



UNIVERSIDADE
ESTADUAL de LONDRINA

ELISA LAURENTI

**MATERIAIS ENCAPSULANTES NATURAIS NA
OBTENÇÃO DE ESFERAS DE *S. CEREVISIAE* PARA
INCORPORAÇÃO EM RAÇÃO EXTRUSADA DE FRANGOS
DE CORTE**

Londrina
2011

ELISA LAURENTI

**MATERIAIS ENCAPSULANTES NATURAIS NA
OBTENÇÃO DE ESFERAS DE *S. CEREVISIAE* PARA
INCORPORAÇÃO EM RAÇÃO EXTRUSADA DE
FRANGOS DE CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

Aluna: Elisa Laurenti

Orientadora: Profa. Dra. Sandra Garcia

Londrina
2011

**Catálogo elaborado pela Divisão de Processos Técnicos da Biblioteca Central da
Universidade Estadual de Londrina**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)

L383m Laurenti, Elisa.

Materiais encapsulantes naturais na obtenção de esferas de *S. cerevisiae* para incorporação em ração extrusada de frangos de corte / Elisa Laurenti. – Londrina, 2011. 100 f. : il.

Orientador: Sandra Garcia.

Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Agrárias, Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, 2011.

Inclui bibliografia.

1. Ave doméstica – Alimentação e rações – Teses. 2. *Saccharomyces cerevisiae* – Processo de extrusão – Teses. 3. Leveduras – Solidificação – Teses. 4. Probióticos – Teses. I. Garcia, Sandra. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos. III. Título.

CDU 641:579

ELISA LAURENTI

**MATERIAIS ENCAPSULANTES NATURAIS NA
OBTENÇÃO DE ESFERAS DE *S. CEREVISIAE* PARA
INCORPORAÇÃO EM RAÇÃO EXTRUSADA DE FRANGOS DE
CORTE**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciência de Alimentos, nível Mestrado, da Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Ciência de Alimentos.

BANCA EXAMINADORA

Dra. Adriana Lourenço Soares
UEL – Londrina/PR

Dra. Alice Yoshiko Tanaka
FATEC – Marília/SP

Dra. Sandra Garcia
UEL – Londrina/PR

Londrina, 16 de dezembro de 2011.

À minha mãe.

AGRADECIMENTOS

À minha família, em especial a minha mãe, Ana Cristina Lopes, e minhas irmãs, Camila e Carolina Laurenti, pelos conselhos e ajuda.

Ao meu namorado, Thiago Massa Oliveira, por todas as palavras de conforto e estímulo.

Aos colegas de laboratório, Douglas Xavier, Juliana Moraes Freixo, Rafael Mizobuti e Juliane Alves, por todos os momentos de descontração e apoio.

Aos meus amigos, Vittor Zancanela e Fábio Ronque, por sempre estarem ao meu lado.

À minha orientadora, Sandra Garcia, por toda a paciência e confiança.

À professora Célia Guadalupe Tardeli de Jesus Andrade e ao Osvaldo Capello por todo o ensinamento e companhia no Laboratório de Microscopia e Microanálise.

Ao Valter Garcia Godoy e seus funcionários, da empresa Gibeom, por toda a ajuda oferecida no decorrer deste último ano de mestrado.

Ao Prof^o Antonio R. Giriboni Monteiro e seus estagiários do curso de Engenharia de Alimentos da Universidade Estadual de Maringá, Marina Crepaldi, Diana Gallego, Renata De Marco, Mariane Ferreira Silva, João Olavo Quelhas e Diego Rodrigues Marques, por toda atenção e dedicação em mais uma etapa do meu projeto.

Ào Grupo Lesaffre pela doação dos probióticos com tanta aspiração e eficiência.

Sem vocês, nada seria possível. Obrigada!

**“Sobre tudo que se deve guardar, guarda o teu coração,
porque dele procedem as fontes da vida”**

Bíblia Sagrada (Prov. 4:23)

LAURENTI, Elisa. **Materiais encapsulantes naturais na obtenção de esferas de *S. cerevisiae* para incorporação em ração extrusada de frangos de corte.** 2011. 100 f. Dissertação (Mestrado em Ciência de Alimentos) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina.

RESUMO

A incorporação de probióticos em rações extrusadas para animais continua sendo um grande desafio. A proteção física de um agente ativo através da microencapsulação por hidrocolóides é uma nova abordagem para aprimorar a sobrevivência probiótica. O objetivo deste trabalho foi estudar mucilagens e gomas naturais, ágar-ágar (A-A), alginato (ALG), iota-carragena (I-CAR), goma arábica (ARA), taro (TARO), inhame (INH), linhaça (LIN) e quiabo (QUI) como materiais encapsulantes na obtenção de esferas de *Saccharomyces cerevisiae* para incorporação em ração extrusada de frangos de corte. As esferas foram obtidas pelas técnicas de encapsulação por extrusão, emulsão e imobilização em cubos de ágar-ágar. Foi avaliada a liberação da levedura durante simulação gastrointestinal *in vitro*, a viabilidade da mesma após o processo de extrusão da ração e a microscopia eletrônica de varredura do microrganismo nas diferentes matrizes poliméricas. O método por solidificação ou imobilização em cubos de ágar-ágar foi o mais adequado para se obter esferas rígidas de levedura, além de ser rápido e de ótimo rendimento. As esferas produzidas com os diferentes materiais apresentaram a seguinte ordem crescente de liberação da levedura: QUI<LIN<ALG<INH<ARA<I-CAR<A-A<TARO. De maneira geral, os materiais encapsulantes compostos por mucilagens apresentaram melhor retenção do microrganismo no interior da esfera quando comparados aos tratamentos com gomas. Microscopicamente não foram observadas diferenças entre os tratamentos, no entanto, todos proporcionaram proteção física ao probiótico e apresentaram poros e fissuras na extensão da cápsula. O probiótico encapsulado e não-encapsulado não apresentou células viáveis após o processo de extrusão da ração.

Palavras – chave: Probióticos. Leveduras. Encapsulação. Liberação. Aves.

LAURENTI, Elisa. **Encapsulating material in getting natural spheres of *S. cerevisiae* for incorporation into extruded feed of broilers.** 2011. 100 p. Dissertation (M.Sc. Food Science) - University of Londrina, Londrina.

SUMMARY

The incorporation of probiotics in extruded feed for animals remains a major challenge. The physical protection of an active agent through hydrocolloids microencapsulation is a new approach to improve probiotic survival. The aim of this study was to use natural gums and mucilages, agar agar (A-A), alginate (ALG), iota-carrageenan (I-CAR), arabic gum (ARA), taro (TARO), yams (YAM), linseed (LIN) and okra (OKR) as encapsulating material to get *Saccharomyces cerevisiae* spheres for incorporation into extruded feed of broilers. The spheres were obtained by the techniques of encapsulation by extrusion, emulsion and entrapment in cubes of agar agar. We evaluated the release of yeast during gastrointestinal simulation in vitro, the viability of the same after the extrusion process of the feed and scanning electron microscopy of the microorganism in different polymeric matrices. The method for solidification or entrapment in cubes of agar was most suitable for obtaining hard spheres of yeast, in addition to being fast and optimum performance. The beads produced with different materials showed the following increasing order of release of yeast: OKR<LIN<ALG<YAM<ARA<I-CAR<A-A<TARO. There were no visual differences between the micrographs in all treatments, but all provide physical protection to the yeast and showed pores and cracks in the extension of the sphere. Generally speaking, encapsulating materials consist of mucilages showed better retention of the microorganism within the sphere compared to treatments with gums. Microscopically there were no differences between treatments, however, all provided physical protection to the probiotic and showed pores and cracks in the extension of the capsule. The encapsulated probiotic and non-encapsulated showed no viable cells after the extrusion process of the feed.

Key – words: Probiotics. Yeas. Encapsulation. Release. Birds. SEM.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Consumo de ração por espécie em 2010.....	23
Figura 2 – Movimentação financeira em 2010: participação das matérias-primas em rações avícolas.....	24
Figura 3 – Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas: microesferas (A) e microcápsulas (B)	26
Figura 4 – Imagens de taro (A) e inhame (B)	41
Figura 5 – Fluxograma de produção do Biosaf SC 47.....	46
Figura 6 – Processo de imobilização de <i>S. cerevisiae</i> em cubos e ágar-ágar	49
Figura 7 – Fluxograma do processo de extrusão	53
Figura 8 – Placa com colônias de <i>S. cerevisiae</i> incubadas por 96 horas à 25°C	54
Figura 9 – Obtenção de cápsulas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> pelo método de extrusão, sendo “A” o processo de gotejamento da solução encapsulante juntamente com a levedura em cloreto de cálcio, “B” a solução encapsulante dentro da seringa e “C” as cápsulas obtidas.....	56
Figura 10 – Esferas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> obtidas pelo método de imobilização em cubos de ágar-ágar, sendo “A” a esfera úmida, “B” a esfera seca em estufa a 45°C e “C” a esfera observada em microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 50 vezes.....	57
Figura 11 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> não-encapsulado	59
Figura 12 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em ágar-ágar.....	62
Figura 13 – Esferas de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> encapsuladas em ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	63
Figura 14 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em goma arábica	64
Figura 15 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em alginato de sódio	66
Figura 16 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em	

iota-caragena	68
Figura 17 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em mucilagem de linhaça (A), taro (B), inhame (C) e quiabo (D).....	73
Figura 18 – Média de liberação (% log UFC/g) do probiótico <i>S. cerevisiae</i> das cápsulas compostas de ágar-ágar e diferentes gomas e mucilagens após a digestão <i>in vitro</i>	74
Figura 19 – Digestão <i>in vitro</i> do probiótico <i>S. cerevisiae</i> encapsulado em mucilagens e gomas	76
Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 3.000 (A) e 20.000 (B) vezes de leveduras encapsuladas em mucilagem de quiabo apresentando um sistema de “colméia”	78
Figura 21 – Medidas de diâmetro de células de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> encapsulada obtidas por microscopia eletrônica de varredura (5.000 x).....	79
Figura 22 – Microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 20.000 vezes (A,B,C), 10.000 vezes (D,E,F), 5.000 vezes (G,H,I) e 2.400 vezes (J,K,L).....	80
Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos compostos por gomas A-A, ALG, ARA e I-CAR, sendo nas colunas A- aumento de 50 vezes com levedura, B- aumento de 600 vezes com levedura e C-aumento de 600 vezes sem levedura	81
Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos compostos por mucilagens INH, I-CAR, TARO, LIN e QUI, sendo nas colunas A- aumento de 50 vezes com levedura, B- aumento de 600 vezes com levedura e C-aumento de 600 vezes sem levedura	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Propriedades dos microorganismos utilizados como probióticos	18
Tabela 2 – Métodos de microencapsulação e suas técnicas	30
Tabela 3 – Agentes encapsulantes e seus prováveis mecanismos de liberação.....	31
Tabela 4 – Relação de polímeros naturais.....	33
Tabela 5 – Aplicação do ágar-ágar como material encapsulante	35
Tabela 6 – Aplicação do alginato como material encapsulante no ano de 2011	37
Tabela 7 – Aplicação da carragena como material encapsulante	38
Tabela 8 – Aplicação da goma arábica como material encapsulante	40
Tabela 9 – Valores médios* da composição centesimal do inhame <i>in natura</i> (IN) e da mucilagem de inhame <i>in natura</i> (MI).....	42
Tabela 10 – Composição centesimal da goma do grão de linhaça	44
Tabela 11 – Composição centesimal* da mucilagem da polpa do quiabo liofilizado	45
Tabela 12 – Processo de extração da mucilagem de quiabo, taro, linhaça e inhame	47
Tabela 13 – Relação dos tratamentos e suas composições	48
Tabela 14 – Contagem (log UFC/g) e viabilidade (% \pm desvio padrão) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> não-encapsulado após a digestão <i>in vitro</i>	58
Tabela 15 – Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	61
Tabela 16 – Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por goma-arábica e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	64
Tabela 17 – Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por alginato de sódio e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	65
Tabela 18 – Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por iota-	

	carragena e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	67
Tabela 19	– Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% ± desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de linhaça e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	69
Tabela 20	– Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% ± desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de taro e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	70
Tabela 21	– Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% ± desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de inhame e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	71
Tabela 22	– Contagem (log UFC/g) do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> liberado (% ± desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de quiabo e ágar-ágar após a digestão <i>in vitro</i>	72
Tabela 23	– Comparação na liberação do probiótico <i>Saccharomyces cerevisiae</i> das cápsulas compostas de diferentes matrizes encapsulantes (%) nos diferentes tempos e pH's do processo de digestão <i>in vitro</i>	75

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 OBJETIVOS	16
2.1 OBJETIVO GERAL	16
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	16
3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	17
3.1 PROBIÓTICOS	17
3.1.1 Probióticos na Avicultura	19
3.1.2 Levedura como Probiótico para Frangos de Corte	21
3.1.3 Probióticos em Rações Processadas para Frangos de Corte	22
3.2 MICROENCAPSULAÇÃO	25
3.2.1 Microencapsulação de Microorganismos Probióticos	27
3.2.2 Aplicação de Probióticos Microencapsulados na Avicultura	28
3.2.3 Técnicas de Microencapsulação	29
3.2.4 Materiais Encapsulantes	30
3.3 POLÍMEROS NATURAIS COMO MATERIAIS ENCAPSULANTES	32
3.3.1 Gomas e Mucilagens	32
3.3.2 Ágar-ágar	34
3.3.3 Alginatos	35
3.3.4 Carragenas	37
3.3.5 Goma Arábica	39
3.3.6 Mucilagem de Taro e Inhame	40
3.3.7 Mucilagem de Linhaça	43
3.3.8 Mucilagem de Quiabo	44
4 MATERIAL E MÉTODOS	46
4.1 MICRORGANISMO PROBIÓTICO: <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i>	46
4.2 MATERIAIS ENCAPSULANTES	47
4.3 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM PARA ENCAPSULAÇÃO	47
4.4 ENCAPSULAÇÃO DO PROBIÓTICO COM MUCILAGENS E GOMAS	48
4.5 LIBERAÇÃO DA LEVEDURA ENCAPSULADA SOB CONDIÇÕES	

GASTROINTESTINAIS SIMULADAS	51
4.6 VIABILIDADE DA LEVEDURA APÓS O PROCESSO DE EXTRUSÃO	52
4.7 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DE <i>S. CEREVISIAE</i> POR GRAMA DE AMOSTRA	54
4.8 Microscopia Eletrônica de Varredura	55
4.9 Análise Estatística.....	55
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	56
5.1 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO.....	56
5.2 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL <i>IN VITRO</i>	58
5.2.1 Digestão <i>In Vitro</i> do Probiótico <i>S.Cerevisiae</i> não-Encapsulado.....	58
5.2.2 Digestão <i>In Vitro</i> do Probiótico Encapsulado em Gomas.....	60
5.2.3 Digestão <i>In Vitro</i> do Probiótico Encapsulado em Mucilagens	68
5.2.4 Digestão <i>In Vitro</i> de todos os Tratamentos: uma Visão Geral.....	74
5.3 VIABILIDADE DO PROBIÓTICO ENCAPSULADO E NÃO-ENCAPSULADO APÓS O PROCESSO DE EXTRUSÃO.....	76
5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	77
6 CONCLUSÕES	84
7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS	86
REFERÊNCIAS.....	87

1 INTRODUÇÃO

A busca pela máxima eficiência alimentar na avicultura é um ponto crítico a ser considerado nas criações comerciais. Muitos aditivos, dentre eles os antibióticos, são rotineiramente utilizados em rações para controlar agentes prejudiciais ao processo digestivo, promovendo melhora nos índices zootécnicos e maximizando a produção. Em todo o mundo, no entanto, é fato crescente a restrição ao uso de antibióticos em doses subterapêuticas como aditivos na nutrição animal devido a possibilidade do desenvolvimento de resistência bacteriana (FURLAN et al., 2004).

Como alternativas, existem no mercado diferentes produtos que têm sido sugeridos para substituir os antibióticos como promotores de crescimento. Entre eles, os mais importantes são os probióticos e prebióticos como uma nova opção. Probióticos são descritos como microorganismos benéficos fornecidos na ração das aves como forma de melhorar o equilíbrio da microbiota (TEIXEIRA et al., 2003). O conceito de prebiótico engloba ingredientes alimentares que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias benéficas no intestino e que não sofrem ação das enzimas digestivas.

