



LARISSA CAROLINA DE MORAIS

**PARTÍCULAS DE ALGINATO E MUCILAGEM DE ORA-
PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* MILLER) RECOBERTAS COM
QUITOSANA OU PROTEÍNA DO SORO DO LEITE PARA
ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus***

**LAVRAS - MG
2024**

LARISSA CAROLINA DE MORAIS

PARTÍCULAS DE ALGINATO E MUCILAGEM DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* MILLER) RECOBERTAS COM QUITOSANA OU PROTEÍNA DO SORO DO LEITE PARA ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS - MG
2024**

Ficha catalográfica elaborada pelo Sistema de Geração de Ficha Catalográfica da Biblioteca
Universitária da UFLA, com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

Morais, Larissa Carolina de.

Partículas de alginato e mucilagem de ora-pro-nobis (*Pereskia
aculeata* Miller) recobertas com quitosana ou proteína do soro do
leite para encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* / Larissa
Carolina de Moraes. - 2024.

94 p. : il.

Orientador(a): Jaime Vilela de Resende.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Lavras, 2024.
Bibliografia.

1. Hidrocoloide. 2. Interação eletrostática. 3. *Lactobacillus
acidophilus*. I. Resende, Jaime Vilela de. II. Título.

LARISSA CAROLINA DE MORAIS

PARTÍCULAS DE ALGINATO E MUCILAGEM DE ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* MILLER) RECOBERTAS COM QUITOSANA OU PROTEÍNA DO SORO DO LEITE PARA ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus*

ALGINATE AND MUCILAGE FROM ORA-PRO-NOBIS (*Pereskia aculeata* MILLER) PARTICLES COATED WITH CHITOSAN OR WHEY PROTEIN FOR ENCAPSULATION OF *Lactobacillus acidophilus*

Tese apresentada à Universidade Federal de Lavras, como parte das exigências do Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos, área de concentração em Ciência dos Alimentos, para a obtenção do título de Doutora.

APROVADA em 28 de março de 2024.

Dra. Isabelle Cristina de Oliveira Neves

UFSCar

Dr. Diego Alvarenga Botrel

UFLA

Dra. Lanamar de Almeida Carlos

UFSJ

Dr. Fabiano Freire Costa

UFJF

Prof. Dr. Jaime Vilela de Resende
Orientador

**LAVRAS – MG
2024**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, por me sustentar com a sua poderosa mão, por me abençoar e conceder saúde, força e discernimento necessários para realização do doutorado. Sem Ele eu não seria nada e não chegaria até aqui.

Ao meu esposo Eduardo, pelo apoio incondicional, por ser meu alicerce. Agradeço o amor, dedicação, paciência e por estar sempre ao meu lado.

Aos meus pais Ronildo e Roseléia e ao meu irmão Rawan que acompanharam minha longa trajetória acadêmica, sempre me incentivaram e nunca mediram esforços para ajudar no que fosse preciso.

Ao professor Dr. Jaime Vilela de Resende pela orientação, paciência, empatia, pela confiança depositada em mim e disposição em me assistir na execução deste trabalho. Que bom seria se todos os pós-graduandos fossem agraciados com “Jaimes” como orientadores.

A todos do Laboratório de Refrigeração de Alimentos, pelos ensinamentos, descontrações e por estarem sempre disponíveis para me auxiliar. Agradeço em especial à Ana Cristina pelo companheirismo, amizade, pelas palavras de incentivo e por toda a ajuda.

A professora Lizzy Ayra Alcântara Veríssimo, pela amizade, por todo o suporte e atenção concedidos.

Aos professores Diego Alvarenga Botrel e José Guilherme Lembi por cederem a estrutura necessária para a realização dos experimentos.

A técnica Aline Norberto do Laboratório de Microscopia Eletrônica e Análise Estrutural pelos ensinamentos e confiança.

A todos os funcionários do Departamento de Ciência dos Alimentos pelos conselhos, ajuda e convivência diária, em especial aos técnicos Creusa, Pâmela e Felipe.

A Universidade Federal de Lavras, ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos e ao Departamento de Ciência dos Alimentos, pela oportunidade.

Ao CNPq, CAPES e FAPEMIG pela concessão de bolsa de doutorado e apoio financeiro à pesquisa.

Muito obrigada!

*“Para que todos vejam, e saibam, e considerem, e juntamente entendam que a mão do Senhor
fez isto”*

Isaías 41:20.

RESUMO

Por ser rica em biopolímero arabinogalactana, a mucilagem de ora-pro-nóbis (MOPN), apresenta amplo potencial tecnológico aplicado à indústria de alimentos, inclusive na formação de partículas por gelificação iônica. No entanto, estudos mostram que as esferas formadas com MOPN e alginato apresentam grandes poros, que podem ser diminuídos com o revestimento dessas partículas com biopolímeros de carga oposta ao hidrogel, formando um complexo polieletrólito. Essa combinação de técnicas é amplamente empregada no setor alimentício e um campo de aplicação é a encapsulação de probióticos para produção de alimentos funcionais. O objetivo do presente trabalho foi sintetizar micropartículas de mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) e alginato de sódio (ALG) revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC) ou quitosana (QUI) para a encapsulação de *L. acidophilus* ATCC 4356 aplicados em sorvetes. As partículas foram produzidas por gelificação iônica empregando um delineamento composto central rotacional para otimizar as concentrações de biopolímeros que proporcionaram maior eficiência de encapsulação aos microrganismos. Essas esferas foram caracterizadas quanto à morfologia, distribuição de tamanho, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e teste de digestão *in vitro*. Posteriormente, as partículas foram adicionadas em sorvetes e a viabilidade dos probióticos foi avaliada durante 60 dias de armazenamento e também após teste de recristalização. Os resultados mostraram que *L. acidophilus* foi encapsulado com sucesso nas micropartículas sintetizadas com eficiência de encapsulação máxima de 96,86% para as esferas sem revestimento (SR_p), 98,40% para partículas revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) e 99,56% para os tratamentos revestidos com quitosana (QUI_p). As concentrações otimizadas de cada biopolímero foram de 0,6% (m/m) para MOPN, 0,9% (m/m) para ALG, 5,25% (m/m) para WPC e 1,2% (m/m) para QUI. As análises de potencial zeta e FTIR confirmaram o revestimento das partículas com WPC e QUI. As partículas sintetizadas apresentaram formato esférico e diâmetros médios de Sauter (D₃₂) que variaram de 172,50 a 272,25 µm. As microesferas QUI_p foram mais porosas, menos estáveis termicamente e apresentaram menores taxas de sobrevivência de microrganismos em condições de trato gastrointestinal simulado e em sorvetes, quando comparadas às demais. Já as micropartículas SR_p e WPC_p exibiram os melhores resultados de viabilidade para o teste de digestão *in vitro* (68,65% e 67,45%); para o armazenamento do sorvete (71,23% e 72,49%); e para viabilidade após ciclos de recristalização (93,32% e 92,47%). Os resultados para as células livres foram inferiores aos apresentados para as células microencapsuladas, confirmando a capacidade das micropartículas de MOPN e ALG, revestidas ou não, protegerem os microrganismos probióticos frente às condições adversas. Finalmente, foi possível atestar o potencial da MOPN na encapsulação de princípios ativos, sobretudo probióticos.

Palavras-chave: hidrocoloide; interação eletrostática; microrganismo; viabilidade; sorvete.

ABSTRACT

Because it is rich in arabinogalactan biopolymer, ora-pro-nóbis mucilage (MOPN) has broad technological potential applied to the food industry, including in the formation of particles by ionic gelation. However, studies show that spheres formed with MOPN and alginate have large pores, which can be reduced by coating these particles with biopolymers of opposite charge to the hydrogel, forming a polyelectrolyte complex. This combination of techniques is widely used in the food industry and one field of application is the encapsulation of probiotics for the production of functional foods. The objective of the present work was to synthesize microparticles of ora-pro-nobis mucilage (MOPN) and alginate (ALG) coated with whey protein concentrate (WPC) and chitosan (QUI) for the encapsulation of *L. acidophilus* ATCC 4356 applied in ice cream. The particles were produced by ionic gelation using a central rotational composite design to optimize the concentrations of biopolymers that provided greater encapsulation efficiency for the microorganisms. These spheres were characterized regarding morphology, size distribution, Fourier transform infrared spectroscopy (FTIR), thermogravimetric analysis (TGA) and in vitro digestion test. Subsequently, the particles were added to ice cream and the viability of the probiotics was evaluated during 60 days of storage and also after recrystallization test. The results showed that *L. acidophilus* was successfully encapsulated in the synthesized microparticles with maximum encapsulation efficiency of 96.86% for uncoated spheres (SRp), 98.40% for particles coated with whey protein concentrate (WPCp) and 99.56% for treatments coated with chitosan (QUIp). The optimized concentrations of each biopolymer were 0.6% (m/m) for MOPN, 0.9% (m/m) for ALG, 5.25% (m/m) for WPC and 1.2% (m /m) for QUI. Zeta potential and FTIR analyzes confirmed the coating of the particles with WPC and QUI. The synthesized particles had a spherical shape and average Sauter diameters (D32) that ranged from 172.50 to 272.25 μm . The QUIp microspheres were more porous, less thermally stable and showed lower survival rates of microorganisms in the simulated gastrointestinal tract and in ice cream, when compared to the others. The SRp and WPCp microparticles showed the best viability results for the in vitro digestion test (68.65% and 67.45%); for storing ice cream (71.23% and 72.49%); and for viability after recrystallization cycles (93.32% and 92.47%). The results for free cells were lower than those presented for microencapsulated cells, confirming the ability of MOPN and ALG microparticles, coated or not, to protect probiotic microorganisms against adverse conditions. Finally, it was possible to attest to the potential of MOPN in encapsulating active ingredients, especially probiotics.

keywords: hydrocolloid; electrostatic interaction; microorganism; viability; ice cream.

INDICADORES DE IMPACTO

O presente trabalho mostrou-se promissor no intuito de investigar novas vertentes da MOPN, associando tal hidrocoloide a outros biopolímeros para a encapsulação de microrganismos probióticos e para a produção de um sorvete funcional, obtendo resultados positivos quanto à eficiência de encapsulação ($EE \geq 74,73 \%$) e quanto à resistência dos probióticos frente a condições adversas. Por ser uma hortaliça não convencional e crescer em ambientes áridos a ora-pro-nobis, bem como a mucilagem obtida a partir dessa planta, apresentam um baixo custo de produção contribuindo para a diminuição dos custos relacionados a encapsulação de princípios ativos, impactando economicamente tal setor. Além disso, o emprego dessa nova fonte de hidrocoloide pode ser visto como uma forma de ampliar e diversificar a tecnologia de encapsulação voltada para a indústria de alimentos, sobretudo, a de alimentos funcionais. O fato de desenvolvermos partículas capazes de proteger microrganismos probióticos frente a condições adversas durante a produção e armazenamento de um sorvete funcional contribui para que o alimento ofereça benefícios à saúde do consumidor, como regulação do trânsito e peristaltismo intestinal, estímulo à proliferação de bactérias benéficas e aumento da resistência contra microrganismos patogênicos. Sendo assim, podemos observar que o presente estudo pode impactar tecnológica e economicamente a indústria de alimentos, além de contribuir de forma considerável para a saúde e o bem-estar dos consumidores por meio da ingestão de um alimento rico em probióticos (*Lactobacillus acidophilus*).

IMPACT INDICATORS

The present work showed promise for investigating new aspects of MOPN, associating this hydrocolloid with other biopolymers for the encapsulation of probiotic microorganisms and for the production of a functional ice cream, obtaining positive results in terms of encapsulation efficiency ($EE \geq 74, 73 \%$) and regarding the resistance of probiotics to adverse conditions. As it is an unconventional vegetable and grows in arid environments, ora-pro-nobis, as well as the mucilage obtained from this plant, has a low production cost, contributing to the reduction of costs related to the encapsulation of active ingredients, impacting the economy of this sector. Furthermore, the use of this new source of hydrocolloid can be seen as a way to expand and diversify encapsulation technology aimed at the food industry, especially functional foods. The fact that we develop particles capable of protecting probiotic microorganisms against adverse conditions during the production and storage of a functional ice cream contributes to the food offering health benefits to the consumer, such as regulating intestinal transit and peristalsis, stimulating the proliferation of beneficial bacteria. and increased resistance against pathogenic microorganisms. Therefore, we can observe that the present study can have a technological and economic impact on the food industry, in addition to contributing considerably to the health and well-being of consumers through the ingestion of a food rich in probiotics (*Lactobacillus acidophilus*).

LISTA DE FIGURAS

PRIMEIRA PARTE

Figura 1 - Morfologia das diferentes partículas obtidas por encapsulação.	17
Figura 2 - Modelo de caixa de ovos gerado pela gelificação iônica.	19
Figura 3 - Gelificação iônica externa.	20
Figura 4 - Esquema de interação eletrostática.	21
Figura 5 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- (formados a partir de resíduos de ácido manurônicos e gulurônicos, respectivamente) e dos blocos heteropoliméricos M-G-M-, que constituem a molécula de alginato.	24
Figura 6 - Estrutura da arabinogalactana do tipo I. Cadeia principal β -D-galactopiranosose (1,4) e ramificações de β -D-galactopiranosose (1,6) e α -L-arabinofucose.	27
Figura 7 - Desacetilação da quitina e formação da quitosana - estrutura.	29

SEGUNDA PARTE

Figura 1 - Fluxograma de produção do sorvete probiótico.	56
Figura 2 - Curvas de crescimento de <i>L. acidophilus</i> ATCC 4356 (a) Log UFC.mL ⁻¹ X Densidade óptica (600 nm); (b) Densidade óptica (600 nm) X Tempo.	59
Figura 3 - Curva de contorno para a eficiência de encapsulação levando em consideração as variáveis (a) MOPN e ALG nos tratamentos revestidos com WPC, (b) MOPN e ALG nos tratamentos revestidos com QUI, (c) MOPN e WPC, (d) MOPN e QUI, (e) ALG e WPC, (f) ALG e QUI.	65
Figura 4 - Fotomicrografias com aumento de 40 x das micropartículas (a) SR _p (b) WPC _p (c) QUI _p	68
Figura 5 - Eletromicrografias de varredura das micropartículas (a) SR _p - 2000 x; (b) SR _p - 10000 x; (c) WPC _p - 2000 x; (d) WPC _p - 10000 x; (e) QUI _p - 2000 x; (F) QUI _p - 10000 x.	70
Figura 6 - Distribuição de tamanho das micropartículas sem revestimento SR _p , revestidas com concentrado proteico de soro de leite WPC _p , ou revestidas com quitosana QUI _p	71
Figura 7 - Espectro de FTIR para os biopolímeros ALG, MOPN, QUI, WPC e para as micropartículas SR _p , WPC _p , QUI _p	73

Figura 8 - Curvas de TGA para as micropartículas sem revestimento (SR _p); revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC _p) e revestidas com quitosana (QUI _p).	76
Figura 9 - Viabilidade ao longo do armazenamento de <i>L. acidophilus</i> adicionados no sorvete na forma livre (LIVRES), em micropartículas sem revestimento SR _p , revestidas com concentrado proteico de soro de leite WPC _p , e revestidas com quitosana QUI _p	83
Figura 10 - Micrografia de fluorescência dos sorvetes adicionados das micropartículas (a) SR _p – 0 dias; (b) SR _p – 60 dias; (c)WPC _p – 0 dias; (d)WPC _p – 60 dias; (e) QUI _p – 0 dias; (f) QUI _p – 61 dias; (g) Células livres – 0 dias; (h) Células livres – 60 dias;.....	84

LISTA DE TABELAS

SEGUNDA PARTE

Tabela 1 - Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para micropartículas recobertas com concentrado proteico de soro de leite.	50
Tabela 2 - Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para micropartículas recobertas com quitosana.	51
Tabela 3 - Delineamento composto central rotacional com os resultados de eficiência de encapsulação para as micropartículas produzidas.	61
Tabela 4 - Caracterização das soluções poliméricas formadoras das micropartículas.	66
Tabela 5 - Diâmetro médio (D32) e índice de polidispersividade (Span) das micropartículas SR _p , WPC _p e QUI _p	72
Tabela 6 - Estabilidade térmica das micropartículas no segundo estágio de degradação.	77
Tabela 7 - Taxa de sobrevivência dos <i>L. acidophilus</i> encapsulados e livres em condição gastrointestinal simulada.	78
Tabela 8 - Taxa de sobrevivência dos <i>L. acidophilus</i> nos sorvetes.	81

SUMÁRIO

	PRIMEIRA PARTE	13
1	INTRODUÇÃO	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo geral	15
2.2	Objetivos específicos	15
3	REFERENCIAL TEÓRICO	17
3.1	Encapsulação	17
3.2	Gelificação iônica	18
3.3	Interação eletrostática	21
3.4	Materias poliméricos formadores de partículas	22
3.4.1	Alginato	24
3.4.2	Mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN)	25
3.4.3	Quitossana	28
3.4.4	Proteína do soro do leite	30
3.5	Probióticos	31
3.6	Sorvete como material carreador de probiótico	33
	REFERÊNCIAS	35
	SEGUNDA PARTE	44
	ARTIGO	44
	TERCEIRA PARTE	94
	CONSIDERAÇÕES FINAIS	94

PRIMEIRA PARTE

1 INTRODUÇÃO

A encapsulação é uma tecnologia que permite o revestimento de compostos sólidos, gotículas de líquidos ou gases, através de diferentes tipos de materiais poliméricos, convertendo-os em produtos de maior conveniência e aplicabilidade. Seu principal objetivo é proporcionar proteção ao material encapsulado contra condições adversas do meio externo (umidade, calor, pH, oxigênio e luz) e, permitir sua liberação controlada em locais específicos, mediante certos estímulos (Nezamdoost-Sani et al., 2024; Paulo; Santos, 2017).

A técnica de encapsulação vem sendo extensivamente estudada e, devido à sua grande versatilidade quanto à materiais e métodos empregados, essa tecnologia apresenta aplicações em diversos setores como: indústria alimentícia, química, farmacêutica, biomédica, agrícola, têxtil, de energia, entre outras (Afzaal et al., 2019; Etchepare et al., 2015; Guilherme et al., 2015; Paulo; Santos, 2017; Treenate; Monvisade, 2017)

Quanto às metodologias, a encapsulação oferece uma gama de opções, variando entre métodos físicos, químicos e físico-químicos. Neste último grupo, destaca-se a gelificação iônica por ser uma técnica simples, rápida e de fácil execução, na qual partículas de gel são formadas a partir de ligações cruzadas entre polímeros e íons bivalentes, sobretudo Ca^{2+} (Etchepare et al., 2015; Nezamdoost-Sani et al., 2024).

O principal polímero empregado na gelificação iônica é o alginato de sódio que consiste em um heteropolissacarídeo natural, biocompatível, biodegradável que forma gel instantaneamente em contato com íons cálcio (Funami et al., 2009; Wang et al., 2022). Todavia, tem-se intensificado a busca por novos materiais poliméricos, como hidrocoloides, que possibilitem a formação de gel e conseqüentemente a encapsulação de princípios ativos por gelificação iônica (Rodrigues et al., 2022; Salehi et al., 2015). Neste contexto, cactáceas, como o ora-pro-nobis, revelam-se como fontes de hidrocoloides com potencial aplicação para encapsular substâncias devido à composição rica em polissacarídeos e proteínas (Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Takeiti et al., 2009).

A planta *Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida no Brasil como ora-pro-nobis (OPN), é uma cactácea que, além de apresentar baixo custo de produção, contém um alto teor de biopolímero arabinogalactana, encontrando desta maneira, aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica (Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Nogueira Silva et al., 2023).

Nos últimos anos, o potencial tecnológico da mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) vem sendo explorado como agente espessante, emulsificante e gelificante na produção de petit suisse (Silva et al., 2021) e bebidas lácteas fermentadas (Amaral et al., 2018) como agente formador de nanoemulsões (Lago et al., 2019), na produção de filmes poliméricos (Oliveira et al., 2019) e também como material de parede para encapsulação de α -tocoferol por liofilização (Neves et al., 2020; Oliveira et al., 2023).

Em estudo recente foi avaliada a capacidade da MOPN na formação de partículas de hidrogéis e foi verificado que a mucilagem atuou juntamente com o alginato de sódio na reticulação da cadeia polimérica. No entanto, as esferas apresentaram elevada porosidade, alta difusão e baixa resistência mecânica (Morais et al., 2023). Visando a diminuição dessa porosidade e a melhora das características de proteção da partícula, tem sido proposta a aplicação de um revestimento através de interações eletrostáticas pela adição de um polieletrólito (polissacarídeo ou proteína) de carga elétrica oposta à apresentada pelo gel, formando os chamados complexos polieletrólitos (Etchepare et al., 2015, 2020).

Nessa vertente o uso de quitosana e proteína do soro do leite apresenta-se interessante, já que em valores de pH inferiores ao pKa da quitosana e ao ponto isoelétrico das proteínas do soro, tais polímeros apresentam-se carregados positivamente, podendo interagir com os grupamentos carboxílicos da superfície das partículas de gelificação, formando complexos estáveis sobre a partícula (McClements, 2017).

No ramo alimentício, estudos têm mostrado que partículas recobertas com quitosana e proteína do soro do leite tem sido empregadas com sucesso na encapsulação de óleos, compostos bioativos, microrganismos probióticos, entre outros (Etchepare et al., 2020; Etchepare et al., 2015; Krasaekoopt; Bhandari; Deeth, 2006; Ribeiro et al., 2014a). Ressalta-se que as pesquisas com probióticos têm se intensificado devido ao interesse crescente da população por alimentos funcionais que garantam benefícios a saúde humana (Misra; Pandey; Mishra, 2021). Neste contexto, microrganismos probióticos vem ganhando cada vez mais espaço no mercado, sobretudo no setor lácteo cujos produtos apresentam características físico-químicas, como teor de sólidos totais e pH, favoráveis para o carregamento de cepas probióticas (Afzaal et al., 2019, 2020; Zaeim et al., 2020).

Sorvetes são sobremesas lácteas que se apresentam como bons carreadores de probióticos. Contudo, a integridade e viabilidade dos microrganismos, mesmo encapsulados, é ameaçada pelos processos de congelamento e recristalização, uma vez que a formação e o crescimento de cristais de gelo acarretam danos à parede celular, causando a morte dos

microrganismos probióticos (Homayouni, 2012; Soukoulis; Fisk; Bohn, 2014; Zaeim et al., 2020).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como intuito explorar a mucilagem de ora-pro-nobis como material encapsulante, empregando diferentes biopolímeros para revestimento das partículas, a fim de torná-las aptas para proteger os microrganismos probióticos durante o congelamento e a recristalização de sorvetes.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Sintetizar e caracterizar partículas de alginato de sódio e mucilagem de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) recobertas com quitosana ou concentrado proteico do soro do leite, utilizando-as para encapsular probióticos aplicados em sorvetes.

2.2 Objetivos específicos

- Produzir diferentes partículas a partir dos polímeros naturais alginato de sódio e mucilagem de ora-pro-nobis por gelificação iônica;
- Produzir diferentes partículas empregando concentrado proteico de soro de leite ou quitosana como material de revestimento;
- Otimizar as concentrações de cada biopolímero para uma maior eficiência de encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356.
- Determinar a carga elétrica líquida das soluções de biopolímero formadoras das partículas;
- Caracterizar as partículas através de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV);
- Caracterizar as propriedades químicas e térmicas das partículas por meio de espectroscopia de Infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) e análise termogravimétrica (TGA);
- Analisar a viabilidade *in vitro* de *L. acidophilus* encapsulados em suco gástrico e suco intestinal simulados;
- Aplicar *L. acidophilus* livres e encapsulados em sorvetes;

- Analisar a viabilidade dos *L. acidophilus* livres e encapsulados durante 60 dias de armazenamento do sorvete e também sob condições de recristalização desse alimento;

3 REFERENCIAL TEÓRICO

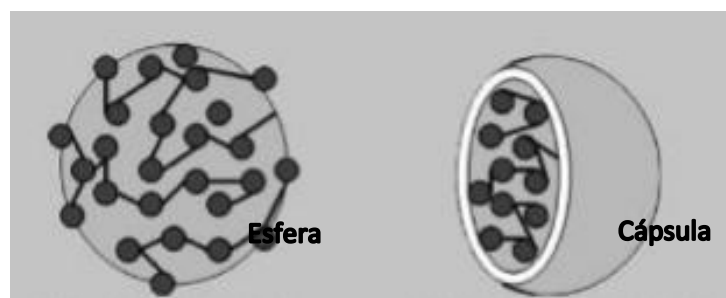
3.1 Encapsulação

A tecnologia de encapsulação foi apresentada pela primeira vez na década de 1950 por Green e Schleicher com um registro de patente para a preparação de cápsulas contendo corantes, que foram desenvolvidas para serem incorporadas ao papel para fins de cópia. Desde então, a metodologia passou por constantes avanços sendo empregada para as mais diversas finalidades (Paulo; Santos, 2017).

A encapsulação consiste em um conjunto de técnicas que permitem aprisionar ou revestir princípios ativos (sólidos, líquidos ou gasosos) com um material transportador a fim de formar partículas em escala macro, micro ou nanométrica. Os materiais revestidos (agente ativo) são também designados como núcleo, enchimento ou fase interna, enquanto os materiais de revestimento (material transportador) são conhecidos como material de parede, membrana, casca, matriz ou fase externa (Devi et al., 2017; Paulo; Santos, 2017)

Morfologicamente, o produto da encapsulação pode ser classificado como cápsula ou esfera. No primeiro caso, uma partícula mononucleada é envolvida por uma parede com estrutura do tipo reservatório. Já no caso das esferas, o agente ativo polinucleado encontra-se disperso no material de parede, em estrutura semelhante à uma esponja (Figura 1) (Pereira et al., 2018).

Figura 1 - Morfologia das diferentes partículas obtidas por encapsulação.



Fonte: Beraldo (2016).

O principal objetivo da encapsulação é proteger determinados compostos modulando seu perfil de liberação e convertendo-os em produtos de maior conveniência e aplicabilidade (Nezamdoost-Sani et al., 2024). Ademais, a técnica pode ser empregada para aumentar a

estabilidade de princípios ativos, impedir a volatilização dos mesmos, bem como mascarar propriedades indesejáveis. Devido a sua grande versatilidade, a encapsulação apresenta aplicações em diversos setores como: indústria alimentícia, química, farmacêutica, biomédica, agrícola, de energia, entre outras (Afzaal et al., 2019; Etchepare et al., 2015; Guilherme et al., 2015; Paulo; Santos, 2017; Treenate; Monvisade, 2017).

A indústria de alimentos é a segunda principal força motriz para o progresso da encapsulação. Neste setor, os métodos são utilizados para revestir ingredientes funcionais, bioativos, enzimas ou probióticos, compostos que geralmente apresentam alta instabilidade em matriz alimentícia, podendo sofrer degradação em condições adversas de pH, temperatura, luminosidade, umidade e oxigenação. Neste caso, as cápsulas e esferas revelam-se como uma estratégia para preservar a estabilidade de vitaminas, minerais, corantes, acidulantes, antioxidantes, controlando reações oxidativas e possibilitando a liberação controlada de tais compostos. Além disso, as partículas podem potencializar sabores e aromas específicos, mascarar odores indesejáveis ou mesmo aumentar a bioatividade dos ingredientes (Paulo; Santos, 2017).

Apesar das inúmeras aplicações, aspectos básicos, como a metodologia empregada na formação das partículas, devem ser considerados para que os sistemas encapsulados atinjam sua finalidade. A escolha do método vai depender das características físico-químicas do material que foi carregado e do polímero encapsulante, assim como as propriedades de barreira e liberação desejadas para o produto final que foi obtido (Jones; Decker; McClements, 2010).

