A dispersão de óleo (O) foi preparada dispersando o surfactante PGPR (3%, p/p) em óleo de milho e homogeneização a 65 °C por 25 min (SAPEI; NAQVI; ROUSSEAU, 2012) usando um agitador magnético (modelo 752A/6, Fisatom, São Paulo, Brasil). As dispersões aquosas usadas para formar a fase aquosa externa (A<sub>2</sub>) foram

compostas de gelatina (6% p/v). A gelatina foi hidratada por 30 min, seguido de agitação magnética a 50 °C por 25 min (WANG; ADHIKARI; BARROW, 2014)

## **2.5 Microencapsulamento de células de *L. plantarum* por dupla emulsificação seguida de coacervação complexa**

Emulsões duplas foram preparadas por um procedimento de dois passos: no primeiro passo uma emulsão primária (A/O) foi preparada, e no segundo passo esta emulsão primária foi incorporada em segunda dispersão aquosa (A). A emulsão primária foi preparada adicionando 6,5g da dispersão aquosa interna a 8,5g da dispersão óleo/PGPR sob agitação vigorosa (6000rpm por 60 segundos) usando um homogeneizador Ultra-Turrax (modelo T18 Basic, IKA Works Inc., Wilmington, NC, EUA). Então, para preparar a emulsão dupla 13g da emulsão primária (A/O) foram lentamente adicionada a 100g da dispersão aquosa externa sob homogeneização por 5500 rpm por 90 segundos utilizando o equipamento Ultra-Turrax.

A coacervação complexa foi realizada de acordo com Shaddel et al. (2018), com pequenas modificações. Em resumo, 100 mL das emulsões duplas foram lentamente adicionadas a 100 mL da solução de goma arábica (6%, 40 °C), usando uma proporção de 1: 1 de biopolímeros (gelatina: goma arábica). Em seguida, 200 mL de água esterilizada foram cuidadosamente adicionados a esta mistura e o pH foi ajustado para 4,0 (HCl 0,1 N) sob agitação a 40 °C. O sistema resultante foi resfriado a 10 °C em banho de gelo, ainda sob agitação. O material frio resultante foi armazenado a 7 °C durante 2 horas, para que as microcápsulas decantassem, facilitando a remoção da fase aquosa. Em seguida, as microcápsulas úmidas foram armazenadas em frascos devidamente esterilizados e armazenados a 5 °C até a utilização.

## **2.6. Preparo e caracterização das polpas e do néctar**

### **2.6.1. Preparação da polpa de cenoura e acerola**

As acerolas (*Malpighia emarginata*) e cenouras (*Daucus carota* L.) foram adquiridas no comércio da cidade de Viçosa (Minas Gerais, Brasil). Ambos os vegetais foram inicialmente lavados em água corrente a fim de retirar as sujidades e, em seguida, sanitizados em solução contendo 200 mg·L<sup>-1</sup> de cloro ativo, por um período de 15 minutos a 5 °C, com posterior enxágue em solução clorada a 20 mg·L<sup>-1</sup> por 5 minutos. Após a etapa de higienização, as acerolas foram despulpadas em despulpador mecânico (Tecnint, Pouso Alegre, Brasil) para obtenção da polpa e a

cenoura foi triturada em liquidificador (Philips Walita Daily RI2004) com adição de água potável na proporção de 1:1.

### **2.6.2. Preparação do néctar misto de cenoura e acerola e adição de *L. plantarum***

O néctar de cenoura e acerola foi elaborado a partir de 60 % de polpa dos vegetais (40% de cenoura e 20% de acerola) 35% de água, 5% de açúcar. Os néctares obtidos foram pasteurizados a 82 °C por 2 min em banho-maria, sendo em seguida resfriado até 28 °C com água gelada.

As microcápsulas contendo as células de *L. plantarum* obtidas de acordo com a seção 2.5 possuíam viabilidade celular de  $8.03 \pm 0.2 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  e foram adicionadas no néctar misto de cenoura e acerola até a obtenção de no mínimo  $7 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ . Como tratamento controle no néctar misto de cenoura e acerola pasteurizado e resfriado foram adicionadas células livres obtidas de acordo com a sessão 2.3 até a obtenção de no mínimo  $10^7$  células por mililitro de néctar ( $\text{UFC.mL}^{-1}$ ). Após a obtenção de todos os néctares mistos, estes foram envasados em garrafas de vidro estéreis de 100 mL com tampas metálicas e armazenados a 5 °C por um período 28 dias.

### **2.6.3. Análises de pH, acidez total titulável (ATT) e sólidos solúveis totais**

As análises de pH, acidez total titulável e sólidos solúveis totais foram realizadas conforme metodologia da AOAC (2000). O pH foi determinado por leitura direta em potenciômetro (MS Tecnopon mPA-210). Para determinar a acidez, em percentual de ácido cítrico, foram pesados 10 g de amostra e adicionados em 100 mL de água destilada e, em seguida, titulou-se com uma solução padrão  $0,1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$  de NaOH até pH final de 8,2-8,4 (ponto final da titulação). A determinação do teor de sólidos solúveis totais (SST) foi realizada diretamente em refratômetro de bancada modelo ABBÉ (WYA-2S), a 25 °C, sendo os resultados expressos em °Brix.

### **2.6.4 Determinação de compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos foram determinados pelo método de Folin-Ciocalteu (SWAIN; HILLS, 1959). Em tubos de ensaios foram adicionados: 1,0 mL da amostra (devidamente diluída (1:20)), 7,5 mL de água destilada e 0,5 mL do reagente de Folin Ciocalteu e agitados vigorosamente. Os tubos foram mantidos sob repouso por 3 minutos e, em seguida, adicionou-se 1,0 mL de solução de bicarbonato de sódio saturada (catalizador da reação). Os tubos permaneceram em repouso por mais uma hora (1 h) ao abrigo da luz à temperatura ambiente (25 °C). A solução “branco” foi preparada nas mesmas condições que a amostra, sendo o volume da amostra substituído por 1,0 mL do solvente de extração. A leitura da absorbância da solução

final (após estabilização da reação) foi realizada a 725 nm em espectrofotômetro (UV-1601 PC, Shimadzu). O teor de compostos fenólicos totais foi calculado com base na curva padrão de ácido gálico P.A. variando entre 0 e 200 mg·L<sup>-1</sup>. Os resultados foram expressos em mg de equivalentes de ácido gálico (GAE) por 100 g de amostra (mg GAE. 100 mL<sup>-1</sup>). As amostras de néctar misto de cenoura adicionadas de células probióticas de *L. plantarum* livre ou encapsuladas foram analisadas logo após a elaboração (tempo 0) e após 28 dias de armazenamento a 5 °C.