Na matriz alimentícia a viabilidade de um probiótico depende de fatores como pH, temperatura de estocagem, nível de oxigênio e presença de microorganismos competidores e inibidores (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002). Segundo Gilliland (1989), os microorganismos probióticos devem ser metabolicamente estáveis e ativos no produto, sobreviver à passagem no trato digestivo superior e apresentar efeitos benéficos quando chegar ao intestino do hospedeiro. Devido a estes fatores, novas alternativas estão sendo estudadas para conferir proteção aos microorganismos probióticos e, com isso, favorecer a exposição do microorganismo ao hospedeiro.

Pesquisas apresentam resultados controversos quanto à utilização de probióticos na avicultura de corte (GIL de los SANTOS e GIL-TURNES, 2005). Possivelmente, devido a vários fatores como: a utilização de antimicrobianos, a composição e o processamento das dietas, além do manejo de alimentação podem explicar parte da inconsistência dos resultados (CHEESON, 1994). Muitos microorganismos probióticos não resistem a determinados antibióticos ou a peletização (TURNER et al., 2001).

Fornecer células probióticas viáveis protegidas por uma barreira física contra condições ambientais adversas e condições do trato intestinal é uma alternativa que tem recebido considerável interesse. A proteção física dos probióticos através da microencapsulação por hidrocolóides é uma nova abordagem para aprimorar a sobrevivência probiótica (ALVES-FILHO; GARCIA, 2008), pois aprisiona ou imobiliza a célula bacteriana aumentando assim sua resistência (KRASAEKOOPT et al., 2003).

A microencapsulação, embora seja uma tecnologia inovadora, ainda é pouco explorada comercialmente na área de alimentos. Faz-se necessário um grande esforço em pesquisa e desenvolvimento para aprimorar e otimizar as técnicas e identificar materiais de parede ideais para aplicações comerciais, uma vez que os resultados das pesquisas têm sido promissores e esta tecnologia tem se mostrado uma alternativa viável para solucionar dificuldades na incorporação de alguns ingredientes e aditivos em alimentos (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008). Com a internacionalização da economia e as crescentes pressões por legislação ambiental, é cada vez maior a procura de soluções alternativas para o uso de tecnologia com menor comprometimento com o ambiente, como a utilização de gomas naturais (SILVA; SILVA, 2003) como materiais encapsulantes.

A microencapsulação é uma alternativa promissora para a solução de grande parte dos problemas encontrados pela indústria para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos. Entretanto, o desafio está em selecionar o material e o processo adequado para cada tipo de aplicação (FEED; FOOD, 2011).

Probióticos encapsulados em gomas naturais e termo-resistentes podem, futuramente, abranger uma grande fatia de mercado. A excelência em adicionar probióticos em rações extrusadas e peletizadas poderá instituir produtos inovadores para rações de peixes, cães, aves domésticas e outros animais, além de substituir por completo os antibióticos que apresentam um grande problema de saúde pública atualmente.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver esferas de *Saccharomyces cerevisiae* encapsuladas com diferentes materiais naturais e avaliar sua viabilidade para incorporação em ração extrusada de frangos de corte.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar diferentes métodos de encapsulação de *Saccharomyces cerevisiae*;
- Verificar a liberação de células de levedura das diferentes esferas durante a simulação do trato gastrointestinal *in vitro*;
- Determinar a viabilidade de *Saccharomyces cerevisiae* nas diferentes esferas após o processo de extrusão;
- Avaliar imagens das esferas obtidas com os diferentes materiais encapsulantes através de Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 PROBIÓTICOS

Existem várias definições de probióticos que dependem da compreensão, dos mecanismos de ação e dos seus efeitos sobre a saúde e o bem-estar dos seres humanos (ANAL & SINGH, 2007).

A definição para probióticos comumente utilizada é a proposta por Fuller (1989): um suplemento alimentar constituído de microorganismos vivos, capazes de beneficiar o hospedeiro através do equilíbrio da microbiota intestinal. A Organização Mundial de Saúde - OMS define como bactérias ou leveduras que, quando ingeridos em quantidades adequadas, conferem um ou mais benefícios à saúde do hospedeiro (OMS, 2001). Enquanto para a Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA, “probióticos são microorganismos vivos capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal, produzindo efeitos benéficos à saúde do indivíduo” (ANVISA, 2004).

Segundo Fuller (1989) os probióticos podem ser fornecidos ao animal de diversas maneiras, pois o tipo de preparação vai depender do uso pretendido como, por exemplo, para serem incorporados em ração peletizada ou produzidos em forma de cápsulas, pasta, em pó ou granulados. Segundo a ANVISA (2005) os probióticos podem ser comercializados nas formas sólida, semi-sólida ou líquida, tais como: tabletes, comprimidos, drágeas, pós, cápsulas, granulados, pastilhas, soluções e suspensões.

A princípio, para que ocorram os efeitos benéficos do uso de probióticos, os níveis administrados devem ser suficientemente elevados. Segundo Stefe et al. (2008), em ecologia microbiana, considera-se que um microorganismo influencia no ecossistema onde ele se encontra, somente quando a sua população for igual ou superior a 10^7 unidades formadoras de colônias por grama ou mL (UFC/g ou UFC/mL) do conteúdo. Portanto, a concentração em células vivas viáveis do probiótico deve ser ajustada na preparação inicial, levando-se em consideração a capacidade de sobrevivência do microorganismo, sem se multiplicar no tubo digestivo, e o efeito de diluição intestinal, de maneira a atingir, no mínimo, 10^7 UFC/g no conteúdo intestinal.

Além dos fatores citados acima, para que um microrganismo seja considerado probiótico, ele deverá apresentar as seguintes propriedades descritas na Tabela 1 abaixo:

Tabela 1 – Propriedades dos microorganismos utilizados como probióticos.

Características	Propriedades funcionais
Estabilidade quando expostos à ação de ácidos e dos sais biliares.	Sobrevivência no intestino, mantendo a propriedade de adesão e outras qualidades.
Aderência aos enterócitos e muco intestinal.	Imunomodulação e exclusão competitiva de patógenos.
Exclusão competitiva e colonização do trato intestinal.	Multiplicação no trato intestinal, exclusão competitiva de patógenos, estímulo à microbiota benéfica.
Antagonismo das bactérias patogênicas.	Exclusão do patógeno, prevenção da adesão do patógeno ao hospedeiro, normalização da microbiota intestinal.
Seguros para utilização.	Identificação e caracterização do microrganismo utilizado.
Os efeitos devem ser clinicamente validados e documentados.	Dosagem mínima efetiva capaz de promover uma resposta.

Fonte: Salminen et al. apud Gil de los Santos e Gil-Turnes, (2005).

Os mecanismos de ação dos probióticos não estão inteiramente elucidados, entretanto, especula-se que um ou mais processos, associados ou não, alterariam a atividade e a composição da microbiota intestinal (PELICANO et al., 2002). Estes mecanismos estão relacionados à competição por sítios de ligação ou exclusão competitiva, ou seja, as bactérias probióticas ocupam o sítio de ligação (receptora ou pontos de ligação) na mucosa intestinal formando uma barreira física às bactérias patogênicas. Assim, as bactérias seriam excluídas por competição de espaço (TOURNUT, 1998). Além disso, ocorre a competição por nutrientes, pois os microorganismos probióticos nutrem-se de ingredientes parcialmente degradados pelas enzimas digestivas normais das aves. A competição por nutriente não ocorre entre a ave e a bactéria, mas sim entre as bactérias intestinais por seus nutrientes específicos (FURLAN et al., 2004).

3.1.1 Probióticos na Avicultura

O uso de antibióticos como promotores de crescimento na indústria avícola tem sido discutido (SANTIN et al., 2001) e já é considerado pela OMS um risco crescente para a saúde humana (NICODEMO, 2001).

O aparecimento de bactérias resistentes a antimicrobianos, em seres humanos, vem sendo relacionado com o uso de antibióticos na alimentação animal. A utilização de antibióticos como promotores de crescimento, em espécies domésticas e sob baixas dosagens (20 mg a 150 mg/kg alimento), leva ao aparecimento de linhagens resistentes a antibióticos na microbiota intestinal, estando incluídas bactérias patogênicas como a *Salmonella*. Por meio das fezes ou pelo consumo de produtos de origem animal (carne, leite, ovos), uma parte das bactérias resistentes dissemina-se e coloniza o trato gastrointestinal de seres humanos (NICODEMO, 2001).

Devido aos riscos inerentes ao uso de agentes antimicrobianos, torna-se necessária busca de produtos alternativos que possam substituir os antibióticos na alimentação animal sem causar perdas de produtividade e qualidade dos produtos (LODDI et al., 2000).

A simples retirada dos antibióticos, como promotores de crescimento, causaria sérios problemas na produção de proteína animal, devido à queda no desempenho. Dentre essas alternativas, os prebióticos e os probióticos poderiam contribuir devido ao desenvolvimento de microorganismos benéficos no trato gastrointestinal (TGI), resultando na melhoria das condições envolvidas nos processos de digestão e absorção dos nutrientes. Entretanto, devido a uma série de fatores que afetam a ação desses produtos, os resultados de experimentos obtidos são contraditórios, necessitando, portanto, de um maior esclarecimento sobre seus reais efeitos, no intuito de assegurar a sua aplicação como alternativa aos tradicionais promotores de crescimento (PELICANO et al., 2002).

Embora tenham sido relatados resultados controversos a respeito da eficácia dos probióticos, foi demonstrado que algumas cepas probióticas, além de mudar a estrutura da microbiota bacteriana do trato gastrointestinal de aves, podem prevenir infecções e melhorar a qualidade de carcaça, mantendo os mesmos índices de produtividade alcançados com a utilização de antimicrobianos, reduzindo a

mortalidade, as condenações de carcaça, melhorando a conversão alimentar e o ganho de peso (GIL de los SANTOS; GIL-TURNES, 2005).

Estudos recentes realizados por Ribeiro et al. (2009), comprovaram que a substituição de antibióticos por simbióticos (leveduras + mananoligossacarídeos) é uma alternativa viável e econômica. Maiorka et al. (2001) reforçaram o mesmo conceito, afirmando que a utilização de simbióticos (parede celular de *S. cerevisiae* + *Bacillus subtilis*) na dieta de frangos é uma alternativa viável na avicultura de corte, pois não foram observadas diferenças significativas no desempenho das aves quando comparadas ao grupo tratado com antibióticos.

Segundo Franco et al. (2005) uma opção para a substituição de antimicrobianos nas rações seria o uso de leveduras, como a *Saccharomyces cerevisiae*, subproduto da indústria sucroalcooleira, pois preserva as ações benéficas e elimina as características indesejáveis dos antibióticos, como a resistência bacteriana.

Em resumo, Gomes (2011) cita as vantagens da utilização de microorganismos probióticos em monogástricos:

- a) Auxílio na digestão e absorção de nutrientes (envolvimento na bioquímica intestinal, especialmente em relação à ação sobre os sais biliares);
- b) Ação inibitória no crescimento de bactérias patogênicas (produção de bacteriocinas que agem inibindo o crescimento de outras bactérias);
- c) Produção de lactato e acetato que reduzem o pH do meio, exercendo efeito antibacteriano;
- d) Produção de metabólitos que inibem bactérias Gram negativas e positivas patogênicas;
- e) Produção de vitaminas do grupo B;
- f) Estímulo do sistema imunológico através da ativação dos macrófagos;
- g) Ativação do sistema imunológico contra células malignas;
- h) Restauração da microbiota intestinal após antibioticoterapia.

3.1.2 Levedura como Probiótico para Frangos de Corte

A levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) é um subproduto da indústria alcooleira amplamente utilizado na alimentação de frangos de corte (KANAYAMA et al., 2009). Devido à rápida velocidade de crescimento

destes microorganismos, ocorre sempre o excesso de produção de levedura, que pode ser usada para os mais diversos fins depois de desidratada como, por exemplo, na alimentação animal (GRANGEIRO et al., 2001).

Para cada litro de álcool produzido, gera-se um excedente de 25 a 30g de leveduras, obtendo-se cerca de 420 mil toneladas de leveduras, somente por este segmento industrial, que devem ser reutilizadas, uma vez que, como resíduo, seu descarte provoca problemas ambientais (COSTA, 2004).

As leveduras, embora não sejam capazes de colonizar os aparelhos digestivos de monogástricos ou de ruminantes, têm efeitos positivos quando suplementadas vivas nas dietas destas categorias animais. Em monogástricos a sua principal ação é a hidrólise de dissacarídeos, efeito anti-adesivo de microorganismos patogênicos, estimulação da imunidade, inibição de toxinas e efeito inibidor sobre bactérias patogênicas (GOMES, 2011).

Segundo Silva (2009), as principais vantagens de se usar as leveduras nas rações de aves e suínos são:

- a) Fonte de nucleotídeos: melhora a morfologia intestinal (aumenta a altura das vilosidades e, conseqüentemente, o poder de absorção de nutrientes) e aumenta a resposta imune;
- b) Economia de energia: estima-se que 20% da energia bruta da dieta seja destinada à renovação celular intestinal, assim os nucleotídeos fornecidos na dieta permitem a economia de energia endógena necessária para a divisão celular;
- c) Proteína de alto valor biológico, sem fatores anti-nutricionais, importante para animais jovens;
- d) Apresenta um bom balanço de aminoácidos, com destaque para a lisina e treonina;
- e) Fonte natural de vitaminas do complexo B, inclusive Inositol: promotor de crescimento natural;
- f) Fonte de ácido glutâmico (glutamina e glutamato): melhora a palatabilidade das rações estimulando o consumo, servindo também como fonte de ATP para os linfócitos e macrófagos (sistema imune), fornece N para a síntese de

nucleotídeos e precursor da glutatona que reduz os radicais livres. A glutamina e o glutamato são precursores de moléculas com mucinas, aumentando a produção de muco no epitélio intestinal.

- g) Melhora a integridade intestinal por ser fonte de mananoligossacarídeos (MOS) (poder aglutinante de bactérias que possuem fimbria – exemplos: *Salmonella spp* e *E. coli*);
- h) Melhora a qualidade da ração peletizada (poder aglutinante);
- i) Alto poder de adsorção de micotoxinas presentes na ração.

Segundo Kill et al. (2005), entre as alternativas para diminuir custos com a alimentação, pode-se fazer uso da inclusão de levedura de cana de açúcar em rações de frangos de corte. Porém, o nível de inclusão irá influenciar diretamente nas características de produção, pois a queda no desempenho dos frangos ocorreu a partir de 10% (p/v) de inclusão na ração.

Segundo Grangeiro et al. (2001) a inclusão da levedura de cana-de-açúcar na ração de frangos de corte pode ser usada em níveis de até 7,5%, sem afetar significativamente o desempenho zootécnico e as características de carcaça.

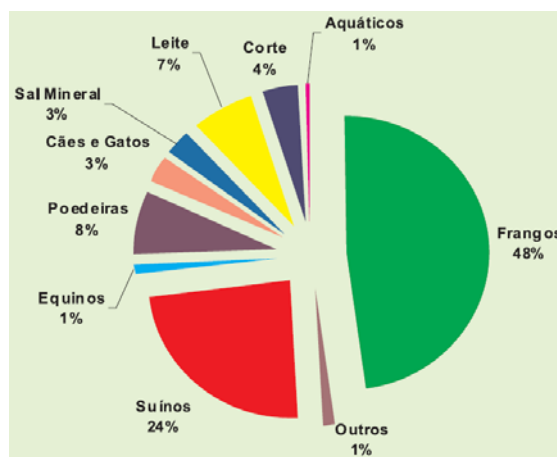
Franco (2005), ao avaliar a utilização de *Saccharomyces cerevisiae* vivas e mortas em substituição aos antibióticos (Olaquinox e Bacitracina de Zinco) na ração de frangos de corte, concluiu que as leveduras podem substituir os antimicrobianos testados com a mesma eficiência em relação ao ganho de peso, conversão alimentar, consumo de ração e eficiência produtiva. Os autores Subrata et al. (1996), Maiorka et al. (2001), Grigoletti et al. (2002), Flemming (2005), Machado et al. (2010), entre outros, chegaram a mesma conclusão, reforçando que as leveduras podem substituir os antibióticos em rações sem afetar a produtividade avícola.