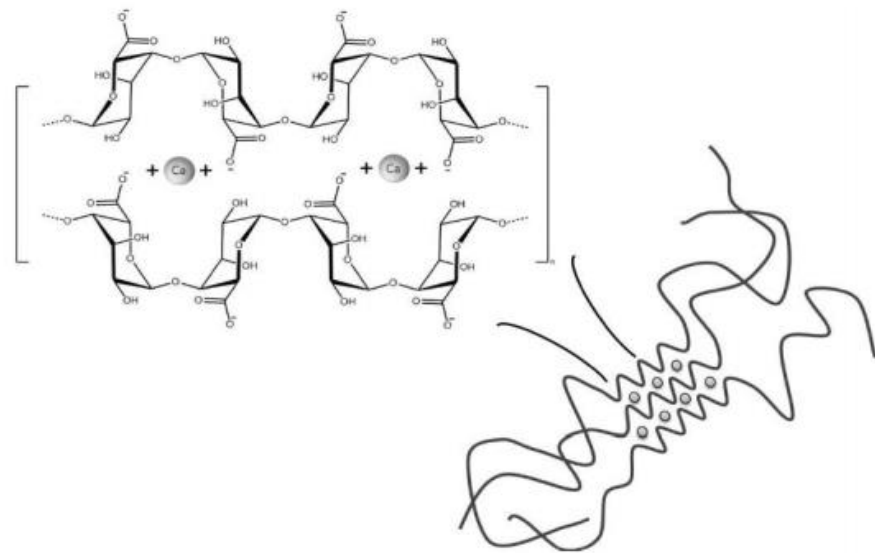
A literatura relata uma infinidade de técnicas físicas, químicas ou físico-químicas para encapsular compostos. Dentre os métodos físicos, é possível citar a técnica de atomização, spray dryer e liofilização. No caso dos métodos químicos, as técnicas mais utilizadas são as de emulsão ou polimerização interfacial, inclusão molecular e cocristalização. Em se tratando de métodos físico-químicos, incluem-se a coacervação, envolvimento lipossômico e gelificação iônica, sendo a última amplamente empregada no setor alimentício por ser simples e utilizar condições amenas na produção das esferas (Etchepare et al., 2015; Nezamdoost-Sani et al., 2024; Parra Huertas, 2010).

3.2 Gelificação iônica

A produção de partículas através da gelificação iônica é baseada na capacidade dos polieletrólitos fazerem ligações cruzadas na presença de contra-íons, formando uma estrutura em malha tridimensional, conhecida como o modelo de caixa de ovos (Etchepare et al., 2015).

Por esse método, uma solução polimérica carregada negativamente forma ligações com cátions de baixa massa molecular, formando partículas também denominadas como contas, beads ou hidrogéis (Castelo; Silva; Furtado, 2020; Prezotti; Cury; Evangelista, 2014).

Figura 2 - Modelo de caixa de ovos gerado pela gelificação iônica.



Fonte: Etchepare et al. (2015).

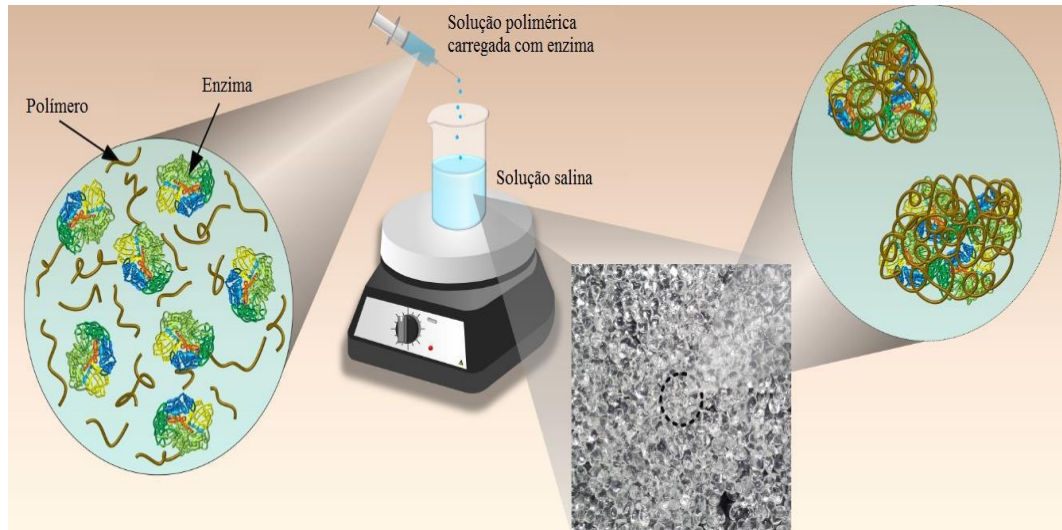
A gelificação iônica pode ocorrer de forma interna ou externa. No primeiro caso, a produção de partículas se dá pela liberação de íons divalente, como o cálcio, inicialmente na forma de um sal insolúvel, na solução/emulsão do polissacarídeo contendo material ativo. O processo de gelificação tem início a partir da mudança de pH do sistema por adição de uma solução ácida. A diminuição do pH provoca a liberação dos íons cálcio, permitindo assim a complexação deste íon com os grupos carboxílicos dos polissacarídeos, possibilitando a formação do gel (Holkem; Codevilla; Menezes, 2015).

Já a gelificação externa (Figura 3) é uma técnica cuja as partículas são produzidas pelo gotejamento de uma solução polimérica negativamente carregada em uma solução catiônica, normalmente contendo cálcio sob agitação constante. A formação das ligações cruzadas ocorre por meio da difusão dos cátions para dentro da solução de hidrocoloide. Isto é, as ligações cruzadas desenvolvem-se lenta e progressivamente da superfície para o interior da partícula gelificada ao longo do tempo (Castelo; Silva; Furtado, 2020; Etchepare et al., 2015; Prezotti; Cury; Evangelista, 2014).

Neste contexto, vale ressaltar que as propriedades das partículas como resistência mecânica, cinética da formação do gel, volume, porosidade, estabilidade e difusividade são

influenciadas diretamente pela concentração de hidrocoloides e de cátions, pelo tempo de reticulação, pela força iônica e finalmente pelo pH da solução, de maneira que o controle de tais parâmetros é imprescindível para que as partículas atendam suas finalidades (Castelo; Silva; Furtado, 2020).

Figura 3 - Gelificação iônica externa.



Fonte: Silva (2017).

Além de proteger e manter viáveis os agentes ativos frente as variações do meio (temperatura, oxigenação, luz, pH), a gelificação iônica ainda apresenta como vantagens a simplicidade e rapidez na síntese dos hidrogéis e o baixo custo de reprodução, o que justifica os inúmeros estudos empregando a técnica para encapsular enzimas, probióticos, antioxidantes, ácidos graxos poli-insaturados e demais compostos bioativos (Larosa et al., 2018; Sampaio et al., 2019; Silverio et al., 2018; Voo et al., 2016).

Todavia a principal desvantagem das partículas produzidas por esta técnica é a dificuldade em controlar a taxa de liberação do material encapsulado por um longo período. A formação de grandes poros na superfície de hidrogéis reticulados ionicamente, contribuem para uma maior sensibilidade das partículas a valores de pH extremos, o que facilita a perda de princípio ativo por lixiviação ou difusão (Etchepare et al., 2015).

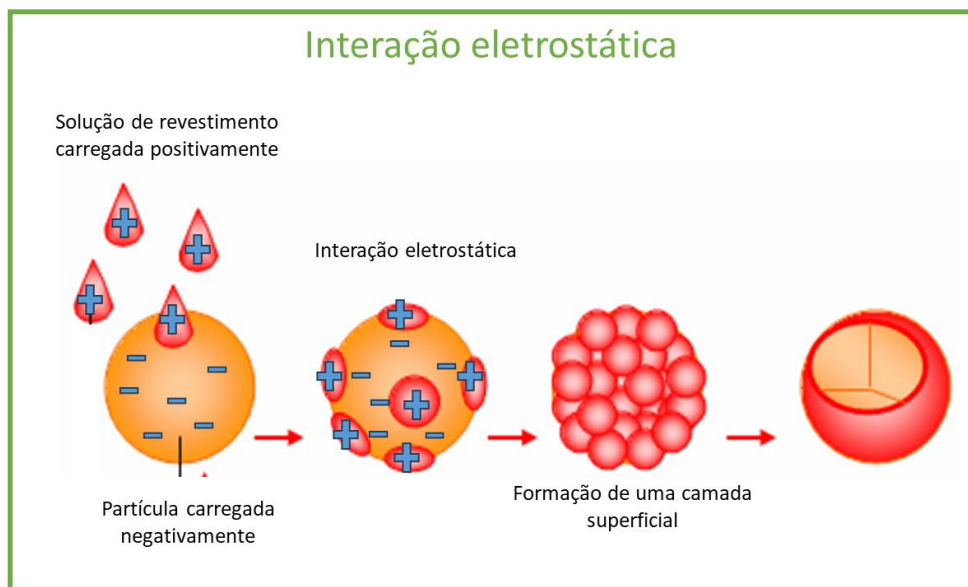
Autores como Iqbal et al. (2019), Krasaekoopt; Watcharapoka (2014) e Ng et al. (2019) mostraram em seus estudos que uma alternativa viável para melhorar a estabilidade e a porosidade dessas partículas é o recobrimento das mesmas com polieletrólitos de cargas opostas. Dessa forma, a interação eletrostática entre a superfície dos hidrogéis e os polietrólitos

diminui o número e o diâmetro dos poros na rede do gel conferindo maior proteção ao material encapsulado.

3.3 Interação eletrostática

A interação eletrostática (Figura 4) ocorre quando biopolímeros de cargas elétricas opostas interagem entre si, ou seja, policátions se associam à poliânions produzindo complexos polieletrólitos que permitem o desenvolvimento de hidrogéis ou partículas mais estáveis devido a formação de uma dupla parede na superfície das partículas (Etchepare et al., 2015, 2016, 2020).

Figura 4 - Esquema de interação eletrostática.



Fonte: Do autor (2024).

A associação entre dois polieletrólitos sofre influência tanto de fatores relacionados ao biopolímero, por exemplo densidade de carga, massa molar, concentração, natureza química e estequiometria; como também de condições ambientais: pH, força iônica e tipo de íon. Ademais, para que a atração ocorra de forma otimizada e a maior parte dos sítios ativos esteja ligada, é necessário que o pH da solução se encontre acima do pKa do polissacarídeo aniônico e abaixo do pKa do biopolímero catiônico, ou do ponto isoelétrico da proteína. Nessas condições, o sistema apresenta uma quantidade de cargas similares, porém de sinais opostos, possibilitando o recobrimento das partículas (McClements, 2017).

Biopolímeros como proteínas e polissacarídeos são os mais utilizados para a interação eletrostática. Todavia também há associação entre dois polissacarídeos antagônicos como por exemplo, alginato e quitosana. No caso das proteínas a carga é gerada pelos resíduos de aminoácidos (Etchepare et al., 2020). Já a carga dos polissacarídeos é resultante de resíduos carboxílicos, grupamentos amins, entre outros (McClements, 2017; Silva et al., 2015).

O recobrimento das partículas com aplicação de polissacarídeos como pectina, alginato e quitosana, e proteínas como a gelatina e proteínas do soro do leite, para a encapsulação de substâncias tem sido promissor em diversos setores, devido as suas características de biodegradabilidade e biocompatibilidade, além da formação de membranas transparentes com boas propriedades mecânicas (Etchepare et al., 2015; Li; McClements, 2011; Xie et al., 2023). Além disso, a interação eletrostática geralmente acontece de forma espontânea em meio aquoso, sem a necessidade de solventes orgânicos (glutaraldeído e/ou etileno), o que isenta as partículas de toxicidade, contribuindo para sua utilização principalmente na área de alimentos (Silva et al., 2015).

Estudos mostram que partículas produzidas por interações eletrostáticas têm mostrado resistência a meios ácidos e à ação das enzimas do trato gastrointestinal. Krasaekoopt; Watcharapoka (2014) analisaram a encapsulação de *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* em cápsulas de alginato revestidas com quitosana e observaram que a viabilidade dos probióticos adicionados em iogurte e suco de fruta foi mantida durante 4 semanas. Por sua vez, Ribeiro et al. (2014b), encapsularam *Lactobacillus acidophilus* por combinação de gelificação iônica com recobrimento de pectina e proteínas do soro do leite. Os autores notaram que a técnica protegeu os microrganismos durante o armazenamento em iogurte conferindo menor acidificação, fornecendo um produto com uma boa impressão geral e com potencial para entrega de probióticos ao trato gastrointestinal humano.

Vale salientar que, embora interações eletrostáticas sejam de grande importância na condução da interação entre os biopolímeros de carga oposta, interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio também podem contribuir de forma significativa para a formação do complexo e o recobrimento dos hidrogéis (Silva et al., 2015).

3.4 Materias poliméricos formadores de partículas

Hidrogéis, partículas ou *beads* podem ser sintetizados a partir de polímeros naturais, sintéticos ou blendas, que são formas simples de combinar as vantagens de diferentes materiais apresentando propriedades sinérgicas. Entretanto, no cenário atual, verifica-se a intensificação

no uso de biopolímeros ou hidrocoloides cujas principais características são biocompatibilidade, biodegradabilidade, não toxicidade, simplicidade e baixo custo de produção (Ischakov et al., 2013; Ullah et al., 2015).

Segundo Reeves et al. (2002) polímeros formadores de hidrogéis são preferencialmente hidrocoloides de ligações cruzadas leves, sendo tal termo utilizado para descrever polímeros heterogêneos de cadeia longa e de alta massa molecular, compostos de polissacarídeos e/ou proteínas que ao serem imersas em soluções, formam dispersões viscosas e/ou géis, sendo bastante utilizadas nos setores industriais com o propósito de modificar a viscosidade, textura e, conseqüentemente, a reologia dos produtos (Phillips; Glyn; Williams, 2009; Saha; Bhattacharya, 2010). Os hidrocoloides podem ser de origem botânica (celulose e goma arábica), animal (caseína, proteínas do soro de leite, quitosana), derivados de algas (carragena, ágar, alginato) ou de microrganismos (goma xantana e dextrana) (Milani; Maleki, 2012; Phillips; Glyn; Williams, 2009) e também são denominados como mucilagem, gomas, coloides hidrofílicos ou ainda polissacarídeos solúveis em água (Jahanbin et al., 2012; Saha; Bhattacharya, 2010).

Normalmente abundantes, os polissacarídeos são obtidos a partir de fontes renováveis, apresentam baixo custo de produção e propriedades peculiares, em que, dependendo do grupo funcional presente na estrutura, é possível fazer uma derivação química capaz de criar um polímero com novas propriedades (Matricardi et al., 2013; Xie et al., 2023).

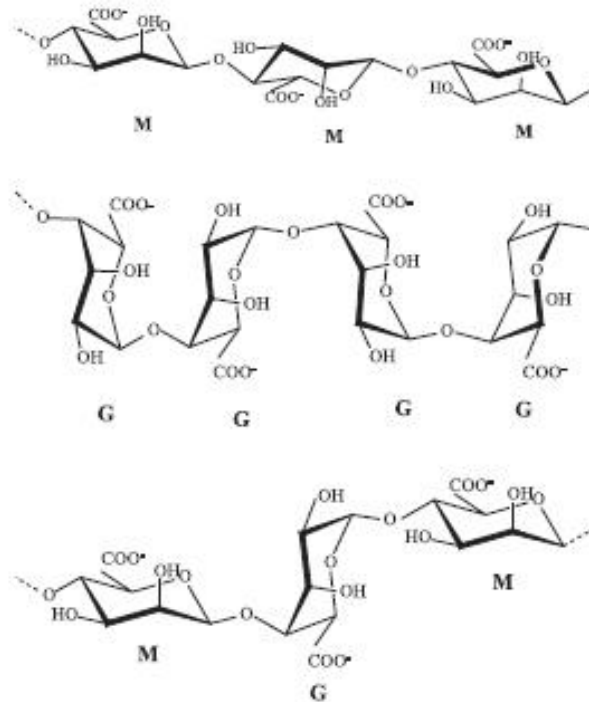
O alginato destaca-se como um polissacarídeo amplamente empregado na fabricação de partículas para as áreas biomédica, farmacêutica e alimentícia. No entanto, é notório a constante busca desses setores por novos biopolímeros com propriedades adequadas, fazendo-se necessário o desenvolvimento de pesquisas que comprovem o potencial de utilização e que viabilizem economicamente a produção de tais matrizes poliméricas (Etchepare et al., 2015; Rodrigues et al., 2022; Ullah et al., 2015).

Observa-se também em sistemas de encapsulação a tendência de produzir partículas a partir de associações entre os próprios polissacarídeos, bem como, entre polissacarídeos e proteínas a fim de melhorar as propriedades do material sintetizado. Neste contexto, quitosana e proteína do soro de leite vêm se destacando como biopolímeros eficientes para o recobrimento de partículas por interação eletrostática, proporcionando maior proteção a princípios ativos contra condições adversas de luz, pH, oxigênio e ingredientes reativos (McClements, 2017; Silverio et al., 2018).

3.4.1 Alginato

Alginatos são heteropolissacarídeos naturais, lineares e não-ramificados contendo ligação entre os resíduos de ácido β -D-manurônico e ácido α -L-gulurônico (Möbus; Siepmann; Bodmeier, 2012). São encontrados na parede celular de algas marrons (*Phaeophyceae*), podendo também ser produzidos por bactérias do gênero *Pseudomonas* e *Azotobacter* (Da Silva; Garcia-Cruz, 2010; Garcia-Cruz; Foggetti; Da Silva, 2008). A Figura 5 mostra a estrutura molecular do alginato.

Figura 5 - Estrutura dos blocos homopoliméricos M- e G- (formados a partir de resíduos de ácido manurônicos e gulurônicos, respectivamente) e dos blocos heteropoliméricos M-G-M-, que constituem a molécula de alginato.



Fonte: Adaptado de Garcia-Cruz; Foggetti; Da Silva (2008).

Os ácidos manurônico e gulurônico apresentam pKa de 3,38 e 3,65, respectivamente, sendo que a variabilidade estrutural desses resíduos influencia diretamente nas propriedades físico-químicas e reológicas do gel obtido. Na presença de cátions divalentes, os resíduos gulurônicos formam géis rígidos que permanecem estáveis por um longo período de tempo. As mesmas propriedades não são observadas em alginatos derivados de *Pseudomonas*, já que neste caso, o polissacarídeo não apresenta blocos de ácido gulurônico (Garcia-Cruz; Foggetti; Da Silva, 2008). A estrutura do hidrogel de alginato é relativamente estável em pH ácido, mas é

facilmente distendida e desintegrada sob condições alcalinas moderadas (pH 7,4) (Gombotz; Wee, 2012; Wang et al., 2022).

Entre os sais de alginato mais empregados, o alginato de sódio destaca-se devido à sua alta solubilidade em água fria e características de transição de solução para gel de forma instantânea quando em contato com íons cálcio (Etchepare et al., 2015).

Segundo Gombotz; Wee (2012), os hidrogéis ou partículas de alginato podem ser preparados por meio do gotejamento da solução de alginato de sódio já contendo o princípio ativo, em solução de íons divalentes como o Ca^{2+} , Sr^{2+} ou Ba^{2+} . Contudo, cátions monovalentes e o Mg^{2+} não induzem a gelificação, devido ao seu tamanho reduzido e carga insuficiente para estabilizar o sistema.

Na encapsulação, o alginato se destaca como material de parede por ser um polímero biocompatível, de alta pureza e baixa toxicidade, sendo empregado em diversos setores. Na área biomédica e farmacêutica, estudos de Chen et al. (2019) e García-Astrain; Avérous (2018) evidenciam a capacidade dos hidrogéis de alginato na encapsulação de enzimas e na entrega controlada de pequenos medicamentos. Na área ambiental, pesquisas registram o uso do hidrogel de alginato no tratamento de efluentes e águas residuais, sobretudo no sequestro de agentes poluentes, metais pesados e corantes tóxicos (Thakur et al., 2018; Wang; Wang; Wang, 2013). Por fim, no setor alimentício os hidrogéis de alginato são comumente empregados na encapsulação de enzimas e de compostos como vitaminas, minerais, ácidos graxos, probióticos e antioxidantes. Trabalhos como o de Martín et al. (2019) e Aguirre Calvo; Santagapita; Perullini (2019) utilizaram hidrogéis de alginato na encapsulação de pectinase e de compostos bioativos de beterrada. Já Zaeim et al. (2020) empregaram o alginato para encapsular probióticos incorporados em sorvetes mostrando a eficiência desse material para tais aplicações.

Apesar de ser muito utilizado em sistemas de encapsulação, o alginato possui limitações que podem inviabilizar o uso da partícula produzida, como o tamanho da cápsula formada e a elevada porosidade do hidrogel. Para melhorar a estabilidade dessas partículas é necessário a combinação do polissacarídeo com outros hidrocoloides e/ou um recobrimento com biopolímero e proteínas (Gombotz; Wee, 2012; Wang et al., 2022).

3.4.2 Mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN)

De acordo com Lima Junior et al. (2013), hidrocoloides extraídos de vegetais têm uma vantagem sobre os de origem animal devido à sua imagem positiva aos olhos dos consumidores. Simultaneamente, a crescente demanda por gomas com funcionalidade específica e que

interajam sinergicamente, melhorando as propriedades funcionais dos alimentos, fazem com que diversas pesquisas sejam realizadas a fim de encontrar fontes alternativas e economicamente viáveis para a extração de hidrocoloides (Salehi et al., 2015).

Autores como Amaral et al. (2018), Conceição et al. (2014), Lima Junior et al. (2013) e Martin et al. (2017) desenvolveram estudos relacionados à extração, caracterização e aplicação de hidrocoloides das folhas de *Pereskia aculeata* Miller, uma cactácea popularmente conhecida no Brasil como ora-pro-nobis (Takeiti et al., 2009). Tal planta é resistente à seca, própria de clima tropical e subtropical, encontrada nos trópicos americanos, como na região sul dos EUA e no Brasil (Brasil, 2010; Martinevski et al., 2013).

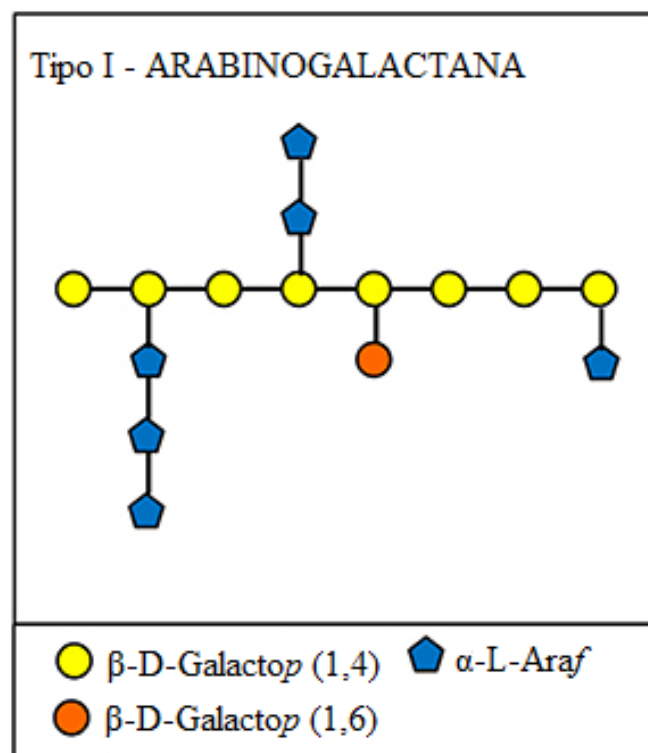
As folhas de ora-pro-nobis são atóxicas, ricas em conteúdo nutricional, sobressaindo-se quanto ao elevado teor de proteínas (25,0% na matéria seca com 85% de digestibilidade) e elevados teores de aminoácidos essenciais, sendo o triptofano o aminoácido mais abundante, e lisina e metionina como os aminoácidos limitantes (Nogueira Silva et al., 2023). Ademais, são ricas nos microelementos como manganês (46,4 mg/100 g), zinco (26,71 mg/100 g) e ferro (14,18 mg/100 g), possuindo também elevados teores de cálcio, fósforo, magnésio e vitaminas, A, C e ácido fólico (Takeiti et al., 2009). Tal cactácea ainda, evidencia-se por apresentar alto teor do biopolímero arabinogalactana (Martin et al., 2017).

Arabinogalactanas são proteoglicanos complexos presentes na parede celular de plantas superiores e são parte do grupo de moléculas chamadas de hidrocoloides ou mucilagens (Mercê et al., 2001). Estudos realizados por Martin et al. (2017) e Mercê et al. (2001) caracterizaram a arabinogalactana das folhas de ora-pro-nobis como tipo I, devido à associação covalente das frações glicídica e proteica (Figura 6). Ainda segundo esses autores, a arabinogalactana é composta por arabinose : galactose : ramnose : ácido galacturônico na proporção de 5,4 : 8,3 : 1,8 : 1,0, respectivamente; sendo a cadeia principal deste biopolímero composta por β -D-galactopirranose com ligações do tipo 1 \rightarrow 4 e substituídas por unidades de arabinose e galactose (Martin et al., 2017).

Quanto à caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis, estudos realizados por Conceição et al. (2014) revelaram que o espectro de FTIR da goma exibiu todas as bandas e picos típicos característicos de polissacarídeos com a presença de componentes proteicos, apresentando grande similaridade com a estrutura da goma-arábica, um polissacarídeo amplamente utilizado na indústria, inclusive para síntese de hidrogéis. Os mesmos autores observaram a presença de grupos carboxila na estrutura da mucilagem de ora-pro-nobis, podendo estes, atuar como sítios de ligação para íons, possibilitando interações entre as cadeias do hidrocoloide e entre hidrocoloide e água para formação de géis poliméricos. Ademais, a

presença de grupamentos carboxila na estrutura do ácido galacturônico e nas cadeias laterais dos aminoácidos fazem com que a MOPN apresente carga elétrica superficial negativa, o que foi observado por Martin et al. (2017) e Moraes et al. (2019) por meio da determinação do potencial zeta. As características físico-químicas mencionadas evidenciam a capacidade da MOPN interagir com demais hidrocoloides, bem como, com moléculas de água formando géis poliméricos a partir de ligações de hidrogênio e interações eletrostáticas.

Figura 6 - Estrutura da arabinogalactana do tipo I. Cadeia principal β -D-galactopiranosose (1,4) e ramificações de β -D-galactopiranosose (1,6) e α -L-arabinofucose.



Fonte: Hijazi et al. (2014).

A MOPN também é higroscópica e possui diferentes tamanhos de partículas. É capaz de formar géis e emulsões devido à presença de componentes proteínáceos na arabinogalactana (Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Nogueira Silva et al., 2023), despertando assim a atenção das indústrias farmacêuticas e alimentícias.

No ramo médico e farmacológico, a MOPN tem sido empregada na suavização de processos inflamatórios na pele, atuando como emoliente (Pinto; Scio, 2014), com potencial antioxidante e antimicrobiano (Souza et al., 2016). Os estudos de Souza et al. (2016) relataram ainda a potencialidade do ora-pro-nobis no controle da proliferação de células cancerígenas, podendo atuar como um remédio natural contra tal enfermidade.

Já na indústria de alimentos, o hidrocoloide extraído das folhas da OPN, é utilizado como aditivo natural agindo como espessante, emulsificante e gelificante (Amaral et al., 2019; Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Silva et al., 2017). Estudos realizados por Amaral et al. (2018) mostraram que a combinação de MOPN com goma guar e goma arábica aumentou o pH, o teor de proteína, a viscosidade aparente, a firmeza e a adesividade de bebidas lácteas fermentadas, contribuindo para reduzir a quantidade de gordura adicionada neste alimento.

Ainda, Lago et al. (2019) analisaram a capacidade da MOPN formar nanoemulsões do tipo óleo-em-água por meio da técnica de ultrassom, observando que maiores concentrações de mucilagem da OPN (%) com menor quantidade de óleo de soja (%) favoreceram a formação de nanoemulsões. Oliveira et al. (2019) também observaram que maiores concentrações de MOPN contribuíram para melhorar a estabilidade térmica e mecânica de filmes poliméricos, indicando que os mesmos podem ser uma alternativa promissora para utilização em embalagens biodegradáveis e/ou comestíveis.

Por fim, Morais et al. (2023) avaliaram a capacidade de formação de gel da MOPN empregando o hidrocoloide em associação com alginato de sódio para a síntese de hidrogéis/partículas pela técnica de gelificação iônica. Os resultados mostraram que a MOPN atuou juntamente com o alginato na reticulação das cadeias poliméricas. No entanto, observou-se uma alta porosidade e redução na estabilidade física e térmica da partícula, o que pode ser solucionado com o recobrimento dos hidrogéis com quitosana ou proteínas por interação eletrostática.