### 2.6.5 Atividade sequestrante do radical livre DPPH•

A atividade sequestrante do radical DPPH• foi realizada conforme a metodologia de Brand-Williams; Cuvelier; Berset (1995), com modificações. Inicialmente, uma solução estoque do radical 2,2-difenil-1-picrilhidrazil (DPPH•) (6,10<sup>-5</sup> mol L<sup>-1</sup>) foi preparada em metanol. Alíquotas de 0,1 mL das amostras diluídas em metanol (1:10) foram transferidas para tubos de ensaio e, em seguida, 2,9 mL do radical DPPH foram adicionados. Após incubação à temperatura ambiente (25 ± 1 °C) e ao abrigo da luz por 90 min, tempo determinado por meio de ensaios preliminares, as leituras das absorvâncias a 517 nm foram realizadas em espectrofotômetro (Modelo UV 1800, Shimadzu, São Paulo, Brasil). O metanol foi utilizado para calibração do equipamento e como amostra “branco”. Os resultados foram expressos em mM de Trolox.mL<sup>-1</sup> do produto (Capacidade Antioxidante Equivalente ao Trolox). As amostras de néctar misto de cenoura e acerola adicionadas de células probióticas de *L. plantarum* na forma livre ou encapsulada foram analisadas logo após a elaboração (tempo 0) e após 28 dias de armazenamento a 5° C.

### 2.6.6. Extração e determinação de β-caroteno

O teor de β-caroteno foi determinado de acordo com Nagata e Yamashita (1992). Dois gramas do néctar misto de cenoura e acerola adicionados de *L. plantarum* na forma livre ou encapsulada foram misturados com 10 mL do solvente de extração contendo acetona e éter de petróleo (4:6, v/v). Em seguida, a mistura foi mantida sob agitação por 15 min e realizou a leitura da absorvância do sobrenadante a 663 nm, 505 nm e 453 nm. A equação (1) foi utilizada para o cálculo do teor de β-caroteno em mg por 100 mL de solvente de extração. Os valores obtidos foram utilizados para a determinação de β-caroteno em mg por 100 mL do produto.

$$\beta\text{-caroteno} = 0,216_{A663} - 1,22_{A645} - 0,304_{A505} + 0,452_{A453} \quad (1)$$

## 2.7. Determinação das características microbiológicas do néctar misto de cenoura e acerola

### **2.7.1. Determinação da qualidade microbiológica**

As análises microbiológicas de coliformes a 30 °C e a 45 °C foram realizadas pela técnica do Número Mais Provável (NMP) de acordo com Kornacki; Johnson (2001), utilizando-se caldo Lauril Sulfato Triptose (LST) para o teste presuntivo, Caldo Bile Verde Brilhante (VB) para confirmar coliformes a 30 °C e Caldo EC para confirmar coliformes que fermentam a 45 °C. O resultado foi expresso em NMP por mililitro de néctar.

A contagem de micro-organismos psicrotróficos foi determinada segundo Cousin; Jay; Vasavada (2001) utilizando-se Ágar Padrão para Contagem (PCA) com incubação a 7 °C por 10 dias. Para a contagem das colônias de psicrotróficos, foram selecionadas as placas contendo de 25 a 250 colônias e os resultados expressos em número de UFC (unidades formadoras de colônias) por mililitros do produto. As amostras de néctar foram analisadas logo após a elaboração (tempo 0) e após 28 dias de armazenamento 5° C

### **2.7.2. Contagem de células viáveis de *L. plantarum***

Amostras de 25 mL do néctar foram suspensas em 225 mL de solução salina e a suspensão mantida a 25 °C durante 30 minutos sob agitação magnética (600 rpm) para liberar as células (ARSLAN et al., 2015). A viabilidade de *L. plantarum* foi determinada aos 0, 7, 14, 21 e 28 dias de armazenamento dos néctares mistos a 5 °C. O plaqueamento foi feito pela técnica "pour plate" em meio de cultura Man-Rogosa-Sharpe (MRS) adicionado de púrpura de bromocresol e carbonato de cálcio (RICHTER; VEDAMUTHU, 2001). As placas foram incubadas a 37 °C por até 72 horas em jarras de anaerobiose. Os resultados expressos em número de UFC (Unidades Formadoras de Colônias) por mililitro do produto.

### **2.7.3. Avaliação da sobrevivência de *L. plantarum* após simulação das condições gastrintestinais *in vitro***

Utilizou-se a metodologia descrita por Bedani; Rossi; Saad (2013) e Campos et al. (2019), utilizando um método *in vitro*, baseado na simulação de sucos gástricos e entéricos e enzimas do trato gastrintestinal (fase gástrica, fase entérica I e fase entérica II). O néctar misto de cenoura e acerola contendo as células probióticas livres e encapsuladas foram expostos a essas condições para avaliar as taxas de sobrevivência de *L. plantarum*.

- Fase gástrica: alíquotas de 10 mL da diluição 10<sup>-1</sup> do néctar misto de cenoura e acerola contendo células livres e encapsuladas de *L. plantarum* foram transferidas para frascos Schott estéreis de 100 mL e o pH ajustado para 2,3-2,6, utilizando HCl 1 N. Em

seguida, pepsina da mucosa gástrica suína e lipase de *Penicillium camemberti* foram adicionadas até atingir as concentrações de 3 g L<sup>-1</sup> e 0,9 mg L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os frascos foram incubados a 37 °C durante 2 horas sob agitação a 150 rpm numa incubadora com agitação (SOLAB, SL 222).

- Fase entérica I: o pH dos sistemas da fase gástrica foi aumentado para 5,4 a 5,7 utilizando uma solução alcalina (pH 12, NaOH 1N e NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O), contendo também bile bovina e pancreatina de pâncreas de suíno nas concentrações de 10 g.L<sup>-1</sup> e 1 g.L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os frascos foram reincubados a 37 °C durante 2 horas sob agitação.
- Fase entérica II: o pH dos sistemas da fase entérica I foi elevado para 6,8-7,2 utilizando a solução alcalina da fase entérica I. A bile bovina e a pancreatina foram então adicionadas nas concentrações de 10 g. L<sup>-1</sup> e 1 g L<sup>-1</sup>, respectivamente. Os sistemas foram novamente incubados a 37 °C durante 2 horas sob agitação, totalizando 6 horas de ensaio.

A enumeração de células sobreviventes nas condições gastrointestinais foi realizada após a conclusão de cada fase (isto é, após 2, 4 e 6 horas). Alíquotas de 1 mL foram retiradas e diluídas em série em solução salina. A contagem de bactérias probióticas foi realizada conforme descrito no item 2.8.2.

## **2.8. Análise estatística**

Para análise e interpretação dos dados, aplicou-se ANOVA e, quando houve diferença significativa, as médias foram comparadas pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade. Para isso, o programa utilizado foi o Statistical Analysis Systems (SAS) (Statistical Analysis System - SAS Institute, Cary, NC, EUA) versão 9.2, licenciado pela Universidade Federal de Viçosa.