3.1.3 Probióticos em Rações Processadas para Frangos de Corte

A produção da indústria de alimentação animal no Brasil registrou incremento de 5,3% em 2010, segundo o Sindicato Nacional da Indústria de Alimentação Animal-SINDIRAÇÕES. De janeiro a dezembro foram produzidos 61,4 milhões de toneladas de rações que movimentaram R\$ 33 bilhões em matérias-

primas. Somente no setor da avicultura de corte, o consumo foi de 30 milhões de toneladas, isto é, 48% da produção nacional, predominando em relação aos outros setores produtivos, como demonstrados na Figura 1 (SINDIRAÇÕES, 2011).

Figura 1 – Consumo de ração por espécie em 2010.



Fonte: Sindirações (2011).

Frente ao enorme mercado de rações na avicultura de corte, Lima² (2007) discorre que se observa a necessidade de aperfeiçoar cada vez mais a manufatura das rações, pois este campo tecnológico propicia uma maximização da utilização dos nutrientes pelas aves e, conseqüentemente, torna a exploração cada vez mais competitiva.

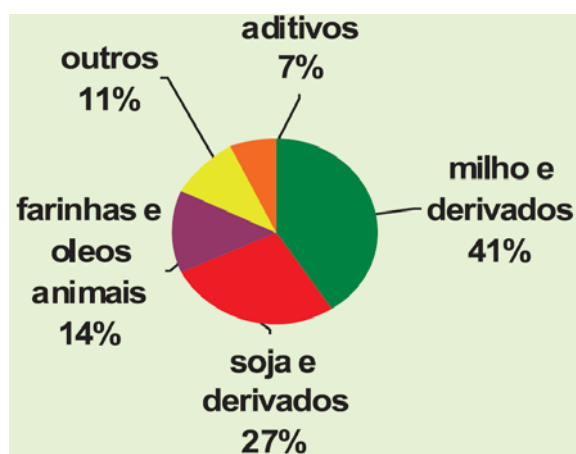
Entre os propósitos do processamento de rações estão principalmente as alterações do tamanho das partículas e o aumento da densidade dos ingredientes. O processamento é um conjunto de operações necessárias para obter o máximo potencial nutricional de um alimento, alterando a estrutura de um ingrediente em seu estado natural. Uma vez que o custo de produção é muito dependente da alimentação, é muito importante ter alimentos adequadamente processados para que se obtenha o máximo benefício (MEURER, 2009).

As principais formas físicas de rações utilizadas na indústria avícola são fareladas, peletizadas, extrusadas ou ainda trituradas (MEURER, 2009). A redução do tamanho de partículas, aglomeração, mistura, tratamento por calor, pressão, mudanças na estrutura do amido, proteína e gorduras estão entre as diferentes formas de processamento que podem promover melhorias no aproveitamento dos nutrientes, pela melhor digestibilidade e maior absorção (OLIVEIRA, 2009).

A extrusão é uma importante tecnologia no desenvolvimento de produtos alimentícios e pode ser considerada como um processo de alta temperatura em tempo curto (HTST), sendo preferido para a retenção de nutrientes. As principais funções desse processo são cozinhar, estruturar e dar forma aos alimentos, sendo que pode ter cada uma dessas ou as três funções ao mesmo tempo (LUSTOSA et al., 2007).

O milho, cereal rico em amido e de alta palatabilidade, é considerado o mais importante componente energético das rações avícolas no Brasil, como demonstra a Figura 2. Quando adequadamente processado por calor, o cereal tem a digestibilidade de seus nutrientes melhorada, aumentando o seu valor energético (LIMA², 2007).

Figura 2 – Movimentação financeira em 2010: participação das matérias-primas em rações avícolas.



Fonte: Sindirações (2011).

O processo de extrusão pode promover alterações no amido, formando uma fração resistente à ação de enzimas do trato gastrointestinal, degradação de polissacarídeos ou complexação com outros polímeros e degradação de estruturas de baixo peso molecular, podendo diminuir o conteúdo de fibra dietética (BERTIPAGLIA et al., 2008). Segundo Faria (2010) o processo resulta na expansão da mistura de ingredientes e promove maior gelatinização do amido, além de aumento na exposição dos nutrientes contidos no interior das células vegetais à ação do processo digestivo dos animais.

As rações e matérias-primas extrusadas promoveram aumento de peso e eficiência alimentar em animais e, em alguns casos, melhoraram

significativamente a palatabilidade dos ingredientes ou rações, segundo Andrigueto et al., apud Brumano e Gattás (2004). Nagano et al. (2003) obtiveram melhores resultados para peso médio e conversão alimentar aos 7 dias de idade para frangos alimentados com dietas peletizadas e extrusadas quando comparadas à ração farelada.

As tentativas de incorporar microorganismos probióticos viáveis em rações extrusadas ainda são ineficazes, segundo Kazarjan (2011), devido às condições térmicas intrínsecas ao processo de fabricação e a falta de entendimento em relação ao processo.

Segundo Gomes (2011) o Grupo Lesaffre encapsulou *Saccharomyces cerevisiae* em uma camada de células mortas da mesma, com o objetivo de melhorar a viabilidade do microrganismo após o processo de peletização, pois as leveduras vivas não são resistentes às condições de pressão, temperatura e umidade normalmente utilizadas no processo. Em função deste invólucro, a empresa desenvolveu o produto Biosaf Sc 47 HR[®] e conseguiu garantir 8 bilhões de UFC/g, desde que a temperatura do processo não ultrapasse os 85°C.

3.2 MICROENCAPSULAÇÃO

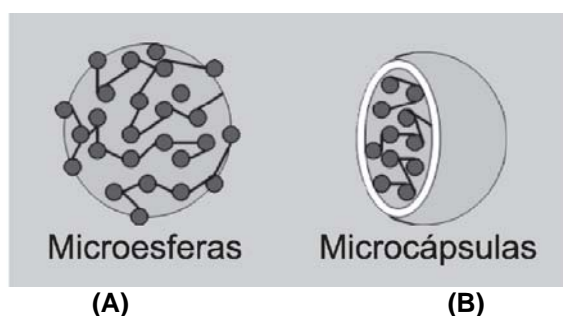
A microencapsulação foi muito utilizada no passado para mascarar o sabor desagradável de certos ingredientes e para simplesmente converter líquidos em sólidos. No entanto, nos últimos anos, o estudo sobre a liberação controlada do ingrediente encapsulado no lugar certo e hora certa tem sido cada vez mais discutido, pois pode melhorar a eficácia dos aditivos alimentares, ampliar o campo de aplicação e assegurar a dosagem ideal. Portanto, esta técnica pode originar ingredientes totalmente novos e com propriedades incomparáveis (GOUIN, 2004).

O termo encapsulação é derivado do latim *cápsula*, que significa *pequena caixa* (COSMÉTICOS e PERFUMES, 2005). Atualmente, a definição de microencapsulação consiste em um processo de empacotamento de materiais sólidos, líquidos ou gasosos em cápsulas extremamente pequenas, as quais podem liberar o conteúdo de forma controlada e sob condições específicas (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008). Qualquer ingrediente pode ser encapsulado, seja um líquido hidrofílico ou hidrofóbico, um óleo viscoso, um sólido, etc.. (ANAL; SINGH, 2007).

O conteúdo da microcápsula é chamado na literatura técnica de “agente ativo”, “fase interna” ou “núcleo”. Já ao referir-se ao material que forma a parte externa, os textos normalmente usam os termos “revestimento”, “membrana”, “agente encapsulador”, “carregador”, “casca” ou “concha” (COSMÉTICOS; PERFUMES, 2005).

As micropartículas resultantes do processo podem apresentar dois tipos de estruturas diferentes, as microesferas e microcápsulas, representadas na Figura 3. Denominam-se esferas os sistemas em que o ativo encontra-se homogeneamente disperso ou solubilizado no interior de uma matriz polimérica. Desta forma, obtém-se um sistema monolítico, onde não é possível identificar um núcleo diferenciado. Microcápsulas, ao contrário, constituem os chamados sistemas do tipo reservatórios, onde é possível identificar um núcleo diferenciado, no qual pode ser sólido ou líquido. Neste caso, a substância encontra-se envolvida por uma membrana, geralmente polimérica, isolando o núcleo do meio externo (COSMÉTICOS; PERFUMES, 2005). No entanto, o termo ‘encapsulação’ tem sido usado em seu sentido mais amplo, englobando tanto a formação de microcápsulas quanto de microsferas (AZEREDO, 2005).

Figura 3 – Esquema ilustrativo diferenciando os tipos de micropartículas: microesferas (A) e microcápsulas (B).



Fonte: Pimentel et al. (2007).

Em um sentido amplo, o encapsulamento pode ser usado para muitas aplicações na indústria de alimentos, pois confere proteção de ingredientes como corantes, temperos, acidulantes, vitaminas e minerais contra perdas nutricionais, estende o prazo de validade, controla reações oxidativas, preserva ou mascara cor, sabores e cheiros (inibindo a reação com outros materiais), protege materiais higroscópicos contra a umidade, estabiliza o material encapsulado no

núcleo e controla a sua liberação (RÉ, 2000; ANAL; SINGH, 2007; DESAI; PARK, 2005).

Várias propriedades das microcápsulas podem ser adaptadas para se adequarem a aplicações de um ingrediente específico, incluindo a sua composição, mecanismo de liberação, tamanho das partículas, forma física e custo (DESAI; PARK, 2005).

3.2.1 Microencapsulação de Microorganismos Probióticos

A microencapsulação é uma alternativa promissora para a solução de grande parte dos problemas encontrados pela indústria para o desenvolvimento de novos alimentos probióticos. Na forma encapsulada, o probiótico apresenta proteção contra as condições adversas do ambiente, como baixos valores de pH, temperatura, umidade e a presença de oxigênio. No trato digestivo, o microrganismo encapsulado também terá maior possibilidade de sobreviver na presença de enzimas, sais biliares e elevada acidez, chegando ao intestino em condições de colonização (FEED; FOOD, 2011).

Annan et al. (2008) submeteram esferas de gelatina revestidas com alginato à condições gastrointestinais simuladas e concluíram que a cápsula promoveu proteção ao microrganismo encapsulado *Bifidobacterium adolescentis*. Por fim, ressaltaram que a matriz encapsulante estudada melhorou a viabilidade da bactéria no segmento superior do trato gastrointestinal permitindo a sua atuação no cólon, onde pode oferecer benefícios a saúde através de mudanças positivas no sistema imune e na microbiota intestinal do hospedeiro.

Segundo Ding e Shah (2009) a microencapsulação de várias bactérias probióticas simultaneamente (*Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium longum*, *L. salivarius*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. paracasei*, *B. lactis* BI-O4 e *B. lactis* Bi-07), em diferentes materiais encapsulantes (alginato, goma guar, goma xantana, goma locusta, goma tara e carragena) resulta na melhor sobrevivência do probiótico quando comparado a células livres em condições ácidas (pH 2) e em altas concentrações de sais biliares. Mandal et al. (2006) chegaram à mesma conclusão ao encapsularem *Lactobacillus casei* NCDC-298 em alginato e explanaram que a matriz também oferece proteção ao microrganismo em processamentos térmicos. Madrigal (2009) encapsulou *Bifidobacterium bifidum* NRRL-41410 em alginato 2% e

concluiu que a viabilidade do microrganismo imobilizado em condições gastrointestinais simuladas foi melhor quando comparada à de células livres, indicando que o suporte proporcionou proteção à bactéria probiótica.

Mokarram et al. (2009) encapsularam os probióticos *Lactobacillus acidophilus* PTCC1643 e *Lactobacillus rhamnosus* PTCC1637 em matriz cálcio-alginato e, as mesmas cápsulas, foram recobertas com uma ou duas camadas de alginato de sódio, com o objetivo de aumentar a sobrevivência do microrganismo durante as condições adversas do trato gastrointestinal. O número de células sobreviventes foi 6,5 log/UFC.mL⁻¹ para *L. acidophilus* e 7,6 log/UFC.mL⁻¹ para *L. rhamnosus* nas cápsulas com dupla camada de alginato de sódio e 2,3 log/UFC.mL⁻¹ e 2,0 log/UFC.mL⁻¹ nas células livres, respectivamente.

A microencapsulação de *Saccharomyces cerevisiae* tem sido utilizada atualmente para diferentes finalidades e obtidas por distintos métodos e materiais encapsulantes, porém ainda não foi pesquisada com a finalidade de promover liberação controlada durante simulações gastrointestinais. Pesquisas realizadas entre 1996 e 2010 utilizaram o alginato como base para microencapsular leveduras com o objetivo, em sua grande maioria, de estudar síntese de enzimas e a dinâmica de crescimento da célula, como avaliaram os autores Jamai et al. (2001), Chang et al. (1996), Behera et al. (2010), Kiss et al. (2004), Koyama e Seki (2004), Milagre et al. (2005), Qi et al. (2005), Safarik et al. (2009), Tanaka et al. (2000), Walsh et al. (1996), Zhou et al. (2010) e Sun et al. (2008). Frente a esses dados, nota-se a necessidade de realizar novas pesquisas de microencapsulação com leveduras em diferentes ou inovadores materiais encapsulantes.

3.2.2 Aplicação de Probióticos Microencapsulados na Avicultura

A utilização de probióticos microencapsulados na avicultura já tem sido investigada por alguns pesquisadores com o objetivo de garantir melhor viabilidade do microrganismo, tanto no intestino como na sua aplicação em rações peletizadas e extrusadas. Nota-se a necessidade de aprofundar pesquisas nesta área, pois uma vez aprimorado a forma de incorporação dos probióticos na alimentação animal, será possível substituir com eficácia os antimicrobianos atualmente proibidos.

Wanaupathumkul e Chitprasert (2009) encapsularam *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 em alumínio-carboximetilcelulose (Al-CMC) com o intuito de aumentar a viabilidade do microrganismo após a inclusão da cápsula na ração farelada e posterior peletização. Após o processo constatou-se uma sobrevivência de $1,22 \cdot 10^3$ UFC/g, enquanto não foi detectada nenhuma célula viável ao administrar o microrganismo não-encapsulado.

Hollister et al. (1994) obtiveram esferas de culturas de bactérias cecais em alginato e as adicionaram em rações de frangos de corte para avaliar a sua eficácia no controle da colonização de *Salmonella typhimurium*, após o desafio de 10^4 UFC do microrganismo por frango, no terceiro dia de vida e inclusão da ração testada. Os resultados indicaram que o tratamento encapsulado foi eficaz na redução da colonização de *S. typhimurium* nos pintainhos avaliados e provou ser um método efetivo e prático na liberação dos microorganismos encapsulados.

O uso de ingredientes alimentícios microencapsulados para liberação controlada e suas aplicações são uma alternativa promissora para as indústrias de alimentos (DESAI; PARK, 2005). O grande desafio está em selecionar o material e o processo adequado para cada tipo de aplicação (FEED; FOOD, 2011).

3.2.3 Técnicas de Microencapsulação

A seleção da técnica de microencapsulação e materiais de revestimento são interdependentes e rege-se pelas propriedades (físicas e químicas) do núcleo e dos materiais de revestimento para a aplicação desejada (DESAI e PARK, 2005), além do mecanismo de liberação desejado para sua ação (RÉ, 2000).

A escolha de uma técnica apropriada de encapsulamento, em alimentos, segundo Madene (2006), depende do custo, do grau de estabilidade necessário durante o armazenamento e processamento do produto, da capacidade de preservar as propriedades dos componentes da cápsula e de liberar o seu interior nas condições específicas pretendidas.

A diferença básica entre os métodos de microencapsulação existentes está no tipo de envolvimento ou aprisionamento do agente ativo pelo agente encapsulante, visto que a combinação entre eles pode ser de natureza física, química ou físico-química (RÉ, 2000), como demonstrado na Tabela 2.