Diante do exposto, observa-se que as características físico-químicas, a abundância e o baixo custo de produção associados à crescente demanda por novas perspectivas de aplicações da mucilagem de *ora-pro-nobis* viabilizam a exploração de seu potencial na síntese de partículas de hidrogel a fim de encapsular princípios ativos, compostos ou probióticos para aplicações na indústria alimentícia, farmacêutica, entre outras.

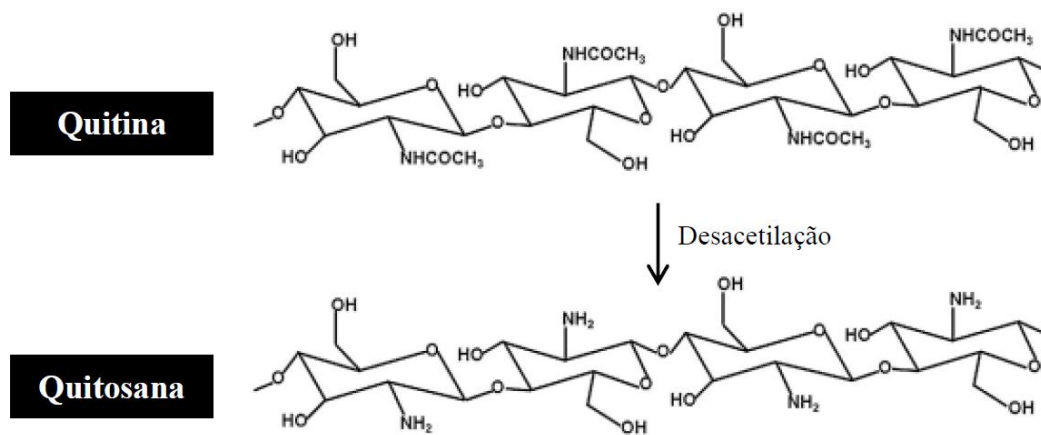
3.4.3 Quitosana

A quitosana é o polímero resultante da desacetilação parcial de quitina (Figura 7), principal componente estrutural do exoesqueleto de invertebrados (crustáceos e insetos) e da parede celular de fungos (Luo; Wang, 2014; Xie et al., 2023). Consiste em um polímero catiônico linear formado pela repetição de duas unidades monoméricas conhecidas como N-

acetil-2-amino-2-deoxi-D-glicosamina (grupos N-acetilados) e resíduos de 2-amino-2-deoxi-D-glicosamina (grupos N-desacetilados, grupos amina) (Anitha et al., 2014).

A quitosana é insolúvel na maioria dos solventes orgânicos, mas se dissolve em soluções de ácidos orgânicos e inorgânicos onde os átomos de nitrogênio são protonados a valores de pH inferiores a 5,5, sendo que dependendo do valor do grau de acetilação, o pKa da quitosana pode variar entre 6,3 e 7,3 (Yan; Bai, 2005). Devido às cargas positivas do grupamento amina, a quitosana é classificada como um polímero catiônico capaz de formar ligações fortes com moléculas de caráter aniônico (Etchepare et al., 2015; Xie et al., 2023).

Figura 7 - Desacetilação da quitina e formação da quitosana - estrutura.



Fonte: Adaptado de Anitha et al. (2014).

Além disso, a quitosana apresenta outras propriedades intrínsecas, tais como biodegradabilidade, biocompatibilidade, atividade antibacteriana, capacidade de atuar como agente quelante de minerais bivalentes e propriedades mucoadesivas. Desta forma, tal polímero tem recebido significativo interesse científico em diferentes áreas, como indústrias médica e farmacêutica, incluindo a engenharia de tecidos e a liberação controlada de fármacos (Etchepare et al., 2015; Luo; Wang, 2014; Wang et al., 2022).

No que se refere ao ramo alimentício, a quitosana tem sido amplamente utilizada para a imobilização enzimática devido à não toxicidade e à alta afinidade protéica (Ju et al., 2012). Tal biopolímero também tem se destacado como um excelente agente de revestimento na encapsulação de compostos bioativos e probióticos, o que se deve à formação de complexos polieletrólitos entre os grupamentos amina da quitosana e os grupos carboxílicos de

polissacarídeos aniônicos (Matté; Rosa, 2013; Simeoni et al., 2014; Wang et al., 2022; Xie et al., 2023).

Em partículas constituídas por matriz de alginato de cálcio, o revestimento com quitosana tem sido aplicado visando melhorar a estabilidade das partículas quando expostas a condições severamente ácidas. A interação eletrostática entre os polímeros torna a esfera estável na presença de pH baixo e agentes quelantes de cálcio, além de reduzir a porosidade do gel de alginato e a degradação da matriz, aumentando a eficácia da encapsulação (Etchepare et al., 2016; Ribeiro et al., 2014a; Wang et al., 2022).

Nualkaekul et al. (2012) e Zaeim et al. (2020) reportaram que cepas probióticas microencapsuladas em matriz alginato e quitosana apresentaram maior estabilidade que a forma livre em suco de romã e sorvete. Ainda, estudos de (Etchepare et al., 2016) mostraram que probióticos encapsulados com alginato e revestidos com quitosana mantiveram-se viáveis em meio gástrico e meio intestinal simulados.

3.4.4 Proteína do soro do leite

As proteínas do soro do leite são coprodutos da indústria de laticínios, especialmente da produção de queijo. São obtidas da fase aquosa do leite após a precipitação da caseína e remoção da gordura. E geralmente são comercializadas como concentrados (WPC), isolados (WPI) e hidrolisados proteicos de soro (HWP), produtos que podem apresentar diferentes propriedades funcionais, devido a variações na composição e nas condições de produção do leite (Batista et al., 2018; Souza et al., 2012; Xie et al., 2023).

O teor proteico do concentrado de soro do leite (WPC) varia de 25% a 80%, sendo a porção restante formada por gotículas de gordura e lactose. Já o isolado proteico de soro é obtido a partir da purificação do WPC e apresenta 90% de proteína em base seca, cujo as principais representantes são a β -lactoglobulina (82%), α -lactoalbumina (15%). Também estão presentes outras proteínas como albumina do soro bovino (BSA), imunoglobulinas, lactoferrina, lactoperoxidase, enzimas, proteínas presentes nos glóbulos de gordura, dentre outros. Por fim, o hidrolisado proteico de soro (HWP) é obtido por meio da quebra das proteínas por ação química ou enzimática e resultam em uma mistura complexa de aminoácidos livres e peptídeos de diferentes comprimentos de cadeia e massa molecular (Haraguchi; Abreu; De Paula, 2006; Kilara; Vaghela, 2018).

As propriedades físico-químicas do WPC estão diretamente relacionadas à β -lactoglobulina e à α -lactoalbumina, já que essas proteínas compõe a maior parte do concentrado

de soro. A β -lactoglobulina é uma proteína pequena que estruturalmente contém duas pontes dissulfeto e um grupo tiol livre, apresenta um ponto isoelétrico na faixa de 4,7 a 5,2 e peso molecular de 18,3 kDa, com 162 resíduos de aminoácidos em sua cadeia polipeptídica. Por sua vez, a α -lactoalbumina possui quatro pontes dissulfeto e nenhum grupo tiol livre, sua massa molar é de 14,2 kDa e seu ponto isoelétrico próximo à 4,6 (Jones; Decker; McClements, 2010).

Quanto à conformação química, essas proteínas apresentam uma estrutura tridimensional globular mantida por pontes de dissulfeto, com grupos hidrofóbicos localizados no interior da estrutura. Tais características garantem a esses compostos as capacidades de emulsificação, estabilização de espuma e geleificação, possibilitando que os mesmos sejam aplicados na indústria de alimentos como aditivos em produtos lácteos, sobremesas, produtos de panificação, molhos frios, entre outros (Batista et al., 2018; Schröder et al., 2017).

As proteínas do soro do leite são polímeros biodegradáveis, solúveis em ampla faixa de pH, apresentando aptidão para a síntese e o recobrimento de partículas ou hidrogéis utilizados na encapsulação de medicamentos, lipídios, bioativos, vitaminas, minerais e probióticos (Jones; Decker; McClements, 2010; Kilara; Vaghela, 2018; Xie et al., 2023). Estudos de Rodea-González et al. (2012) mostraram a eficiência das proteínas do soro de leite na encapsulação de óleos. Segundo os autores as microcápsulas com proteína apresentaram-se morfologicamente sólidas e com boa eficiência de encapsulação. Além disso, Afzaal et al. (2020), Etchepare et al. (2020), Gbassi et al. (2009) e Vanden Braber et al. (2020) verificaram que hidrogéis recobertos com proteína do soro de leite aumentaram a estabilidade de probióticos, mantendo-os viáveis até em condições gastrointestinais.

3.5 Probióticos

Probióticos são alimentos funcionais definidos como microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas conferem benefício à saúde do hospedeiro, devendo ser seguro para o consumo humano, sem a necessidade de supervisão médica (FAO/WHO, 2002). Um microrganismo é considerado probiótico se for habitante normal do trato gastrointestinal, sobreviver à passagem pelo estômago e manter a viabilidade e atividade no intestino (Cook et al., 2012; Misra; Pandey; Mishra, 2021).

Diversos microrganismos podem ser considerados potencialmente probióticos. Bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* são as mais frequentemente empregadas em alimentos, porém gêneros como *Enterococcus*, *Saccharomyces* e *Pediococcus*

também estão ganhando destaque (Etchepare et al., 2015; Menezes et al., 2013; Misra; Pandey; Mishra, 2021).

Dentre os lactobacilos, a espécie *L. acidophilus* constitui a espécie mais comumente empregada em derivados lácteos e seus benefícios à saúde incluem, dentre outros, a redução dos sintomas de intolerância a lactose, a inibição de microrganismos patogênicos e vírus, produção de vitaminas e a redução dos níveis de colesterol. Além disso, tal microrganismo possui a particularidade de ser pouco afetado pela salinidade do meio, tolerar valores baixos de pH e ser microaeróbio, apresentando crescimento em ambientes com pouca oxigenação, o que resulta numa maior resistência e facilidade de emprego durante a fabricação e armazenamento dos alimentos quando comparado com outras culturas probióticas (Reale et al., 2015; Sharma; Saharan, 2014; Xie et al., 2023).

A ingestão de probióticos tem sido associada a inúmeros benefícios à saúde, como regulação do trânsito e peristaltismo intestinal, estímulo à proliferação de bactérias benéficas e aumento da resistência contra microrganismos patogênicos favorecendo a regulação da imunidade local e sistêmica (Menezes et al., 2013; Nezamdoost-Sani et al., 2024). Todavia, o efeito benéfico está condicionado à premissa de que os microrganismos sobrevivam durante o processamento e condições de armazenamento nos produtos onde foram incluídos, permanecendo viáveis até a ingestão em quantidade igual ou superior a 10^7 UFC.g⁻¹ (Etchepare et al., 2015). A legislação brasileira regulamenta que o título de alimento probiótico só pode ser atribuído à produtos que contenham no mínimo $10^8 - 10^{11}$ UFC/100g (Brasil, 2020).

Em suma, as cepas probióticas são muito sensíveis às condições ambientais, sofrendo influência de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre eles as cepas utilizadas, a composição química do meio de fermentação, a acidez final do produto, a disponibilidade de nutrientes, a presença de promotores e inibidores de crescimento, oxigênio dissolvido, temperatura de inoculação e de estocagem (Castro-Cislaghi et al., 2012). Dessa forma, em matriz alimentícia a viabilidade dos probióticos é reduzida significativamente, o que impulsiona a indústria na busca por novas estratégias para manter tais microrganismos viáveis. Neste contexto a encapsulação tem se mostrado uma técnica promissora para a proteção desses probióticos (Menezes et al., 2013; Nezamdoost-Sani et al., 2024).

Diversos trabalhos tem evidenciado o emprego de probióticos encapsulados em uma vasta gama de alimentos fermentados e não fermentados. Song et al. (2018) aplicaram capsulas de *Bifidobactérias longum* em salsichas fermentadas e observaram que a viabilidade dos microrganismos foi preservada em 50%. Já Nualkaekul et al. (2012), relataram que *Lactobacillus plantarum* encapsulados mativeram-se viáveis em suco de romã, enquanto os

probióticos livres morreram em quatro semanas. Por fim Krasaekoopt; Watcharapoka, (2014a), empregaram *Lactobacillus acidophilus* e *Lactobacillus casei* em iogurte e suco de fruta, reportando que os microrganismos mantiveram a viabilidade durante 4 semanas em armazenamento refrigerado, o que confirma a eficiência da encapsulação para proteger microrganismos probióticos, possibilitando maior fabricação de alimentos funcionais.

3.6 Sorvete como material carreador de probiótico

A indústria de laticínios é a principal produtora de alimentos carreadores de probióticos, sendo que os produtos mais relevantes são iogurtes, leites fermentados e queijos. No entanto, o setor vem sofrendo intensa diversificação a ponto de fabricar fórmulas infantis, bebidas lácteas, manteigas e sorvetes adicionados de microrganismos probióticos (Nagpal et al., 2012; Soccol et al., 2014).

Segundo a legislação brasileira, sorvete é um gelado comestível obtido a partir de uma emulsão de gorduras e proteínas, com ou sem adição de outros ingredientes e substâncias que tenham sido submetidas ao congelamento, em condições tais que garantam a conservação do produto no estado congelado ou parcialmente congelado, durante a armazenagem, o transporte e a entrega ao consumo (Brasil, 2022).

O fato de apresentar alto teor de sólidos totais e pH próximo à neutralidade contribui para que o sorvete seja considerado um ambiente favorável à veiculação de probióticos (Homayouni, 2012). Ainda, de acordo com Cruz et al. (2009), as baixas temperaturas de processamento e armazenamento favorecem a longa vida útil do sorvete, atribuindo a este produto a característica de um bom carreador de cepas probióticas.

Por outro lado, a etapa de congelamento na produção do sorvete tem efeito crucial na redução do número de microrganismos viáveis através de danos na parede celular e conseqüentemente, perda de água intracelular (Tyutkov et al., 2022). Além disso, o processo de recristalização que ocorre nessas sobremesas lácteas ao longo do armazenamento também contribui para reduzir drasticamente a viabilidade dos probióticos (Soukoulis; Fisk; Bohn, 2014). Ainda, segundo Homayouni (2012), a morte dos microrganismos também pode ser atribuída à toxicidade do oxigênio incorporado ao sorvete durante à fabricação, visto que muitas cepas probióticas são anaeróbias ou aeróbias facultativas.

Sendo assim, a incorporação de probióticos encapsulados em sorvetes apresenta-se como uma alternativa para impedir a redução da viabilidade dos microrganismos durante o processamento e o armazenamento deste alimento, o que pode ser comprovado pelos estudos

de Zaeim et al. (2020) e Afzaal et al. (2019). No primeiro trabalho, *Lactobacillus plantarum* associados a inulina e amido foram encapsulados em hidrogéis de alginato e quitosana, e posteriormente adicionados em sorvetes. Segundo os autores, as microcápsulas melhoraram a viabilidade dos probióticos no alimento, pois 7,37 e 7,82 log UFC g⁻¹ de bactérias eram viáveis após 90 dias de armazenamento (Zaeim et al., 2020). Afzaal et al. (2019) também aplicaram probióticos encapsulados em sorvetes, empregando alginato e carragenina, e relataram que bactérias encapsuladas tiveram redução de três log no número de UFC g⁻¹, enquanto as células livres reduziram sete log de UFC g⁻¹ ao final de 120 dias, comprovando a eficiência do sorvete como material carreador de probióticos encapsulados.

REFERÊNCIAS

- AFZAAL, M. et al. The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1348–1354, 2019.
- AFZAAL, M. et al. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1649–1656, 2020.
- AGUIRRE CALVO, T. R.; SANTAGAPITA, P. R.; PERULLINI, M. Functional and structural effects of hydrocolloids on Ca(II)-alginate beads containing bioactive compounds extracted from beetroot. **Lwt**, v. 111, n. April, p. 520–526, 2019.
- AMARAL, T. N. et al. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331–342, 2018.
- AMARAL, T. N. et al. Effects of salts and sucrose on the rheological behavior, thermal stability, and molecular structure of the *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 131, p. 218–229, 2019.
- ANITHA, A. et al. Chitin and chitosan in selected biomedical applications. **Progress in Polymer Science**, v. 39, n. 9, p. 1644–1667, 2014.
- BATISTA, M. A. et al. Whey and protein derivatives: Applications in food products development, technological properties and functional effects on child health. **Cogent Food & Agriculture**, v. 4, n. 1, p. 1509687, 2018.
- BERALDO, J. C. Produção de micropartículas de alginato tendo como cobertura gelatina e colágeno com diferentes graus de hidrólise. p. 112, 2016.
- BRASIL. Instrução Normativa IN N° 76 de 5 de novembro de 2020. **Dispõe sobre a atualização da lista de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares**. Diário Oficial da União, Brasília, 11 nov. 2020. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5809185/IN_76_2020_COMP.pdf/28f071f8-8079-4671-a1ec-b47c8dd30917>. Acesso em: 08 mar. 2024.
- BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Resolução de Diretoria Colegiada n. 713, de 1 de julho de 2022. **Requisitos sanitários dos gelados comestíveis e dos preparados para gelados comestíveis**. Diário Oficial da União, Brasília, 6 jul. 2022. Disponível em: <https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/6732335/RDC_713_2022_COMP.pdf/398b847e-78db-451c-9760-9df79c341526>. Acesso em: 18 fev.2024.
- BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Manual de Hortaliças Não-Convencionais/ / Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Secretaria de Desenvolvimento Agropecuário e Cooperativismo**. – 1. ed. Brasília: MAPA/ACS, 2010.

CASTELO, R. M.; SILVA, L. C. ; FURTADO, R. F. Gelificação iônica: técnica eficaz para encapsulação de compostos ativos - uma revisão. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde**, v. 1, p. 546-560, 2020.

CASTRO-CISLAGHI, F. P. DE et al. Bifidobacterium Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: Survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 2, p. 186–193, 2012.

CHÁVARRI, M. et al. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, n. 1–2, p. 185–189, 2010.

CHEN, X. et al. Magnetic and self-healing chitosan-alginate hydrogel encapsulated gelatin microspheres via covalent cross-linking for drug delivery. **Materials Science and Engineering C**, v. 101, n. April 2018, p. 619–629, 2019.

CONCEIÇÃO, M. C. et al. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014.

COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, n. 1, p. 56–67, 2012.

CRUZ, A. G. et al. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, n. 9, p. 1233–1239, 2009.

DA SILVA, A. N.; GARCIA-CRUZ, C. H. A metodologia de superfície de resposta como ferramenta para a avaliação da produção de alginato e poli-hidroxibutirato pela *Azotobacter vinelandii*. **Acta Scientiarum - Technology**, v. 32, n. 2, p. 105–112, 2010.

DEVI, N. et al. Encapsulation of active ingredients in polysaccharide–protein complex coacervates. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 239, p. 136–145, 2017.

ETCHEPARE, M. D. A. et al. Microencapsulação de probióticos pelo método de extrusão associado a interações eletrostáticas Microencapsulation of probiotics by extrusion method associated with electrostatic interactions. *Ciencia e Natureza*, v. 37, p. 75–86, 2015.

ETCHEPARE, M. DE A. et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511–517, 2016.

ETCHEPARE, M. et al. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **LWT**, v. 117, 1 jan. 2020.

FAO/WHO, JOINT. Food and Agriculture Organization of the United States/World Health Organization. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May. 2002

- FUNAMI, T. et al. Rheological properties of sodium alginate in an aqueous system during gelation in relation to supermolecular structures and Ca²⁺ binding. **Food Hydrocolloids**, v. 23, n. 7, p. 1746–1755, 2009.
- GARCÍA-ASTRAIN, C.; AVÉROUS, L. Synthesis and evaluation of functional alginate hydrogels based on click chemistry for drug delivery applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 190, n. March, p. 271–280, 2018.
- GARCIA-CRUZ, C. H.; FOGGETTI, U.; DA SILVA, A. N. Alginato bacteriano: aspectos tecnológicos, características e produção. **Quimica Nova**, v. 31, n. 7, p. 1800–1806, 2008.
- GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103–105, 2009.
- GOMBOTZ, W. R.; WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 64, n. SUPPL., p. 194–205, 2012.
- GUILHERME, M. R. et al. Superabsorbent hydrogels based on polysaccharides for application in agriculture as soil conditioner and nutrient carrier: A review. **European Polymer Journal**, v. 72, p. 365–385, 2015.
- HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C. DE; DE PAULA, H. Proteínas do soro do leite: composição, propriedades nutricionais, aplicações no esporte e benefícios para a saúde humana. **Rev. Nutr.**, v. 19, n. 4, p. 479–488, 2006.
- HIJAZI, M. et al. An update on post-translational modifications of hydroxyproline-rich glycoproteins: toward a model highlighting their contribution to plant cell wall architecture. **Frontiers in Plant Science**, v. 5, n. August, p. 1–10, 2014.
- HOLKEM, A. T.; CODEVILLA, C. F.; MENEZES, C. R. Emulsificação/gelificação iônica interna: Alternativa para microencapsulação de compostos bioativos. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 116–124, 2015.
- HOMAYOUNI, A. ET AL. Factors influencing Probiotic survival in Ice Cream: a Review. **International Journal of Dairy Science**, v. 7, p. 1–10, 2012.
- IQBAL, R. et al. In-vitro GIT Tolerance of Microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* ATCC 35914 Using Polysaccharide-Protein Matrix. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 3, p. 830–839, 2019.
- ISCHAKOV, R. et al. Peptide-based hydrogel nanoparticles as effective drug delivery agents. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 12, p. 3517–3522, 2013.
- JAHANBIN, K. et al. Isolation, purification and characterization of a new gum from *Acanthophyllum bracteatum* roots. **Food Hydrocolloids**, v. 27, n. 1, p. 14–21, 2012.
- JONES, O. G.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 1, p. 21–29,

2010.

KILARA, A.; VAGHELA, M. N. **Proteínas do Soro: Proteínas no Processamento de Alimentos**, 2018.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 2, p. 177–183, 2006.

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

LAGO, A. M. T. et al. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 50, p. 339–353, 2019.

LAROSA, C. et al. Characterisation of bare and tannase-loaded calcium alginate beads by microscopic, thermogravimetric, FTIR and XRD analyses. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 115, p. 900–906, 2018.

LI, Y.; MCCLEMENTS, D. J. Controlling lipid digestion by encapsulation of protein-stabilized lipid droplets within alginate-chitosan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 5, p. 1025–1033, 2011.

LIMA JUNIOR, F. A. et al. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 38–47, 2013.

LUO, Y.; WANG, Q. Recent development of chitosan-based polyelectrolyte complexes with natural polysaccharides for drug delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 64, p. 353–367, 2014.

MARTIN, A. A. et al. Chemical structure and physical-chemical properties of mucilage from the leaves of *Pereskia aculeata*. **Food Hydrocolloids**, v. 70, p. 20–28, 2017.

MARTÍN, M. C. et al. Immobilization of enological pectinase in calcium alginate hydrogels: A potential biocatalyst for winemaking. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**, v. 18, n. March, p. 101091, 2019.

MARTINEVSKI, C. S. et al. Utilização de bertalha (*Anredera cordifolia* (ten.) Steenis) e ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* mill.) Na elaboração de pães. **J. Food Nutr**, v. 24, n. 3, p. 6, 2013.

MATRICARDI, P. et al. Interpenetrating polymer networks polysaccharide hydrogels for drug delivery and tissue engineering. **Advanced Drug Delivery Reviews**, v. 65, n. 9, p. 1172–1187, 2013.

MATTÉ, G. M.; ROSA, S. DA. A tecnologia da microencapsulação através das microesferas de quitosana. **Revista Iberoamericana de Polímeros**, v. 14, n. 145, p. 206–218, 2013.

MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31–59, 2017.

MENEZES, C. R. DE et al. Microencapsulação de probióticos: Avanços e perspectivas. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309–1316, 2013.

MERCÊ, A. L. R. et al. Complexes of arabinogalactan of *Pereskia aculeata* and Co^{2+} , Cu^{2+} , Mn^{2+} , and Ni^{2+} . **Bioresource Technology**, v. 76, p. 29–37, 2001.

MILANI, J.; MALEKI, G. Hydrocolloids in Food Industry. In: **Food Industrial Processes - Methods and Equipment**. [s.l.] InTech Open, 2012. p. 17–38.

MISRA, S.; PANDEY, P.; MISHRA, H. N. Novel approaches for co-encapsulation of probiotic bacteria with bioactive compounds, their health benefits and functional food product development: A review. **Trends in Food Science and Technology**, v. 109, p. 340 – 351, 2021.

MÖBUS, K.; SIEPMANN, J.; BODMEIER, R. Zinc-alginate microparticles for controlled pulmonary delivery of proteins prepared by spray-drying. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 81, n. 1, p. 121–130, 2012.

MORAIS L. C. et al. Protein recovery from Barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Miller) leaves by salting out and isoelectric precipitation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 2, p. 419–430, 2019.

MORAIS, L. C. et al. Synthesis and characterization of hydrogels from alginate and ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 140, n. 42, 10 nov. 2023.

NAGPAL, R. et al. Probiotics, their health benefits and applications for developing healthier foods: A review. **FEMS Microbiology Letters**, v. 334, n. 1, p. 1–15, 2012.

NEVES, I. C. O. et al. Effect of carrier oil on α -tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 1 ago. 2020.

NEZAMDOOST-SANI, N. et al. A comprehensive review on the utilization of biopolymer hydrogels to encapsulate and protect probiotics in foods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, 127907, 1 jan. 2024.

NG, S. L. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* 299v incorporated with oligofructose in chitosan coated-alginate beads and storage stability in ambarella juice. **Malaysian Journal of Microbiology**, v. 15, n. 4, p. 408–418, 2019.

NOGUEIRA SILVA, N. F. et al. *Pereskia aculeata* Miller as a Novel Food Source: A Review. **FoodsMDPI**, v. 12, n. 11, p. 1-12, 1 jun. 2023.

NUALKAEKUL, S. et al. Chitosan coated alginate beads for the survival of

- microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, n. 3, p. 1281–1287, 2012.
- OLIVEIRA, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. August 2018, p. 499–510, 2019.
- OLIVEIRA, N. L. et al. Evaluation of α -tocopherol microencapsulation stability with either coconut oil or canola oil cores in Greek yogurt and butter. **Food Chemistry Advances**, v. 2, 100277, 2023.
- PARRA HUERTAS, R. A. Microencapsulación de Alimentos. **Revista Facultad Nacional de Agronomía**, v. 63, n. 2, p. 5669–5684, 2010.
- PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 77, p. 1327–1340, 2017.
- PEREIRA, K. C. et al. Microencapsulation and release controlled by the diffusion of food ingredients produced by spray drying: a review. **Brazilian Journal of Food Technology**, Campinas, v. 21, e2017083, 2018.
- PHILLIPS, GLYN O., WILLIAMS, P. A. **Handbook of hydrocolloids**. 2. ed. ed. Cambridge: CRC Press, 2009.
- PINTO, N. DE C. C.; SCIO, E. The Biological Activities and Chemical Composition of *Pereskia* Species (Cactaceae)-A Review. **Plant Foods for Human Nutrition**, v. 69, n. 3, p. 189–195, 2014.
- PREZOTTI, F. G.; CURY, B. S. F.; EVANGELISTA, R. C. Mucoadhesive beads of gellan gum/pectin intended to controlled delivery of drugs. **Carbohydrate Polymers**, v. 113, p. 286–295, 2014.
- RÉ, MI, SANTANA, MHA, ÁVILA, MA Tecnologias de Encapsulação para Modificar o Desempenho Alimentar. Em Taylor and Francis Group, LLC, p. 223-275, 2010.
- REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **Lwt**, v. 60, n. 2, p. 721–728, 2015.
- REEVES, W. G., DAMAY, E. C., HAMILTON, W. L., HANSEN, P. A., LINDON, J. N., SOREBO, H. A. **Process for preparing superabsorbent-containing composites**EUUA, 2002.
- RIBEIRO, L. N. M. et al. Pectin-coated chitosan-LDH bionanocomposite beads as potential systems for colon-targeted drug delivery. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 463, n. 1, p. 1–9, 2014a.
- RIBEIRO, M. C. E. et al. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 on physicochemical, sensory and microbiological characteristics of stirred probiotic yoghurt. **Food Research International**, v. 66, p. 424–431, 2014b.