## **3. RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **3.1 Avaliação das características químicas e físicas dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de *Lactobacillus plantarum***

A partir dos dados apresentados na Tabela 1, não houve diferença significativa entre os tratamentos ( $p > 0,05$ ) em relação as características físico-químicas avaliadas. No entanto, ao longo do armazenamento observou-se uma diminuição significativa ( $p < 0,05$ ) nos valores de pH e teor de sólidos solúveis totais (STT) em relação a acidez total titulável um aumento ( $p < 0,05$ ) foi verificado, em ambos os tratamentos

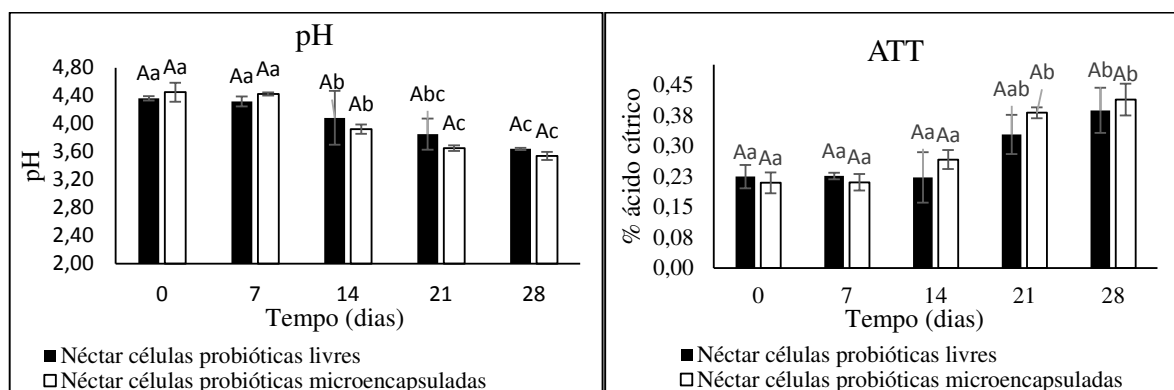


Figura 1- Características físico-químicas de pH, acidez titulável, SST e Aw dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de *L. plantarum*

Médias  $\pm$  desvio padrão na mesma linha seguido por diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  entre as formulações de néctar de cenoura e acerola para o mesmo dia de armazenamento. As médias  $\pm$  desvio padrão na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes, indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  para cada formulação durante o tempo de armazenamento.

A redução significativa no pH e aumento da acidez titulável (ATT) pode ser explicada devido ao crescimento bacteriano e, metabolização dos açúcares simples presentes no néctar, resultando na produção de pequenas quantidades de ácidos orgânicos, durante o armazenamento (GANDOMI, ABBASZADEH, MISAGHI, BOKAIE, & NOORI, 2016). Além disso, segundo Chim; Zambiazzi, (2013), reações envolvidas na decomposição do produto, como hidrólise, oxidação e fermentação, geram compostos ácidos que, por consequência, aumentam a acidez e diminuem o pH do meio.

Resultados semelhantes para esses parâmetros também foram encontrados por Pereira et al. (2013) que observaram aumento do teor de ácido láctico durante o armazenamento e redução no pH em sucos probióticos de caju, indicando que *L. casei* mantém seu metabolismo mesmo sob condições de refrigeração. Moreira et al. (2017) elaboraram suco misto de juçara e manga Ubá processados termicamente e por alta pressão isostática (API) adicionados de *L. rhamnosus* GG também verificaram que os sucos probióticos apresentaram decréscimo de pH e aumento da acidez após 30 dias de estocagem a 4 °C. Deve-se ressaltar que os valores de pH obtidos durante o armazenamento dos sucos são importantes pois a maior acidez pode aumentar a segurança microbiológica e a vida de prateleira, desde que não altere as características sensoriais ou tecnológicas do produto (ZHU, WANG, RAMASWAMY, & YU, 2017).

Não houve diferença no teor de sólidos solúveis totais (SST) entre as amostras em cada tempo avaliado ( $p > 0,05$ ) e ao longo do período de armazenamento ( $p > 0,05$ ). Após o processamento, as formulações apresentaram média de  $8,1 \pm 1,4$  °Brix. Após 28 dias de

armazenamento, esses valores foram de  $7,6 \pm 1,3$ , o que demonstra a estabilidade do produto durante o período de estocagem.

### 3.2. Compostos fenólicos totais, carotenoides e capacidade antioxidante dos néctares de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de *L. plantarum*

Os resultados obtidos para a atividade antioxidante, conteúdo fenólico e  $\beta$ -caroteno dos néctares mistos de cenoura e acerola contendo células livres e encapsuladas de *L. plantarum*, durante 28 dias de armazenamento a  $5^\circ\text{C}$  estão apresentados na Tabela 1.

Tabela 1- Teor de compostos fenólicos, capacidade antioxidante e  $\beta$ -caroteno dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células probióticas de *Lactobacillus plantarum* encapsuladas ou livres no tempo 0 e após 28 dias de armazenamento a  $5^\circ\text{C}$ .

Parâmetros	Tempo (Dias)	Tratamentos	
		Néctar células probióticas livres	Néctar células probióticas microencapsuladas
Compostos fenólicos (mg GAE.100 mL <sup>-1</sup> )	0	150,2 ± 22,9 Aa	150, 8 ± 82,0 Aa
	28	154,4 ± 154,3 Aa	150, 7 ± 172,8 Aa
DPPH (mM)	0	11,5 ± 0,77 Aa	12,1 ± 0,54 Aa
	28	12,0 ± 0,80 Aa	12,6 ± 1,03 Aa
$\beta$ -caroteno (mg.100 mL <sup>-1</sup> )	0	7,9 ± 0,5 Aa	8,0 ± 0,4 Aa
	28	7,8 ± 0,2 Aa	7,9 ± 0,2 Aa

Médias ± desvio padrão seguido por diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  entre os tratamentos para o mesmo dia de armazenamento. As médias ± desvio seguidas de letras minúsculas diferentes, indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  para cada formulação ao longo do tempo de armazenamento.

Não se constatou diferença significativa entre os tratamentos e ao longo do período de armazenamento ( $p > 0,05$ ) evidenciando que o processamento e o armazenamento correto não aceleraram a degradação destes compostos que são sensíveis à oxidação e presença de luz, oxigênio e calor (HAN & KOH, 2011).

Campos et al. (2019) ao avaliarem suco de abacaxi e jussara como carreador de *Lactobacillus rhamnosus* não verificaram alterações significativas em relação aos teores de compostos fenólicos e capacidade antioxidante ( $p > 0,05$ ) ao longo do período de armazenamento de 28 dias a  $8^\circ\text{C}$ , o que está em conformidade com os resultados do presente estudo. Resultados similares foram obtidos por Martins et. al. (2016) ao estudarem o conteúdo de carotenoides totais em salada de frutas adicionada de *Lactobacillus rhamnosus* HN001, os quais não sofreram variação significativa após 5 dias de armazenamento  $8^\circ\text{C}$ .