Segundo Feed e Food (2011), as técnicas de microencapsulação mais comuns são o de emulsão, o de extrusão e a atomização (*spray drying*). O processo de extrusão envolve o preparo de uma solução de polímero, como alginato de sódio, à qual o microrganismo é adicionado. Goteja-se essa mistura em uma solução com cálcio (Ca^{+2}), e as cápsulas são formadas instantaneamente. Na técnica de emulsão, uma suspensão de microrganismos e polímero é adicionada a um grande volume de óleo vegetal e a mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo. Essa emulsão é quebrada, normalmente com a adição de cloreto de cálcio, para formar minúsculas gotas de gel dentro da fase oleosa, as quais são separadas por filtração.

Tabela 2 – Métodos de microencapsulação e suas técnicas.

Métodos de microencapsulação	Técnicas
Métodos físicos	<i>Spray drying</i> , <i>spray cooling</i> , pulverização em banho térmico, leite fluidizado, extrusão centrífuga com múltiplos orifícios, cocristalização e liofilização.
Métodos químicos	Inclusão molecular e polimerização interfacial.
Métodos físico-químicos	Coacervação ou separação de fases, emulsificação seguida de evaporação do solvente, pulverização em agente formador de reticulação e envolvimento lipossômico.

Fonte: Santos et al. apud Azeredo, (2005).

3.2.4 Materiais Encapsulantes

Sofisticados materiais de revestimento e tecnologias foram desenvolvidos ao longo do tempo e uma variedade extremamente ampla de funcionalidades pode ser alcançada através da microencapsulação (GOUIN, 2004).

O material encapsulante é selecionado em função das propriedades físicas e químicas do agente ativo (SUAVE et al., 2006), da não reatividade com o material a ser encapsulado, do processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008).

Os materiais encapsulantes podem ser selecionados dentro de uma ampla variedade de polímeros naturais ou sintéticos, segundo Desai e Park (2005). A composição do material de revestimento é o principal determinante das propriedades funcionais da cápsula e de como ele pode ser usado para melhorar o

desempenho de um ingrediente em particular. Um material de revestimento ideal deve apresentar as seguintes características:

1. Propriedades reológicas satisfatórias em alta concentração e facilidade no manuseio durante processo de encapsulação;
2. Habilidade de dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar o produto;
3. Não-reatividade com o material a ser encapsulado durante o processo e armazenamento;
4. Capacidade de selar e aprisionar o material ativo dentro de sua estrutura durante o processo ou armazenamento;
5. Capacidade de liberar completamente o solvente durante o processo de secagem ou outros;
6. Propriedade de prover máxima proteção ao material ativo contra condições ambientais (p.e., oxigênio, calor, luz, umidade, pH);
7. Solubilidade em solventes permitidos na indústria de alimentos (p.e., água);
8. Economicamente viável e de grau alimentício.

Vários mecanismos podem ser utilizados para desencadear a liberação do agente ativo, como demonstra a Tabela 3.

Tabela 3 – Agentes encapsulantes e seus prováveis mecanismos de liberação.

Agentes Encapsulantes Hidrossolúveis	Mecanismos de Liberação do Agente Encapsulado			
	Mecânico	Térmico	Dissolução	Químico
Alginato	•		•	
Carragena	•		•	
Quitossana	•			
Gelatina	•		•	
Goma Arábica	•	•		
Amido	•	•	•	
Açúcar derivatizado	•	•	•	•

Fonte: Fávaro-Trindade et al. (2008)

3.3 POLÍMEROS NATURAIS COMO MATERIAIS ENCAPSULANTES

3.3.1 Gomas e Mucilagens

Mucilagem e/ou goma são polímeros complexos de polissacarídeos ácidos ou neutros de elevado peso molecular. Não se distingue com exatidão mucilagem de goma, sendo a mucilagem mais fluida e a goma mais viscosa (GLÓRIA e GUERREIRO, 2003). São compostos tipicamente heterogêneos que, após a hidrólise, liberam unidades de açúcar como a arabinose, galactose, glicose, manose, xilose e vários ácidos urônicos (SILVA; SILVA, 2003).

Biopolímeros, como as proteínas e os polissacarídeos, são utilizados pela indústria de alimentos por desempenharem um papel essencial na estrutura, textura e estabilidade dos produtos (KUHN, 2009). A importância das gomas, ou mais especificamente, hidrocolóides (colóides hidrofílicos), é a propriedade de se ligar com a água, podendo atuar como aditivo em alimentos processados para modificar os componentes de textura e propriedades funcionais, com o objetivo de aprimorar a qualidade dos produtos finais (GLICKSMAN, 1969). Por serem compostos muito hidrofílicos, as gomas podem ser utilizadas como umectantes, espessantes, emulsionantes, gelificantes, estabilizantes, coagulantes, lubrificantes, adesivos, formadores de filme e pasta em alimentos (SARAIVA, 2007; WHISTLER e BEMILLER, 1973).

Com a internacionalização da economia e as crescentes pressões por legislação ambiental, é cada vez maior a procura de soluções alternativas para o uso de tecnologia com menor comprometimento com o ambiente, como a utilização de gomas naturais (SILVA; SILVA, 2003). O uso de biopolímeros tem apresentado um forte estímulo no mercado, devido as muitas possibilidades lucrativas para usos industriais e no mercado internacional (OKOJIE et al., 2010).

O polímero natural tem menor custo, sendo que muitos destes produtos fazem parte da alimentação humana em vários continentes e, portanto, não apresentam risco de danos a saúde humana a longo prazo (ABREU-LIMA, 2007). Podem ser originados de exsudatos de algas, couro de bovinos, pele de suínos, tronco de árvores, grãos de cereais, cascas de frutas, produtos de fermentação

biológica, ossos de animais e outros materiais naturais comuns (GLICKSMAN, 1969; SILVA; SILVA, 2003) Alguns exemplos estão descritos na Tabela 4.

Tabela 4 – Relação de polímeros naturais.

Polímero Natural	Origem	Partes de onde é obtido
Alginato de sódio ou algina	Sargaços ou algas pardas (Classe <i>Phaeophyceae</i>)	Toda a alga
Goma Caraia ou etercúlia	Árvore de origem indiana (<i>Sterculia Linné</i>)	Exsudato gomoso dessecado
Goma de Tuna (cactus)	Cactus de Tuna ou Nopal (<i>Opuntia ficus indica</i>)	Folhas ou vagem
Amidos solúveis em água fria	Milho, arroz, batata, trigo e mandioca	Grão ou tubérculo
Gelatina comum	Animais	Ossos, couro e resíduos
Goma Guar	Árvore de Guar (<i>Cyamopsis tetragonologa</i>)	Semente
Carboximetil celulose (CMC)	Árvores	Casca da árvore
Goma de Vinagreira, roselle ou “red sorrel”	Vinagreira ou quiabo roxo (<i>Hibiscus sabdariffa</i>)	Semente
Flocotan	Braúna, Baraúna ou Quebracho (<i>Schinopsis lorentzii</i>)	Casca da árvore
Lentilha	Lentilha (<i>Lens esculentus</i>)	Semente
Tamarindo	Tamarineiro	Semente
Fenogarco ou alova	Árvore (<i>Trigonella foenum</i>)	Semente
Taninos (Tanac) Mimosa	Acácia Negra (<i>Acacia mearnsii</i>)	Casca da árvore
Quitosana/Quitina	Quitosana é extraída da quitina por desacetilação com NaOH	Quitina, constituinte das carapaças (exoesqueleto) dos artrópodes e crustáceos
Babosa ou Aloés	Aloés vera ou Barbandesis	Folha
Cacau	Cacueiro (<i>Theobroma cação</i>)	Polpa
Quiabo	Quiabeiro (<i>Abelmoschus ou Hibiscus esculentus</i>)	Frutos maduros

Fonte: Kirchmer; Diouri; DiBernardo; Borba; Silva-Salesa; Pawluwsky; Hespanhol; Santos, apud Abreu-Lima (2007).

A aplicação de mucilagens como materiais encapsulantes ainda é uma pesquisa recente e promissora. Um exemplo foi o trabalho realizado por Ying et al. (2007), no qual encapsularam *Lactobacillus rhamnosus* no complexo alginato,

quitosana e mucilagem de kiwi (*Actinidia arguta*) para promover a liberação controlada do microrganismo.

Os materiais encapsulantes de biopolímeros naturais são elegidos pela maioria dos pesquisadores por várias razões, incluindo a não toxicidade da matriz (crucial para aplicação em alimentos), a simplicidade da técnica de imobilização, elevada viabilidade e produtividade de células imobilizadas (LEE; HEO, 2000). Polissacarídeos são, em geral, não-tóxicos, biocompatíveis, biodegradáveis e abundantes. A propriedade de ser biodegradável é especialmente vantajosa na liberação do núcleo de uma microcápsula em um determinado momento e/ou em um determinado local no corpo (CHEN et al., 2006).

3.3.2 Ágar-ágar

Os registros históricos apontam que o ágar é o ficocóide de utilização mais antiga, sendo o primeiro a ser usado na indústria alimentícia na forma de géis e em diversas outras aplicações industriais, como aditivos em alimentos. Este hidrocolóide, também conhecido simplesmente como ágar ou agarose, é extraído de diversos gêneros e espécies de algas marinhas vermelhas, da classe *Rhodophyta*, encontrado como carboidrato estrutural na parede das células. É uma mistura heterogênea de dois tipos de polissacarídeos: a agarose, um polímero neutro (fração gelificante), e a agarpectina, um polímero com carga sulfatado (fração não-gelificante). A proporção destes dois polímeros varia de acordo com a espécie da alga, sendo que a agarose é o componente principal, representando cerca de 70% do total (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2008).

O ágar-ágar é utilizado em larga escala na indústria alimentícia. Entre as suas principais propriedades destacam-se seu alto poder gelificante, elevada força de gel a baixas concentrações, baixa viscosidade em solução, alta transparência, gel termo-reversível e temperaturas de fusão/gelificação bem definidas (AGARGEL, 2003).

O ágar é provavelmente o mais forte agente gelificante conhecido, formando géis rígidos a concentrações baixas como 0,5% (GLICKSMAN, 1969). A sua estabilidade depende de dois fatores: hidratação e carga elétrica. A remoção de ambos fatores resulta na floculação do ágar-ágar. Soluções expostas a altas temperaturas por períodos prolongados podem se degradar, resultando na

diminuição da força de gel, que pode ser intensificado com o decréscimo do pH (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2008).

Devido às características intrínsecas do ágar-ágar, este polímero tem sido utilizado como material encapsulante de diferentes microorganismos e para finalidades distintas, como demonstra a Tabela 5.

Tabela 5 – Aplicação do ágar-ágar como material encapsulante.

Material Encapsulante	Técnica de Encapsulação	Microrganismo Encapsulado	Objetivo da Microencapsulação	Referência
Ágar-ágar (5,5%)	Imobilização em cubos	<i>S. cerevisiae</i>	Produção de bio-etanol através da fermentação de flores de <i>Mahula</i>	Behera et al. (2010)
Ágar-ágar (2 a 4%)	Extrusão em óleo resfriado	<i>Bacillus circulans</i>	Produção de ciclodextrina glucanotransferase	Vassileva et al. (2003)
Ágar-ágar (4%)	Solidificação	<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	Produção de hidrogênio na presença de NH_4^+	Zhu et al. (1999)
Ágar-ágar (2 e 6%)	Extrusão em óleo resfriado	<i>Bacillus stearothermophilus</i>	Produção de pululanase	Manolov et al. (1994)

Atualmente, vem sendo utilizado a combinação de dois ou mais polímeros, pois é uma maneira de obter materiais com propriedades diferenciadas ou específicas visando uma determinada aplicação. As propriedades individuais dos polímeros, tais como, processabilidade, flexibilidade, resistência à tensão e ao impacto e resistência química, podem ser modificadas conforme a necessidade (CUNHA, 2005).

3.3.3 Alginatos

O alginato comercial é um sal do ácido algínico, obtido de algas marrons (DAMODARAN et al., 2010), composto por um copolímero linear do ácido β -D-manurônico (M) e do ácido α -L-gulurônico (G), no qual podem estar em blocos únicos (M) ou (G), ou alternados (MG) (BUZZI, 2009). A quantidade e qualidade dos alginatos, obtidos principalmente das algas marrons da Família Feofíceas, dependem das espécies de algas e época da colheita. A produção total de alginato é de cerca de 40.000 toneladas por ano e cerca de 30% é utilizado na indústria de alimentos (IWAKI, 2010).

O alginato é um composto hidrofílico, o que confere a habilidade de atuar como um agente emulsificante e estabilizante, além de ser biodegradável, biocompatível e não-tóxico, permitindo, portanto, numerosas aplicações nas indústrias de alimentos, farmacêuticas e biológicas (LIMA, 2006). As soluções de alginato são altamente viscosas, razoavelmente termoestáveis, termorreversíveis e apresentam pouca ou nenhuma sinérese (DAMODARAN et al., 2010).

As soluções de sais de alginato formam géis em soluções ácidas ou na presença de cálcio ou outros metais polivalentes e, esta habilidade, é a base para muitas aplicações na indústria de alimentos (GLICKSMAN, 1969). Uma vez formado, o gel de alginato mantém sua forma e propriedades reológicas durante o processamento térmico, incluindo todo tipo de cozimento, congelamento e descongelamento, que é uma propriedade desejável em muitos alimentos. Através do controle da liberação de cálcio, o tempo de formação do gel de alginato pode durar de poucos segundos até minutos, podendo ajustar as características reológicas para produtos alimentícios específicos (TURBIANI, 2007).

A viscosidade das soluções de alginato são dependentes da concentração aplicada, da temperatura, do peso molecular do alginato, do pH e da presença de metais polivalentes. Esta variável apresenta valores baixos em altas temperaturas, em pH fora da faixas entre 4 e 10 e em baixas concentrações de íons (GLICKSMAN, 1969).

No fluido gástrico, o alginato é hidratado e convertido em uma estrutura de ácido algínico poroso e insolúvel. Esta estrutura, uma vez submetida ao alto pH do trato gastrointestinal, torna-se solúvel e viscosa. Este comportamento dependente do pH pode ser explorado para perfis de liberação controlada do núcleo (GEORGE; ABRAHAM, 2006).

O alginato é um dos polímeros mais utilizados como material encapsulante para diversas finalidades e áreas de mercado, como demonstra alguns artigos do ano de 2011, na Tabela 6. Segundo Thu e Skjåk-Braek (1996), as microcápsulas de alginato tem se mostrado o produto mais versátil e promissor dentre as técnicas propostas atualmente, possibilitando uma vasta aplicação na indústria, medicina e agricultura.

Tabela 6 – Aplicação do alginato como material encapsulante no ano de 2011.

Material Encapsulante	Técnica de Encapsulação	Microrganismo Encapsulado	Objetivo da Microencapsulação	Referência
Alginato (2%)	Extrusão em CaCl ₂	<i>Lactobacillus casei</i>	Melhorar a viabilidade	Seng-Chan et al. (2011)
Alginato (2%)	Extrusão em CaCl ₂	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Produção de bio-etanol	Lee et al. (2011)
Alginato /Quitosana (2% / 0,4%)	Extrusão em CaCl ₂	<i>Bifidobacterium breve</i>	Liberção controlada	Cook et al. (2011)
Alginato (1,5%)	Emulsão	<i>Lactobacillus casei</i>	Resistência térmica	Babu e Nithyalakshmi (2011)

3.3.4 Carragenas

As carragenas são um grupo de polissacarídeos naturais que estão presentes na estrutura celular de algas vermelhas do tipo *Rhodophyceae*. São geralmente agrupadas em diferentes categorias em função das características estruturais, as Iota (ι), Kappa (κ), Lambda (λ), Mu, Nu e Theta carragenas, sendo a Kappa, Iota e Lambda as mais importantes a nível comercial (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2009).