RODEA-GONZÁLEZ, D. A. et al. Spray-dried encapsulation of chia essential oil (*Salvia hispanica L.*) in whey protein concentrate-polysaccharide matrices. **Journal of Food Engineering**, v. 111, n. 1, p. 102–109, 2012.

RODRIGUES, F. J. et al. Effective encapsulation of reuterin-producing *Limosilactobacillus reuteri* in alginate beads prepared with different mucilages/gums. **Biotechnology Reports**, v. 34, 1 jun. 2022.

SAHA, D.; BHATTACHARYA, S. Hydrocolloids as thickening and gelling agents in food: A critical review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 47, n. 6, p. 587–597, 2010.

SALEHI, F. et al. Modeling of extraction process of crude polysaccharides from Basil seeds (*Ocimum basilicum L.*) as affected by process variables. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 8, p. 5220–5227, 2015.

SAMPAIO, G. L. A. et al. Encapsulation of a lycopene-rich watermelon concentrate in alginate and pectin beads: Characterization and stability. **Lwt**, v. 116, n. April, p. 108589, 2019.

SCHRÖDER, A. et al. Interfacial properties of whey protein and whey protein hydrolysates and their influence on O/W emulsion stability. **Food Hydrocolloids**, v. 73, p. 129–140, 2017.

SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 7, 2014.

SILVA, T. M. DA et al. Coacervação complexa : uma técnica para a encapsulação de probióticos Complex coacervation : a technique for encapsulation of probiotics. **Ciência e Natura**, v. 37, p. 49–55, 2015.

SILVA, K. C. G. et al. Adsorption of protein on activated carbon used in the filtration of mucilage derived from *Pereskia aculeata* Miller. **South African Journal of Chemical Engineering**, v. 23, p. 42–49, 2017.

SILVA, R. C. da. “ β -Galactosidase encapsulada em hidrogéis de carragenana, pectina e carragenana/pectina: estudo comparativo e fatores que influenciam na estabilidade e liberação controlada”. 2017. Dissertação (mestrado em Química), Universidade Federal de Alfenas, Alfenas. 2017.

SILVA, S. H. et al. Freeze-dried Petit Suisse cheese produced with ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) biopolymer and carrageenan mix. **LWT**, v. 149, September 2021, 111764, 2021.

SILVERIO, G. B. et al. Produção e caracterização de micropartículas de alginato obtidas por gelificação iônica e adsorção eletrostática de concentrado proteico de soja. **Ciência Rural**, v. 48, n. 12, 2018.

SIMEONI, C. P. et al. Microencapsulação de probióticos: inovação tecnológica na indústria de alimentos Microencapsulation of probiotics: technological innovation in the food industry. **Ed. Especial Mai**, p. 66–75, 2014.

SOCCOL, C. R. et al. Current Developments in Probiotics. **Journal of Microbial & Biochemical Technology**, v. 07, n. 01, p. 11–20, 2014.

SONG, M. Y. et al. Quality characteristics of functional fermented sausages added with encapsulated probiotic bifidobacterium longum KACC 91563. **Korean Journal for Food Science of Animal Resources**, v. 38, n. 5, p. 981–994, 2018.

SOUKOULIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: Conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 627–655, 2014.

SOUZA, F. N. et al. Production and characterization of microparticles containing pectin and whey proteins. **Food Research International**, v. 49, n. 1, p. 560–566, 2012.

SOUZA, L. F. et al. *Pereskia aculeata* muller (Cactaceae) leaves: Chemical composition and biological activities. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 9, 2016.

TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148–160, 2009.

THAKUR, S. et al. Recent progress in sodium alginate based sustainable hydrogels for environmental applications. **Journal of Cleaner Production**, v. 198, p. 143–159, 2018.

TREENATE, P.; MONVISADE, P. In vitro drug release profiles of pH-sensitive hydroxyethylacryl chitosan/sodium alginate hydrogels using paracetamol as a soluble model drug. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 99, p. 71–78, 2017.

TYUTKOV, N. et al. Probiotics viability in frozen food products. **Food Bioscience**, v. 50, 101996, 1 dez. 2022.

ULLAH, F. et al. Classification, processing and application of hydrogels: A review. **Materials Science and Engineering C**, v. 57, p. 414–433, 2015.

VANDEN BRABER, N. L. et al. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. **Lwt**, v. 118, n. November 2019, p. 108844, 2020.

VOO, W. P. et al. Calcium alginate hydrogel beads with high stiffness and extended dissolution behaviour. **European Polymer Journal**, v. 75, p. 343–353, 2016.

WANG, X. et al. Microencapsulating Alginate-Based Polymers for Probiotics Delivery Systems and Their Application. **Pharmaceuticals**, v. 15, n. 5, 1 maio 2022.

WANG, Y.; WANG, W.; WANG, A. Efficient adsorption of methylene blue on an alginate-based nanocomposite hydrogel enhanced by organo-illite/smectite clay. **Chemical Engineering Journal**, v. 228, p. 132–139, 2013.

XIE, A. et al. Polysaccharides, proteins, and their complex as microencapsulation carriers for delivery of probiotics: A review on carrier types and encapsulation techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, n. 24784, p. 1 – 18, 1 jul. 2023.

YAN, W. L.; BAI, R. Adsorption of lead and humic acid on chitosan hydrogel beads. **Water Research**, v. 39, n. 4, p. 688–698, 2005.

ZAEIM, D. et al. Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. **Food Structure**, v. 25, n. 18, p. 100147, 2020.

ZOU, Q. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 8, p. 1672–1678, 2011.

SEGUNDA PARTE**ARTIGO**

**ENCAPSULAÇÃO DE *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 EM
MICROPARTÍCULAS DE ALGINATO E MUCILAGEM DE ORA-PRO-NOBIS
(*Pereskia aculeata* Miller)**

Norma NBR 6022 (ABNT 2018)

RESUMO

Por ser rica em biopolímero arabinogalactana, a mucilagem de ora-pro-nóbis, apresenta grande potencial tecnológico aplicado à indústria de alimentos, inclusive na formação de partículas por gelificação iônica. Dessa forma, o presente trabalho tem como objetivo sintetizar micropartículas de mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) e alginato de sódio (ALG) revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC) ou quitosana (QUI) para a encapsulação de probióticos aplicados em sorvetes. As partículas foram produzidas por gelificação iônica empregando um delineamento composto central rotacional para otimizar as concentrações de biopolímeros que proporcionaram maior eficiência de encapsulação aos microrganismos. Essas esferas foram caracterizadas quanto à morfologia, distribuição de diâmetro, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), análise termogravimétrica (TGA) e teste de digestão *in vitro*. Posteriormente, as partículas foram adicionadas em sorvetes e a viabilidade dos probióticos foi avaliada durante 60 dias de armazenamento e também após teste de recristalização. Os resultados mostraram que *L. acidophilus* ATCC 4356 foi encapsulado com sucesso nas micropartículas sintetizadas com eficiência de encapsulação máxima de 96,86% para as esferas sem revestimento (SR_p), 98,40% para partículas revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) e 99,56% para os tratamentos revestidos com quitosana (QUI_p). As concentrações otimizadas de cada biopolímero foram de 0,6 % (m/m) para MOPN, 0,9% (m/m) para ALG, 5,25% (m/m) para WPC e 1,2% (m/m) para QUI. As análises de potencial zeta e FTIR confirmaram o revestimento das partículas com WPC e QUI. As partículas sintetizadas apresentaram formato esférico e diâmetros médios de Sauter (D₃₂) que variaram de 172,50 a 272,25 µm. As microesferas QUI_p foram mais porosas, menos estáveis termicamente e apresentaram menores taxas de sobrevivência de microrganismos em condições de trato gastrointestinal simulado e em sorvetes, quando comparadas às demais. Já as micropartículas SR_p e WPC_p exibiram os melhores resultados de viabilidade para o teste de digestão *in vitro* (68,65% e 67,45%); para o armazenamento do sorvete (71,23% e 72,49%); e para viabilidade após ciclos de recristalização (93,32% e 92,47%). Os resultados para as células livres foram inferiores aos apresentados para as células microencapsuladas, confirmando a capacidade das micropartículas de MOPN e ALG, revestidas ou não, protegerem os microrganismos probióticos frente às condições adversas. Além disso, foi possível atestar o potencial da MOPN na encapsulação de princípios ativos.

Palavras-chave: biopolímero; hidrocoloide; viabilidade; probióticos; sorvete.

1 INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde, os probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro, como regulação do trânsito e peristaltismo intestinal, estímulo à proliferação de bactérias benéficas e aumento da resistência contra microrganismos patogênicos (FAO/WHO, 2002). Todavia o efeito benéfico dos probióticos está condicionado à premissa de que os microrganismos sobrevivam durante o processamento e condições de armazenamento nos produtos onde foram incluídos, permanecendo viáveis até o fim da vida útil em quantidade igual ou superior a 10^7 UFC.g⁻¹ (Etchepare et al., 2016). Além disso, probióticos devem ser capazes de tolerar o baixo pH do suco gástrico e resistir à ação dos sais biliares, das secreções pancreática e intestinal e das enzimas digestivas, mantendo sua viabilidade e atividade metabólica no intestino (Rodrigues et al., 2020).

Em suma, as cepas probióticas são muito sensíveis às condições ambientais sofrendo influência de fatores intrínsecos e extrínsecos, o que impulsiona a indústria de alimentos na busca por novas estratégias para manter tais microrganismos viáveis. Neste contexto a encapsulação tem se mostrado uma técnica promissora para a proteção desses microrganismos (Menezes et al., 2013; Tyutkov et al., 2022).

Os probióticos podem ser encapsulados a partir de diferentes técnicas e materiais. A gelificação iônica é o método mais popular empregado para proteger microrganismos, devido à sua simplicidade, baixo custo e condições de formulação suaves que garantem alta viabilidade celular. A técnica é baseada na preparação de uma solução de hidrocolóide, adição de microrganismos e extrusão da suspensão celular através de uma agulha ou um bico. À medida em que a solução contendo hidrocolóides e probióticos é gotejada sobre a solução reticulante, ligações cruzadas se formam dando origem à uma estrutura tridimensional em formato de esferas, que conferem proteção aos microrganismos (Rodrigues et al., 2020).

O principal polímero empregado na gelificação iônica é o alginato de sódio que consiste em um heteropolissacarídeo natural, biocompatível, biodegradável e que forma gel instantaneamente em contato com íons cálcio (Ching; Bansal; Bhandari, 2017). Todavia, tem-se intensificado a busca por novos materiais poliméricos, que possibilitem a formação de gel e consequentemente a encapsulação de princípios ativos (Nami et al., 2023; Rodrigues et al., 2022). Neste contexto, cactáceas, como o *ora-pro-nobis*, revelam-se como fontes de hidrocolóides com potencial aplicação para encapsular substâncias devido à composição rica

em polissacarídeos e proteínas (Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Morais et al., 2023; Nogueira Silva et al., 2023; Takeiti et al., 2009).

A planta *Pereskia aculeata* Miller, popularmente conhecida no Brasil como ora-pro-nobis (OPN), é uma cactácea, que além de apresentar baixo custo de produção, ainda contém um alto teor de biopolímero arabinogalactana, encontrando, desta maneira, aplicação na indústria de alimentos e farmacêutica (Conceição et al., 2014; Lima Junior et al., 2013; Nogueira Silva et al., 2023).

Nos últimos anos, o potencial tecnológico da mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) vem sendo explorado como agente espessante, emulsificante e gelificante na produção de petit suisse (Silva et al., 2021) e bebidas lácteas fermentadas (Amaral et al., 2018) como agente formador de nanoemulsões (Lago et al., 2019) e na produção de filmes poliméricos (Oliveira et al., 2019). Ademais, dois estudos recentes do nosso grupo de pesquisa avaliaram a capacidade da MOPN como material encapsulante. No primeiro Neves et al. (2020) empregaram a MOPN associada a isolado proteico do soro de leite para encapsular α – Tocoferol por liofilização e obtiveram resultados satisfatórios. Já no segundo, Morais et al. (2023) avaliaram a MOPN e alginato de sódio na formação de hidrogéis e observaram que a mucilagem atuou ativamente na reticulação das cadeias poliméricas para síntese das partículas, foi resistente a um ambiente gástrico simulado e se desintegrou em um ambiente intestinal simulado. Tais resultados indicam o potencial desse hidrocoloide na encapsulação de princípios ativos, principalmente probióticos, o que ainda não foi relatado na literatura.

De acordo com Morais et al. (2023), apesar da MOPN auxiliar na formação da rede de gel, as esferas produzidas a partir da combinação de alginato de sódio e mucilagem ainda apresentavam grandes poros e por isso sugere-se o revestimento dessas partículas com concentrado proteico de soro de leite e quitosana, já que em valores de pH inferiores ao pKa da quitosana e ao ponto isoelétrico das proteínas do soro, tais polímeros apresentam-se carregados positivamente, podendo interagir eletrostaticamente com os grupamentos carboxílicos da superfície das partículas de gelificação, formando complexos estáveis sobre a partícula (McClements, 2017)

Entre os diversos alimentos carreadores de probióticos as sobremesas lácteas, sobretudo os sorvetes, se destacam por apresentarem condições de pH e teor de sólidos totais que contribuem para a veiculação de microrganismos. Contudo, a integridade e viabilidade dos probióticos, mesmo encapsulados, é ameaçada pelos processos de congelamento e recristalização, uma vez que a formação e o crescimento de cristais de gelo acarretam danos à

parede celular, causando a morte dos microrganismos probióticos (Homayouni, 2012; Soukoulis; Fisk; Bohn, 2014; Tyutkov et al., 2022).

Diante do exposto, o presente trabalho tem como objetivo encapsular uma cepa probiótica em micropartículas sintetizadas com alginato de sódio e mucilagem de ora-pro-nobis revestidas com concentrado proteico de soro de leite ou quitosana a fim de proteger os microrganismos probióticos durante o congelamento e a recristalização de sorvetes.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material

As folhas de ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) foram colhidas no município de Lavras - MG, Brasil (21° 14' 42 sul, 44° 59' 59 oeste). Alginato de sódio (CAS number 9005-38-3), quitosana de baixo peso molecular (CAS number 9012-76-4) e cloreto de cálcio dihidratado (CAS number 10035-04-8) foram adquiridos na empresa Sigma Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, EUA). O concentrado proteico de soro de leite 80% (m/m) foi gentilmente cedido pela Doremus Alimentos (Guarulhos, SP, Brasil). *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 liofilizados foram adquiridos na Coleção de Culturas Tropical – Fundação André Tosello CCT - FAT (Campinas, SP, Brasil). Os meios de cultura caldo MRS (Man Rogosa Sharpe) e Ágar MRS (Man Rogosa Sharpe) foram adquiridos na empresa KASVI (São José dos Pinais, PR, Brasil). Todos os demais reagentes foram de grau analítico.

2.2 Obtenção da mucilagem de ora-pro-nobis

A extração da mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) foi realizada segundo o processo otimizado por Lima Junior et al. (2013) com modificações. Primeiramente, as folhas de ora-pro-nobis foram trituradas e homogeneizadas em água, na proporção de 1 kg matéria-prima para 2,5 L de água, à temperatura de 100 °C por 10 min, utilizando-se um liquidificador industrial (Metvisa LG10, Brasil). Em seguida, as amostras foram acondicionadas em béqueres e permaneceram sob agitação em banho termostático (Quimis, q-215-2) a 65 °C por 6 h. O homogeinato resultante foi manualmente filtrado com tecido organza e posteriormente submetido a uma filtração à vácuo por meio de um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo (Primar MC 1284, Brasil), utilizando como meio filtrante três camadas de organza. Após a filtração o material foi centrifugado (SP Labor, SP-701, SP, Brasil) a 4680 x g por 10 min. O

líquido remanescente foi adicionado de etanol (95% v/v) na proporção de 3:1 (etanol:solução) e o precipitado retirado, congelado a $-75\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Coldlab, CL120-86V, SP, Brasil), seco em liofilizador (Edwards High Vacuum, L4KR, SP, Brasil) e moído em moinho de bolas (marca: SP Labor, modelo SP-38) para obtenção da mucilagem de OPN em pó.

2.3 Ativação e propagação dos microrganismos

Para a ativação dos microrganismos, a cultura liofilizada de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi reidratada com 0,2 mL de água destilada estéril e posteriormente transferida para um tubo de ensaio contendo 9 mL de caldo Man Rogosa e Sharpe (MRS), previamente esterilizado a $121\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 15 min, incubado a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 48 h conforme instrução da CCT – FAT. Para propagação, a cultura foi subcultivada em 90 mL de caldo MRS e incubada nas mesmas condições por 24 h. Em seguida, alíquotas de 1 mL foram transferidas para microtubos e centrifugadas (SP Labor, SL-5AM, SP, Brasil) a $7126 \times g$ por 5 min. O sobrenadante foi descartado e meio congelante estéril (15 mL glicerol, 0,5 g peptona bacteriológica, 0,3 g extrato de levedura, e 0,5 g NaCl em 100 mL de água destilada com pH ajustado para 7,0) foi acrescido aos microrganismos concentrados que foram estocados em condições de congelamento ($-75\text{ }^{\circ}\text{C}$) para uso como cultura estoque (Ngome et al., 2021).

2.4 Curva de crescimento dos microrganismos

Para realização da curva de crescimento as culturas estocadas em microtubos foram reativadas em 9 mL de caldo MRS e subcultivadas em 290 mL do mesmo caldo de crescimento com incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h. Em intervalos de 2 horas foram realizadas leituras da densidade óptica dessa suspensão em espectrofotômetro UV/visível (NI, 2000 UV, Nova instruments, Brasil) a 600 nm. Simultaneamente, alíquotas de 100 μL da suspensão de células foram submetidas a diluições decimais seriadas em água peptonada (0,1 % m/v) e plaqueadas pela técnica Pour-plate em ágar MRS com incubação a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 24 h em condições aeróbicas. O procedimento foi finalizado quando a absorbância média (densidade óptica) da suspensão de células tornou-se constante (Ngome et al., 2021).

2.5 Preparo dos microrganismos para microencapsulação

A cultura de *L. acidophilus* ATCC 4356 foi reativada e cultivada em caldo MRS (10 %, v/v) a 37 °C por 24 h, posteriormente foi centrifugada (SP Labor, SP-701, SP, Brasil) a 4680 x g por 10 min a 4 °C. O sobrenadante foi descartado e as células com concentração final de aproximadamente 9 Log UFC.mL⁻¹ foram lavadas duas vezes com água destilada estéril, sendo então direcionadas à microencapsulação.

2.6 Delineamento experimental

A síntese das micropartículas foi realizada empregando diferentes concentrações de alginato de sódio (ALG) e mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) como materiais de parede e diferentes teores de quitosana (QUI) e concentrado proteico de soro de leite (WPC) como materiais de recobrimento. Visando otimizar as concentrações dos materiais poliméricos empregou-se o delineamento composto central rotacional (DCCR) com 18 tratamentos sendo 8 pontos fatoriais, 6 pontos axiais e 4 repetições no ponto central. Os níveis reais e codificados podem ser observados na Tabela 1 para as micropartículas recobertas de WPC e na Tabela 2 para os tratamentos recobertos com QUI. As concentrações mínimas e máximas de ALG e MOPN foram definidas de acordo com Morais et al. (2023). Já os teores de QUI e WPC basearam-se no estudo de Iqbal et al. (2019). O delineamento foi planejado com o auxílio de software Chemoface 1.6 (Nunes et al., 2012).

Tabela 1 - Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para micropartículas recobertas com concentrado proteico de soro de leite.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
MOPN (% m/m)	0,26	0,40	0,60	0,80	0,94
ALG (%m/m)	0,56	0,70	0,90	1,10	1,24
WPC (%m/m)	2,30	3,50	5,25	7,00	8,20

MOPN: mucilagem de ora-pro-nobis; ALG: alginato de sódio; WPC: concentrado proteico de soro de leite 80%

Tabela 2 - Variáveis do Delineamento Composto Central Rotacional (DCCR) para micropartículas recobertas com quitosana.

Variáveis	-1,68	-1	0	+1	+1,68
MOPN (% m/m)	0,26	0,40	0,60	0,80	0,94
ALG (% m/m)	0,56	0,70	0,90	1,10	1,24
QUI (%m/m)	0,53	0,80	1,20	1,60	1,87

MOPN: mucilagem de ora-pro-nobis; ALG: alginato de sódio; QUI: quitosana

Vale ressaltar que também foram produzidas micropartículas controle sem revestimento (SR), compostas somente por ALG e MOPN nas concentrações determinadas na Tabela 1 e na Tabela 2 para fins comparativos.

2.7 Preparo das soluções para microencapsulação e recobrimento

O preparo das soluções de ALG e MOPN foi realizado segundo Morais et al. (2023). Inicialmente, soluções aquosas de alginato de sódio e mucilagem de ora-pro-nobis foram produzidas nas concentrações determinadas (Tabela 1 e Tabela 2) e permaneceram em repouso por 12 h para completa hidratação dos biopolímeros. Em seguida, foram homogeneizadas em turrax (Turratec, TE-102, Tecnal, SP, Brasil) a 14.000 rpm por 5 min. Após a dispersão completa dos polímeros, as culturas probióticas de *L. acidophilus* ATCC 4356 (9 Log UFC.mL⁻¹) foram adicionadas às soluções e posteriormente foram submetidas à caracterização e síntese das partículas.

As soluções aquosas de WPC empregadas no recobrimento das micropartículas foram preparadas nas concentrações estabelecidas na Tabela 1, sendo homogeneizadas em turrax (Turratec, TE-102, Tecnal, SP, Brasil) a 14.000 rpm por 5 min. O pH das soluções foi ajustado para 4,0 com adição de ácido acético glacial (37%) e hidróxido de sódio (0,1 M).

Por fim, as soluções com diferentes concentrações de QUI (Tabela 2) foram preparadas em ácido acético 2% (v/v), mantidas em repouso por 12 h e em seguida homogeneizadas em turrax (Turratec, TE-102, Tecnal, SP, Brasil) a 14.000 rpm por 5 min. O valor de pH das soluções também foi ajustado para 4,0 com adição de ácido acético glacial (37%) e hidróxido de sódio (0,1 M).

2.8 Síntese das partículas

A síntese das micropartículas foi realizada pelo método de gelificação iônica associado à interação eletrostática, que envolve primeiramente o desenvolvimento de ligações entre dois polímeros solúveis em água com posterior formação de um complexo coacervado com biopolímero de cargas opostas.

De acordo com o método de Aguilar et al. (2015) adaptado, soluções de ALG, MOPN e *L. acidophilus* foram atomizadas com auxílio de um bico pressurizado tipo spray duplo fluido (Modelo LM MSD 1.0, Labmaq do Brasil, Ribeirão Preto, Brasil), alimentado por uma bomba peristáltica a uma vazão de 0,20 L/h (3,33 mL/min) e uma vazão de ar de 15 L/min. Quando atomizadas, as microesferas formadas entraram em contato com uma solução gelificante de CaCl₂ 1,5% (m/v) agitada mecanicamente (150 rpm), afim de evitar aglomeração das micropartículas. Depois de formadas, as microesferas permaneceram agitadas no banho de gelificação por 30 minutos para a completa estruturação do hidrogel. Em seguida foram lavadas com água deionizada, filtradas à vácuo por meio de um funil de Buchner acoplado a uma bomba de vácuo (Primar MC 1284, Brasil), utilizando como meio filtrante papel de filtro Whatman N° 1. Então, as partículas seguiram para o revestimento com quitosana ou concentrado proteico do soro do leite. As amostras controle, sem revestimento (SR_p), foram filtradas e mantidas em água deionizada a 4 °C ou congeladas para posterior liofilização no equipamento marca Edwards, modelo: L4KR por 48 horas, com pressão de vácuo de 0,998 mbar e temperatura de -40 °C, sendo posteriormente caracterizadas.

O revestimento das partículas de ALG e MOPN com concentrado proteico de soro de leite ou quitosana foi realizado segundo o método de Zou et al. (2011). As microesferas produzidas anteriormente (50 g) foram imersas em 200 mL de solução de WPC ou QUI nas concentrações estabelecidas na Tabela 1 ou Tabela 2, permanecendo sob agitação magnética lenta durante 40 minutos. Em seguida, foram lavadas com água deionizada, filtradas e mantidas a 4 °C ou liofilizadas para posterior caracterização. Todos os ensaios foram conduzidos em temperatura de 20 °C. Ressalta-se que todas as soluções de biopolímero foram testadas quanto à esterilidade e todas as vidrarias utilizadas foram previamente esterilizadas em autoclave a 121 °C por 15 min.

2.9 Eficiência de encapsulação

Para avaliar a eficiência de encapsulação dos probióticos empregou-se a técnica de Iqbal et al. (2019) com modificações, na qual 0,1 g de micropartículas hidratadas e recém preparadas revestidas com WPC, QUI ou sem revestimento (SR) foram adicionadas de 9,9 mL de solução de citrato de sódio 3 % (m/v) e permaneceram sob agitação até a completa desintegração dos hidrogéis, e conseqüentemente a liberação dos probióticos aprisionados na matriz polimérica. Em seguida, alíquotas de 100 µL da suspensão de células foram submetidas a diluições decimais seriadas (10^{-1} a 10^{-5}) em água peptonada (0,1 % m/v) e plaqueadas pela técnica Pour-plate em ágar MRS com incubação a 37 °C por 24 h em condições aeróbicas para enumeração das células viáveis. A eficiência de encapsulação (EE) foi obtida pela Equação 1, onde, N é o número de células viáveis aprisionadas nas microesferas (UFC.mL⁻¹) e N₀ é o número de células livres adicionadas à mistura de biopolímeros antes do encapsulamento (UFC.mL⁻¹).

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

A partir do delineamento empregado foi possível otimizar as concentrações de material de parede e de revestimento que obtiveram os melhores resultados para eficiência de encapsulação. Sendo assim, os tratamentos revestidos com concentrado proteico de soro de leite (WPC), revestidos com quitosana (QUI) e sem revestimento (SR) que apresentaram os valores mais elevados para a eficiência de encapsulação foram selecionados para prosseguir com as análises de caracterização.

2.10 Determinação do potencial zeta das soluções

O potencial zeta das soluções de alginato e mucilagem de ora-pro-nobis, bem como de concentrado proteico do soro do leite ou quitosana foi determinado medindo a mobilidade eletroforética das soluções utilizando o analisador de potencial zeta Zetasizer, modelo Nano-Z (Malvern Instrumentos, Malvern, Worcestershire, U.K.). As amostras foram diluídas em água deionizada (pH 7) na proporção de 1:1000 e as medições foram feitas a 25°C, sendo os resultados expressos como média de 3 leituras em mV.

2.11 Análise morfológica

A morfologia das micropartículas foi avaliada por meio de microscopia óptica (MO) e microscopia eletrônica de varredura (MEV) (Morais et al., 2023). Para isto, lâminas contendo esferas hidratadas foram observadas em um microscópio de luz polarizada (Meiji ML 5000, Meiji Techno América, Santa Clara, USA). As fotomicrografias foram capturadas com uma câmera fotográfica modelo CMOS (Evtscan, China).

Para as análises de MEV, as partículas secas foram fixadas em stubs utilizando uma fita de dupla face, seguido de metalização com uma fina camada de ouro. As eletromicrografias foram obtidas usando um microscópio eletrônico de varredura (Tescan-Clara, Czech Republic) com voltagem de aceleração de 15 kV.

2.12 Diâmetro médio e distribuição de tamanho das micropartículas

A análise de distribuição de tamanho das microesferas produzidas foi feita usando a técnica de espalhamento de luz estática em aparelho Mastersizer 3000, modelo Hydro 3000 UM (Malvern Instruments, Worcestershire, Reino Unido). Uma alíquota de micropartículas WPC_p, QUI_p e SR_p hidratadas foi dispersa em água destilada e o diâmetro médio das micropartículas foi expresso em μm segundo o diâmetro médio de Sauter (D_{32}). Além disso, o índice de polidispersividade (span - adimensional) foi obtido conforme Equação 2 (Aguilar et al., 2015).

$$\text{Índice de polidispersividade} = \frac{d(0.9) - d(0.1)}{d(0.5)} \quad (2)$$

Onde, $d(0,1)$, $d(0,5)$ e $d(0,9)$ são diâmetros médios volumétricos (μm) a 10%, 50% e 90% do volume acumulado, respectivamente.