### .3.3 Avaliação da qualidade microbiológica dos néctares mistos de cenoura e acerola adicionados de células livres ou encapsuladas de *L. plantarum*

Os néctares mistos adicionados de células livres ou encapsuladas de *L. plantarum* mantiveram suas características microbiológicas preservadas ao longo do período de estocagem (Tabela 2), evidenciando a adequação das etapas de pré-processamento/processamento e a eficácia do tratamento térmico, bem como a sanidade e estabilidade dos néctares em relação aos micro-organismos do grupo coliformes. Por outro lado, houve um aumento na contagem de micro-organismos psicotróficos em ambos os tratamentos após 28 dias de estocagem a 5 °C.

Tabela 2. Número Mais Provável de coliformes a 30°C e a 45°C e contagem de micro-organismos psicotróficos em néctar misto de cenoura e acerola adicionados células de *L. plantarum* livre ou encapsulado.

Tratamentos	Avaliação microbiológica					
	Coliformes a 30 °C (NNM·mL <sup>-1</sup> )		Psicotróficos (Log UFC·mL <sup>-1</sup> )		Coliformes a 45 °C (NNM·mL <sup>-1</sup> )	
	Tempo (dias)					
	0	28	0	28	0	28
Néctar células probióticas livres	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	< 1,0	4,2
Néctar células probióticas microencapsuladas	<3,0	<3,0	<3,0	<3,0	< 1,0	4,5

Cecilia; Aguayo; Artés (2013) ao desenvolverem um produto composto de 100 mL de suco e 50 g de pedaços de melão Galia tratados termicamente a 70°C/3 min e armazenados a 5°C por 7 dias verificaram um aumento de bactérias psicotróficas e aeróbias totais com o tempo de armazenamento em todos os tratamentos. Gervilla; Guamis; Saldo (2010) também verificaram aumento na contagem de bactérias psicotróficas após 30 dias de armazenamento a 4 °C, nos sucos de maçã submetidos a 100, 200 e 300 MPa a 20°C. Segundo LI et al. (2010) as bactérias injuriadas na pasteurização ou pressurização podem recuperar sua viabilidade durante o armazenamento dependendo do dano que sofreram e da matriz alimentar que se encontram, ocasionando o aumento da contagem celular durante o armazenamento.

### 3.4. Contagem de células viáveis de *L. plantarum* nos néctares mistos de cenoura e acerola

As alterações na viabilidade das células probióticas em néctar misto de cenoura e acerola durante o armazenamento refrigerado são apresentadas na Figura 1. Verifica-se que a forma como as células de *L. plantarum* foram adicionadas (encapsulada ou livre) não afetou a viabilidade celular nos néctares mistos de cenoura e acerola. Logo após a elaboração (tempo 0), as formulações apresentavam contagens médias de *L. plantarum* de aproximadamente 7,38 log UFC.mL<sup>-1</sup>. Ao longo do armazenamento observou-se um aumento significativo ( $p < 0,05$ ) da viabilidade celular, em ambos os tratamentos, que apresentaram contagem média final de aproximadamente 8,0 log UFC.mL<sup>-1</sup>.

O aumento da contagem de *L. plantarum* adicionado em néctar misto de cenoura e acerola ao longo do tempo pode ser devido a presença de nutrientes como fibras, açúcares, vitaminas, dentre outros, disponíveis para o metabolismo celular e a ausência de culturas iniciais que poderiam competir com a cultura probiótica (MOREIRA et al., 2017; MARTINS et al., 2016). A cenoura e seus produtos, tais como sucos, são amplamente conhecidos por serem ricos em fitonutrientes, particularmente carotenóides, minerais, vitaminas e fibras (JABBAR et al., 2014). Em relação às células livres, as fibras presentes na composição do néctar poderiam proteger fisicamente as células probióticas dos danos causados pelas condições adversas (SAARELA et al., 2006). Além disso, a acerola é fonte de vitamina C (ácido ascórbico), o que pode ter contribuído para a redução do oxigênio dissolvido no meio (RITA et al., 2018) criando um ambiente anaeróbico favorável para a sobrevivência do probiótico.

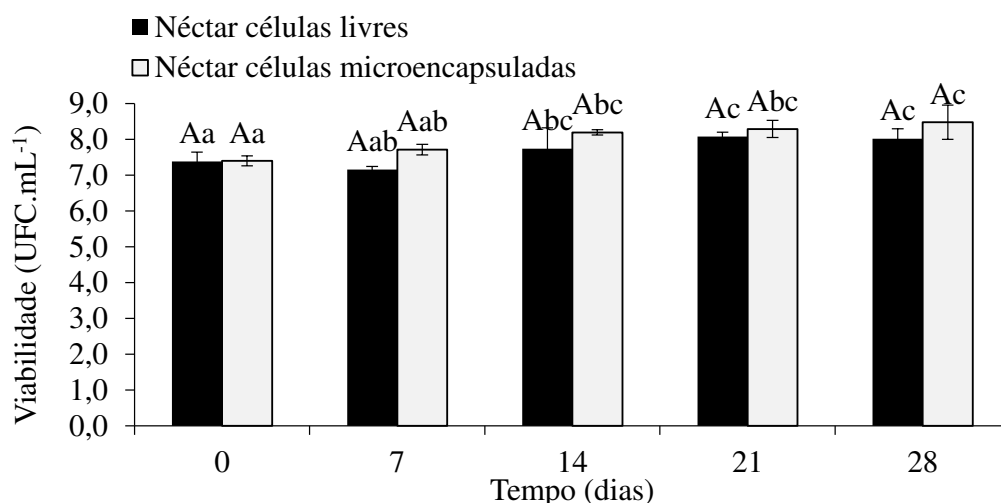


Figura 1 Viabilidade de *L. plantarum* livre e encapsulado adicionado em néctar de cenoura e acerola durante 28 dias de armazenamento a 5 °C.

Médias  $\pm$  desvio padrão seguido por diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  entre os tratamentos para o mesmo dia de armazenamento. As médias  $\pm$  desvio seguidas de letras minúsculas diferentes, indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  para cada formulação ao longo do tempo de armazenamento.

Mousavi et al. (2011) observaram que *L. plantarum* e *L. delbrueckii* em suco de romã fermentado apresentaram crescimento ótimo e manutenção da viabilidade durante as primeiras duas semanas de armazenamento a 4 °C. Moreira et al. (2017) verificaram contagens de células probióticas de *L. rhamnosus* acima de 10,8 UFC mL<sup>-1</sup> durante os 30 dias de armazenamento a 4 °C em suco misto de juçara e manga ubá, demonstrando sua viabilidade neste produto. Luiz et al., (2019) ao avaliarem suco de cacau probiótico também verificaram o crescimento e manutenção da viabilidade celular de *L. casei* necessária para efeitos benéficos à saúde durante toda a vida de prateleira por 42 dias a 5°C.