Grande parte da produção da carragena é destinada à indústria de alimentos, devido a sua ampla aplicabilidade como agente gelificante, emulsificante e estabilizante (WHISTLER; BEMILLER, 1973), além da particularidade de formar coloides e géis em meios aquosos sob concentrações muito baixas (SANTOS et al., 2008). Segundo ÁgarGel (2003) a carragena possui uma habilidade única de formar uma ampla variedade de texturas de gel à temperatura ambiente: gel firme ou elástico; transparente ou turvo; forte ou fraco; termo-reversível ou estável ao calor; alta ou baixa temperatura de fusão/gelificação.

É um polissacarídeo de característica aniônica e alto peso molecular (GLICKSMAN, 1969) com conteúdo de éster sulfato de 15% a 40% formado por unidades alternadas de D-galactose e 3,6-anidro-galactose (3,6-AG). A posição e o número de grupos de éster sulfato, bem como o conteúdo de 3,6-AG, determinam as diferenças primárias entre os tipos de carragena (AGARGEL, 2003).

Assim como é encontrada na natureza, a carragena é associada, através dos seus grupos sulfato, com cátions metálicos como potássio, cálcio e sódio (GLICKSMAN, 1969). A força do gel, a solubilização, a viscosidade e a temperatura de gelificação e fusão são diretamente proporcionais à concentração de carragena e sais (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2009), porém a concentração de cátions superior a certo limite implicará na diminuição da força de gel (AGARGEL, 2003).

A dispersão de carragena, em meio aquoso, é viscosa. A viscosidade depende da temperatura, concentração, e presença de outras moléculas de soluto, do tipo de carragena e do peso da molécula. Aumentando a concentração de carragena na solução, a viscosidade aumenta quase em ordem logarítmica (SANTOS et al., 2008).

A estabilidade da solução de carragena é prejudicada em pH ácido e altas temperaturas, sendo a ordem crescente de estabilidade $\text{iota} > \text{lambda} > \text{kappa}$ (GLICKSMAN, 1969). A ação combinada de temperatura e acidez pode gerar uma degradação das carragenas, resultando na perda de viscosidade e dureza (ADITIVOS; INGREDIENTES, 2009).

A aplicação da carragena como material encapsulante é muito ampla, como demonstra a Tabela 7.

Tabela 7 – Aplicação da carragena como material encapsulante.

Material Encapsulante	Técnica de Encapsulação	Microrganismo Encapsulado	Objetivo da Microencapsulação	Referência
K-carragena	Emulsão	<i>B. longum</i>	Viabilidade em iogurte e durante a refrigeração	Adhikari et al. (2000)
K-carragena	Liofilização	<i>B. bifidum</i>	Crescimento e viabilidade em queijo cheddar	Dinakar e Mistry (1994)
K-carragena/ Goma Locusta	Emulsão	<i>B. longum</i>	Estabilidade do microrganismo no processo	Maitrot et al. (1997)
K-carragena	Extrusão em KCl	<i>S. cerevisiae</i>	Padrões de crescimento do microrganismo na microcápsula	Walsh et al. (1996)

3.3.5 Goma Arábica

A goma arábica, também conhecida como goma acácia, é a mais antiga e bem conhecida de todas as gomas naturais (GLICKSMAN, 1969). É uma resina natural, composta por polissacarídeos e glicoproteínas, extraída dos talos e ramificações da árvore de duas espécies de acácia, a *Acacia senegal* e a *Acacia seyal*. Uma árvore pode exsudar de 400 a 7.000 gramas de goma por ano em produção comercial (ISLAM, 1997).

Quimicamente é classificada como um complexo arabinogalactano. Esta substância nativa tem em média um peso molecular entre 300 e 800 kDa. Sua composição é 95% de polissacarídeos em base seca e de 1% a 2% de diferentes proteínas. Além disso, possui substâncias associadas, como polifenóis e minerais (magnésio, potássio, cálcio, sódio), em cerca de 3% a 4%. A fração polissacarídica é composta por uma cadeia linear de galactose β 1,3 ligadas. Esta cadeia é ramificada na posição 1,6 com cadeias de galactose e arabinose. A ramnose, unidades de ácido glucurônico ou ácido metil-glucurônico, é encontrada nas extremidades das cadeias.

A goma acácia tem a propriedade única de não apresentar alta viscosidade em baixas concentrações, em torno de 1 a 5%, sendo possível observar esta característica em soluções acima de 40 a 50%. Esta habilidade de formar soluções de alta concentração é responsável pela excelente propriedade estabilizante e emulsificante. A viscosidade aumenta nitidamente com o aumento do pH a um máximo entre 5 e 7 e diminui lentamente entre pH 10 a 14 e com a adição de eletrólitos (GLICKSMAN, 1969).

A sua utilização na indústria de alimentos é muito ampla por apresentar diversas propriedades tecnológicas, nutritivas e funcionais tais como: melhor textura, estabilização de agentes emulsificantes, baixa viscosidade e ausência de odor e sabor (FONSECA; SREBERNICH, 2010). Segundo Madene (2006) essas características a tornam um material encapsulante versátil para a maioria dos métodos de encapsulação. Algumas aplicações estão demonstradas na Tabela 8.

Tabela 8 – Aplicação da goma arábica como material encapsulante.

Material Encapsulante	Técnica de Encapsulação	Microrganismo Encapsulado	Objetivo da Microencapsulação	Referência
Goma arábica (10%)	Atomização	<i>L. paracasei</i> NFBC 338	Viabilidade durante o armazenamento e à exposição ao suco gástrico suíno.	Desmond et al. (2002)
Goma arábica e Alginato de Cálcio (2%)	Aspersão	<i>L. acidophilus</i> NCFM e <i>B. lactis</i> BI-04	Sobrevivência após secagem e processo/armazenamento de sorvete	Boscarioli (2010)
Goma arábica (1,25%)	Coacervação complexa	<i>B. lactis</i> Bb12	Tolerância ao oxigênio	Matsubara et al. (2006)
Goma arábica (10%)	Atomização	<i>L. acidophilus</i>	Viabilidade durante a encapsulação/armazenamento	Rapacci e Ramos (2007)

A goma acácia é considerada prebiótico, pois, assim como outras fibras solúveis, é apenas digerida no intestino, onde é convertida em nutrientes necessários para um melhor desenvolvimento das bifidobactérias e lactobacilos, aumentando favoravelmente a microbiota bacteriana (OLIVEIRA, 2008).

3.3.6 Mucilagem de Taro (*Colocasia esculenta*) e Inhame (*Dioscorea spp.*)

Segundo Pedralli et al. (2002) ficou estabelecido que os órgãos governamentais, universidades, empresas de pesquisas e de extensão rural, Sociedade de Olericultura do Brasil e demais entidades ligadas ao setor agrícola, oficializem e divulguem, no âmbito técnico-científico nacional, a nova nomenclatura, onde “inhame” (*Colocasia esculenta*) passa a ter a denominação definitiva de “taro” e as Dioscoreáceas (*Dioscorea spp.*), chamadas popularmente no norte/nordeste brasileiro de “carás” e “inhames”, passam a ter a denominação definitiva de “inhame”. A Figura 4 ilustra o taro e o inhame, utilizando a nomenclatura atual.

Figura 4 – Imagens de taro (A) e inhame (B).



O inhame (*Dioscorea alata*) e o taro (*Colocasia esculenta*) são hortaliças muito rústicas, de clima tropical, que apresentam bom desenvolvimento sob precipitações pluviométricas anuais em torno de 1.500 mm. Produzem tubérculos comestíveis que integram a dieta humana, ricos em carboidratos, saudáveis e de alta qualidade nutritiva, principalmente como fonte de energia, contendo apreciáveis teores de tiamina (vitamina B1), riboflavina (vitamina B2), niacina (vitamina B3), além de vitamina A e ácido ascórbico (vitamina C) (SANTOS, 1996).

a) Inhame

Inhame (*Dioscorea sp.*) é uma planta monocotiledônea, da família *Dioscoreaceae*, herbácea, trepadeira, pertencente ao gênero *Dioscorea* (PEDRALLI et al., 2002). Segundo Mayo (1999) as *Dioscoreaceae* apresentam nove gêneros e cerca de 850 espécies, de distribuição tropical, subtropical e temperada.

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) 100 g da parte comestível do inhame contém: 78,9% de umidade, 78 calorias, 1,5g de proteína, 0,1g de lipídeos, não contém colesterol, 18,9g de carboidrato, 2,6g de fibra, 0,6g de cinzas, 5mg de cálcio, 15mg de magnésio, 0,02mg de manganês, 28mg de fósforo, 0,3mg de ferro, 1mg de sódio, 203mg de potássio, 0,1mg de cobre, 0,2mg de zinco, não contém retinol, 0,12 mg de piridoxina e contém traços de riboflavina, niacina e vitamina C.

Fonseca (2006) avaliou a composição centesimal (umidade em base úmida e extrato etéreo, proteínas, fibra bruta, cinzas e carboidratos totais em base seca) e o valor calórico do inhame *in natura* (IN) e da mucilagem de inhame *in natura* (MI) obtida por filtração, representados na Tabela 9.

Tabela 9 – Valores médios* da composição centesimal do inhame *in natura* (IN) e da mucilagem de inhame *in natura* (MI).

Melhoradores	Umidade (%, bu)	Extrato Etéreo (%, bs)	Proteína (%, bs)	Fibra Bruta (%, bs)	Cinzas (%, bs)	Carboidratos Totais (%, bs)
IN	74,50 ^a	0,29 ^b	6,89 ^a	0,74 ^b	2,83 ^b	88,76 ^a
MI	73,73 ^a	0,41 ^b	5,95 ^a	0,79 ^b	3,16 ^b	88,20 ^a

*Médias seguidas de mesma letra na coluna, não diferem entre si, pelo teste de Tukey (0,05).

Fonte: Fonseca (2006).

A porção polissacarídica é composta em sua maior parte de manose, poucas quantidades de arabinose, glicose e galactose e traços de xilose e ramnose (TANOUE; SIMOZONO, 1991).

Segundo Reis et al. (2010) o amido de inhame é estável ao aquecimento e agitação, tem tendência intermediária a retrogradação, apresenta baixo poder de inchamento e solubilidade em água e óleo a frio, além de possuir quantidade significativa de proteínas e açúcares redutores.

b) Taro

Segundo Santos (2002), a espécie *Colocasia esculenta* não apresenta semelhança com as espécies do gênero *Dioscorea*, portanto, inferindo que a espécie não é inhame e nem cará, sendo denominada pelo nome vulgar de Taro, seguindo a denominação internacional. Taro (*Colocasia esculenta* (L.) Schott) é uma planta pertencente à família *Araceae* (SANTOS et al., 2007). Segundo Mayo (1999) as *Araceae* apresentam cerca de 105 gêneros e 3.500 espécies, com distribuição tropical.

Segundo a Tabela Brasileira de Composição de Alimentos (TACO, 2006) 100 g da parte comestível do taro contém: 73,3% de umidade, 97 calorias, 2,1g de proteína, 0,2g de lipídeos, não contém colesterol, 23,2g de carboidrato, 1,7g de fibra, 1,2g de cinzas, 12mg de cálcio, 29mg de magnésio, 0,15mg de manganês, 65mg de fósforo, 0,4mg de ferro, 568mg de potássio, 0,17mg de cobre, 0,3mg de zinco, não contém retinol, 0,08mg de tiamina, 0,11 mg de piridoxina, 5,6 mg de vitamina C e contém traços de riboflavina e sódio.

A mucilagem de taro é altamente solúvel em água e é composta principalmente por polímeros de carboidratos neutros altamente ramificados.

Apresenta em sua maior parte a D-galactose (61,6%) como seu constituinte, seguido de D-glicose (19,7%) e D-arabinose (16,2%). Pequenas quantidades de ácido galacturônico e proteínas foram encontradas na mucilagem. A viscosidade é similar à goma arábica a 2% e não é influenciada pelo pH ou força iônica (LIN; HUANG, 1993).

3.3.7 Mucilagem de Linhaça (*Linum Usitatissimum*)

A linhaça é a semente do linho (*Linum usitatissimum* L.), da família *Linaceae*, uma planta nativa do oeste asiático e do mediterrâneo. Possui em sua composição química cerca de 30 a 40% de gordura, 20 a 25% de proteína, 20 a 28% de fibra dietética total, 4 a 8% de umidade e 3 a 4% de cinzas, além de vitaminas A, B, D e E e minerais. (COSKUNER; KARABABA, 2007).

A semente possui elevado conteúdo de fibra alimentar solúvel, que pela alta capacidade de hidratação e força do gel formado, é tradicionalmente denominada de goma ou mucilagem, a qual representa aproximadamente 8% do peso da semente (MONEGO, 2009).

Segundo Anderson e Lowe (1997) a mucilagem de linhaça possui diferentes polissacarídeos como o ácido D-galacturônico, L-ramnose, L-galactose e D-xilose. Em porcentagem, o ácido urônico e xilana mais ramnosana apresentam valores de 26,4 e 39,6%.

Segundo Monego (2009) a goma do grão apresenta alta capacidade de hidratação ($17,48 \pm 0,23$ g de água/g de amostra) e viscosidade estável na faixa de pH de 4 a 6 (aproximadamente 4,5 mPas), podendo ser utilizada como potencial agente hidrocolóide em alimentos e outros segmentos da indústria. A composição centesimal da goma obtida do grão está demonstrada na Tabela 10.

Tabela 10 – Composição centesimal da goma do grão de linhaça.

Amostras	Goma do grão (% na matéria seca)
Fibra total	85,07 ± 3,98 ^a
Fibra solúvel	73,21 ± 2,73 ^a
Fibra insolúvel	11,67 ± 1,19 ^c
Umidade	7,23 ± 0,04 ^a
Cinzas	6,24 ± 0,08 ^a
Gordura	0,18 ± 0,01 ^d
Proteína	6,22 ± 0,12 ^d
Carboidratos	6,88 ± 0,78 ^b

Resultados expressos em média e desvio padrão. Letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

Fonte: Monego (2009).

Soluções de mucilagem de linhaça são caracterizadas pela formação de géis a frio termorreversíveis. A temperatura de dissolução, o valor de pH e a adição de sais minerais de diferentes valências afetam a força do gel. A adição de NaCl e sais de fosfato diminuem a força do gel e a incorporação de pequenas concentrações de CaCl_2 (<0,3% p/v) já apresentam efeito contrário (CHEN et al., 2006).

3.3.8 Mucilagem de Quiabo (*Abelmoschus Esculentus*)

O quiabo (*Abelmoschus esculentus* (L.) Moench), originário da África, pertencente à família *Malvaceae* e tradicionalmente cultivado em regiões tropicais (SILVA, 2004). Segundo o censo agropecuário realizado no Brasil em 2006, pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE, 2006), foram produzidas 116.990 toneladas de quiabo.

Na indústria farmacêutica a goma de quiabo tem sido utilizada como material de revestimento de comprimidos medicamentosos para conferir controle na liberação de drogas, no qual apresenta resultados mais eficientes quando comparada as gomas comumente utilizadas para esta finalidade, como, por exemplo, a carboximetilcelulose (EMEJE, et al., 2007; KUMAR, et al., 2009; OGAJI, 2010; OKOYE et al., 2011). Já na indústria de alimentos a mucilagem tem sido utilizada como um ótimo emulsificante e agente anti-espumante (MISHRA, 2007), porém não foi explorada como agente encapsulante.

Uma das características marcantes da goma de quiabo é a notável habilidade de formar fio em soluções aquosas e acredita-se que esta propriedade é causada pelos grandes agregados moleculares (WHISTLER; BEMILLER, 1973).

Apresenta pH 5,75 (1%), viscosidade 373,6 cp, solubilidade em água 0,1316 (g/100g-25°C) (OGAJI, 2010) e as propriedades reológicas são influenciadas pela presença de sais (WHISTLER; BEMILLER, 1973). Os macro-componentes da mucilagem estão representados na Tabela 11.

Tabela 11 – Composição centesimal* da mucilagem da polpa do quiabo liofilizado.

Parâmetros	Valores (g/100g amostra)
Proteína	17,63 ± 0,12
Lipídeos	4,31 ± 0,06
Cinzas	7,53 ± 0,11
Fibra Alimentar Solúvel	20,45 ± 0,10
Açúcares totais	50,08 ± 0,25

*Valores em base seca e médios de três repetições (± desvio padrão).

Fonte: Silva (2006).