2.13 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os grupos funcionais presentes nas micropartículas controle, revestidas com quitosana ou concentrado proteico de soro de leite foram identificados por análise de espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), realizadas em equipamento de FTIR (Thermo Scientific, USA, modelo iS50 FTIR). As amostras (0,5 mg) foram adicionadas de

brometo de potássio (KBr) e avaliadas na região de 400-4000 cm^{-1} , com a resolução de 4 cm^{-1} (Li et al., 2021).

2.14 Análise térmica

As análises termogravimétricas foram realizadas em um analisador térmico Shimadzu 60 H (Shimadzu Corporation, Kyoto, Japão). O procedimento foi realizado sob atmosfera de nitrogênio a uma taxa de fluxo de 50 $\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}$, na faixa de temperatura de 25 a 700 $^{\circ}\text{C}$ com taxa de aquecimento de 10 $^{\circ}\text{C}\cdot\text{min}^{-1}$ (Morais et al., 2023).

2.15 Viabilidade dos microrganismos em condição gastrointestinal simulada

As micropartículas com probióticos secas foram submetidas a condições gastrointestinais simuladas de acordo com Meira et al. (2023) adaptado. Inicialmente, 0,25 g microesferas foram digeridos em 7,5 g de suco gástrico simulado (SGJ). O SGJ foi preparado usando pepsina da mucosa gástrica suína (1 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) e NaCl (8,755 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$). As amostras foram adicionadas de SGJ e seu pH foi ajustado para 2 usando HCl (1 M) para simular as condições gástricas. Em seguida, os tubos com as soluções foram inseridos em banho-maria a 37 $^{\circ}\text{C}$ e agitados a 100 rpm para reproduzir os movimentos peristálticos. Ao final de 120 min, alíquotas de 1 mL foram retiradas, submetidas a diluições decimais seriadas (10^{-1} – 10^{-3}) em água peptonada (0,1 % m/v) e plaqueadas pela técnica Pour-plate em ágar MRS com incubação a 37 $^{\circ}\text{C}$ por 24 h em condições aeróbicas para enumeração das células viáveis. Após a digestão gástrica o pH das soluções foi ajustado para 7 com NaOH (1 M) e o suco intestinal simulado (SIJ) contendo pancreatina (2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$) foi adicionado na proporção de 1:1 (SGJ:SIJ). As soluções foram mantidas sob agitação a 37 $^{\circ}\text{C}$ por mais 120 min. Ao final do processo, alíquotas de 1 mL foram retiradas para plaqueamento e enumeração de células viáveis, conforme descrito acima.

Para avaliar a resistência dos *L. acidophilus* encapsulados em condições gastrointestinal simuladas, a taxa de sobrevivência foi calculada de acordo com a Equação 3.

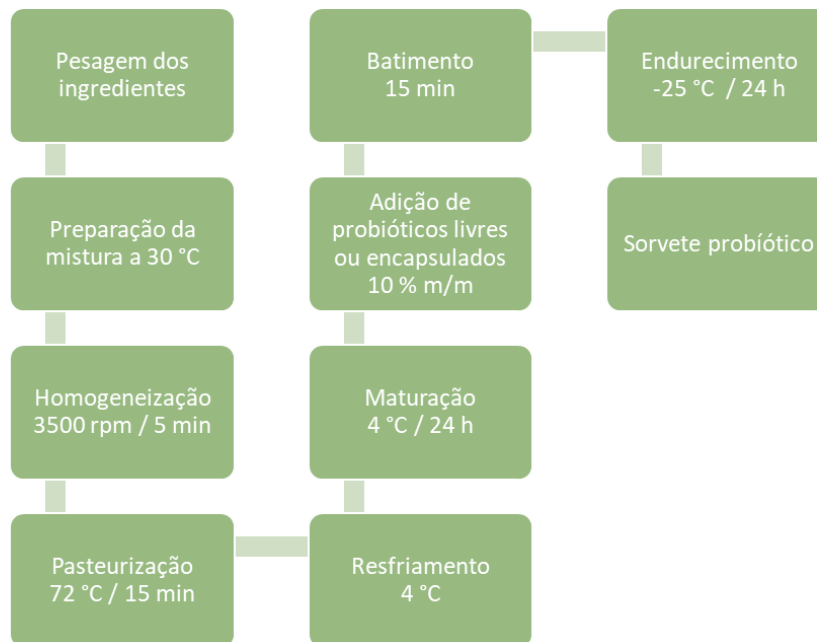
$$Ts (\%) = \frac{\text{Log } N}{\text{Log } N_0} \times 100 \quad (3)$$

Onde, T_s é a taxa de sobrevivência, N (UFC.mL⁻¹) é a contagem total viável de cepas probióticas após exposição a condições gastrointestinal simuladas *in vitro* e N_0 (UFC.mL⁻¹) é a contagem total viável de cepas probióticas antes da exposição a condições gastrointestinal simuladas *in vitro*.

2.16 Produção do sorvete probiótico

O sorvete foi fabricado conforme a Figura 1, de acordo com a metodologia de Pereira et al. (2011).

Figura 1 - Fluxograma de produção do sorvete probiótico.



Fonte: Do autor (2024)

A mistura base foi preparada contendo 10% (m/m) de gordura de origem láctea (creme de leite, 35% de gordura) (Laticínio Verde Campo, Lavras, MG, Brasil), 11% (m/m) de sólidos não gordurosos (leite em pó desnatado, 95% de sólidos) (Nutriway Foods, Contagem, MG, Brasil), 10% (m/m) de sacarose (Companhia União, São Paulo, SP, Brasil), 4% (m/m) de xarope de milho (Arcólor, São Paulo, SP, Brasil), 0,6% (m/m) de mix estabilizante/emulsificante (Emulsificante Selecta, Jaraguá do Sul, SC, Brasil), 4% (m/m) saborizante de chocolate (Selecta, Jaraguá do Sul, SC, Brasil) e 60,4% (m/m) de água. Os ingredientes foram homogeneizados em liquidificador industrial (Metvisa LG10, Brasil) a 3500 rpm por 5 min e pasteurizados a 72 °C durante 15 min em banho-maria. A mistura foi resfriada a 4 °C e maturada

por 24 h. *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foram inoculados no sorvete na forma livre e na forma de micropartículas sem revestimento (SR_p), revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) ou revestidas com quitosana (QUI_p). A proporção de probióticos ou de micropartículas adicionadas foi de 10% (m/m) com relação a massa total do sorvete. Após a adição dos probióticos o sorvete foi processado por 15 minutos em bateadeira (Mondial® Prática Due) sob condições assépticas para incorporação de ar e em seguida foi congelado a -25 ± 3 °C em câmara de congelamento.

2.17 Viabilidade dos probióticos durante o armazenamento do sorvete

A viabilidade dos probióticos livres e encapsulados foi analisada nas amostras de sorvete armazenadas em 0, 15, 30, 45 e 60 dias com adaptações do método descrito por Afzaal et al. (2019b, 2020). Para enumeração das células viáveis, 3 g de sorvete probiótico foi adicionado de 27 mL de solução de citrato de sódio 3% (m/v) e permaneceram sob agitação rápida à 25 °C durante 5 min ou até a completa desintegração dos hidrogéis. Em seguida, alíquotas de 100 µL da suspensão de células foram submetidas a diluições decimais seriadas ($10^{-1} - 10^{-3}$) em água peptonada (0,1 % m/v) e plaqueadas pela técnica Pour-plate em ágar MRS com incubação a 37 °C por 24 h em condições aeróbicas. A viabilidade dos probióticos foi obtida pela Equação 4.

$$V (\%) = \frac{\text{Log } N}{\text{Log } N_0} \times 100 \quad (4)$$

Onde, V é a viabilidade (%), N (UFC.mL⁻¹) é a contagem total viável de cepas probióticas durante o armazenamento do sorvete e N₀ (UFC.mL⁻¹) é a contagem total viável de cepas probióticas imediatamente após a fabricação do sorvete, ou seja, antes do armazenamento.

2.18 Microscopia de fluorescência do sorvete – teste vivo/morto

A microscopia de fluorescência dos sorvetes foi realizada segundo a técnica descrita por Batista et al. (2019) para análise das células de *L. acidophilus* vivas e mortas no tempo 0 e 60 dias. Para tanto, empregou-se o microscópio confocal a laser Zeiss Axio-Observer Z1 LSM 780 e o software Zen 2010 (Carl Zeiss Microscopy MBH). O fluorocromo Syto9 (Thermo

Fischer ®) foi usado para marcar células bacterianas vivas e o iodeto de propídio (Sigma ®) foi utilizado para marcar as bactérias mortas. Resumidamente, 5 µL de cada amostra de sorvete foram depositados acima de blocos de ágar-ágar de 0,25 cm² e mantidos imóveis por 5 min. Na mesma superfície foram aplicados 5 µL de Syto9 (20 µM) e a mistura foi incubada no escuro por 40 min. Em seguida, foram adicionados 5 µL de iodeto de propídio (1 µg.mL⁻¹) e as amostras permaneceram no escuro durante 5 min. Por fim as lâminas foram acondicionadas no microscópio confocal com a utilização dos detectores ChS1 e Ch2 para as células vivas e mortas, respectivamente.

2.19 Viabilidade dos probióticos em condições de recristalização

Com intuito de simular a recristalização, os sorvetes foram submetidos a variações de temperatura segundo método adaptado de Giarola et al. (2019). As amostras permaneceram 12 horas armazenadas a -18 °C e em seguida foram acondicionadas a -6 °C por mais 12 horas, sendo esse ciclo repetido durante 5 dias. Posteriormente a viabilidade dos probióticos livres e encapsulados foi avaliada por plaqueamento conforme descrito no tópico 2.17.

2.20 Análise Estatística

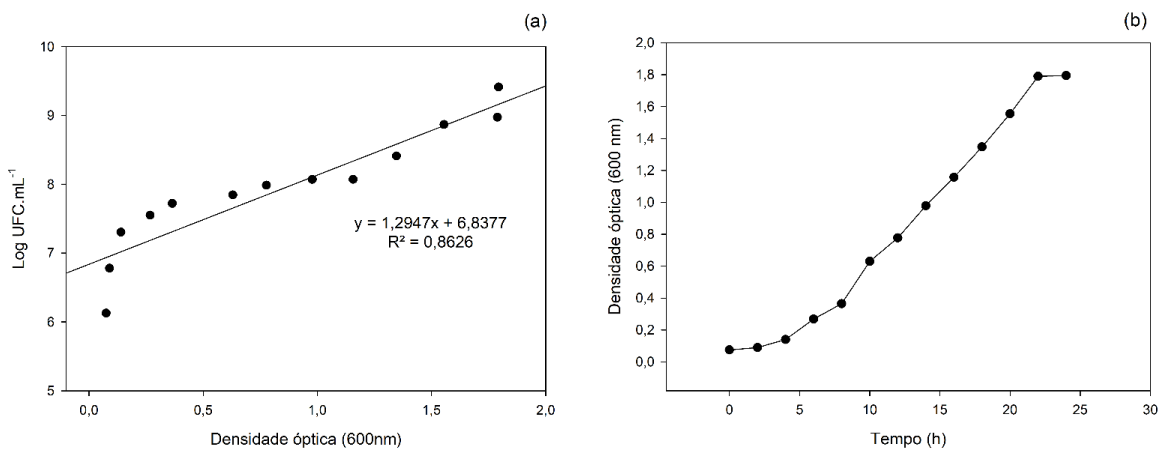
Os resultados para eficiência de encapsulação foram submetidos a análise de variância com nível de significância de 5%, em seguida, ajustou-se um modelo matemático polinomial utilizando-se como critério a significância dos parâmetros ajustados ($p < 0,05$), a falta de ajustamento do modelo e o coeficiente de determinação (R^2). Os demais resultados foram avaliados por meio de Análise de Variância (ANOVA) seguido do teste de média Tukey ($p < 0,05$). Todas as análises foram realizadas em triplicata empregando o pacote estatístico SAS University Edition (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA). As curvas de contorno e os demais gráficos foram plotados com auxílio do software SigmaPlot (versão 11.0).

3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

3.1 Curva de crescimento dos microrganismos

O crescimento da cepa de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 foi avaliado por meio da densidade óptica (cm^{-1}) a 600 nm e pela contagem de unidades formadoras de colônias (UFC) em ágar Man Rogosa Sharpe a cada 2 horas e os resultados podem ser observados na Figura 2.

Figura 2 - Curvas de crescimento de *L. acidophilus* ATCC 4356 (a) Log UFC.mL⁻¹ X Densidade óptica (600 nm); (b) Densidade óptica (600 nm) X Tempo.



Fonte: Do Autor (2024).

Verifica-se na Figura 2 que a contagem máxima de células foi de 9 Log UFC.mL⁻¹ em 24 horas de incubação. Valor semelhante foi encontrado por Meng et al. (2021) ao empregar caldo MRS no crescimento de lactobacilos. Tais autores registraram que em $24 \pm 1,78$ horas de fermentação a cepa de *L. acidophilus* LA-5 apresentou um crescimento máximo de $1,21 \pm 0,26 \times 10^9$ UFC/ mL.

Na Figura 2 (b) é possível observar três fases do crescimento da cultura láctea. Nas quatro primeiras horas de incubação nota-se a fase lag de crescimento, na qual ocorre elevada atividade metabólica sem que haja multiplicação efetiva dos microrganismos. Em seguida, verifica-se a fase log marcada pelo crescimento rápido e exponencial dos lactobacilos que é evidenciado pela elevação da densidade óptica de 0,200 para 1,800 cm^{-1} entre 4 h e 22 h. Por fim, nas últimas duas horas é possível perceber uma estabilidade na densidade óptica indicando a fase estacionária, cujo número de células produzidas é igualado ao número de células mortas devido à restrição de nutrientes necessários ao crescimento microbiano e à produção de metabólitos tóxicos ao microrganismo (Aider-Kaci; AidarbekovA; Aider, 2023; Ni et al., 2023).

Os resultados do presente estudo são sutilmente superiores aos valores obtidos por Aider-Kaci; Aidarbekova; Aider (2023) para a curva de crescimento de *L. acidophilus* ATCC 4356 em caldo MRS. Em sua pesquisa, os autores verificaram que o crescimento máximo da cepa foi 8 Log UFC.mL⁻¹ com uma densidade óptica (600 nm) de $1 \pm 0,01$. Todavia, observaram que o crescimento exponencial das células ocorreu no intervalo de 6 h a 16 h, com uma taxa de crescimento específico de 0,2585 h⁻¹ e um tempo de duplicação de 5 h, diferente dos valores encontrados no presente estudo de 0,1221 h⁻¹ e 5,7 h. Tais resultados podem estar relacionados às condições experimentais aplicadas, uma vez que Aider-Kaci, Aidarbekova e Aider (2023) conduziram seu experimento em meio anaeróbico enquanto esta pesquisa foi realizada em meio aeróbio. Sabe-se que os *L. acidophilus* são microrganismos microaeróbios, apresentando maior crescimento em ambientes com pouca oxigenação, portanto, meios com teor de oxigênio reduzido favorecem o crescimento celular desta espécie (Reale et al., 2015; Sharma; Saharan, 2014).

Por fim, para obter a contagem de células em função da densidade óptica a 600 nm ajustou-se um modelo de regressão linear com coeficiente de determinação de 0,86 (Figura 2 a) a partir da qual foi padronizado o crescimento da cepa empregada nas próximas etapas do trabalho.

3.2 Eficiência de encapsulação

Segundo Afzaal et al. (2019a) a eficiência de encapsulação, bem como a sobrevivência dos microrganismos probióticos estão intimamente relacionadas ao tipo e à concentração de material de parede utilizado na síntese de micropartículas. Tal afirmação corrobora com os resultados encontrados no presente estudo para *L. acidophilus* ATCC 4356 encapsulados com diferentes composições de material de parede.

Na Tabela 3 é possível observar os valores de eficiência de encapsulação empregando o delineamento experimental (DCCR) cujas variáveis independentes foram as concentrações de MOPN, ALG e material de revestimento (WPC ou QUI). Verifica-se que em âmbito geral as diferentes micropartículas apresentaram uma eficiência de encapsulação superior a 74%, sendo os valores máximos aproximadamente 96%, 98% e 99% para as microesferas formadas por MOPN e ALG sem revestimento (SR_p), revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) e revestidas com quitosana (QUI_p), respectivamente. O alto rendimento na encapsulação indica o aprisionamento bem-sucedido de células viáveis nas microesferas,

evidenciando o potencial desses biopolímeros como materiais encapsulantes de microrganismos.

Tabela 3 - Delineamento composto central rotacional com os resultados de eficiência de encapsulação para as micropartículas produzidas.

Tratamento	MOPN	ALG	Revest.	Eficiência de encapsulação (%)		
				SR _p	WPC _p	QUI _p
1	-1	1	-1	77,89	77,06	79,96
2	-1	1	1	88,60	80,42	74,73
3	-1	-1	-1	85,72	90,75	86,09
4	-1	-1	1	89,05	93,13	93,67
5	1	1	-1	91,39	95,03	93,36
6	1	1	1	79,55	94,57	87,71
7	1	-1	-1	83,36	90,03	89,13
8	1	-1	1	83,42	89,41	85,36
9	-1,68	0	0	83,75	83,58	78,48
10	1,68	0	0	81,01	85,66	81,95
11	0	1,68	0	80,32	82,43	81,90
12	0	-1,68	0	94,38	93,18	97,44
13	0	0	-1,68	94,84	93,57	93,86
14	0	0	1,68	93,79	81,61	89,16
15	0	0	0	96,86	98,29	99,56
16	0	0	0	95,01	96,98	96,58
17	0	0	0	93,82	94,99	98,62
18	0	0	0	94,51	98,40	98,35

MOPN: mucilagem de ora-pro-nobis; ALG: alginato de sódio; Revest.: material de revestimento das micropartículas (concentrado proteico do soro de leite ou quitosana); SR_p: micropartícula sem revestimento; WPC_p: micropartícula revestida com concentrado proteico do soro de leite; QUI_p: micropartícula revestida com quitosana.

Nota-se que as cápsulas produzidas somente por ALG e MOPN (SR_p) apresentaram capacidade de encapsulação elevada (77,89% – 96,86%) o que também foi observado por outros pesquisadores ao combinar alginato com diferentes hidrocoloides para a encapsulação de probióticos. Nami et al. (2020) sintetizaram micropartículas de alginato e goma-persa para

aprisionar *Lactococcus lactis* e obtiveram uma eficiência de encapsulação superior a 98%. Ademais, Rodrigues et al. (2017) encapsularam *Lactobacillus casei* em microesferas de alginato combinadas com mucilagem de quiabo e linhaça registrando um rendimento de células de 95,09% e 93,92%, respectivamente. Por fim, Rodrigues et al. (2022) verificaram que o uso de gomas e mucilagens oriundas de tamarindo, mutamba, cássia tora, psyllium e konjac associadas a alginato melhorou a eficiência de encapsulação de *Limosilactobacillus reuteri* de 93,2% para 97,4% em comparação ao alginato puro.

De acordo com esses autores, apesar de ser amplamente utilizado para a encapsulação microbiana, o uso de alginato majoritariamente pode resultar na formação de partículas muito porosas. Portanto, o emprego de hidrocolóides extraídos de plantas em combinação com alginato pode melhorar as propriedades das partículas e aumentar o aprisionamento das células, uma vez que tais mucilagens comumente apresentam alta estabilidade coloidal e características aniônicas, como é o caso da MOPN (Morais et al., 2019), que contribuem para o estabelecimento de interações eletrostáticas e para a formação das partículas (Rodrigues et al., 2020).

A alta porosidade das esferas formadas predominantemente por alginato, como citado acima, também pode justificar o fato dos tratamentos 1 e 2 apresentarem as menores eficiências de encapsulação para todas as micropartículas produzidas (SR_p , WPC_p , QUI_p) já que, tais tratamentos empregaram elevados teores de alginato e concentrações baixas de MOPN.

A partir da Tabela 3 verifica-se também que o revestimento das micropartículas com WPC ou QUI aumentaram a eficiência de aprisionamento dos probióticos possivelmente devido as características da matriz polimérica. Para o primeiro material, as características anfífilas e sua capacidade de formar interações eletrostáticas com polissacarídeos carregados negativamente fazem com que as proteínas do soro de leite sejam frequentemente empregadas para o revestimento de micropartículas probióticas. Iqbal et al. (2019) avaliaram a capacidade de WPC recobrir esferas de alginato com *B. bifidum* e registraram uma eficiência de encapsulação de 93,8%, valor semelhante ao encontrado no presente trabalho. No caso da quitosana o aumento da eficiência de encapsulação está ligado à sua natureza catiônica que permite a interação com polímeros aniônicos como alginato e MOPN. Krasaekoopt; Watcharapoka, (2014) aprisionaram *L. acidophilus* e *L. casei* em partículas de alginato revestidas com quitosana e obtiveram um rendimento de células de 79,4%. Todavia, em um estudo preliminar tais autores verificaram uma encapsulação máxima de 99,9% para *Lactobacillus acidophilus* 547, *Bifidobacterium bifidum* ATCC 1994, and *Lactobacillus casei*

(Krasaekoopt; Bhandari; Deeth, 2006), valores similares à eficiência de encapsulação mínima e máxima encontradas para as micropartículas QUI_p sintetizadas neste trabalho.

Com base nos resultados de eficiência de encapsulação para as partículas recobertas com WPC e QUI foram gerados modelos matemáticos levando em consideração apenas os termos estatisticamente significativos ($p < 0,05$), com falta de ajuste da regressão e coeficientes de determinação satisfatórios. Os modelos estão descritos nas Equações 5 e 6, a partir das quais foram geradas curvas de contorno observadas na Figura 3. Vale salientar que não foi obtido um modelo matemático para as micropartículas sem revestimento, já que essas são formadas apenas por dois materiais poliméricos, e, portanto, não se enquadram em um DCCR de três variáveis.

$$EE_{WPC} = 52,17 + 23,67MOPN + 40,90ALG + 8,88WPC - 95,96MOPN^2 + \quad (5)$$

$$114,31MOPN * ALG - 67,81ALG^2 - 0,91WPC^2$$

$$R^2 = 0,83$$

$$EE_{QUI} = 21,46 + 113,72MOPN + 63,24ALG + 33,82QUI - 160,73MOPN^2 + \quad (6)$$

$$98,91MOPN * ALG - 77,18ALG^2 - 15,23QUI^2$$

$$R^2 = 0,91$$

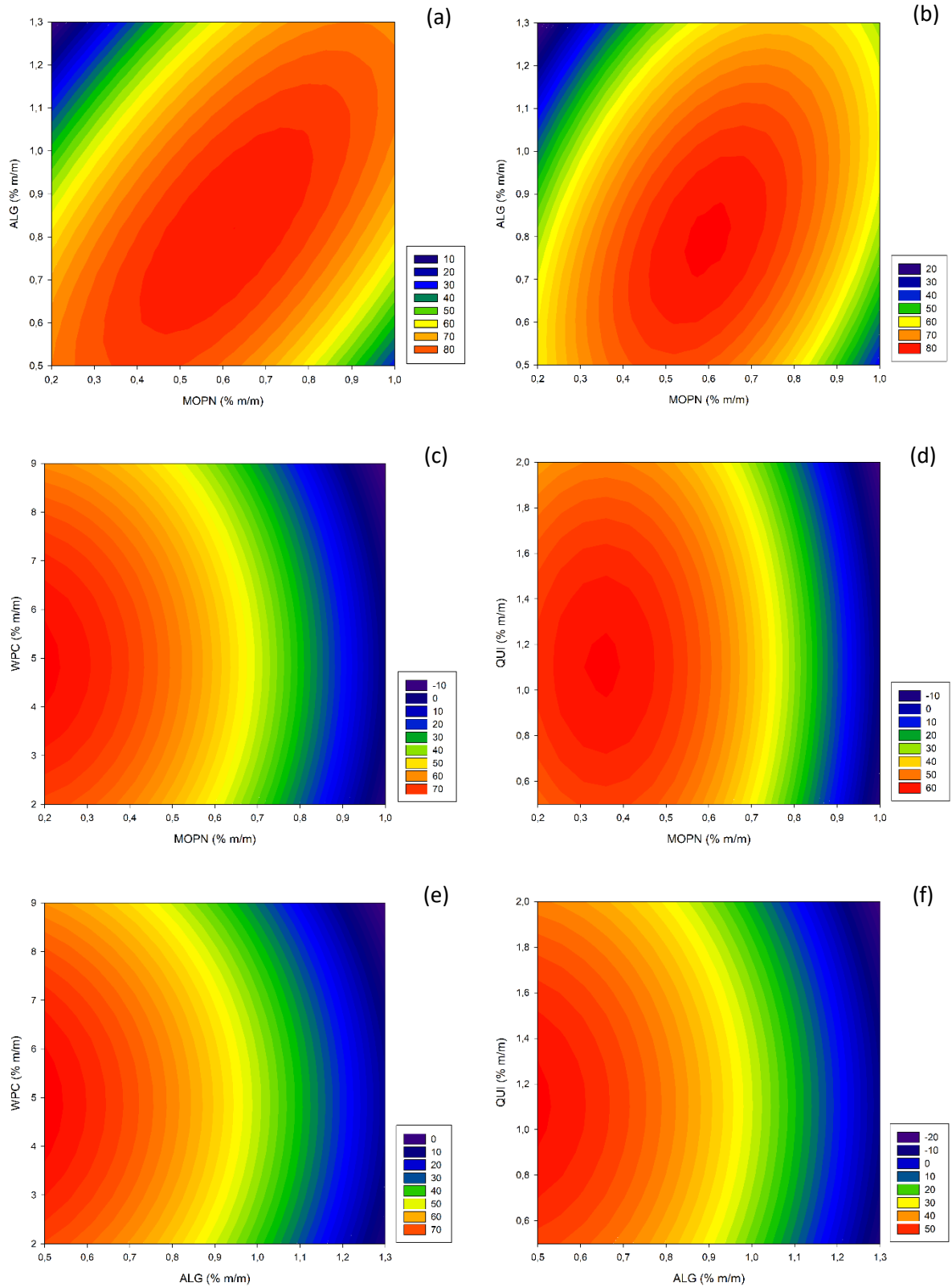
De acordo com o modelo obtido para as micropartículas revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) o efeito linear das concentrações de MOPN, ALG e WPC, bem como, a interação entre MOPN e ALG apresentaram contribuição positiva para a eficiência de encapsulação, sendo que o fator que mais influenciou no aprisionamento de células foi a interação entre mucilagem de ora-pro-nobis e alginato, indicando que esses biopolímeros atuam juntamente para a formação das micropartículas, como foi relatado por Morais et al. (2023). Tais autores, por meio da caracterização física, química e térmica observaram que a mucilagem de ora-pro-nobis foi capaz de interagir com o alginato de sódio na formação das cadeias poliméricas, dando origem a esferas com uso potencial na indústria de alimentos.

Quanto ao modelo predito para as microesferas recobertas com quitosana, observa-se que as maiores contribuições para a eficiência de encapsulação estão relacionadas a concentração de mucilagem de ora-pro-nobis, sendo que o efeito linear de MOPN contribuiu positivamente, enquanto o efeito quadrático dessa variável contribuiu de forma negativa para a retenção de células nas microesferas, apontando novamente que o emprego desse hidrocoloide pode alterar as características das partículas (Morais et al., 2023; Neves et al., 2020) e as propriedades de materiais poliméricos (Oliveira et al., 2019).

Comparando somente os efeitos lineares das soluções de recobrimento nos modelos matemáticos, observa-se que tanto WPC quanto QUI auxiliaram positivamente no aprisionamento de células, sugerindo que o pH empregado (4,0) contribuiu para que as proteínas tivessem carga elétrica líquida positiva e a quitosana também estivesse positivamente carregada tornando possível a interação eletrostática com ALG e MOPN que são biopolímeros aniônicos. No entanto, verifica-se que a contribuição de WPC foi inferior a de QUI o que pode estar relacionado com a intensidade dessa carga elétrica líquida, ou seja, WPC possivelmente apresentava menos carga elétrica positiva do que QUI (Rodrigues et al., 2020).