A composição do néctar misto de cenoura e acerola afetou positivamente as células livres que não enfrentaram condições tão adversas para o seu crescimento, não diferindo da viabilidade celular em relação às células encapsuladas ( $p > 0,05$ ). No entanto, além das células probióticas estarem viáveis no produto, estas devem sobreviver à passagem do trato gastrointestinal e serem capazes de agregar-se como parte da microbiota natural e apresentar efeitos benéficos após aderirem às superfícies epiteliais do intestino do hospedeiro (MITSUOKA, 2014). Portanto, para definir a capacidade funcional de um alimento probiótico, a sobrevivência das bactérias ao longo do trato gastrointestinal deve ser verificada, realizando simulações *in vitro* e/ou *in vivo* a fim de fornecer aos consumidores produtos verdadeiramente probióticos (TRIPATHI; GIRI, 2014).

### **3.5. Avaliação da sobrevivência de *L. plantarum* às condições gastrointestinais simuladas *in vitro***

O ensaio *in vitro* foi realizado com as fases gástrica, entérica I e entérica II do trato gastrointestinal após a elaboração (tempo 0) e após 28 dias de armazenamento a 5°C dos néctares mistos de cenoura e acerola, adicionados de células livres ou encapsuladas (Figura 3)

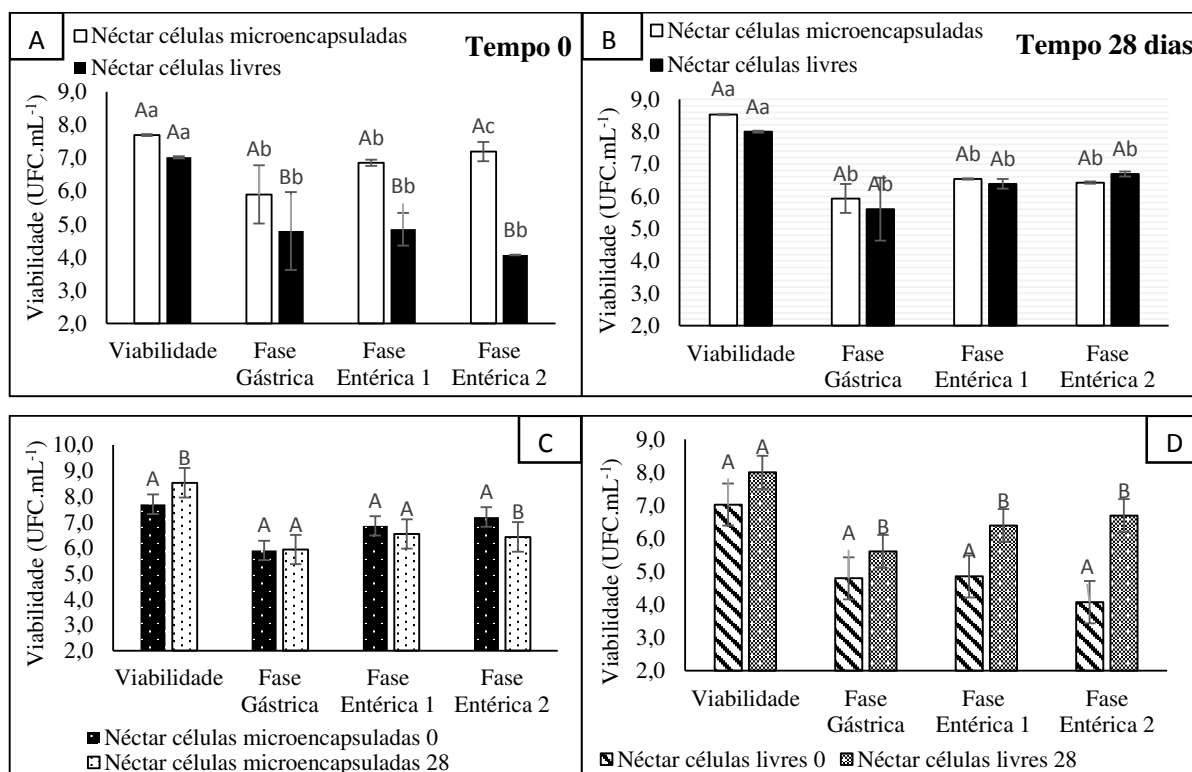


Figura 3 Sobrevivência de *L. plantarum* na forma livre ou encapsulada adicionado em néctar misto de cenoura e acerola e submetido a condições gastrointestinais simuladas *in vitro*.

Médias  $\pm$  desvio padrão seguido por diferentes letras maiúsculas indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  entre os tratamentos para o mesmo dia de armazenamento. As médias  $\pm$  desvio padrão na mesma coluna, seguidas de letras minúsculas diferentes, indicam diferenças estatisticamente significativas a  $p \leq 0,05$  para cada formulação ao longo das fases da simulação do trato gastrointestinal.

No tempo 0, na fase gástrica, que corresponde a 2 h de ensaio, foi observado declínio na sobrevivência das células probióticas de *L. plantarum* em todas as amostras ( $p < 0,05$ ). A viabilidade de células livres em néctar misto de cenoura e acerola diminuiu de  $7,02 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  para  $4,80 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ , enquanto a de células microencapsuladas diminuiu de  $7,69 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  para  $6,0 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  (Figura 3A). O suco gástrico geralmente representa a condição mais estressante para os microrganismos probióticos seguido do suco pancreático e sais biliares do intestino delgado. As células quando expostas às condições ácidas intracelulares aumentam o consumo de energia visando a manutenção do pH, com isso, outras funções celulares cruciais são afetadas causando a morte celular (CORCORAN et al., 2005). Ferrando et al. (2016) constataram que estirpes de *L. plantarum* Lp 813 e Lp 998 após a passagem pelo trato gastrointestinal apresentaram uma redução na contagem de células viáveis de, aproximadamente, 3 ciclos log. Acredita-se que a sobrevivência superior das células microencapsuladas comparadas às células

livres no presente estudo se deve à lenta degradação das microcápsulas em condições ácidas, promovendo uma barreira física contra os fluidos gástricos, aumentando a proteção das células contra as condições adversas do trato gastrointestinal.