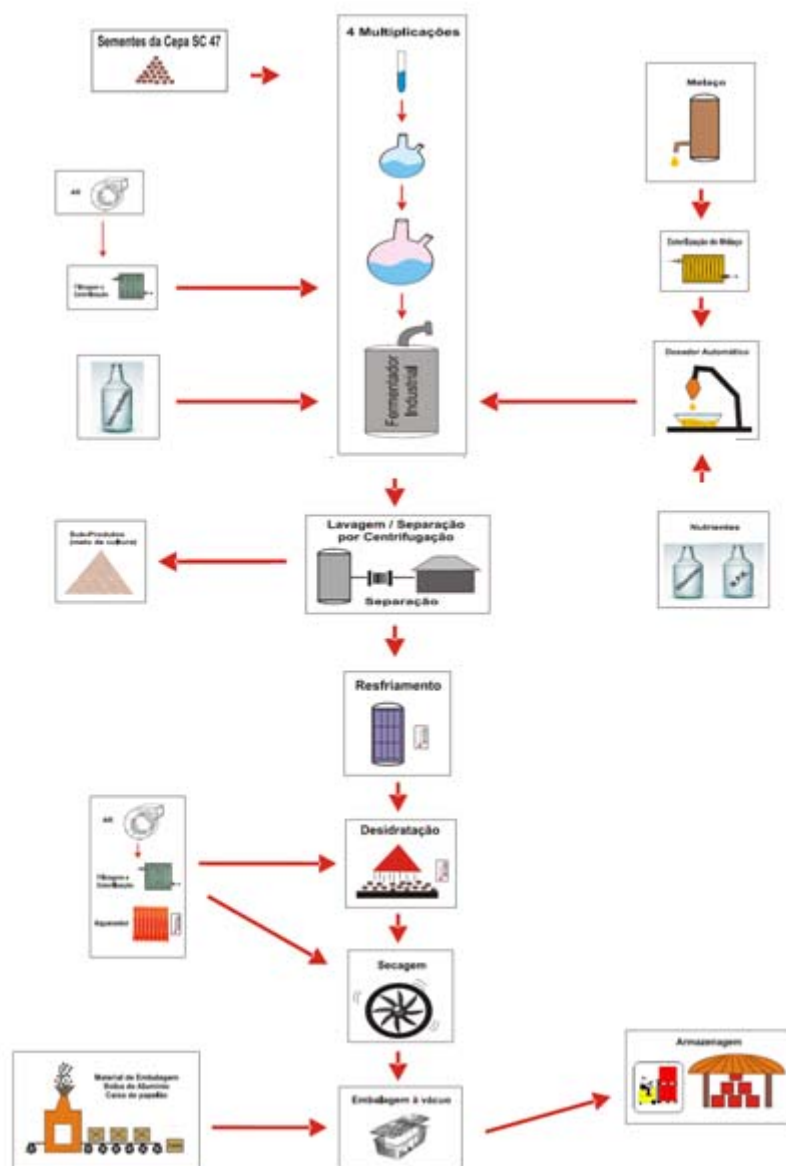
Segundo Silva (2006) a mucilagem do quiabo também pode atuar como prebiótico, pois os microorganismos *Lactobacillus acidophilus La-5* e *Bifidobacterium lactis Bb-12* obtiveram efeito positivo para o crescimento quando inoculados em meio de cultura enriquecido com mucilagem, uma vez que a mucilagem é rica em glicose, ramnose, ácido galacturônico e galactose, além de outros nutrientes como proteínas, aminoácidos, vitaminas e minerais. A mucilagem de quiabo é composta por ramnose, ácido galacturônico e galactose na proporção de 1:1:1 (HIROSE et al., 2004).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 MICROORGANISMO PROBIÓTICO: *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

A levedura viável desidratada (*Saccharomyces cerevisiae*) foi obtida através do produto comercial Biosaf SC-47 produzido por Lesaffre – Saf Agri Brasil. O fluxograma de produção do probiótico está descrito na Figura 5.

Figura 5 – Fluxograma de produção do Biosaf SC 47.



Fonte: Grupo Lesaffre.

















4.2 MATERIAIS ENCAPSULATES

Foram utilizados para a encapsulação, além das mucilagens, o Ágar-Ágar (Becton Dickinson & Co.), Alginato de Sódio (Vetec), Goma Arábica (Sunset) e Iota-Carragena (Griffit).

4.3 EXTRAÇÃO DA MUCILAGEM PARA ENCAPSULAÇÃO

Foram extraídas as mucilagens de inhame, taro, linhaça e quiabo através da metodologia proposta por Lima¹ (2007), como demonstrado na Tabela 12.

Tabela 12 – Processo de extração da mucilagem de quiabo, taro, linhaça e inhame.

PRODUTO INICIAL	PROCESSADO	EXTRAÇÃO	MUCILAGEM
 QUIABO			
 TARO			
 LINHAÇA			
 INHAME			

Cada uma das fontes citadas acima, exceto a linhaça, foi cortada em fatias finas e processada em processador doméstico por 15 segundos. Cem gramas de cada produto foram mantidas em água destilada à temperatura ambiente por 2

horas e, após este período, completou-se o volume para 1 litro, removendo-se o resíduo com peneira fina para se obter a mucilagem.

A metodologia de extração da mucilagem do quiabo e da linhaça foi adaptada. O quiabo processado foi mantido em rede de tecido no processo de extração para facilitar a separação da mucilagem do resíduo. A linhaça foi moída em moinho (IKA A11) por 15 segundos para posteriormente ser homogeneizada em água.

4.4 ENCAPSULAÇÃO DO PROBIÓTICO COM MUCILAGENS E GOMAS

a) Método de solidificação

O método de encapsulação utilizado foi o de imobilização em cubos de ágar-ágar, adaptado do modelo proposto por Behera et al. (2010).

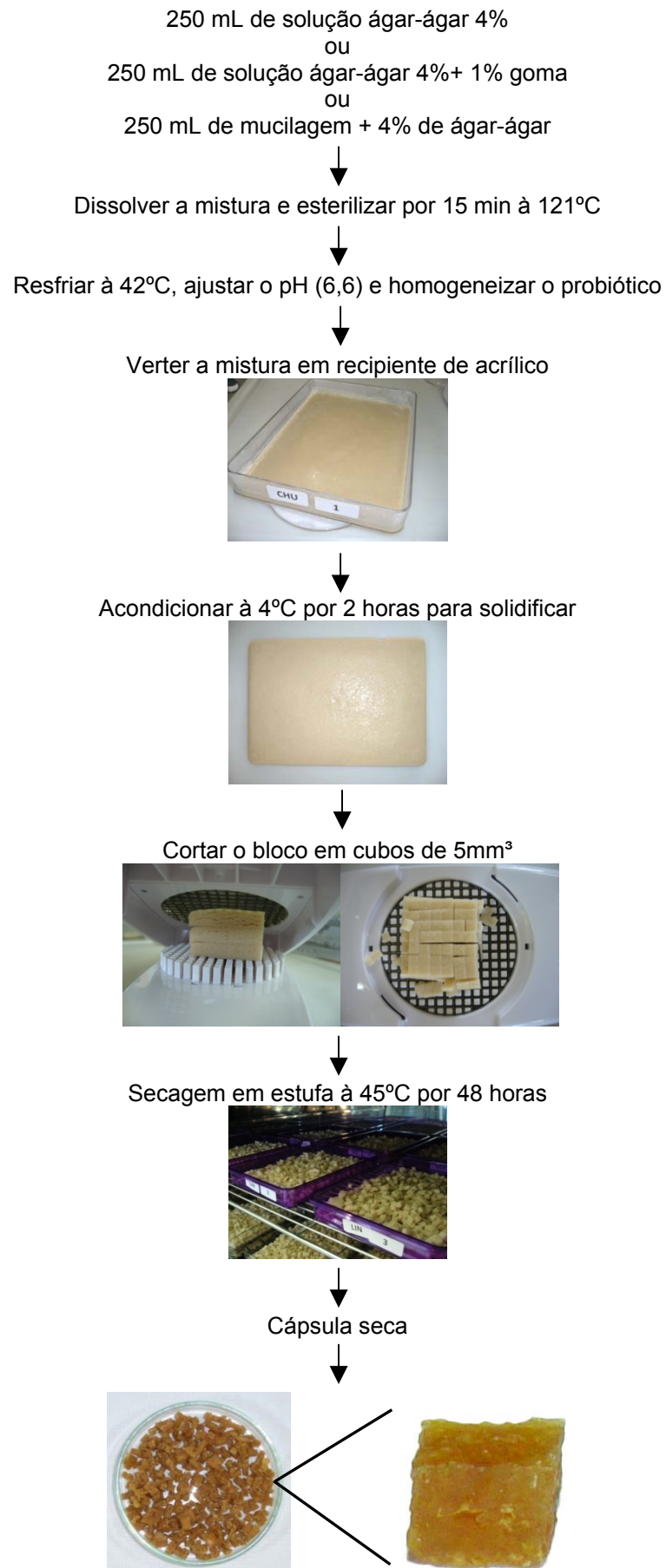
Para cada processo de encapsulação foi utilizado um volume total de 250 mL para todos os 8 tratamentos, sendo estes descritos na Tabela 13.

Tabela 13 – Relação dos tratamentos e suas composições.

TRATAMENTOS*	PROBIÓTICO (% - p/v)	ÁGAR-ÁGAR (% - p/v)	ÁGUA DESTILADA (mL)	GOMAS (% - p/v)	MUCILAGEM (mL)
1. Ágar-Ágar (A-A)	10	4	250	X	X
2. Alginato (ALG)	10	4	250	1	X
3. Goma Arábica (ARA)	10	4	250	1	X
4. Iota-Carragena (ICAR)	10	4	250	1	X
5. Mucilagem Inhame (INH)	10	4	X	X	250
6. Mucilagem Taro (TAR)	10	4	X	X	250
7. Mucilagem Quiabo (QUI)	10	4	X	X	250
8. Mucilagem Linhaça (LIN)	10	4	X	X	250

*Em todos os tratamentos foram adicionados 0,1% (p/v) de TWEEN-20.

O fluxograma do método de imobilização em ágar-ágar está ilustrado na Figura 6 e melhor elucidado a seguir.

Figura 6 – Processo de imobilização de *S. cerevisiae* em cubos e ágar-ágar.

Inicialmente, a solução composta por ágar-ágar e/ou com mucilagens e/ou com gomas e Tween-20, foi esterilizada em autoclave por 15 minutos à 121°C. O Tween-20 foi utilizado para aprimorar a permeabilidade da cápsula e, com isso, evitar a ruptura desta pelo CO₂ sintetizado pelo microrganismo (CHANG et al., 1996). Após a esterilização, a solução foi mantida em banho-maria até atingir a temperatura de 42°C. Ao atingir a temperatura esperada, o pH foi ajustado para 6,6 com uma solução de NaOH 1N ou HCl 1N para que o probiótico fosse adicionado e homogeneizado por 15 segundos através de um mixer (Philips RI1341). A mistura foi rapidamente vertida em um recipiente de acrílico (20,5cm x 14,5 cm) e mantida sob refrigeração à 4°C por 2 horas para solidificar. O bloco obtido foi cortado igualmente em cubos de 5 mm³ através de um cortador manual. Os cubos foram redistribuídos novamente nos recipientes de acrílico e mantidos em estufa com circulação de ar à 45°C por 48 horas para realizar a secagem.

b) Método de extrusão

A metodologia utilizada foi adaptada do modelo proposto por Krasaekoopt et al. (2006). Inicialmente, uma solução de alginato de sódio (2% p/v) foi esterilizada em autoclave por 15 minutos à 121°C. Após a esterilização, a solução foi mantida em banho-maria até atingir a temperatura de 42°C. Ao atingir a temperatura esperada, o pH foi ajustado para 6,6 com uma solução de NaOH 1N para que o probiótico (10% p/v) fosse adicionado e homogeneizado por 15 segundos através de um mixer (Philips RI1341). Por fim, a mistura foi acondicionada em uma seringa com agulha e gotejada em uma solução estéril de cloreto de cálcio 0,1M para obter as microcápsulas.

c) Método de emulsão

A metodologia utilizada foi adaptada do modelo proposto por Sheu e Marshall (1993). Inicialmente, uma solução de alginato de sódio (2% p/v) foi esterilizada em autoclave por 15 minutos à 121°C. Após a esterilização, a solução foi mantida em banho-maria até atingir a temperatura de 42°C. Ao atingir a temperatura esperada, o pH foi ajustado para 6,6 com uma solução de NaOH 1N para que o probiótico (10% p/v) fosse adicionado e homogeneizado por 15 segundos através

de um mixer (Philips RI1341). Posteriormente, 1 parte da mistura polímero/células foi homogeneizada em 5 partes de óleo vegetal estéril, contendo Tween 80 (0,2%), através de uma barra magnética a 200 rpm. Após a formação da emulsão, foi adicionada lentamente uma solução de cloreto de cálcio (0,1M) para quebrar a fase água/óleo e obter as esferas.

4.5 LIBERAÇÃO DA LEVEDURA ENCAPSULADA SOB CONDIÇÕES GASTROINTESTINAIS SIMULADAS

Para simular os sucos entéricos e gástricos, foi utilizada a metodologia proposta por Liserre et al. (2007).

Dez gramas de cápsulas foram adicionadas a 90 mL de solução ácida preparada com 75 mL de 1N HCl, 2 g de NaCl e água destilada até completar 1 litro. O pH desta solução foi corrigido até 1,5 utilizando uma solução alcalina preparada com 150 mL de 1N NaOH, 14 g de $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ e água destilada até completar 1 litro. Pepsina 3 g/L (Inlab) e lipase de *Rhizopus oryzae* 0,9 mg/L (Sigma) foram adicionadas a este suco e incubadas à 37°C por 120 minutos com agitação a 150 rpm. Posteriormente, o pH foi ajustado para 5,6 através da solução alcalina descrita previamente e adicionou-se pancreatina 1 g/L (Inlab) e sais biliares ou Oxagall 10 g/L (Difco) e incubado à 37°C por adicionais 120 minutos sob agitação a 150 rpm. Por fim, o pH foi ajustado para 7,5 adicionando mais solução alcalina e a concentração de pancreatina e sais biliares foram reajustadas para 1 g/L e 10 g/L respectivamente e foi incubado à 37°C por 120 minutos com agitação a 150 rpm.

Alíquotas foram removidas das soluções nos seguintes períodos para efetuar a contagem de UFC/g de *Saccharomyces cerevisiae* liberadas das esferas:

- a) Após 5, 30, e 120 minutos na solução de pH 1,5;
- b) Após 5, 30, e 120 minutos na solução de pH 5,6;
- c) Após 5, 30, e 120 minutos na solução de pH 7,5.

Cada tratamento foi avaliado em triplicata sendo que, para cada repetição, as diluições foram plaqueadas em duplicata para efetuar a média da contagem. A liberação foi representada em porcentagem, como descreve Pennacchia et al. (2008), utilizando a seguinte fórmula:

$$\text{LIBERAÇÃO (\%)} = \frac{C_f}{C_i} \times 100$$

sendo C_f a contagem final (log UFC/g) de células liberadas para o meio externo, após o período do processo em questão, e C_i a contagem inicial (log UFC/g) antes do processo.