A Figura 3 mostra que os maiores valores para eficiência de encapsulação de *L. acidophilus* foram obtidos em concentrações de MOPN variando de 0,4% a 0,7% (m/m) para micropartículas WPC_p e de aproximadamente 0,6% (m/m) para os tratamentos QUI_p. Quanto ao teor de ALG as maiores contagens de células viáveis foram encontradas em intervalos de 0,6% a 1,0% (m/m) para WPC_p e entre 0,7% e 0,9% (m/m) para QUI_p. Por fim, concentrações de aproximadamente 5% (m/m) de WPC e teores de quitosana na faixa de 1,0 a 1,2% (m/m) também proporcionaram maior aprisionamento de probióticos. Com base nesses valores foi definido que as micropartículas correspondentes ao ponto central do DCCR seguiriam para a caracterização e aplicação. Sendo assim, as próximas análises foram realizadas com microesferas produzidas com: 0,6% (m/m) de MOPN, 0,9% (m/m) de ALG e 5,25% (m/m) de WPC para partícula WPC_p; 0,6% (m/m) de MOPN, 0,9% (m/m) ALG e 1,2% (m/m) de QUI para micropartícula QUI_p; e finalmente, 0,6% (m/m) de MOPN e 0,9% (m/m) de ALG para a partícula controle sem revestimento (SR_p).

Figura 3 - Curva de contorno para a eficiência de encapsulação levando em consideração as variáveis (a) MOPN e ALG nos tratamentos revestidos com WPC, (b) MOPN e ALG nos tratamentos revestidos com QUI, (c) MOPN e WPC, (d) MOPN e QUI, (e) ALG e WPC, (f) ALG e QUI.



Fonte: Do autor (2024).

3.3 Potencial zeta das soluções

O potencial zeta é uma medida da carga elétrica superficial de moléculas e revela-se como um valor preditivo de reações entre biomateriais. Portanto, o valor encontrado para tal parâmetro nos permite inferir a respeito da interação superficial entre biopolímeros (Ni et al., 2023).

A solução polimérica composta por 0,6% (m/m) de MOPN e 0,9% (m/m) de ALG (SR_s) foi avaliada quanto ao pH e, posteriormente, quanto ao potencial zeta e os resultados indicaram uma carga elétrica líquida superficial de $-55,28 \pm 1,43$ mV em pH de $6,08 \pm 0,13$ (Tabela 4). A título de comparação, uma solução contendo 1,5% (m/m) de alginato, que corresponde ao total de biopolímeros empregados no tratamento SR_s, também foi avaliada e registrou um potencial zeta de $-51,28 \pm 1,93$ mV em um pH de $7,05 \pm 0,10$. A partir desses resultados observa-se que a substituição de 0,6% de alginato por MOPN causou um aumento na carga elétrica superficial negativa da solução. Esse resultado pode ser explicado pelo fato das proteínas presentes na mucilagem de ora-pro-nobis apresentarem ponto isoelétrico em pH igual a 1,7. Logo, em valores de pHs superiores ao ponto isoelétrico esse hidrocólide está carregado negativamente, sendo a carga mais negativa quanto maior o pH da solução de MOPN (Morais et al., 2019).

Ainda com relação a SR_s, a carga elétrica negativa dessa solução também está associada a presença de grupamentos carboxílicos (COO⁻) na matriz polimérica do alginato e da mucilagem de ora-pro-nobis. Segundo Moraes et al. (2023) e Rodrigues et al. (2020), esse grupo químico confere ao alginato e às mucilagens a capacidade de se ligarem com a água e com íons divalentes como Ca²⁺ para formarem geis/partículas e também possibilitam a interação desses biopolímeros com materiais carregados positivamente.

Tabela 4 - Caracterização das soluções formadoras das micropartículas.

Tratamentos	pH	Potencial zeta (mV)
SR_s	$6,08 \pm 0,13$	$-55,28 \pm 1,43$
WPC_s	$4,00 \pm 0,20$	$1,75 \pm 0,11$
QUI_s	$4,00 \pm 0,20$	$50,18 \pm 1,50$

SR_s: solução de mucilagem de ora-pro-nobis e alginato de sódio; WPC_s: solução de concentrado proteico de soro de leite; QUI_s: solução de quitosana;

As soluções de recobrimento formadas por 5,25% (m/m) de concentrado proteico de soro de leite ou 1,2% (m/m) de quitosana tiveram o pH previamente ajustados para $4,0 \pm 0,2$

antes de serem empregadas no revestimento. O valor de pH foi escolhido com base no ponto isoelétrico das proteínas do soro de leite (4,6 – 5,2) e no pKa da quitosana (6,2 – 7,0) (Jones; Decker; McClements, 2010; Rivera et al., 2015).

De acordo com a Tabela 4, os resultados mostraram que no pH escolhido a solução de quitosana apresentou uma carga elétrica líquida positiva de $+50,18 \pm 1,50$ mV, visto que em valores de pH inferiores ao pKa, esse biopolímero apresenta-se carregado positivamente, podendo interagir por meio de interações eletrostáticas com ALG e MOPN para revestimento das micropartículas. Os valores encontrados no presente trabalho se assemelham aos resultados obtidos por Rivera et al. (2015) na síntese de nanocápsulas ocas de alginato recobertas com quitosana. Segundo os autores, as soluções de quitosana em pH = 3 e alginato em pH = 6 apresentaram cargas superficiais de $+ 48,20 \pm 7,00$ e $-58,28 \pm 4,48$, respectivamente, o que significa que podem interagir por forças eletrostáticas para realizar deposição de camadas na microcápsula.

No caso do concentrado proteico de soro de leite a carga elétrica líquida superficial também foi positiva $+1,75 \pm 0,11$ mV. No entanto, o valor baixo registrado para essa solução indica que o pH está próximo do ponto isoelétrico desse conjunto de proteínas e por consequência, a deposição da camada superficial pode ser menos eficiente. Este resultado também pode ser associado à menor contribuição do teor de WPC nos modelos matemáticos gerados para eficiência de encapsulação. Na formação de micropartículas de alginato, pectina e concentrado proteico de soro de leite, Aguilar et al. (2015) verificaram que o potencial zeta da solução WPC variou de $22,5 \pm 3,7$ mV (pH 3) a $-27,2 \pm 4,2$ mV (pH 7), faixa que abrange o resultado encontrado para soluções de WPC no presente trabalho.

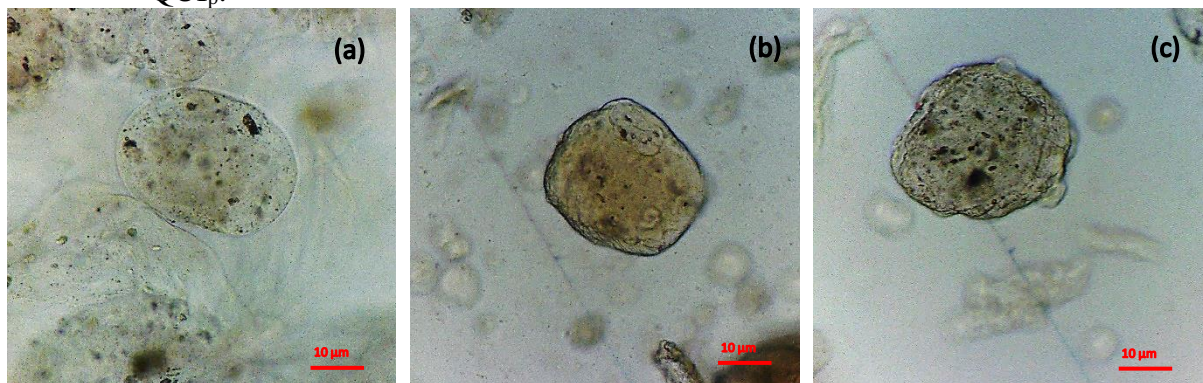
3.4 Análise morfológica

A matriz polimérica utilizada para encapsular princípios ativos influencia diretamente na morfologia das partículas, podendo alterar o formato, o tamanho e a regularidade superficial das esferas (Morais et al., 2023). Na Figura 4 são mostradas as fotomicrografias das micropartículas úmidas sem revestimento, revestidas com WPC e revestidas com QUI.

Percebe-se que as micropartículas úmidas apresentaram formato esférico com uma superfície ligeiramente irregular. É possível notar que a irregularidade é maior para as partículas que foram submetidas ao revestimento. Além disso, observa-se uma coloração esverdeada/amarronzada para todas as partículas, sendo mais intensa para as esferas recobertas. Segundo Moraes et al. (2023), essa coloração está associada à presença de MOPN na matriz

polimérica. Contudo, a diferença na intensidade da cor e na irregularidade das microesferas WPC_p e QUI_p em comparação à SR_p é um indicativo de que houve uma deposição de camada formada pelos polímeros adicionados na superfície das microesferas. Ainda com relação a microscopia óptica, observa-se em segundo plano que há micropartículas maiores e menores, apontando que o método empregado para síntese permite a obtenção de microesferas com diferentes diâmetros.

Figura 4 - Fotomicrografias com aumento de 40 x das micropartículas (a) SR_p (b) WPC_p (c) QUI_p .



Fonte: Do autor (2024).

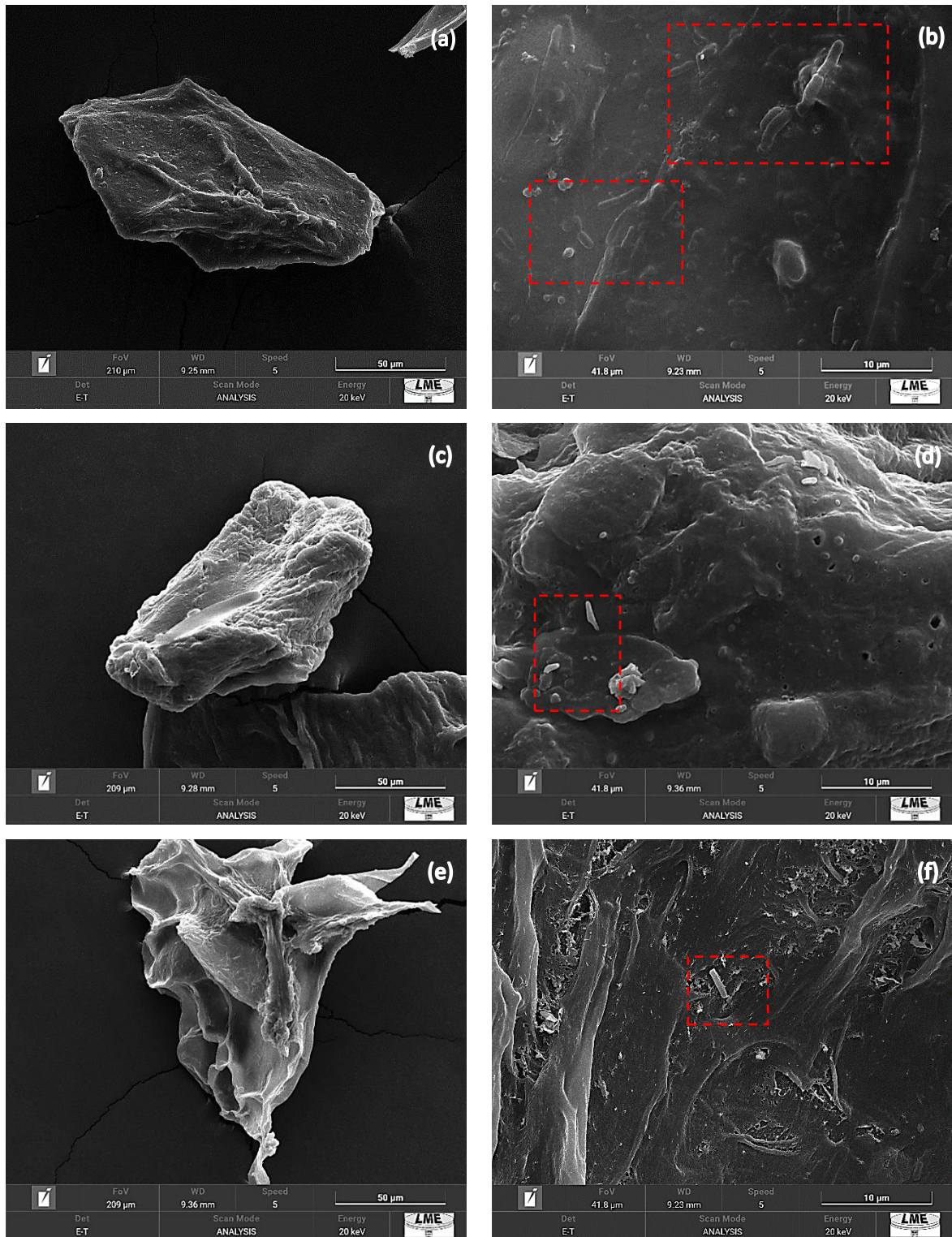
As eletromicrografias de varredura (Figura 5) mostraram que todas as micropartículas sofreram um encolhimento apresentando alterações no formato após a secagem do material, o que pode ocorrer devido a colapsos da rede polimérica durante o processo de liofilização. De acordo com Li et al. (2021), o enrugamento das esferas à base de alginato pode ser atribuído principalmente ao fato de que as estruturas porosas das micropartículas e a sinerese de água dessas microesferas durante a liofilização desestabilizam a rede de gel do alginato, causando problemas estruturais na matriz polimérica. Observação morfológica semelhante foi verificada por Huang et al. (2021) para esferas de alginato e goma laca e por Moraes et al. (2023) para hidrogéis de alginato e mucilagem de *ora-pro-nobis*.

Quanto à porosidade, observa-se que a micropartícula com poros menores foi SR_p seguida da WPC_p e, por fim, a QUI_p apresentou grandes poros e uma estrutura bem diferente das demais (Figura 5e). O mesmo comportamento foi observado para esferas de alginato combinadas com inulina, goma arábica e quitosana avaliadas por Li et al. (2021). Esses autores observaram que inulina e goma arábica contribuíram para formação de esferas menos porosas. Por outro lado a superfície das esferas de alginato revestidas com quitosana parecia mais áspera, porosa e robusta, o que segundo esses pesquisadores pode ser atribuído ao emprego de concentrações de quitosana insuficientes para impedir o colapso da rede de gel.

Verificou-se ainda que a micropartícula sem revestimento (SR_p) apresentou uma superfície mais densa, homogênea e com menor deposição de grumos (Figura 5a). Em contrapartida a microesfera revestida com WPC_p exibiu um grande acúmulo de grumos (Figura 4c) que pode estar associado à baixa carga elétrica líquida positiva (próxima a 0) da solução de WPC, de forma que as proteínas passaram a aglomerar-se na superfície da esfera. Resultado similar foi obtido por Luo et al. (2022) para partículas de alginato, pectina e proteína do soro de leite. Tais esferas apresentaram grumos e aglomerações em sua superfície que foram atribuída à presença de proteínas do soro de leite.

Finalmente, na Figura 5 (b), (d) e (f) é possível verificar a presença de células de *L. acidophilus* ao longo da estrutura das partículas, o que confirma sua caracterização como esfera ou partícula do tipo matriz, na qual o material ativo está distribuído ao longo de toda a rede polimérica (Etchepare et al., 2020; Rodrigues et al., 2022). Além disso, é possível observar que a partícula SR_p exibiu maior quantidade de células na superfície quando comparadas às demais, indicando que realmente houve a deposição de uma camada de WPC ou de QUI na superfície das partículas submetidas ao revestimento, o que pode proporcionar uma maior proteção dos microrganismos frente às condições adversas. Etchepare et al. (2016) e Etchepare et al. (2020) encapsularam *L. acidophilus* em matriz de alginato revestida com quitosana e matriz de alginato recoberta com proteína do soro de leite, respectivamente, e também observaram que as células de probióticos estavam distribuídas em toda a matriz polimérica e que as partículas sem revestimento apresentavam mais células na superfície do que as revestidas. Tais resultados corroboram com o encontrado no presente trabalho.

Figura 5 - Eletromicrografias de varredura das micropartículas (a) SR_p - 2000 x; (b) SR_p - 10000 x; (c) WPC_p - 2000 x; (d) WPC_p - 10000 x; (e) QUI_p - 2000 x; (F) QUI_p - 10000 x.



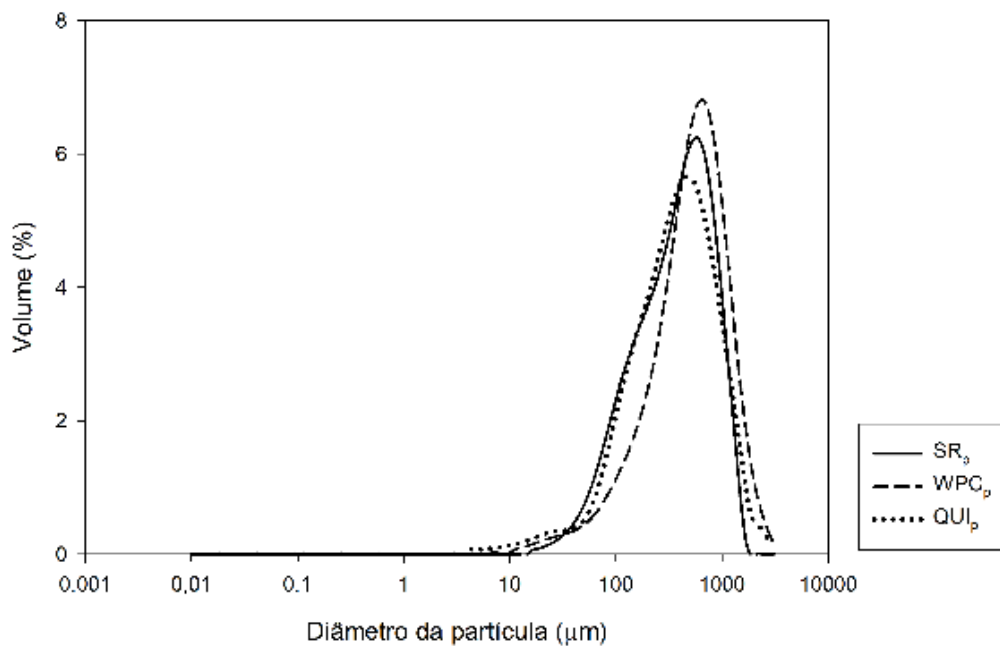
 L. acidophilus na superfície das micropartículas.

Fonte: Do autor (2024).

3.5 Diâmetro médio das micropartículas e índice de polidispersividade (Span)

A distribuição de tamanho das micropartículas SR_p , WPC_p e QUI_p pode ser observada na Figura 6. Nota-se que todos os tratamentos apresentaram uma distribuição de tamanho unimodal e normal, o que também pode ser visto pelo índice de polidispersividade (Span) que variou de 2,12 a 2,59 (Tabela 5). Resultado semelhante foi encontrado por Aguilar et al. (2015) ao produzirem esferas de alginato empregando um bico duplo fluido para atomização das soluções poliméricas. Nesse trabalho, os autores também observaram uma distribuição de tamanho unimodal e normal, sendo o índice de polidispersividade compreendido entre 1,5 e 2,0. Segundo tal estudo, esses valores de Span indicam que as partículas apresentam uma estreita faixa de distribuição de tamanho o que é atribuído ao material polimérico e ao uso do atomizador duplo fluido para a produção de micropartículas.

Figura 6 - Distribuição de tamanho das micropartículas sem revestimento SR_p , revestidas com concentrado proteico de soro de leite WPC_p , ou revestidas com quitosana QUI_p .



Fonte: Do autor (2024).

Na Tabela 5 verifica-se que as micropartículas apresentaram diâmetros médios de Sauter (D_{32}) estatisticamente diferentes ($p < 0,05$), confirmando que o tipo de material polimérico influencia diretamente no tamanho das microsferas. A micropartícula SR_p exibiu um diâmetro médio de $232,00 \pm 5,57 \mu\text{m}$, valor inferior ao observado por Nami et al. (2020) ao produzirem

micropartículas de alginato e goma persa (340 - 370 μm), mas próximo ao diâmetro registrado para esferas de alginato e gel de psyllium (80 - 220 μm) (Haghshenas et al., 2015). O diâmetro encontrado para a partícula sem revestimento também foi muito inferior ao obtido anteriormente por Morais et al. (2023) para esferas de ALG e MOPN (1,69 mm). Essa variação de tamanho deve-se às diferenças nos processos para obtenção dos hidrogéis. No trabalho de Morais et al. (2023), os hidrogéis esféricos foram produzidos empregando uma agulha de 0,45 mm acoplada a uma bomba peristáltica com vazão de 0,5 mL/min, enquanto a presente pesquisa empregou um bico atomizador, que permitiu a formação de partículas menores.

A microesfera WPC_p apresentou um diâmetro médio ($272,25 \pm 11,72 \mu\text{m}$) superior ao valor encontrado para a partícula sem revestimento. Em seus estudos Aguilar et al. (2015) também registraram que partículas de alginato e pectina ao serem recobertas com WPC aumentaram o diâmetro de 259 μm para 283 μm . Ademais, Etchepare et al. (2020) também observaram fenômeno semelhante, no qual as esferas revestidas com WPC foram maiores que as amostras sintetizadas somente com ALG, sendo tal comportamento atribuído a deposição da camada polimérica superficial e também a formação de aglomerados de proteínas na superfície das esferas.

Por outro lado, a micropartícula QUI_p apontou um diâmetro inferior às demais ($172,50 \pm 9,07 \mu\text{m}$), o que não era previsto, mas pode ser justificado pelo fato da quitosana interagir eletrostaticamente com os grupos carboxila negativos do alginato, reduzindo as ligações desse polímero com as moléculas de água. Isso pode levar à desidratação do gel, expelindo parte da água presente na partícula e, portanto, reduzindo seu tamanho (Etchepare et al., 2020)

Tabela 5 - Diâmetro médio (D32) e índice de polidispersividade (Span) das micropartículas SR_p , WPC_p e QUI_p .

Tratamentos	Diâmetro médio de Sauter - D_{32} (μm)	Índice de polidispersividade (Span)
SR_p	$232,00 \pm 5,57^b$	$2,18 \pm 0,07^b$
WPC_p	$272,25 \pm 11,72^a$	$2,12 \pm 0,06^b$
QUI_p	$172,50 \pm 9,07^c$	$2,59 \pm 0,37^a$

SR_p : micropartícula sem revestimento; WPC_p : micropartícula revestida com concentrado proteico de soro de leite; QUI_p : micropartícula revestida com quitosana.

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey ($p < 0,05$).

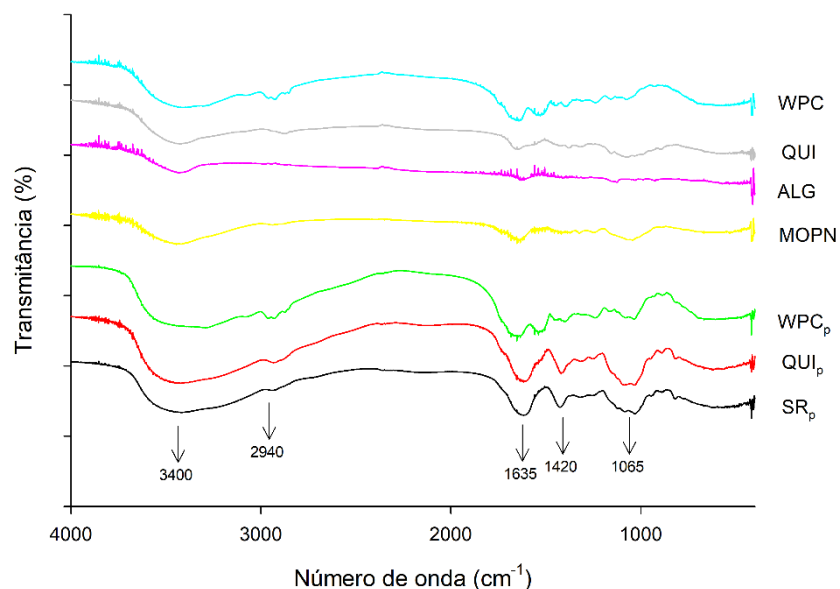
O tamanho da partícula é um parâmetro fundamental em aplicações industriais de microencapsulação, pois pode ser um fator limitante em produtos alimentícios, uma vez que partículas grandes podem afetar a textura e os atributos sensoriais de um alimento (Norcino et

al., 2022). Todavia, microesferas maiores proporcionam melhor proteção às células aprisionadas contra ambientes agressivos (Mahmoud et al., 2020). Nami et al. (2020) produziram partículas de alginato e goma persa para encapsulação de *Lactococcus lactis* com diâmetro de 340 - 370 μm . As esferas exibiram alta eficiência de encapsulação ($> 98\%$), boa proteção contra as condições digestivas simuladas ($> 61\%$) e não causaram alterações na textura de suco de laranja. Com base nisso, pode-se inferir que as micropartículas SR_p , WPC_p e QUI_p são opções viáveis para a aplicação de *L. acidophilus* microencapsulados em produtos alimentícios.

3.6 Espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier

Os espectros de FTIR de alginato de sódio, mucilagem de ora-pro-nobis, concentrado proteico de soro de leite, quitosana e das micropartículas SR_p , WPC_p e QUI_p podem ser observados na Figura 7.

Figura 7 - Espectro de FTIR para os biopolímeros ALG, MOPN, QUI, WPC e para as micropartículas SR_p , WPC_p , QUI_p .



Fonte: Do autor (2024).

O espectro de alginato (ALG) apresentou uma banda em torno de 3300 cm^{-1} relacionada ao estiramento O – H e um pequeno pico próximo de 1600 cm^{-1} associado a vibração de alongamento do grupo carbonil ($-\text{C}=\text{O}$) presente no ânion carboxilato (COO^-). Por fim, notou-

se um pico muito ligeiro entre 1050 – 1100 cm^{-1} atribuído ao alongamento assimétrico da estrutura sacarídica C–O–C, típica desse biopolímero (Kulig et al., 2016).

Para a mucilagem de ora-pro-nobis (MOPN) observou-se uma banda próxima a 3400 cm^{-1} relacionada ao estiramento da vibração associada de O – H e N – H. Além disso, notou-se um pico muito sutil em torno de 2925 cm^{-1} que pode se referir ao estiramento da vibração assimétrica fraca de C – H e uma banda em torno de 1640 cm^{-1} que também pode estar ligada aos estiramentos assimétricos da ligação do grupo COO^- . Por fim próximo a 1050 cm^{-1} registrou-se uma banda característica de vibração de alongamento C – O. O espectro obtido no presente trabalho foi muito semelhante ao relatado por Conceição et al. (2014) na caracterização da mucilagem de ora-pro-nobis.

O concentrado proteico de soro de leite (WPC) exibiu um espectro com uma banda larga em 3300 cm^{-1} também atribuída ao estiramento da ligação O – H e um pequeno pico em 2925 cm^{-1} relacionada ao estiramento alifático fraco de C – H. Ademais observou-se picos em 1633 cm^{-1} e 1537 cm^{-1} característicos de proteína. O primeiro está associado ao alongamento das ligações C = O e C – N na região da amida I, já o segundo pode descrever o alongamento da ligação C – N e a flexão de N – H na região da amida II (Luo et al., 2022).

O espectro da quitosana (QUI) mostrou uma banda ampla em torno de 3400 cm^{-1} que corresponde a vibrações de estiramento provenientes da sobreposição das ligações O – H e N – H. O pico suave em 2881 cm^{-1} pode identificar vibrações de estiramento CH_2 do anel de piranose na estrutura da quitosana. Entre 1652 cm^{-1} e 1598 cm^{-1} verificou-se o alongamento da ligação C = O e a flexão de N – H, das amidas I e II, respectivamente. Por fim a banda larga entre 1030 cm^{-1} e 1080 cm^{-1} mostrou o estiramento C – O – C e C – O característicos de polissacarídeos (Kulig et al., 2016).

Quanto às micropartículas, observou-se que a banda compreendida entre 3300 cm^{-1} e 3500 cm^{-1} apresentou maior intensidade para SR_p , WPC_p e QUI_p quando comparada aos polímeros puros. Além disso, essa banda mostrou-se mais acentuada para micropartículas revestidas com WPC e QUI, indicando a formação de novas ligações de hidrogênio entre os grupos OH e NH dos materiais de revestimento com os grupamentos C = O e O – H dos materiais de parede. Ademais, verificou-se um aumento na intensidade do pico próximo à 1635 cm^{-1} e o surgimento de um pico em 1420 cm^{-1} que sugere a formação de complexos polieletrólitos entre os revestimentos (QUI ou WPC) e a matriz de ALG e MOPN por meio da interação eletrostática entre as aminas e o grupo carboxila (Kulig et al., 2016).