Nas fases entéricas I e II, as quais simulam o intestino delgado e grosso, respectivamente, verificou-se que a viabilidade da cultura probiótica livre no néctar misto de cenoura e acerola não diferiu ( $p > 0,05$ ) quanto a viabilidade da fase gástrica. No entanto, verificou-se diferença ( $p < 0,05$ ) na viabilidade de células encapsuladas quando comparada a fase entérica II ( $7,20 \log \text{UFC mL}^{-1}$ ) e fase gástrica livre ( $6,00 \log \text{UFC mL}$ ). No néctar contendo *L. plantarum* microencapsulado a viabilidade na fase entérica I aumentou de  $6,85 \log \text{UFC.mL}^{-1}$  para  $7,20 \log \text{UFC mL}^{-1}$  (fase gástrica II). Os resultados obtidos estão de acordo com Schell & Beermann (2014) que também observaram um aumento na sobrevivência de *L. reuteri* microencapsulado DSM 20016 (em soro doce e goma-laca) durante o ambiente gastrointestinal *in vitro*, provavelmente devido à recuperação da estrutura celular das bactérias lesadas e também por mecanismos de resposta ao estresse. As fases entéricas I e II, que simulam o intestino delgado e grosso, respectivamente, apresentam pH mais elevado, sendo 5,4-5,7 para Fase entérica I e 6,8-7,2 para Fase entérica II (Bedani, Rossi, & Saad, 2013). Estes valores superiores pH podem ocasionar a manutenção da viabilidade celular, garantindo que o micro-organismos alcance o intestino com contagens acima  $6 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ , colonizando-o e exercendo efeitos benéficos no hospedeiro.

No tempo de 28 dias de armazenamento, após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, também verificou-se um declínio na sobrevivência das células probióticas livres de *L. plantarum* ( $p < 0,05$ ), em ambos os tratamentos. Não foram observadas diferenças significativas entre os tratamentos após a simulação de cada fase gastrointestinal ( $p > 0,05$ ) (Figura 3B). No entanto, ocorreu um aumento da sobrevivência das células livres em relação ao tempo 0 de armazenamento (Figura 3D). Tal resultado pode ser atribuído devido a adaptação celular às condições de armazenamento ao longo do tempo e também devido a resposta ao estresse. Ranadheera et al. (2014) assumiram que a incorporação de bactérias do ácido láctico em sucos de frutas com pH baixo pode aumentar a resistência das bactérias a condições ácidas estressantes subsequentes, como as encontradas no trato gastrointestinal. Resultados semelhantes foram obtidos por Roberts et al. (2018) que não verificaram diferenças significativas na viabilidade de células livres e imobilizadas após 15 dias de armazenamento de suco de maçã a 120 minutos de exposição às condições gastrointestinais simuladas. Em relação às células de *L. plantarum* microencapsuladas observa-se que a contagem celular foi mantida superior a  $6,0 \log \text{UFC.mL}^{-1}$ , entretanto, observou-

se uma diminuição da sobrevivência em relação ao tempo 0 (Figura 3 C). Como dito anteriormente, devido a presença de uma barreira física formada pelo material de parede, as células probióticas encapsuladas estavam mais protegidas, com isso, não ficaram expostas como as células livres sob as condições presentes no néctar misto de cenoura e acerola. Portanto, a adaptação e resistência de *L. plantarum* verificada nas células livres não foi observada para as células encapsuladas. Além disso, a possível solubilização das microcápsulas durante o período de armazenamento pode ter ocasionado a exposição das células de *L. plantarum* associadas a essa fração aos fluidos gástricos, o que explica a redução observada em sua viabilidade.

De acordo com Nazzaro, Orlando, Fratianni, & Coppola, (2012), após a ingestão do alimento probiótico é necessário que no mínimo  $10^6$  - $10^7$  UFCg<sup>-1</sup> destes microrganismos possa atingir o ponto específico de atuação (intestino delgado ou intestino grosso) e exercer o efeito desejado. Verifica-se que no néctar misto de cenoura e acerola contendo células probióticas logo após o seu preparo (tempo 0) e após 28 dias de armazenamento as células de *L. plantarum* microencapsuladas apresentavam viabilidade celular acima de 6,0 log UFC.mL<sup>-1</sup> contendo, portanto, a quantidade mínima de células viáveis recomendada, em contraste, no tratamento contendo as células livres de *L. plantarum* a viabilidade celular no tempo 0 foi de 4,70 log UFC.mL<sup>-1</sup> sendo necessário uma ingestão de aproximadamente 100 mL do produto para se obter os benefícios dos probióticos.

#### 4. CONCLUSÕES

As microcápsulas contendo as células de *L. plantarum* não alteraram as características físico químicas (pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e atividade de água) e funcionais ( $\beta$ -caroteno, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante) do néctar misto de cenoura e acerola, quando comparado ao néctar contendo células livres.

O microencapsulamento das células de *L. plantarum* adicionados ao néctar misto de cenoura e acerola, ofereceu proteção às condições adversas do trato gastrointestinal durante o armazenamento refrigerado sobretudo no início da vida de prateleira

Desta forma, a microencapsulamento de células probióticas de *L. plantarum* utilizando a dupla emulsificação seguido de coacervação complexa se mostrou eficiente por aprisionar e proteger as células principalmente no início da estocagem garantindo a ingestão de elevado número de *L. plantarum*, responsável por promover benefícios ao hospedeiro.

O néctar de misto de cenoura e acerola apresentou-se como uma excelente matriz carreadora de *L. plantarum* sendo uma alternativa para a população que não consomem derivados lácteos probióticos.

## 5. AGRADECIMENTOS

Agradecemos ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro deste estudo.

## 6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, B.; GANI, A.; GANI, A.; SHAH, A.; AHMAD, F. 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, 2018.

ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS – AOAC. (2000). Official *Methods of Analysis of the AOAC*. 16. ed. Washington, DC.

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

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

BEDANI, R.; ROSSI, E. A.; SAAD, S. M. I. 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, n. 2, p. 382–389, 2013.

BERISTAIN-BAUZA, S. C.; MANI-LÓPEZ, E.; PALOU, E.; LÓPEZ-MALO, A. Antimicrobial activity and physical properties of protein films added with cell-free supernatant of *Lactobacillus rhamnosus*. **Food Control journal**, v. 62, p. 44–51, 2016.

BRAND-WILLIAMS, W.; CUVELIER, M. E.; BERSET, C. Use of a Free Radical Method to Evaluate Antioxidant Activity. **LWT - Food Science and Technology**, v.28, p. 25-30, 1995.

CAMPOS, R. C. de A. B.; MARTINS, E. M. F.; PIRES, B. de A.; PELUZIO, M. do C. G.; CAMPOS, A. N. da; ROCHA; RAMOS, A. M.; JÚNIOR, B. R. de C. L.; MARTINS, A. D. de O.; SILVA, R. R. da; MARTINS, M. L. 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**, v. 116, n. November 2017, p. 1247–1257, 2019.

CECILIA, A.; AGUAYO, E.; ARTÉS, F. Shelf-life and quality attributes in fresh-cut Galia

melon combined with fruit juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 343–348, 2013.

CHIM, J. F.; ZAMBIAZI, R. C. Estabilidade da vitamina C em néctar de acerola sob diferentes condições de estocagem. **Revista Brasileira de Produtos Agroindustriais**, v. 15, n. 4, p. 321–327, 2013.