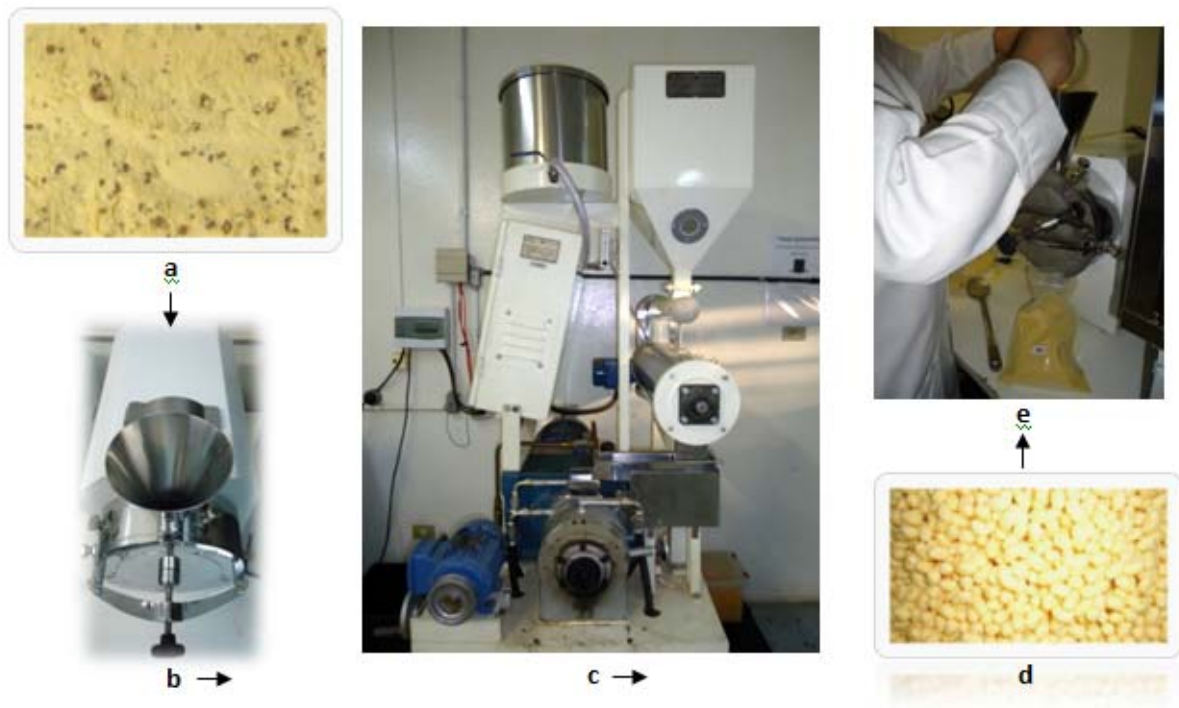
4.6 VIABILIDADE DO PROBIÓTICO ENCAPSULADO E NÃO-ENCAPSULADO APÓS O PROCESSO DE EXTRUSÃO

O veículo utilizado para incorporar as cápsulas e submeter ao processo de extrusão foi um fubá comercial obtido no mercado local. A farinha de milho foi escolhida com o objetivo de facilitar a passagem da matéria-prima através da rosca.

As misturas do probiótico encapsulado e não-encapsulado (10%) com a farinha de milho (90%) foram previamente umedecidas (5% p/v) e homogeneizadas em um moinho de facas (ACB LABOR) para possibilitar a extrusão dos tratamentos com eficácia.

O processo de extrusão foi realizado no Laboratório de Cereais da Universidade Estadual de Maringá (UEM), utilizando a extrusora Imbramaq (Modelo IB-50, fabricação 2009, capacidade nominal de 50 kg/h), de acordo com a metodologia proposta por Justen et al. (2011). As misturas foram adicionadas diretamente na entrada do sistema de extrusão (camisa e rosca) por meio de um dosador próprio para pequenas amostras. Desta forma, foi possível trabalhar com amostras de apenas 400 g. Utilizaram-se os seguintes parâmetros: (i) Die plate= 2 furos com corte central; (ii) Corrente do motor principal= 15 a 22 A; (iii) Inversor da faca de corte= 5 A; (iv) Temperatura= 70°C. Os péletes obtidos foram posteriormente moídos em moinho de facas (ACB LABOR) para homogeneizar a amostra e, com isso, facilitar a contagem microbiológica. O fluxograma do processo de extrusão está melhor ilustrado na Figura 7.

Figura 7 – Fluxograma do processo de extrusão, sendo (a) o probiótico misturado com o fubá, (b) o moinho onde a mistura foi homogeneizada, (c) extrusora Inbramaq, (d) os péletes produzidos na extrusão, (e) os péletes moídos.



Além do cálculo de viabilidade das células após a extrusão, também foi realizada a contagem de leveduras do fubá antes do processo, para evitar contagens superestimadas, através da metodologia elucidada no item 4.7 utilizando 25 g de amostra. A viabilidade da levedura encapsulada e não-encapsulada após a extrusão foi calculada da seguinte forma:

$$\text{VIABILIDADE (\%)} = \frac{CF}{CI} \times 100$$

sendo CF a contagem final (log UFC/g) após o processo de extrusão e CI a contagem inicial (log UFC/g) antes do processo.

4.7 CONTAGEM DE UNIDADES FORMADORAS DE COLÔNIA (UFC) DE *S. CEREVISIAE* POR GRAMA DE AMOSTRA

Para realizar a contagem em duplicata de UFC/g do probiótico pó, das cápsulas úmidas e secas, com ou sem o emprego de extrusão, foi necessário homogeneizar a amostra para que o microrganismo pudesse ser liberado do interior das cápsulas e, com isso, evitar respostas subestimadas. Para isto, foi utilizada a metodologia elucidada por Annan et al. (2008), na qual dilui-se cinco gramas de amostra em 45mL de água peptonada estéril (45°C) e tritura-se em um homogeneizador tipo turrax (Marconi, MA-102) por 30 segundos. Já na digestão *in vitro*, não foi necessário homogeneizar os cubos com a solução, pois o objetivo foi quantificar as células que foram liberadas das cápsulas.

Baseando-se na metodologia proposta por Guillou et al. (2003), as alíquotas iniciais foram diluídas a concentrações apropriadas e semeadas em profundidade em ágar extrato de levedura glicose cloranfenicol (YGC) (Becton Dickinson & Co.) em duplicata e incubadas aerobicamente à 25°C por 96 horas. Após o período necessário de incubação, foram contadas as colônias nas placas (Figura 8) e os resultados foram expressos em log (UFC/g).

Figura 8 – Placa com colônias de *S. cerevisiae* incubadas por 96 horas à 25°C.



Foi necessário realizar o ajuste matemático da contagem das placas obtidas na simulação gastrointestinalna *in vitro*. A média da contagem das placas foi ajustada de acordo com o volume de NaOH adicionado durante o procedimento, como demonstra a fórmula:

$$\text{TOTAL AJUSTADO (UFC/g)} = \frac{\text{CF} \times \text{Vol. NaOH}}{100}$$

sendo CF a média da contagem final (UFC/g) após a digestão *in vitro*.

4.8 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Para analisar a microestrutura das esferas foi utilizada a metodologia adaptada de Bhaskaracharya e Shah (2000), proposta por Ainsley-Reid et al. (2005) com algumas modificações.

As esferas foram fixadas em glutaraldeído 2%/0,1M tampão fosfato (pH 7,2) por 1 hora em temperatura ambiente, fraturadas em nitrogênio líquido e mantidas na mesma solução *over night*. No dia seguinte, foram submetidas a mais 3 lavagens de 15 minutos cada em tampão fosfato e, posteriormente, mantidas em solução de ósmio 1%/0,1M tampão fosfato por 1 hora sem iluminação, lavadas 3 vezes em tampão fosfato por 15 minutos cada e desidratadas gradualmente em etanol 70, 80, 90 e 100% por um período total de 1 hora e 55 minutos. Por fim, as esferas mantidas em álcool 100% foram secas em ponto crítico (BAL-TEC, CPD 030), recobertas com ouro (BAL-TEC, SCD 050) e observadas em microscópio eletrônico de varredura (FEI QUANTA-200, Phillips) em alto vácuo e tensão (20 kV).

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

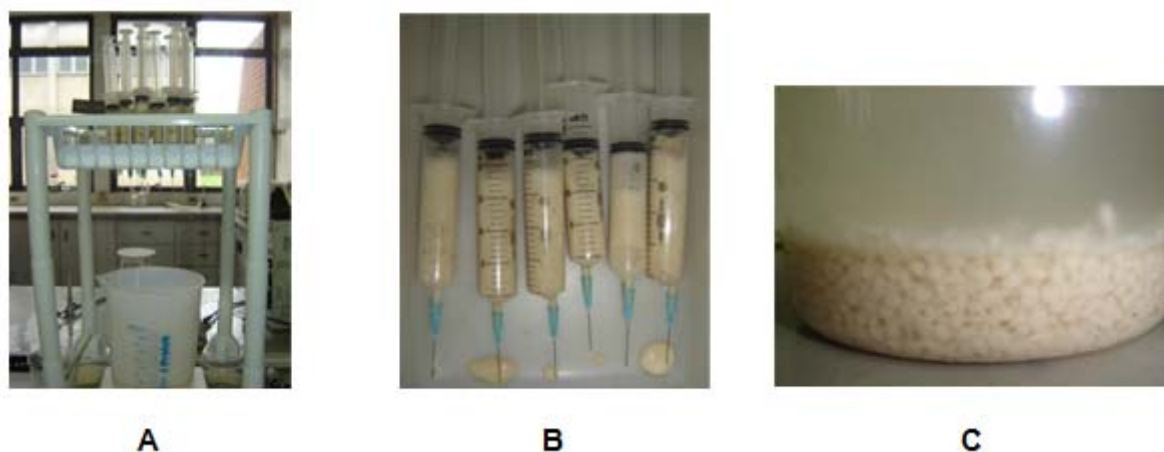
Os resultados foram submetidos a análise de variância, seguido por comparação de médias pelo teste de Tukey a 5% de probabilidade, através do pacote computacional SISVAR (Sistema de Análise de Variância para Dados Balanceados).

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 MÉTODOS DE ENCAPSULAÇÃO

Em testes preliminares, na tentativa de obter cápsulas rígidas, os métodos de extrusão (alginato de sódio/cloreto de cálcio) e emulsão foram aplicados sem sucesso, pois as cápsulas resultantes apresentaram pouca rigidez e desintegravam com a manipulação. A técnica de emulsão também apresentou a desvantagem de produzir o óleo como resíduo, que implicaria em providenciar um destino adequado em função da questão ambiental. No processo de extrusão (Figura 9), a falta de rigidez das cápsulas foi devido a produção de gás pela levedura dentro da seringa, originando um produto espumoso de difícil solidificação, além da ruptura das próprias esferas.

Figura 9 – Obtenção de cápsulas de *Saccharomyces cerevisiae* pelo método de extrusão, sendo “A” o processo de gotejamento da solução encapsulante juntamente com a levedura em cloreto de cálcio, “B” a solução encapsulante dentro da seringa e “C” as cápsulas obtidas.



Entretanto, Behera et al. (2010) imobilizaram a levedura com sucesso pelo método de extrusão, homogeneizando as células em uma solução de 4% de alginato de sódio e solidificando as gotas em cloreto de cálcio 0,1M. As cápsulas de alginato de sódio foram mais eficientes que as esferas de ágar-ágar para a produção de etanol pelos microorganismos imobilizados.

O método escolhido para a obtenção das cápsulas neste trabalho, a técnica de imobilização em cubos de ágar-ágar, ou simplesmente solidificação, foi o mais adequado para se obter esferas rígidas de leveduras.

A técnica de imobilização em ágar-ágar é simples e apresenta custo-benefício vantajoso, segundo Behera et al. (2010). O produto obtido por esta técnica, além de rígido, apresentou cubos de 2,5 mm de altura (5 mm^3) que, após a secagem, diminuíram o tamanho em 10 vezes. Outro fator importante evidenciado foi a presença de poros de diversos tamanhos que poderiam facilitar a passagem do microrganismo para o meio externo. O aspecto dos cubos pode ser observado na Figura 10.

Figura 10 – Esferas de *Saccharomyces cerevisiae* obtidas pelo método de imobilização em cubos de ágar-ágar, sendo “A” a esfera úmida, “B” a esfera seca em estufa a 45°C e “C” a esfera observada em microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 50 vezes.



A escolha de uma técnica apropriada de encapsulamento, em alimentos, depende do custo, do grau de estabilidade necessário durante o armazenamento e processamento do produto, da capacidade de preservar as propriedades dos componentes da cápsula e de liberar o seu interior nas condições específicas pretendidas (MADENE, 2006).

O método encapsulação por solidificação utilizado nesta pesquisa demonstrou ser efetivo, rápido e de ótimo rendimento para a encapsulação de leveduras, apesar de o ágar-ágar não ser um produto de baixo custo, ele foi de grande valia nesta metodologia, permitindo o estudo comparativo entre os materiais encapsulantes naturais associados à solução, além de ser um hidrocolóide biodegradável.

5.2 SIMULAÇÃO GASTROINTESTINAL *IN VITRO*

5.2.1 Digestão *In Vitro* do Probiótico *Saccharomyces Cerevisiae* não-encapsulado

O número de células viáveis em função do pH e tempo está demonstrado na Tabela 14. A análise dos resultados sugere que a levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, sofre a ação do conjugado pH-enzimas-tempo, uma vez que houve diferenças significativas entre contagem inicial e final.

Tabela 14 – Contagem (log UFC/g) e viabilidade (% \pm desvio padrão) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* não-encapsulado após a digestão *in vitro*.

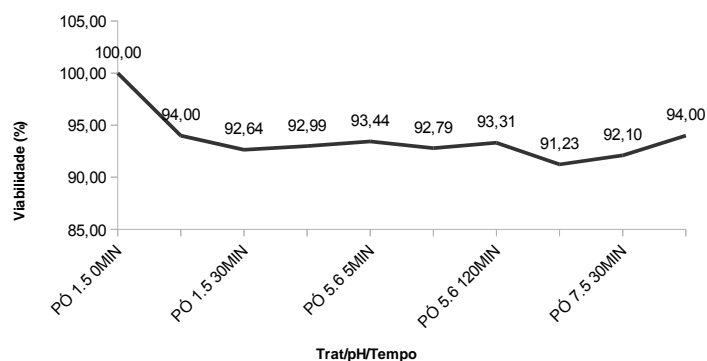
Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Final (log)	Viabilidade (%)
9,18 (100% ^b)	1,5*	5	8,63	94,00 \pm 1,16 ^a
		30	8,50	92,64 \pm 1,82 ^a
		120	8,53	92,99 \pm 2,66 ^a
	5,6*	125	8,57	93,44 \pm 2,43 ^a
		150	8,51	92,79 \pm 2,23 ^a
		240	8,56	93,31 \pm 2,03 ^a
	7,5*	245	8,37	91,23 \pm 1,69 ^a
		270	8,45	92,10 \pm 2,06 ^a
		360	8,63	94,00 \pm 3,01 ^a
	Média de viabilidade (CV= 2,44%)			

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0.05).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

No início do processo da digestão *in vitro*, quando o microrganismo é submetido a uma condição de pH extremamente ácida (pH 1,5) e às enzimas (lipase e pepsina), a viabilidade diminuiu apenas 6,00% e manteve a sobrevivência de 94% constante durante todo o processo, demonstrando que o microrganismo é resistente as condições gastrointestinais simuladas. Na passagem de pH 1,5 para 5,6, além da solução alcalina, são acrescentados sais biliares e pancreatina ao sistema e nota-se que a contagem não apresentou diferença estatística. Portanto, é possível concluir que o único fator que conferiu a queda de 6% na viabilidade do microrganismo na simulação gastrointestinal foi o pH ácido, pois o aumento do pH e a adição de sais biliares e enzimas (lipase, pepsina e pancreatina) não alterou a contagem até o fim do procedimento. Estes resultados são melhores observados na Figura 11.

Figura 11 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* não-encapsulado.



A *Saccharomyces cerevisiae* possui proteínas na membrana unidas ao ATP que são responsáveis pela translocação de sais biliares. Também foi evidenciada a presença de vesículas que podem internalizar os sais para a sua posterior degradação, mediante enzimas catabólicas (Ortiz et al., 2008).

Rajkowska e Kunicka-Styczynska (2010) isolaram cepas *Saccharomyces cerevisiae* de kefir e fezes de frangos e analisaram a sobrevivência das leveduras obtidas em condições gastrointestinais simuladas, comparando os resultados com cepas comerciais (Henterol®, Hamadin® e Omniflora®) e algumas de coleção (MYA-796 e MYA-797). A concentração de sais biliares (0,1 e 1%) não influenciou a viabilidade das cepas, todas foram resistentes por um período de 4 horas à 37°C. Na simulação gastrointestinal, todos os tratamentos apresentaram viabilidade entre 75,50-93,20% e 83,10-97,30% após 4 horas de incubação com pepsina (3g/L) em pH 2,0 e pancreatina (1g/L) em pH 8,0, respectivamente. Com esses resultados, os autores concluíram que o pH é o fator que mais influencia no crescimento das leveduras.