Pesquisas anteriores registraram comportamento semelhante ao observado no presente trabalho. Luo et al. (2022) e Kulig et al. (2016) ao avaliarem os espectros de FTIR para

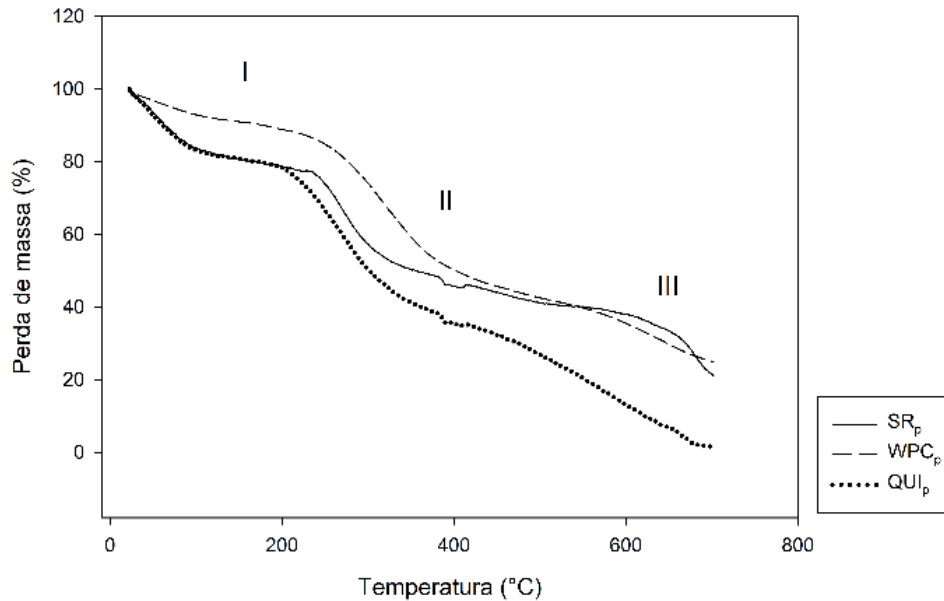
partículas de alginato, pectina e proteína do soro de leite e para complexos de alginato e quitosana, respectivamente, perceberam alterações na intensidade da banda próxima a 3300 cm^{-1} e nos picos em torno de 1630 cm^{-1} e 1440 cm^{-1} o que atribuíram a interações eletrostáticas entre os biopolímeros de carga oposta. Ainda, Rodrigues et al. (2022) afirmam que picos mais acentuados em comprimentos de ondas próximos a 1627 cm^{-1} e 1417 cm^{-1} também podem estar relacionados à interação satisfatória entre o cálcio e as frações aniônicas de hidrocoloides, confirmando a capacidade de alginato e mucilagem de ora-pro-nobis se ligarem com o cálcio para a formar partículas por gelificação iônica.

3.7 Análise térmica das micropartículas

Na Figura 8 estão representadas as curvas de TGA para as micropartículas SR_p , WPC_p e QUI_p . Observa-se que todas as esferas apresentaram curvas com três estágios de degradação térmica. No geral, o primeiro estágio pode ser identificado em intervalo de temperatura de $25\text{ }^\circ\text{C}$ a $120\text{ }^\circ\text{C}$ e corresponde à perda de água que está adsorvida por interações físicas e perda de compostos voláteis presentes no sistema polimérico. Nesta etapa a redução de massa foi de aproximadamente 18%, 10% e 16% para as partículas SR_p , WPC_p e QUI_p , respectivamente. Tais valores se assemelham ao resultado de 18% de perda de massa encontrado por Moraes et al. (2023) para esferas de alginato e mucilagem de ora-pro-nobis e também se encontram próximos da faixa de 10% – 16% relatada por Luo et al. (2022) para partículas de alginato, pectina e proteína do soro do leite na fase inicial de degradação. A menor perda de massa para as esferas recobertas possivelmente ocorreu devido a sinérese do gel no processo de interação eletrostática, isto é, as partículas revestidas apresentaram menos água adsorvida pois na formação da camada superficial houve contração da matriz polimérica e, conseqüentemente, liberação de água da estrutura (Etchepare et al., 2020).

O segundo estágio de degradação ocorreu aproximadamente entre $110\text{ }^\circ\text{C}$ e $370\text{ }^\circ\text{C}$ e a perda de massa foi de cerca de 32 – 41% o que foi atribuído a decomposição química dos principais componentes, entre eles polissacarídeos e proteínas. Em intervalo de temperatura semelhante ($150\text{ a }350\text{ }^\circ\text{C}$) Luo et al. (2022) verificaram uma perda de massa de 26 a 28 % para compósitos de alginato-pectina- proteína do soro de leite. Segundo esses autores, a composição das partículas interfere diretamente em sua degradação já que essa fase é marcada por uma despolimerização e descarboxilação das moléculas presentes na matriz polimérica.

Figura 8 - Curvas de TGA para as micropartículas sem revestimento (SR_p); revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) e revestidas com quitosana (QUI_p).



Fonte: Do autor (2024).

De acordo com Kulig et al. (2016) a estabilidade térmica de um material é determinada pela etapa de maior perda de massa durante o processo de degradação, logo, os materiais mais resistentes termicamente são aqueles que apresentam menor redução da massa e maior temperatura inicial de decomposição. Ao analisarmos o segundo estágio de degradação das micropartículas detalhado na Tabela 6 notamos que as esferas SR_p e WPC_p foram as mais estáveis, uma vez que apresentaram as maiores temperaturas iniciais de decomposição e as menores perdas de massa. Em contrapartida, a esfera revestida com quitosana foi a menos estável pois iniciou a degradação em uma temperatura inferior às demais e também exibiu uma redução maior de massa o que pode estar relacionado a sua estrutura mais porosa e menos densa tornando-a mais susceptível à decomposição. A relação entre porosidade e resistência térmica também foi observada por Morais et al. (2023) para as esferas de ALG e MOPN de modo que foi constatado que os hidrogéis menos estáveis termicamente foram os que apresentaram maior número de poros e uma estrutura mais frágil química e mecanicamente.

Finalmente, o terceiro estágio de degradação foi por volta de 340 a 700 °C e está associado à degradação oxidativa de resíduos de carbono e minerais. A perda de massa foi de aproximadamente 25 % para SR_p e WPC_p , enquanto QUI_p continuou degradando até atingir uma massa residual de aproximadamente 1,5%. Kulig et al. (2016) observaram que no último estágio de degradação complexos entre alginato e quitosana apresentaram uma perda de massa de 22,21% e um resíduo de 30,56%. A diferença de valor entre tal estudo e o presente trabalho

pode ser justificada pela temperatura final de degradação, já que Kulig et al. (2016) finalizaram a análise termogravimétrica em 300 °C. Vale ressaltar que a presença de massa residual das amostras pode ser atribuída ao fato de a análise ter sido conduzida em atmosfera de nitrogênio, gerando uma decomposição incompleta do material, o que também foi relatado por Oliveira et al. (2019).

Tabela 6 - Estabilidade térmica das micropartículas no segundo estágio de degradação.

Tratamentos	T _i * (°C)	T _F (°C)	PM (%) (T _i -T _F)
SR _p	120	360	32
WPC _p	135	370	35
QUI _p	110	340	41

SR_p: micropartícula sem revestimento; WPC_p: micropartícula revestida com concentrado proteico de soro de leite; QUI_p: micropartícula revestida com quitosana.

*T_i, temperatura inicial de decomposição; T_F, temperatura final de decomposição; PM, % de perda de massa na faixa de decomposição.

3.8 Viabilidade dos microrganismos em condição gastrointestinal simulada

A técnica e os materiais utilizados para encapsulação de probióticos devem ser adequados para que as bactérias aprisionadas permaneçam viáveis durante a passagem pelo trato gastrointestinal, podendo colonizar o intestino e oferecer benefícios à saúde do consumidor (Rodrigues et al., 2022). Para avaliar a eficiência das micropartículas SR_p, WPC_p e QUI_p na proteção de *L. acidophilus*, as esferas e células livres foram submetidas à condição gastrointestinal simulada, permanecendo 2 horas em meio gástrico e sequencialmente sendo adicionados de suco intestinal simulado no qual permaneceram por mais 2 horas, totalizando 4 horas de ensaio. A taxa de sobrevivência dos probióticos nos sucos gástrico e intestinal simulados pode ser observada na Tabela 7.

É possível notar que a redução no número de células viáveis de *L. acidophilus* após a exposição ao SGJ e SIJ foi maior para as células livres que apresentaram uma taxa de sobrevivência de apenas 64,23% e 56,58%, respectivamente. Os resultados de taxa de sobrevivência superiores para os probióticos encapsulados indicam que o material foi capaz de minimizar efetivamente os danos causados aos microrganismos pelos fluidos digestivos, confirmando a eficiência desses biopolímeros na encapsulação de probióticos.

Tabela 7 - Taxa de sobrevivência dos *L. acidophilus* encapsulados e livres em condição gastrointestinal simulada.

Tratamentos	Sobrevivência (%)	
	Suco gástrico simulado (SGJ)	Suco intestinal simulado (SIJ)
SR_p	78,51 ± 1,51 ^a	68,65 ± 0,76 ^a
WPC_p	78,17 ± 0,78 ^a	67,45 ± 1,16 ^a
QUI_p	71,35 ± 1,14 ^b	63,27 ± 0,19 ^b
Células livres	64,23 ± 1,79 ^c	56,58 ± 0,44 ^c

SR_p: micropartícula sem revestimento; WPC_p: micropartícula revestida com concentrado proteico de soro de leite; QUI_p: micropartícula revestida com quitosana.

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

As maiores taxas de sobrevivência foram encontradas para a micropartícula SR_p com contagem de células viáveis de 78,51% para o meio gástrico e sobrevivência de 68,65% de microrganismo ao final de todo o processo digestivo simulado. Esse valor se assemelha ao encontrado por Nami et al. (2020) em microesferas de alginato e goma persa para encapsulação de *L. lactis*. Os autores observaram que após a digestão simulada a contagem de células reduziu de 9,98 Log UFC.g⁻¹ para 6,10 Log de UFC.g⁻¹, representando uma taxa de sobrevivência de aproximadamente 61% ao empregar a goma persa. Além disso, registraram que as esferas formadas somente com alginato permitiram a sobrevivência de apenas 40% dos microrganismos, indicando boa atuação da goma na proteção dos probióticos. Rodrigues et al. (2022) também avaliaram a sobrevivência de microrganismos encapsulados combinando alginato com diferentes gomas e mucilagens e observaram que ao final do processo digestivo a sobrevivência de *L. reuteri* foi 31,84% para células livres, 54,8% para hidrogéis de alginato e 72-76,6% para esferas de alginato associadas a mucilagem de psyllium, mucilagem de mutamba, goma de tamarindo e goma konjac. Segundo tais pesquisadores, a maior sobrevivência das células com a utilização de gomas/mucilagens pode estar associada a capacidade desses hidrocoloides melhorarem as propriedades das partículas, como a resistência à degradação em pH ácido estomacal e resistência à hidrólise enzimática nas condições intestinais simuladas, com possíveis efeitos sinérgicos entre as bactérias aprisionadas e o material encapsulante.

Uma outra justificativa foi usada por Mu et al. (2018) para explicar a maior taxa de sobrevivência de *L. acidophilus* em hidrogéis de alginato e goma konjac. De acordo com esse estudo, a goma konjac melhorou a estabilidade das partículas e a sobrevivência da bactéria, principalmente por aumentar a estanqueidade do material de parede e por realizar atividade

prebiótica, garantindo aos microrganismos proteção na fase gástrica e liberação progressiva sob sucos entéricos.

Apesar de não haver relatos do emprego da mucilagem de ora-pro-nobis para encapsulação de probióticos, acredita-se que a maior sobrevivência de *L. acidophilus* em esferas de ALG e MOPN se deve ao fato desse hidrocoloide atuar juntamente com o alginato na formação dos hidrogéis, permitindo a síntese de partículas com estrutura e porosidade necessária para resistir ao suco gástrico simulado e serem desintegradas progressivamente em meio intestinal simulado de forma que os probióticos possam colonizar o intestino grosso (Morais et al., 2023). Além disso, as folhas da ora-pro-nobis são ricas em fibras apresentando um conteúdo de 2,4 – 5,2% (m/m) de fibras solúveis e de 19,2 – 33,9% (m/m) de fibras insolúveis (Nogueira Silva et al., 2023), o que pode contribuir para uma ação prebiótica da MOPN, favorecendo a viabilidade de *L. acidophilus* no trato intestinal.

A micropartícula WPC_p também apresentou valores elevados para a taxa de sobrevivência de *L. acidophilus*, sendo estatisticamente igual ($p < 0,05$) à esfera SR_p para ambos os meios empregados. Verificou-se que após a exposição ao meio gástrico simulado a contagem de células viáveis foi de 78,17% e ao final do processo digestivo 67,45% dos microrganismos haviam sobrevivido. Esses valores são próximos aos encontrados por Gbassi et al. (2009) para encapsulação de *L. plantarum* em partículas de alginato revestidas com proteína do soro de leite. Tais autores notaram que após a passagem pelo meio gástrico simulado as esferas de alginato e proteína permitiram a sobrevivência de 57-77% de microrganismos e após a passagem pelo meio intestinal cerca 30% dos probióticos eram viáveis, o que foi considerado satisfatório, uma vez que as células livres foram completamente eliminadas ainda na fase gástrica da digestão. Etchepare et al. (2020) também produziram micropartículas probióticas com alginato e WPC e verificaram que a aplicação de uma camada superficial de proteína foi benéfica para a sobrevivência de *L. acidophilus*, que no estado livre apresentou uma contagem de 4,79 Log UFC.g⁻¹ (38%) e em partículas de ALG-WPC o número foi de 9,19 Log UFC.g⁻¹ (77,35%) após digestão simulada. Em suma, a eficiência da proteína do soro de leite na proteção dos probióticos possivelmente está atrelada à abundância de resíduos de aminoácidos em sua estrutura que permite a formação de complexos polieletrólitos a partir de interações eletrostáticas formando complexos mais resistentes às enzimas digestivas e às condições inóspitas do suco gástrico. Além disso, seu efeito tamponante e sua resistência à ambientes ácidos também proporcionam maior viabilidade aos microrganismos (Krunić; Obradović; Rakin, 2019; Luo et al., 2022).

Quanto a micropartícula revestida com quitosana, observa-se que QUI_p também conferiu proteção aos probióticos, sendo registrada uma taxa de sobrevivência de 63,27% no final da digestão contra apenas 56,58% para as células livres. Diversos autores também verificaram que o uso de quitosana em micropartículas probióticas possibilita uma maior viabilidade de microrganismos quando submetidos à digestão *in vitro* (Lin et al., 2024). Phuong Ta et al. (2021) notaram que microesferas de alginato e quitosana permitiram uma viabilidade de 3,68 Log UFC.mL⁻¹ no final da digestão gástrica enquanto as células livres de *L. platarum* perderam viabilidade nos primeiros 60 minutos de ensaio digestivo. Vaziri; Alemzadeh; Vossoughi (2018) também verificaram que após a imersão de hidrogéis de alginato e quitosana em meio gastrointestinal simulado a redução de *L. platarum* foi de 1,78 Log UFC.mL⁻¹, ao passo que a redução foi de 4,70 Log UFC.mL⁻¹ para microrganismos livres.

Ao compararmos a taxa de sobrevivência probiótica para as três micropartículas observamos que QUI_p obteve resultados inferiores às demais, o que pode ser justificado pela maior porosidade dessas esferas, conforme foi relatado na análise de microscopia. Poros maiores facilitam a interação entre os microrganismos e o suco gastrointestinal, que por apresentar pHs extremos (~2,0) e enzimas digestivas, provocam maior perda de viabilidade celular. Além disso, sabe-se que a quitosana é um biopolímero com propriedade antimicrobiana, o que também pode prejudicar a atividade das cepas probióticas (Lin et al., 2024).

3.9 Viabilidade dos probióticos durante o armazenamento do sorvete

Para avaliar a eficiência de proteção das micropartículas, *L. acidophilus* livres e encapsulados foram adicionados em sorvetes e monitorados durante 60 dias de armazenamento à -20 °C. Os resultados para a viabilidade dos probióticos ao longo do tempo podem ser observados na Tabela 8.

Inicialmente, observa-se que na data de produção dos sorvetes (0 dias) houve uma ligeira redução no número de *L. acidophilus* viáveis, com maior intensidade para as células livres e encapsuladas em QUI_p. Esse fenômeno indica que o processo de congelamento reduziu a viabilidade dos probióticos o que está associado ao estresse mecânico nas estruturas celulares durante a cristalização; à exposição longa a baixas temperaturas que reduz a atividade celular; e ao alto teor de oxigênio dissolvido no sorvete que é uma desvantagem para a sobrevivência dessas bactérias lácticas (Tyutkov et al., 2022). Tal comportamento também foi observado por Farias et al. (2019) em sorvetes adicionados de *L. casei* e *L. rhamnosus* livres e encapsulados com matriz de alginato e quitosana.

Tabela 8 - Taxa de sobrevivência dos *L. acidophilus* nos sorvetes.

Trat	Viabilidade (%)					
	0 dias	15 dias	30 dias	45 dias	60 dias	Recrist.
SR_p	99,69 ± 0,12 ^{aA}	83,74 ± 1,51 ^{bA}	80,25 ± 0,78 ^{cA}	77,29 ± 0,20 ^{dA}	71,23 ± 0,27 ^{eA}	93,32 ± 2,05 ^A
WPC_p	97,90 ± 0,40 ^{aA}	82,44 ± 0,39 ^{bA}	79,11 ± 0,79 ^{cA}	77,26 ± 0,52 ^{cA}	72,49 ± 0,92 ^{dA}	92,47 ± 0,09 ^{AB}
QUI_p	91,95 ± 1,65 ^{aB}	76,75 ± 1,70 ^{bB}	75,04 ± 0,77 ^{bB}	71,48 ± 0,24 ^{cB}	65,48 ± 1,38 ^{dB}	90,12 ± 0,12 ^B
Livres	91,99 ± 1,33 ^{aB}	74,62 ± 1,10 ^{bC}	73,33 ± 2,14 ^{bcB}	72,16 ± 0,19 ^{cB}	67,51 ± 1,13 ^{dC}	86,98 ± 0,62 ^C

SR_p: micropartícula sem revestimento; WPC_p: micropartícula revestida com concentrado proteico de soro de leite; QUI_p: micropartícula revestida com quitosana.

Recrist.: viabilidade dos microrganismos após o teste de recristalização.

Médias seguidas de mesmas letras minúsculas na linha e mesmas letras maiúsculas na coluna não diferem entre si pelo teste de Tukey (p<0,05).

Na Tabela 8 verifica-se que houve uma redução significativa (p<0,05) na taxa de sobrevivência dos probióticos durante o armazenamento, sendo registrada uma perda de aproximadamente 25% entre os tempos 0 e 60 dias para todos os tratamentos. A contagem inicial de *L. acidophilus* foi de 8,52 – 9,05 Log UFC.g⁻¹ e após os 60 dias diminuiu para 6,16 – 6,61 Log UFC.g⁻¹, como pode ser observado na Figura 8. A mesma tendência decrescente foi constatada por Afzaal et al., (2019b) para sorvetes adicionados de *L. casei* livres e encapsulados com alginato e com WPC. Após 80 dias os autores registraram contagem 6,41 Log UFC.mL⁻¹, 8,59 Log UFC.mL⁻¹ e 8,39 Log UFC.mL⁻¹ para os sorvetes contendo células livres, encapsuladas com alginato e encapsuladas com WPC. Sengsaengthong; Oonsivilai, (2019) também observaram a diminuição da contagem de *Lactobacillus sp.* livres e microencapsulados em sorvetes armazenados por 180 dias. Ao final desse período, a taxa de sobrevivência obtida por esses pesquisadores foi de 72% e 93% para células livres e encapsuladas, respectivamente. A diferença dos valores registrados entre esses estudos e o presente trabalho pode ser justificada pela variedade de cepa probiótica utilizada nas pesquisas, que possivelmente apresentam resistências físicas distintas (Farias et al., 2019).

A perda de viabilidade dos probióticos em sorvetes está relacionada com as operações de produção e conservação desse alimento. Segundo Tyutkov et al. (2022) durante o processo de congelamento e armazenamento de sorvetes, a célula probiótica fica exposta a diversos fatores destrutivos, sendo os mais significativos o estresse térmico, a formação e crescimento de cristais de gelo, a pressão osmótica e o estresse oxidativo. Cada um desses pontos causa danos mecânicos e/ou físico-químicos na estrutura da parede celular e o efeito sinérgico desses fatores contribuem para a redução expressiva de viabilidade dos microrganismos ao longo do tempo, o que explica os resultados obtidos neste estudo.

A partir da Tabela 8 é possível perceber que dentro de um mesmo intervalo de tempo houve diferença significativa entre os tratamentos ($p < 0,05$). No geral, as esferas SR_p e WPC_p foram estatisticamente iguais e apresentaram as maiores contagens de células viáveis para todos os tempos avaliados, o que está de acordo com os resultados encontrados nas análises de caracterização e teste digestivo das micropartículas. Acredita-se que a maior proteção conferida por esses hidrogéis deve-se principalmente ao fato de serem menos porosos e com maiores diâmetros. De acordo com Nezamdoost-Sani et al. (2024) esferas maiores e menos porosas permitem elevada proteção do princípio ativo devido à redução de contato com o meio externo e à diminuição da área de superfície exposta ao oxigênio, o que fornece uma boa barreira contra condições adversas. Vale ressaltar, que *L. acidophilus* são bactérias microaerófilas e, portanto, quando são expostos à um alto teor de oxigênio, como observado em sorvetes, ocorre uma redução na viabilidade probiótica (Reale et al., 2015).

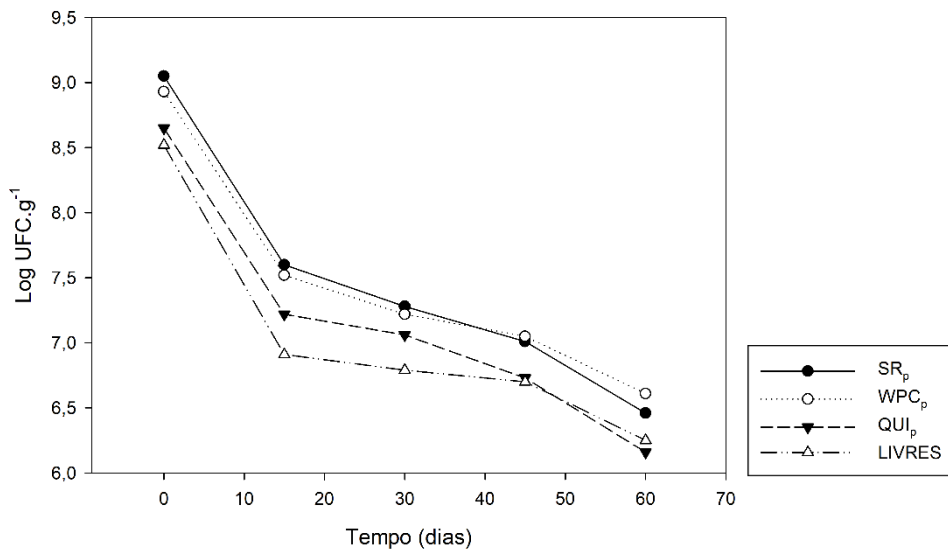
A porosidade e o tamanho da partícula também podem explicar o motivo do hidrogel QUI_p apresentar taxas de sobrevivência mais baixas quando comparado às demais partículas. Observa-se na Tabela 8 que nos tempos 0, 30 e 45 dias a viabilidade dos *L. acidophilus* encapsulados em QUI_p foi estatisticamente igual à sobrevivência das células livres, indicando que tal micropartícula não foi capaz de proteger significativamente os probióticos nesses tempos. Ademais, no final do armazenamento (60 dias) a quantidade de probióticos vivos foi ligeiramente inferior em QUI_p comparado as células livres. Esse comportamento também pode estar relacionado com a menor resistência térmica dos hidrogéis revestidos com quitosana, como foi verificado na análise termogravimétrica, e principalmente, se deve à ação antimicrobiana desse polissacarídeo (Lin et al., 2024). Segundo Xie et al. (2023) a quitosana pode inibir o crescimento de microrganismos, incluindo as bactérias do ácido lático, logo, sua utilização como material transportador de probióticos pode ser desvantajosa, dependendo da cepa empregada.

Com base nos resultados pode-se notar que as micropartículas SR_p e WPC_p foram eficientes na proteção dos *L. acidophilus* durante a produção e armazenamento de sorvete, uma vez que a redução da viabilidade probiótica foi significativamente superior para as células livres. Autores como Damodharan et al. (2017), Afzaal et al. (2019b) e Zaeim et al. (2020) também comprovaram a eficácia da encapsulação para garantir a sobrevivência de cepas probióticas em sorvetes, empregando como materiais encapsulantes alginato-goma alfarroba, alginato e WPC e alginato-quitosana.

Além disso, observa-se na Figura 9 que a contagem de células viáveis para os tratamentos SR_p e WPC_p ao fim de 45 dias de armazenamento foi superior 7 Log UFC.g^{-1} , o

que possibilita que o sorvete produzido e armazenado durante 45 dias seja considerado um alimento funcional. Segundo a Instrução Normativa N° 76 de 2020 (ANVISA) para que um alimento seja considerado probiótico é necessário a presença de células na concentração de 10^8 e 10^{11} UFC.g⁻¹ (Brasil, 2020). Todavia, a Organização Mundial da Saúde estabelece que a viabilidade de probióticos deve permanecer acima de 10^7 UFC.g⁻¹ até o fim da vida útil do produto para que, posteriormente, o microrganismo confira benefícios à saúde do consumidor (FAO/WHO, 2002). Sendo assim, o sorvete adicionado de micropartícula QUI_p deixou de ser considerado alimento funcional em torno de 35 dias de armazenamento, enquanto o sorvete com células livres no 15° dia já não poderia ser denominado sorvete probiótico. Tais resultados confirmam que as partículas produzidas com alginato, mucilagem de ora-pro-nobis, concentrado proteico de soro de leite e quitosana foram capazes de proteger os *L. acidophilus* durante o armazenamento dos sorvetes.