COMUNIAN, T. A.; THOMAZINI, M.; ALVES, A. J. G.; DE MATOS JUNIOR, F. E.; DE CARVALHO BALIEIRO, J. C.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013.

CORCORAN, B. M.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Survival of Probiotic *Lactobacilli* in Acidic Environments Is Enhanced in the Presence of Metabolizable Sugars. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 6, p. 3060–3067, 2005.

COSTA, M. G. M.; FONTELES, T. V.; DE JESUS, A. L. T.; RODRIGUES, S. Sonicated pineapple juice as substrate for *L. casei* cultivation for probiotic beverage development: Process optimisation and product stability. **Food Chemistry**, v. 139, n. 1–4, p. 261–266, 2013.

COUSIN, M. A.; JAY, J. M.; VASAVADA, P. C. Psychrotrophic microorganisms. DOWNES, F.P; ITO, K. (Ed.). **In: Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association –APHA, p. 159-166, 2001.

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Effectiveness of ascorbic acid as an oxygen scavenger in improving viability of probiotic bacteria in yoghurts made with commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, n. 6–7, p. 435–443, 1997.

EGHBAL, N.; YARMAND, M. S.; MOUSAVI, M.; DEGRAEVE, P.; OULAHAL, N.; GHARSALLAOUI, A. Complex coacervation for the development of composite edible films based on LM pectin and sodium caseinate. **Carbohydrate Polymers**, v. 151, p. 947–956, 2016.

FAO/WHO. (Food and Agriculture Organization of the United Nations, World Health Organization). **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Report of a Joint FAO/WHO Expert Consultation, Córdoba, Argentina, 2001.

FERRANDO, V.; QUIBERONI, A.; REINHEIMER, J.; SU, V. Functional properties of *Lactobacillus plantarum* strains : A study in vitro of heat stress in fl uence Ver o. **Food Microbiology**, v. 54, p. 154–161, 2016.

FURTADO, L. L.; MARTINS, M. L.; RAMOS, A. M.; DA SILVA, R.; LEITE, B. R.; MARTINS, E. Viability of probiotic bacteria in tropical mango juice and the resistance of the strains to gastrointestinal conditions simulated in Viabilidade de bactérias probióticas em suco tropical de manga e resistência das estirpes às condições gastrointestinais. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 40, n. 1, p. 149–162, 2019.

GANDOMI, H.; ABBASZADEH, S.; MISAGHI, A.; BOKAIE, S.; NOORI, N. Effect of

chitosan-alginate encapsulation with inulin on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG during apple juice storage and under simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 365–371, 2016.

GERVILLA, R.; GUAMIS, B.; SALDO, J. Effect of UHPH on indigenous microbiota of apple juice A preliminary study of microbial shelf-life. **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, n. 3, p. 261–267, 2010.

HAN, H. M.; KOH, B. K. Effect of phenolic acids on the rheological properties and proteins of hard wheat flour dough and bread. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 91, n. 13, p. 2495–2499, 2011.

JABBAR, S.; ABID, M.; HU, B.; WU, T.; MUHAMMAD, M.; LEI, S.; ZHU, X.; ZENG, X. Quality of carrot juice as influenced by blanching and sonication treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 55, n. 1, p. 16–21, 2014.

KERRY, G. R.; PATRA, K. J.; GOUDA, S.; PARK, Y.; SHIN, H.; DAS, G. ScienceDirect Benefaction of probiotics for human health : A review. **Journal of Food and Drug Analysis**, v. 26, n. 3, p. 927–939, 2018.

KOURKOUTAS, Y. Ã.; KANELLAKI, M.; KOUTINAS, A. A. Apple pieces as immobilization support of various microorganisms. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, p. 980–986, 2006.

LI, L.; FENG, L.; YI, J.; HUA, C.; CHEN, F.; LIAO, X.; WANG, Z.; HU, X. High hydrostatic pressure inactivation of total aerobic bacteria , lactic acid bacteria , yeasts in sour Chinese cabbage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 180–184, 2010.

LUIZ, A.; VELOSO, H.; RODRIGUES, S.; KELLY, V.; ABREU, G.; OLIVEIRA, T. De; FARIA, W.; NARAIN, N.; LÚCIA, A.; PEREIRA, F. Production and stability of probiotic cocoa juice with sucralose as sugar substitute during refrigerated storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 99, n. July 2018, p. 371–378, 2019.

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

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

MOREIRA, R.; LOPES, M.; RICARDO, B.; LEITE, D. C.; MAURÍCIO, E.; MARTINS, F.; PAULO, C.; CABRAL, D.; OLIVEIRA, D.; CUNHA, D.; PEREIRA, D. S. LWT - Food Science and Technology mango juice mixture with added Development of a juçara and Uba *Lactobacillus rhamnosus* GG processed by high pressure. **LWT - Food Science and Technology**, v. 77, 2017.

MOUSAVI, Z. E.; MOUSAVI, S. M.; RAZAVI, S. H.; KIANI, H. Fermentation of pomegranate juice by probiotic lactic acid bacteria. **World J Microbiol Biotechnol**, v. 27, p. 123–128, 2011.

NAGATA, M.; YAMASHITA, I. Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomatoes fruit. **Journal of the Japanese Society for food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 925-928, 1992

NAKKARACH, A.; WITHAYAGIAT, U. Comparison of synbiotic beverages produced from riceberry malt extract using selected free and encapsulated probiotic lactic acid bacteria. **Agriculture and Natural Resources**, v. 52, n. 5, p. 467–476, 2018.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182–186, 2012.

PANDA, S. K.; BEHERA, S. K.; WITNESS QAKU, X.; SEKAR, S.; NDINTEH, D. T.; NANJUNDASWAMY, H. M.; RAY, R. C.; KAYITESI, E. Quality enhancement of prickly pears (*Opuntia* sp.) juice through probiotic fermentation using *Lactobacillus fermentum* - ATCC 9338. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 453–459, 2017.

QUEIROZ, L.; EDUARDO, Z. I.; LUCY, J. I. L.; FRIES, M.; I, N. N. T. Microencapsulação de probióticos : avanços e perspectivas. **Ciência Rural**, p. 1–8, 2013.

RAMOS, P. E.; ABRUNHOSA, L.; PINHEIRO, A.; CERQUEIRA, M. A.; MOTTA, C.; CASTANHEIRA, I.; CHANDRA-HIOE, M. V.; ARCOT, J.; TEIXEIRA, J. A.; VICENTE, A. A. Probiotic-loaded microcapsule system for human in situ folate production: Encapsulation and system validation. **Food Research International**, v. 90, p. 25–32, 2016.

REDDY, L. V.; MIN, J.; WEE, Y. Production of Probiotic Mango Juice by Fermentation of Lactic Acid Bacteria. **Microbial Biotechnoly**, v. 43, p. 120–125, 2015.