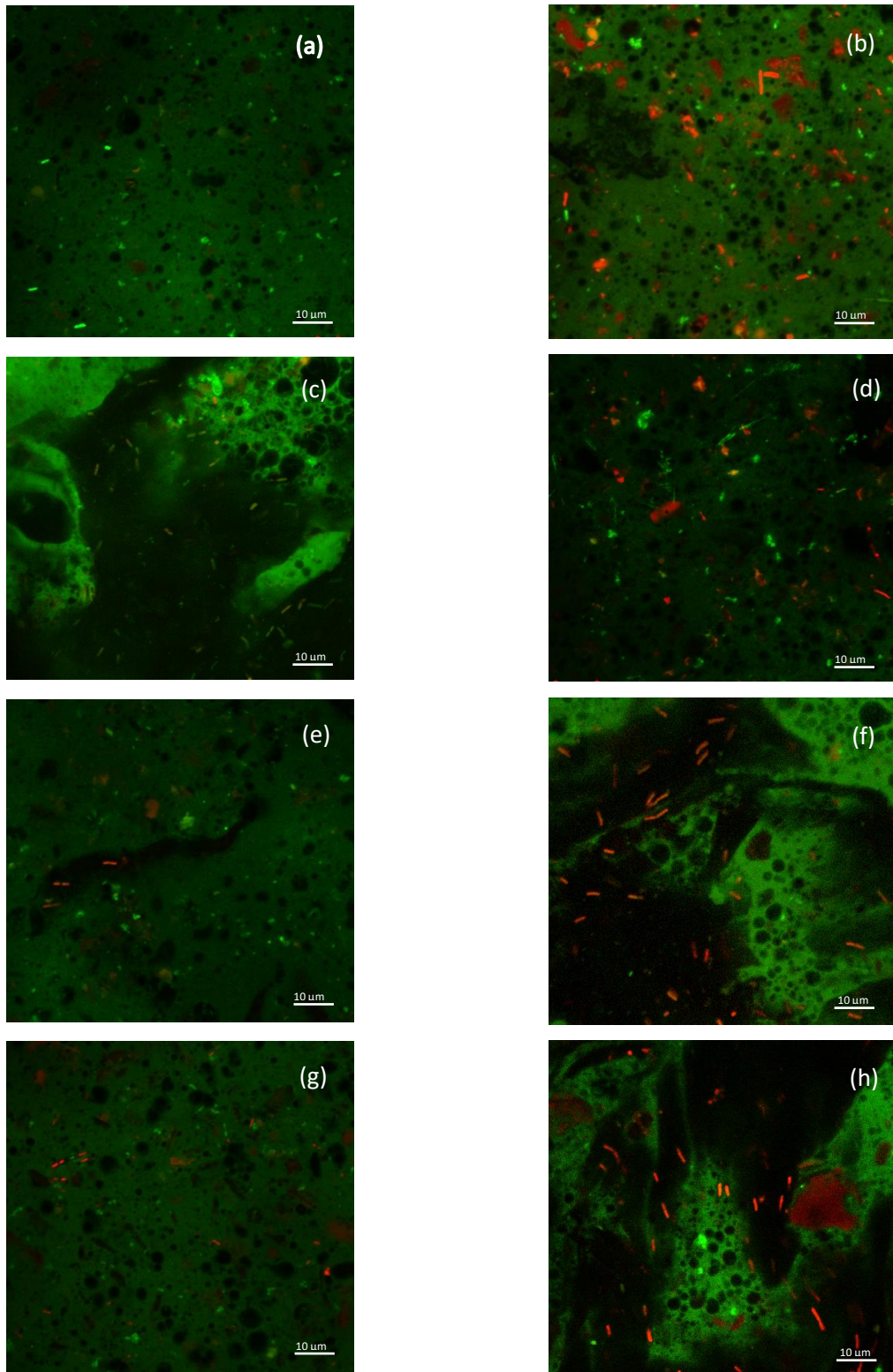
Figura 9 - Viabilidade ao longo do armazenamento de *L. acidophilus* adicionados no sorvete na forma livre (LIVRES), em micropartículas sem revestimento SR_p, revestidas com concentrado proteico de soro de leite WPC_p, e revestidas com quitosana QUI_p.



Fonte: Do autor (2024).

A eficácia das esferas na preservação dos microrganismos também pode ser observada a partir da microscopia de fluorescência realizada nos tempos 0 e 60 dias (Figura 10).

Figura 10 - Micrografia de fluorescência dos sorvetes adicionados das micropartículas (a) SR_p – 0 dias; (b) SR_p – 60 dias; (c)WPC_p – 0 dias; (d)WPC_p – 60 dias; (e) QUI_p – 0 dias; (f) QUI_p – 60 dias; (g) Células livres – 0 dias; (h) Células livres – 60 dias;



Ampliação de 100 x.

Fonte: Do autor (2024).

Observou-se na Figura 10 que no tempo inicial de armazenamento as amostras eram compostas majoritariamente por células vivas, retratadas por bastonetes fluorescentes na cor verde. Em contrapartida, verifica-se que em 60 dias grande parte dos microrganismos apresentavam coloração vermelha, indicando a redução da viabilidade celular. Também é possível notar maior sobrevivência para os tratamentos SR_p e WPC_p, uma vez que ainda apresentavam células vivas no 60º dia, diferentemente dos sorvetes com partículas QUI_p e com células livres que ao final do armazenamento exibiam, sobretudo células mortas. Logo, é possível concluir que as imagens obtidas pela técnica de microscopia de fluorescência confirmam visualmente os resultados encontrados a partir do plaqueamento dos sorvetes probióticos e atestam a maior eficiência das micropartículas SR_p e WPC_p na proteção de *L. acidophilus*.

3.10 Viabilidade dos probióticos em condições de recristalização

Durante o armazenamento de gelados comestíveis é comum a ocorrência de flutuações de temperatura que geram o redimensionamento e a redistribuição dos cristais de gelo, podendo causar danos adicionais à estrutura do alimento e à membrana fosfolipídica de células vivas (Zhu; Zhou; Sun, 2019). Para avaliar o efeito da recristalização na viabilidade de *L. acidophilus*, os sorvetes adicionados de microrganismos livres e encapsulados foram submetidos a flutuações de temperatura durante 5 dias e os resultados estão dispostos na Tabela 8.

É possível observar que a recristalização afetou de forma significativa a viabilidade dos probióticos, com efeito mais pronunciado para as células livres que apresentaram uma taxa de sobrevivência de 86,98% enquanto a viabilidade dos microrganismos microencapsulados foi igual ou superior a 90,12%.

Segundo Zeashan et al. (2020), o aumento dos cristais de gelo decorrente das flutuações de temperatura afeta a viabilidade dos probióticos em sorvete, pois os cristais grandes e distribuídos de forma desigual podem causar irreversivelmente rupturas e danos mecânicos na parede celular, gerando extravasamento do conteúdo interno e a morte dos microrganismos. Além disso, Abghari; Sheikh-Zeinoddin; Soleimani-zad, (2011) afirmam que as células já danificadas durante o congelamento devido ao estresse térmico e a cristalização morrem gradualmente no armazenamento do sorvete devido a recristalização do gelo.

Diante do exposto, é notável que as micropartículas sintetizadas neste trabalho foram eficazes na proteção dos *L. acidophilus* durante a recristalização, o que se dá pelo fato das esferas formarem uma camada ao redor dos microrganismos evitando os danos mecânicos

causados pelos grandes cristais de gelo. Ademais, observa-se que entre os tratamentos, a partícula QUI_p foi a que forneceu menor proteção aos microrganismos o que pode ser atrelado aos seus grandes poros que facilitam o contato dos cristais de gelo com os microrganismos e por consequência, contribuem para a lise celular (Zeashan et al., 2020).

Na literatura não foram encontrados trabalhos que avaliassem especificamente o dano da recristalização de gelo na viabilidade de probióticos adicionados em sorvete na forma livre e encapsulado. Todavia, é possível inferir o efeito da recristalização ao longo do armazenamento de sorvetes probióticos, já que, esse fenômeno ocorre naturalmente em alimentos congelados. Estudos como o de Afzaal et al. (2019b) e Afzaal et al. (2020) observaram que a viabilidade de *L. casei* e *L. acidophilus* ao longo 80 dias de armazenamento de sorvete foi maior para células encapsuladas do que para células livres. No primeiro caso, a taxa de sobrevivência para células livres, encapsuladas com alginato ou com WPC foi de 67% (6,41 Log UFC.mL⁻¹), 93% (8,59 Log UFC.mL⁻¹) e 88% (8,39 Log UFC.mL⁻¹), respectivamente (Afzaal et al., 2019b). Já na segunda pesquisa, a viabilidade dos probióticos foi de 61% (6,12 Log UFC.mL⁻¹) para células livres, 88% (8,74 Log UFC.mL⁻¹) para células encapsuladas com alginato e 84% (8,39 Log UFC.mL⁻¹) para microrganismos encapsulados com carragenina (Afzaal et al., 2020). Zaeim et al., (2020) também verificou que ao final de 90 dias de armazenamento sorvetes com *L. plantarum* livres exibiram uma viabilidade de 81% (6,63 Log UFC.g⁻¹) enquanto células encapsuladas com alginato, quitosana e inulina sobreviveram com uma taxa de 90% (7,37 Log UFC.g⁻¹). Por fim, Maleki et al. (2023) registou que células encapsuladas com proteína do soro de leite, biocelulose e inulina tiveram uma viabilidade de 94% (6,68 Log UFC.g⁻¹), já os *L. rhamnosus* livres apresentam viabilidade de 86% (6,11 Log UFC.g⁻¹) em sorvetes armazenados por 50 dias. Os trabalhos citados evidenciam que as micropartículas são capazes de proteger os probióticos ao longo do armazenamento e, portanto, durante o processo de recristalização, corroborando com os resultados encontrados no presente estudo.

4 CONCLUSÃO

A partir dos resultados nota-se que *L. acidophilus* ATCC 4356 foi encapsulado com sucesso nas micropartículas sintetizadas com alginato e mucilagem de ora-pro-nobis revestidas com concentrado proteico de soro de leite ou quitosana. A eficiência de encapsulação variou de 77,89% a 96,86% para as esferas sem revestimento (SR_p), de 77,06% a 98,40% para partículas

revestidas com concentrado proteico de soro de leite (WPC_p) e por fim, de 74,73% a 99,56% para os tratamentos revestidos com quitosana (QUI_p).

As concentrações otimizadas de cada biopolímero foram de 0,6 %(m/m) para MOPN, 0,9% (m/m) para ALG, 5,25% (m/m) para WPC e 1,2%(m/m) para QUI. A análise de potencial zeta verificou a carga elétrica líquida negativa para a solução de alginato e mucilagem, e validou a carga elétrica líquida positiva para as soluções de WPC e QUI, indicando a capacidade das soluções interagirem eletrostaticamente para formação de partículas revestidas. O revestimento das esferas também foi confirmado por meio de alterações nos espectros de FTIR dos hidrogéis e dos biopolímeros puros.

As partículas sintetizadas apresentaram formato esférico e diâmetros médios de Sauter (D₃₂) que variaram de 172,50 a 272,25 µm. Uma alta porosidade e um menor diâmetro foram observados para os hidrogéis QUI_p que também exibiram menor resistência térmica. Essas características associadas à capacidade antimicrobiana da quitosana contribuíram para que os probióticos encapsulados em QUI_p, quando comparados com SR_p e WPC_p, apresentassem menor taxa de sobrevivência em condição gastrointestinal simulada e menor viabilidade durante a produção e armazenamento de sorvete.

Finalmente, verificou-se que os sorvetes adicionados de micropartículas SR_p e WPC_p apresentaram contagem de células viáveis superiores a 7 Log UFC.g⁻¹, durante 45 dias de armazenamento, podendo ser considerados alimentos funcionais nesse período. Para os sorvetes produzidos com QUI_p e células livres a alegação de alimento probiótico só pode ser usada durante 35 dias e 15 dias respectivamente.

Diante do exposto, conclui-se que as micropartículas sintetizadas com alginato, mucilagem de ora-pro-nobis, concentrado proteico de soro de leite ou quitosana foram eficientes na encapsulação e na proteção de *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356 frente a condições adversas. Ademais, os resultados confirmam o grande potencial da mucilagem de ora-pro-nobis como material de suporte para encapsulação de compostos biológicos e/ou químicos, encontrando diversas aplicações no setor alimentício.

REFERÊNCIAS

- ABGHARI, A.; SHEIKH-ZEINODDIN, M.; SOLEIMANIAN-ZAD, S. Nonfermented ice cream as a carrier for *Lactobacillus acidophilus* and *Lactobacillus rhamnosus*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 1, p. 84–92, jan. 2011.
- AFZAAL, M. et al. Functional exploration of free and encapsulated probiotic bacteria in yogurt and simulated gastrointestinal conditions. **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 12, p. 3931–3940, 1 dez. 2019a.
- AFZAAL, M. et al. The Effect of Encapsulation on The Stability of Probiotic Bacteria in Ice Cream and Simulated Gastrointestinal Conditions. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 4, p. 1348–1354, 1 dez. 2019b.
- AFZAAL, M. et al. Survival and stability of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated gastrointestinal conditions and in ice cream. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 3, p. 1649–1656, 1 mar. 2020.
- AGUILAR, K. C. et al. Protein adsorption onto alginate-pectin microparticles and films produced by ionic gelation. **Journal of Food Engineering**, v. 154, p. 17–24, 2015.
- AIDER-KACI, F. A.; AIDARBEKOVA, S.; AIDER, M. Impact of electro-activated whey on growth, acid and bile resistance of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus acidophilus* ATCC 4356. **Heliyon**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2023.
- AMARAL, T. N. et al. Blends of *Pereskia aculeata* Miller mucilage, guar gum, and gum Arabic added to fermented milk beverages. **Food Hydrocolloids**, v. 79, p. 331–342, 2018.
- BATISTA, N. N. et al. Nondairy ice cream based on fermented yam (*Dioscorea* sp.). **Food Science and Nutrition**, v. 7, n. 5, p. 1899–1907, 1 maio 2019.
- BRASIL. Instrução Normativa IN Nº 76 de 5 de novembro de 2020. Dispõe sobre a atualização da lista de constituintes, de limites de uso, de alegações e de rotulagem complementar dos suplementos alimentares. Diário Oficial da União, Brasília, 11 nov. 2020. Disponível em: <
https://antigo.anvisa.gov.br/documents/10181/5809185/IN_76_2020_COMP.pdf/28f071f8-8079-4671-a1ec-b47c8dd30917>. Acesso em: 08 mar. 2024.
- CHING, S. H.; BANSAL, N.; BHANDARI, B. Alginate gel particles—A review of production techniques and physical properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 6, p. 1133–1152, 13 abr. 2017.
- CONCEIÇÃO, M. C. et al. Thermal and microstructural stability of a powdered gum derived from *Pereskia aculeata* Miller leaves. **Food Hydrocolloids**, v. 40, p. 104–114, 2014.
- DAMODHARAN, K. et al. Co-encapsulation of lactic acid bacteria and prebiotic with alginate-fenugreek gum-locust bean gum matrix: Viability of encapsulated bacteria under simulated gastrointestinal condition and during storage time. **Biotechnology and Bioprocess Engineering**, v. 22, n. 3, p. 265–271, 1 jun. 2017.

ETCHEPARE, M. DE A. et al. Effect of resistant starch and chitosan on survival of *Lactobacillus acidophilus* microencapsulated with sodium alginate. **LWT - Food Science and Technology**, v. 65, p. 511–517, 2016.

ETCHEPARE, M. et al. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **LWT**, v. 117, 1 jan. 2020.

FAO/WHO, JOINT. Food and Agriculture Organization of the United States/World Health Organization. Working group report on drafting guidelines for the evaluation of probiotics in food. Guidelines for the Evaluation of Probiotics in Food. London, Ontario, Canada, 30 April - 1 May. 2002

FARIAS, T. G. S. DE et al. Viabilities of *Lactobacillus rhamnosus* ASCC 290 and *Lactobacillus casei* ATCC 334 (in free form or encapsulated with calcium alginate-chitosan) in yellow mombin ice cream. **LWT**, v. 100, p. 391–396, 1 fev. 2019.

GBASSI, G. K. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, n. 1, p. 103–105, 31 jan. 2009.

GIAROLA, T. M. DE O. et al. Effects of Golden Flaxseed Flour on Ice Recrystallization in Uvaia (*Eugenia pyriformis* Cambess.) Diet Sherbet. **Food and Bioprocess Technology**, v. 12, n. 12, p. 2120–2135, 1 dez. 2019.

HAGHSHENAS, B. et al. Microencapsulation of probiotic bacteria *Lactobacillus plantarum* 15HN using alginate-psyllium-fenugreek polymeric blends. **Journal of Applied Microbiology**, v. 118, n. 4, p. 1048–1057, 2015.

HOMAYOUNI, A. ET AL. Factors influencing Probiotic survival in Ice Cream: a Review. **International Journal of Dairy Science**, v. 7, p. 1–10, 2012.

HUANG, X. et al. Microencapsulation of probiotic lactobacilli with shellac as moisture barrier and to allow controlled release. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 101, n. 2, p. 726–734, 30 jan. 2021.

IQBAL, R. et al. In-vitro GIT Tolerance of Microencapsulated *Bifidobacterium bifidum* ATCC 35914 Using Polysaccharide-Protein Matrix. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 11, n. 3, p. 830–839, 2019.

JONES, O. G.; DECKER, E. A.; MCCLEMENTS, D. J. Comparison of protein-polysaccharide nanoparticle fabrication methods: Impact of biopolymer complexation before or after particle formation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 344, n. 1, p. 21–29, 2010.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. C. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **LWT**, v. 39, n. 2, p. 177–183, 2006.

- KRASAEEKOOPT, W.; WATCHARAPOKA, S. Effect of addition of inulin and galactooligosaccharide on the survival of microencapsulated probiotics in alginate beads coated with chitosan in simulated digestive system, yogurt and fruit juice. **LWT**, v. 57, n. 2, p. 761–766, 2014.
- KRUNIĆ, T.; OBRADOVIĆ, N. S.; RAKIN, M. B. Application of whey protein and whey protein hydrolysate as protein based carrier for probiotic starter culture. **Food Chemistry**, v. 293, p. 74–82, 30 set. 2019.
- KULIG, D. et al. Study on alginate-chitosan complex formed with different polymers ratio. **Polymers**, v. 8, n. 5, 2016.
- LAGO, A. M. T. et al. Ultrasound-assisted oil-in-water nanoemulsion produced from *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Ultrasonics Sonochemistry**, v. 50, p. 339–353, 2019.
- LI, Q. et al. Fabrication and characterization of Ca(II)-alginate-based beads combined with different polysaccharides as vehicles for delivery, release and storage of tea polyphenols. **Food Hydrocolloids**, v. 112, n. August 2020, p. 106274, 2021.
- LIMA JUNIOR, F. A. et al. Response surface methodology for optimization of the mucilage extraction process from *Pereskia aculeata* Miller. **Food Hydrocolloids**, v. 33, n. 1, p. 38–47, 2013.
- LIN, Q. et al. **Advances in polysaccharides for probiotic delivery: Properties, methods, and applications**. **Carbohydrate Polymers**, v. 323, 121414, 1 jan. 2024.
- LUO, X. et al. Preparation of alginate-whey protein isolate and alginate-pectin-whey protein isolate composites for protection and delivery of *Lactobacillus plantarum*. **Food Research International**, v. 161, 1 nov. 2022.
- MAHMOUD, M. et al. Survivability of alginate-microencapsulated *Lactobacillus plantarum* during storage, simulated food processing and gastrointestinal conditions. **Heliyon**, v. 6, n. 3, 1 mar. 2020.
- MALEKI, O. et al. Production and characterization of synbiotic ice cream using microencapsulation and cryopreservation of *Lactobacillus rhamnosus* in whey protein/bio-cellulose/inulin composite microcapsules. **Journal of Food Measurement and Characterization**, v. 17, n. 4, p. 3909–3917, 1 ago. 2023.
- MCCLEMENTS, D. J. Designing biopolymer microgels to encapsulate, protect and deliver bioactive components: Physicochemical aspects. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 240, p. 31–59, 2017.
- MEIRA, A. C. F. D. O. et al. Microencapsulation of β -carotene using barley residue proteins from beer waste as coating material. **Journal of Microencapsulation**, v. 40, n. 3, p. 171–185, 2023.
- MENEZES, C. R. DE et al. Microencapsulação de probióticos: Avanços e perspectivas. **Ciencia Rural**, v. 43, n. 7, p. 1309–1316, 2013.

MENG, L. et al. The nutrient requirements of *Lactobacillus acidophilus* LA-5 and their application to fermented milk. **Journal of Dairy Science**, v. 104, n. 1, p. 138–150, 1 jan. 2021.

MORAIS, L. C. et al. Synthesis and characterization of hydrogels from alginate and ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 140, n. 42, 10 nov. 2023.

MORAIS, L. C. et al. Protein recovery from Barbados gooseberry (*Pereskia aculeata* Miller) leaves by salting out and isoelectric precipitation. **Revista Mexicana de Ingeniería Química**, v. 18, n. 2, p. 419–430, 2019.

MU, R. J. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with konjac glucomannan hydrogel. **Food Hydrocolloids**, v. 76, p. 42–48, 1 mar. 2018.

NAMI, Y. et al. Alginate-Persian Gum-Prebiotics microencapsulation impacts on the survival rate of *Lactococcus lactis* ABRIINW-N19 in orange juice. **LWT**, v. 124, 1 abr. 2020.

NAMI, Y. et al. Impacts of alginate–basil seed mucilage–prebiotic microencapsulation on the survival rate of the potential probiotic *Leuconostoc mesenteroides* ABRIINW.N18 in yogurt. **International Journal of Dairy Technology**, v. 76, n. 1, p. 138–148, 1 fev. 2023.

NEVES, I. C. O. et al. Effect of carrier oil on α -tocopherol encapsulation in ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller) mucilage-whey protein isolate microparticles. **Food Hydrocolloids**, v. 105, 1 ago. 2020.

NEZAMDOOST-SANI, N. et al. A comprehensive review on the utilization of biopolymer hydrogels to encapsulate and protect probiotics in foods. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 254, 127907, 1 jan. 2024.

NGOME, M. T. et al. Biosynthesis of propionic acid using whey and calcium carbonate by mixed culture of *Propionibacterium freundenreichii* ATCC 6207 and *Lactobacillus paracasei*. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**, v. 38, n. 4, p. 811–822, 1 dez. 2021.

NI, F. et al. Enhancing viability of *Lactobacillus plantarum* encapsulated by alginate-gelatin hydrogel beads during gastrointestinal digestion, storage and in the mimic beverage systems. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 224, p. 94–104, 1 jan. 2023.

NOGUEIRA SILVA, N. F. et al. *Pereskia aculeata* Miller as a Novel Food Source: A Review. **FoodsMDPI**, v. 12, n. 11, p. 1-12, 1 jun. 2023.

NORCINO, L. B. et al. Development of alginate/pectin microcapsules by a dual process combining emulsification and ultrasonic gelation for encapsulation and controlled release of anthocyanins from grapes (*Vitis labrusca* L.). **Food Chemistry**, v. 391, 15 out. 2022.

NUNES, C. A. et al. Chemoface: A novel free user-friendly interface for chemometrics. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 23, n. 11, p. 2003–2010, 2012.

- OLIVEIRA, N. L. et al. Development and characterization of biodegradable films based on *Pereskia aculeata* Miller mucilage. **Industrial Crops and Products**, v. 130, n. August 2018, p. 499–510, 2019.
- PEREIRA, G. DAS G. et al. Influence of the partial substitution of skim milk powder for soy extract on ice cream structure and quality. **European Food Research and Technology**, v. 232, n. 6, p. 1093–1102, 2011.
- PHUONG TA, L. et al. Electrospayed mucoadhesive alginate-chitosan microcapsules for gastrointestinal delivery of probiotics. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 597, 15 mar. 2021.
- REALE, A. et al. Tolerance of *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus paracasei* and *Lactobacillus rhamnosus* strains to stress factors encountered in food processing and in the gastro-intestinal tract. **Lwt**, v. 60, n. 2, p. 721–728, 2015.
- RIVERA, M. C. et al. Hollow chitosan/alginate nanocapsules for bioactive compound delivery. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 79, p. 95–102, 2015.
- RODRIGUES, F. J. et al. Effect of natural polymers on the survival of *Lactobacillus casei* encapsulated in alginate microspheres. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, n. 5, p. 431–439, 4 jul. 2017.
- RODRIGUES, F. J. et al. Encapsulated probiotic cells: Relevant techniques, natural sources as encapsulating materials and food applications – A narrative review. **Food Research International**, v. 137, 109682, 1 nov. 2020.
- RODRIGUES, F. J. et al. Effective encapsulation of reuterin-producing *Limosilactobacillus reuteri* in alginate beads prepared with different mucilages/gums. **Biotechnology Reports**, v. 34, 1 jun. 2022.
- SENGSAENGTHONG, S.; OONSIVILAI, R. Effect of microencapsulation of *Lactobacillus* sp. 21C2-10 isolated from cassava pulp on physicochemical, sensorial and microbiological characteristics of ice cream. **International Food Research Journal**, v. 26, n. 2, p. 585–594, 2019.
- SHARMA, D.; SAHARAN, B. S. Simultaneous production of biosurfactants and bacteriocins by probiotic *Lactobacillus casei* MRTL3. **International Journal of Microbiology**, v. 2014, p. 7, 2014.
- SILVA, S. H. et al. Freeze-dried Petit Suisse cheese produced with ora-pro-nóbis (*Pereskia aculeata* Miller) biopolymer and carrageenan mix. **LWT**, v. 149, September 2021, 111764, 2021.
- SOUKOULIS, C.; FISK, I. D.; BOHN, T. Ice cream as a vehicle for incorporating health-promoting ingredients: Conceptualization and overview of quality and storage stability. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 13, n. 4, p. 627–655, 2014.

- TAKEITI, C. Y. et al. Nutritive evaluation of a non-conventional leafy vegetable (*Pereskia aculeata* Miller). **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 60, p. 148–160, 2009.
- TYUTKOV, N. et al. Probiotics viability in frozen food products. **Food Bioscience**, v. 50, 101996, 1 dez. 2022.
- VAZIRI, A. S.; ALEMZADEH, I.; VOSSOUGHI, M. Improving survivability of *Lactobacillus plantarum* in alginate-chitosan beads reinforced by Na-tripolyphosphate dual cross-linking. **LWT**, v. 97, p. 440–447, 1 nov. 2018.
- XIE, A. et al. Polysaccharides, proteins, and their complex as microencapsulation carriers for delivery of probiotics: A review on carrier types and encapsulation techniques. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 242, n. 24784, p. 1 – 18, 1 jul. 2023.
- ZAEIM, D. et al. Microencapsulation of probiotics in multi-polysaccharide microcapsules by electro-hydrodynamic atomization and incorporation into ice-cream formulation. **Food Structure**, v. 25, 1 jul. 2020.
- ZEASHAN, M. et al. Survival and behavior of free and encapsulated probiotic bacteria under simulated human gastrointestinal and technological conditions. **Food Science and Nutrition**, v. 8, n. 5, p. 2419–2426, 1 maio 2020.
- ZHU, Z.; ZHOU, Q.; SUN, D. W. Measuring and controlling ice crystallization in frozen foods: A review of recent developments. **Trends in Food Science and Technology**, v. 90, p. 13–25, 1 ago. 2019.
- ZOU, Q. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium bifidum* F-35 in reinforced alginate microspheres prepared by emulsification/internal gelation. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 46, n. 8, p. 1672–1678, 2011.

TERCEIRA PARTE

CONSIDERAÇÕES FINAIS

No âmbito da encapsulação, observa-se uma crescente busca por novos biopolímeros, como hidrocoloides, que apresentem características físico-químicas e estruturais desejáveis para produzir partículas resistentes que protejam os princípios ativos e permitam sua liberação quando necessário. Neste contexto, cactáceas, como o ora-pro-nobis (*Pereskia aculeata* Miller), revelam-se como fontes de hidrocoloides com potencial aplicação para encapsular substâncias devido sua composição rica em polissacarídeos e proteínas. A mucilagem extraída das folhas de ora-pro-nobis (MOPN) contém um alto teor de biopolímero arabnogalactana, é atóxica, biocompatível e possui a capacidade de interagir com água e outros materiais poliméricos para formar geis, emulsões, entre outros.

Nos últimos anos, o potencial tecnológico da MOPN vem sendo explorado. Todavia, ainda não havia sido registrado o emprego dessa mucilagem para encapsulação de probióticos. Portanto, o presente trabalho mostrou-se promissor no intuito de explorar novas vertentes da MOPN, associando tal hidrocoloide a outros biopolímeros para a encapsulação de microrganismos probióticos e para a produção de um sorvete funcional.

Os resultados deste estudo mostraram que *L. acidophilus* ATCC 4356 foi encapsulado com sucesso nas micropartículas sintetizadas com alginato e mucilagem de ora-pro-nobis revestidas com concentrado proteico de soro de leite ou quitosana, com eficiência de encapsulação superior a 74,73%. As concentrações otimizadas de cada biopolímero foram de 0,6 % (m/m) para mucilagem de ora-pro-nobis, 0,9% (m/m) para alginato de sódio, 5,25% (m/m) para concentrado proteico de soro de leite e 1,2% (m/m) para quitosana. Os microrganismos encapsulados em micropartículas sem revestimentos e revestidas com concentrado proteico de soro de leite apresentaram maior taxa de sobrevivência em condição gastrointestinal simulada e maior viabilidade durante a produção e armazenamento de sorvete, possibilitando que o mesmo fosse considerado um alimento funcional durante 45 dias de armazenamento, com contagem de células viáveis superior a 7 Log UFC.g⁻¹.

Os resultados encontrados confirmam o grande potencial da MOPN como material de suporte para encapsulação de compostos biológicos e/ou químicos, encontrando diversas aplicações no setor alimentício. Além disso, a partir do presente estudo outras pesquisas podem ser desenvolvidas a fim de explorar tal hidrocoloide aplicando novas técnicas de encapsulação, novos princípios ativos e novas combinações de materiais poliméricos.