RICHTER, R. L., VEDAMUTHU, E. R. (2001). Milk and milk products. In: Downes, F. P., & Ito, K. (Ed.). **Compendium of methods for the microbiological examination of foods**. 4.ed. Washington: American Public Health Association - APHA, p. 483-495.

RITA, M.; PORTO, A.; OKINA, V. S.; PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, H.; RITA, M.; PORTO, A.; OKINA, V. S.; PIMENTEL, T. C.; GARCIA, S.; GARCIA, S.; PRUDENCIO, S. H. Beet and orange mixed juices added with *Lactobacillus acidophilus*. **Nutrition & Food Science**, v. 48, pp 76-78, 2018.

ROBERTS, D.; REYES, V.; BONILLA, F.; DZANDU, B.; LIU, C.; CHOULJENKO, A.; SATHIVEL, S. Viability of *Lactobacillus plantarum* NCIMB 8826 in fermented apple juice under simulated gastric and intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 97, n. June, p. 144–150, 2018.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M. E.; ESTRADA-FERNÁNDEZ, A. G.; GARCÍA-ALMENDÁREZ, B. E.; LUDEÑA-URQUIZO, F.; CAMPOS-MONTIEL, R. G.; PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J. Viability of *Lactobacillus plantarum* entrapped in double emulsion during Oaxaca cheese manufacture , melting and simulated intestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**, v. 59, p. 768–773, 2014.

ROUXINOL-DIAS, A. L.; PINTO, A. R.; JANEIRO, C.; RODRIGUES, D.; MOREIRA, M.; DIAS, J.; PEREIRA, P. Probiotics for the control of obesity – Its effect on weight change. **Porto**

**Biomedical Journal**, v. 1, n. 1, p. 12–24, 2016.

SAARELA, M.; VIRKAJÄRVI, I.; NOHYNEK, L.; VAARI, A.; MÄTTÖ, J. Fibres as carriers for *Lactobacillus rhamnosus* during freeze-drying and storage in apple juice and chocolate-coated breakfast cereals. **International Journal of Food Microbiology**, v. 112, p. 171–178, 2006.

SAPEI, L.; NAQVI, M. A.; ROUSSEAU, D. Stability and release properties of double emulsions for food applications. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 2, p. 316–323, jun. 2012.

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

SIDIRA, M.; SANTARMAKI, V.; KIOURTZIDIS, M.; ARGYRI, A. A.; PAPADOPOULOU, O. S.; CHORIANOPOULOS, N.; TASSOU, C.; KALOUTSAS, S.; GALANIS, ??lex; KOURKOUTAS, Y. Evaluation of immobilized *Lactobacillus plantarum* 2035 on whey protein as adjunct probiotic culture in yoghurt production. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 137–146, 2017.

SILVA, M. P.; TULINI, F. L.; MARTINS, E.; PENNING, M.; FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PONCELET, D. Comparison of extrusion and co-extrusion encapsulation techniques to protect *Lactobacillus acidophilus* LA3 in simulated gastrointestinal fluids. **LWT - Food Science and Technology**, v. 89, n. October 2017, p. 392–399, 2018.

TRIPATHI, M. K.; GIRI, S. K. Probiotic functional foods: Survival of probiotics during processing and storage. **Journal of Functional Foods**, v. 9, n. 1, p. 225–241, 2014.

WANG, B.; ADHIKARI, B.; BARROW, C. J. Optimisation of the microencapsulation of tuna oil in gelatin – sodium hexametaphosphate using complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 158, p. 358–365, 2014.

WESSMAN, P.; MAHLIN, D.; AKHTAR, S.; RUBINO, S.; LEIFER, K.; KESSLER, V.; HÅKANSSON, S. Impact of matrix properties on the survival of freeze-dried bacteria. **J Sci Food Agric**, p. 2518–2528, 2011.

ZHANG, Q.; WU, Y.; FEI, X. Effect of probiotics on body weight and body-mass index : a systematic review and meta-analysis of randomized , controlled trials. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 67, n. 5, p. 571–580, 2016.

ZHU, S.; WANG, C.; RAMASWAMY, H. S.; YU, Y. LWT - Food Science and Technology Phase transitions during high pressure treatment of frozen carrot juice and in fl uence on *Escherichia coli* inactivation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 79, p. 119–125, 2017.

## CONCLUSÃO GERAL

As condições otimizadas (pH 4,0 e proporção de biopolímeros 50:50) foram adequadas para a formação de microcápsulas por dupla emulsificação associada à coacervação complexa. Além disso, as microcápsulas apresentavam dispersibilidade de  $0,183 \pm 0,17 \text{ g.mL}^{-1}$ , umidade de 4,5%, atividade de água de  $0,34 \pm 0,03$ , higroscopicidade de  $9,20 \pm 0,43 \text{ g}$  de água absorvida por 100 g. e tamanho médio entre  $66,07 \pm 3,04 \mu\text{m}$  a  $105,66 \pm 3,24 \mu\text{m}$  que são consideradas características adequadas para aplicação em alimentos.

As microcápsulas obtidas a partir dupla emulsificação associada à coacervação complexa apresentaram elevada eficiência (97,78%) no encapsulamento de *L. plantarum* e resultados satisfatórios relacionados à viabilidade celular após simulação *in vitro* das condições gastrointestinais em comparação com células livres. Após a simulação *in vitro* das condições gastrointestinais, a viabilidade das células encapsuladas foi de 80,4%, enquanto que para as células livres foi de apenas 25,0% a 37 °C. A viabilidade das células probióticas foi mantida durante o armazenamento a 8 °C e -18 °C durante 45 dias.

As microcápsulas contendo as células de *L. plantarum* não alteraram as características físico químicas (pH, acidez total titulável, sólidos solúveis totais e atividade de água) e funcionais ( $\beta$ -caroteno, compostos fenólicos totais e capacidade antioxidante) do néctar misto de cenoura e acerola, quando comparado ao néctar contendo células livres. Verificando que o microencapsulamento das células de *L. plantarum* adicionados ao néctar misto de cenoura e acerola, ofereceu proteção às condições adversas do trato gastrointestinal durante o armazenamento refrigerado sobretudo no início da vida de prateleira

A aplicação das células de *L. plantarum* encapsuladas pela técnica de dupla emulsificação seguida de coacervação complexa apresentou-se como uma abordagem útil e promissora, representando uma nova alternativa a ser aplicada no desenvolvimento de alimentos funcionais. Além disso, o néctar misto de cenoura e acerola adicionado de células probióticas de *L. plantarum* encapsuladas pela técnica de dupla emulsificação e coacervação complexa é um novo produto, com potencial efeito probiótico, que pode ser uma alternativa para a população que não consome derivados lácteos, seja por questões de saúde ou filosofia de vida.