A tolerância ao pH deve-se a dois tipos de anti-transportadores de Na^+/H^+ que a levedura possui, que são a Nha1p e a Nahx1p, que estão localizados na membrana plasmática e no compartimento pré-vacuolar endosomal, respectivamente. Essas proteínas catalisam o intercâmbio de cátions monovalentes (Na^+ , K^+ e H^+) através das membranas, de tal modo, que regulam as concentrações de cátions e pH a nível citoplasmático e de organelas. Outro possível mecanismo de regulação é através da ATPase, localizada na membrana citoplasmática, criando-se um gradiente eletroquímico de prótons que conduz ao transporte secundário de solutos, que está envolvido na manutenção do pH perto da neutralidade (RUBIO et al., 2008).

Pennacchia et al. (2008) isolaram 22 cepas de *Saccharomyces cerevisiae* de diferentes matrizes alimentícias (queijos, vinhos e embutidos cárneos curados) e determinaram, *in vitro*, a sobrevivência das leveduras após a passagem no trato gastrointestinal. A simulação inicial foi realizada em pH 2,5 por 2,5 horas à 37°C e alcançaram uma viabilidade média de 95,35%. Porém, quando adicionaram sais biliares (0,3%) e pancreatina (0,1%) à solução inicial e incubado por um período de 5 horas, apenas 3 cepas apresentaram sobrevivência maior que 90%, indicando que a escolha da cepa é determinante na seleção de um microrganismo probiótico.

De acordo com os resultados evidenciados, é possível afirmar que a linhagem avaliada, *Saccharomyces cerevisiae* (Biosaf SC-47®), apresenta ótimas características probióticas, pois apresenta 94% de células viáveis após a digestão simulada *in vitro*, isto é, a célula sobrevive ao pH ácido, aos sais biliares e às enzimas digestivas, indicando que a levedura irá alcançar o trato gastrointestinal inferior de forma quantitativa e qualitativamente ideais para afetar positivamente o equilíbrio intestinal.

A resistência do microrganismo em estudo em ambientes críticos pode ser uma ótima ferramenta para pesquisas de liberação controlada do núcleo de microcápsulas, sob condições gastrointestinais simuladas, originando respostas mais confiáveis. O desprendimento das células, nos diferentes períodos, pode ser avaliado sem que ocorram respostas subestimadas, pois as leveduras conseguem sobreviver durante todo o processo. Segundo Liserre et al. (2007) estudos sobre a sobrevivência de bactérias probióticas em soluções tampão podem levar à resultados errôneos, porque o potencial de sobrevivência pode ser subestimado. Ainda ressalta que os resultados da literatura sobre a eficácia de encapsulamento para proteção de culturas probióticas são controversos e existe uma alta variação nos parâmetros avaliados, o que torna difícil a identificação do melhor procedimento de microencapsulação.

5.2.2 Digestão *In Vitro* do Probiótico Encapsulado em Gomas

a) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em ágar-ágar (A-A)

O tratamento, denominado "A-A", composto por 4% (p/v) de ágar-ágar e 10% (p/v) de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*), foi considerado como

controle dos processos de encapsulação, pois os demais tratamentos tinham como base o ágar-ágar na mesma concentração, porém eram adicionados de mucilagens ou gomas.

Diferente do abordado anteriormente, os tratamentos contendo a levedura encapsulada foram avaliados de acordo com o número de células liberadas da cápsula durante a simulação gastrointestinal e não a sua sobrevivência, conforme a metodologia aplicada por Liserre et al. (2007).

O número de células liberadas da esfera durante a simulação gastrointestinal *in vitro* está descrito na Tabela 15, observa-se que as porcentagens foram significativamente diferentes. A liberação da levedura foi rápida logo no início do processo em pH 1,5, houve liberação de 86,70% do seu conteúdo, alcançando estabilidade no tempo 30 minutos no mesmo pH. O conteúdo médio liberado durante todo o processo foi de aproximadamente 92,00%.

Tabela 15 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,57	1,5*	5	6,56	86,70 \pm 0,82 ^a
		30	6,98	92,18 \pm 1,64 ^b
		120	6,96	91,91 \pm 1,86 ^b
	5,6*	125	7,05	93,09 \pm 1,50 ^b
		150	6,97	92,06 \pm 1,88 ^b
		240	6,98	92,28 \pm 1,47 ^b
	7,5*	245	6,98	92,22 \pm 1,30 ^b
		270	6,93	91,61 \pm 1,72 ^b
		360	6,94	91,70 \pm 1,49 ^b
		Média de liberação (CV= 1,69%)		

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0.05).

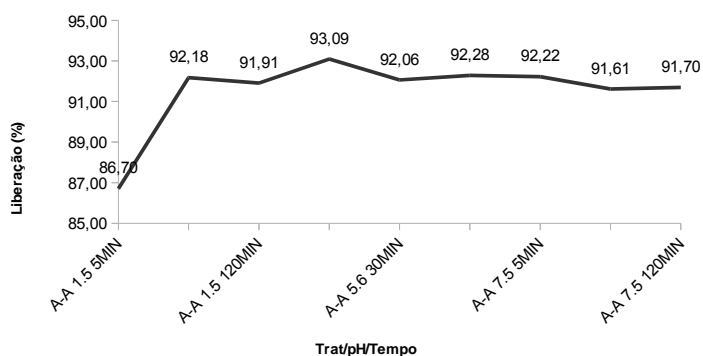
*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

Frente a esses resultados é possível afirmar que o fator determinante para a liberação dos microorganismos da matriz em questão é o pH ácido, primeiro contato da cápsula no início da digestão, pois mesmo com o aumento do pH e do tempo de avaliação, o percentual de liberação da cápsula continua constante até o término do processo. Segundo Glicksman (1969) a sensibilidade das cápsulas de ágar-ágar ao meio ácido pode ser explicada pela diminuição da força de gel, que pode ser intensificado com o decréscimo do pH.

Assim que as cápsulas são submetidas à solução ácida com enzimas, as células do interior das esferas são gradualmente liberadas para o meio externo e, por essa razão, a liberação é menor no início do processo da simulação gastrointestinal e aumenta até atingir estabilidade, como demonstra a Figura 12. Os resultados da simulação sugerem que a liberação permanece constante a partir do tempo 30 minutos em pH 1,5, indicando que seria liberado 92% do conteúdo encapsulado no trato gastrointestinal superior, onde é a fase mais crítica da digestão. Portanto, até o final do processo, aproximadamente 8% do conteúdo encapsulado continua aprisionado na esfera, apontando que o ágar-ágar não é um material encapsulante adequado para conferir liberação controlada.

Segundo Landim (2008) o desafio está em desenvolver materiais encapsulantes que resistam ao pH ácido e se desintegram em pH levemente básico, para que as células sejam liberadas, em sua maior parte, no intestino e não no estômago, onde a maioria dos gêneros probióticos utilizados atualmente não sobrevivem.

Figura 12 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em ágar-ágar.



A simulação gastrointestinal facilitou a difusão das células para o meio externo, mas não alterou a sua característica física, pois após o término do processo as cápsulas continuaram íntegras e intumescidas em sua maior parte (Figura 13), indicando que as esferas são fisicamente resistentes às condições de pH, enzimas e agitação à 150 rpm por 360 minutos. Segundo Nascimento et al. (2011) para que ocorra a difusão, o polímero deve se intumescer (por exemplo, com água), o que leva ao abaixamento da temperatura de transição vítrea (T_g), tornando o material mais plástico e, deste modo, o núcleo pode se difundir para o meio externo.

Figura 13 – Esferas de *Saccharomyces cerevisiae* encapsuladas em ágar-ágar após a digestão *in vitro*.



b) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em ágar-ágar e goma arábica (ARA)

Neste tratamento a goma arábica 1% (p/v) foi adicionada ao ágar-ágar 4% (p/v) para compor o material encapsulante. Não foram observadas diferenças estatísticas ($p < 0,05$) na liberação de células durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, descritas na Tabela 16.

A difusão da levedura do interior da cápsula foi rápida logo no início do processo em pH 1,5, liberação de 74,90% do conteúdo, alcançando estabilidade no tempo 5 minutos em pH 5,6. O conteúdo médio liberado durante todo o processo foi de aproximadamente 85,00%.

Tabela 16 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por goma-arábica e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

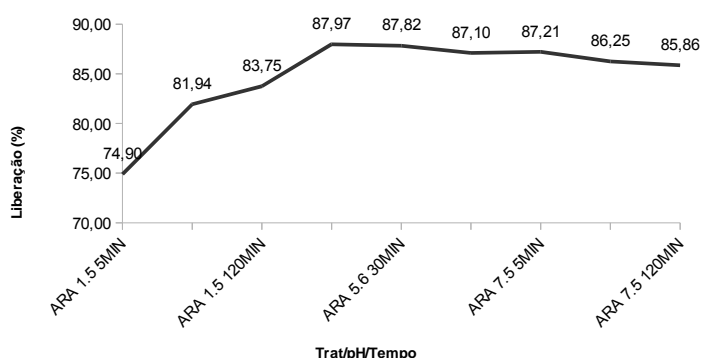
Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,83	1,5*	5	5,84	74,90 \pm 10,33 ^a
		30	6,39	81,94 \pm 6,51 ^a
		120	6,53	83,75 \pm 5,17 ^a
	5,6*	125	6,85	87,97 \pm 2,28 ^a
		150	6,84	87,82 \pm 1,89 ^a
		240	6,79	87,10 \pm 3,12 ^a
	7,5*	245	6,80	87,21 \pm 1,81 ^a
		270	6,72	86,25 \pm 2,80 ^a
		360	6,69	85,86 \pm 1,37 ^a
Média de liberação (CV=5,66%)				84,75

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

O comportamento de liberação foi distinto quando comparado ao tratamento controle, como demonstrado na Figura 14, pois as células difundiram gradualmente para o meio externo até atingir a estabilidade em pH 5,6 no tempo 5 minutos, enquanto o tratamento controle atingiu o seu pico máximo de liberação logo no tempo 30 minutos em pH 1,5. Este padrão demonstra que a liberação foi mais lenta quando foi adicionada a goma arábica ao sistema, isto é, *in vivo* poderá diminuir a exposição das células ao suco gástrico, aumentando a probabilidade do microrganismo alcançar viável ao intestino.

Figura 14 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em goma arábica.



Desmond et al. (2002) encapsularam, por coacervação complexa, o microrganismo *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 em leite desnatado reconstituído

(10% p/v) e goma acácia (10% p/v) e avaliaram a resistência da cápsula quando exposta ao suco gástrico porcino (pH 3,0) à 37°C por 120 minutos. Os autores afirmam que as cápsulas foram mais resistentes durante a simulação em suco gástrico porcino, quando comparadas às células encapsuladas sem a goma (controle). Porém, a sobrevivência ainda foi muito baixa devido a sensibilidade do microrganismo ao pH ácido.

Portanto, a goma acácia melhorou as características de liberação controlada, mas o material encapsulado não foi eficientemente aprisionado durante a simulação gastrointestinal, pois apenas 15 % do conteúdo encapsulado estava retido na extensão da esfera, ainda que 7% a mais quando comparado ao controle. O pH ácido foi o principal fator para a liberação das células para o meio externo.

c) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em alginato de sódio (ALG)

A Tabela 17 apresenta diferenças estatísticas ($p < 0,05$) apenas no início do processo e a porcentagem de liberação manteve-se constante a partir do tempo 30 minutos em pH 1,5. O alginato de sódio em media reteve 22,57% do microrganismo dentro da esfera, aproximadamente 15% mais eficiente em relação ao tratamento controle, que aprisionou apenas 8% do material encapsulado.

Tabela 17 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por alginato de sódio e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

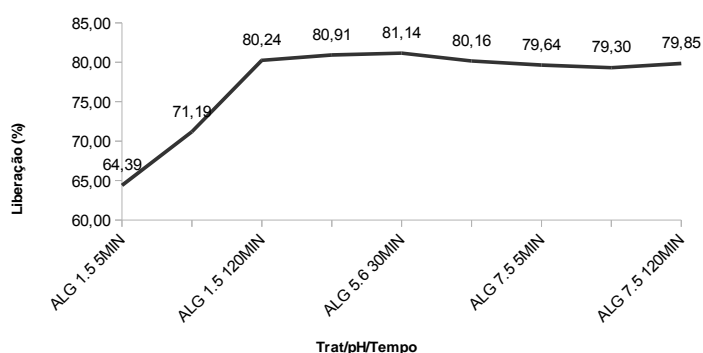
Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)	
7,93	1,5*	5	5,13	64,39 \pm 10,19 ^a	
		30	5,67	71,19 \pm 6,09 ^{ab}	
		120	6,39	80,24 \pm 2,58 ^b	
	5,6*	125	6,45	80,91 \pm 3,23 ^b	
		150	6,47	81,14 \pm 3,04 ^b	
		240	6,39	80,16 \pm 2,26 ^b	
		245	6,35	79,64 \pm 1,49 ^b	
		7,5*	270	6,32	79,30 \pm 1,55 ^b
			360	6,36	79,85 \pm 1,81 ^b
Média de liberação (CV=5,78%)				77,43	

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P < 0,05$).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

O comportamento de liberação foi gradual, atingindo o seu pico de liberação no tempo 120 minutos em pH 1,5, como demonstra a Figura 15, diferente do tratamento controle que atingiu o pico no tempo 30 minutos do mesmo pH. Além da característica de liberação controlada, a goma também favoreceu a retenção do microrganismo na cápsula, demonstrando ser uma opção eficiente como material encapsulante.

Figura 15 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em alginato de sódio.



A maior retenção da levedura em alginato de sódio pode ser explicada pela característica da goma em formar géis sob condições ácidas (GLICKSMAN, 1969). Outro fator é a habilidade de torna-se solúvel e viscosa quando submetida ao alto pH do trato gastrointestinal. Este comportamento dependente do pH pode ser explorado para perfis de liberação controlada do núcleo (GEORGE e ABRAHAM, 2006).

Ding e Shah (2009) microencapsularam, por emulsão, microorganismos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em 3% de alginato e avaliaram a liberação das células em pH 2,0 por 120 minutos que, decorridos 30 minutos do processo, apresentaram valores entre 79,47% e 86,94%.

Liserre et al. (2007) submetem cápsulas de *Bifidobacterium animalis subsp. lactis*, obtidas por extrusão em alginato 2% (p/v), sob as mesmas condições gastrointestinais *in vitro* desempenhadas neste projeto e concluíram que a encapsulação favoreceu a sobrevivência do microrganismo quando comparado as células não-encapsuladas.

Portanto, a utilização de 1% de alginato de sódio juntamente com 4,00% de ágar-ágar aprimora a característica de liberação controlada, resultando em

uma média de 77,43% de células liberadas da esfera durante o processo de digestão *in vitro*.

d) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em iota-carragena (I-CAR)

A porcentagem de células liberadas da esfera durante a simulação gastrointestinal *in vitro* está descrita na Tabela 18 e foram significativamente diferentes. A esfera com iota-carragena reteve 14% do material encapsulado, um valor 6% mais alto quando comparado ao tratamento controle, que aprisionou 8% das células no interior da esfera.

Ding e Shah (2009) microencapsularam, por emulsão, microorganismos do gênero *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em 3% de carragena e avaliaram a liberação das células em pH 2,0 por 120 minutos. Após decorridos 30 minutos do processo, os valores de liberação das células para o meio externo estiveram entre 79,23% e 85,55%.

Tabela 18 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por iota-carragena e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)	
7,70	1,5*	5	5,87	76,14 \pm 0,25 ^a	
		30	6,22	80,69 \pm 0,46 ^b	
		120	6,90	89,54 \pm 0,25 ^d	
	5,6*	125	6,83	88,61 \pm 1,29 ^d	
		150	6,83	88,61 \pm 0,88 ^d	
		240	6,80	88,28 \pm 0,35 ^{dc}	
		245	6,58	85,43 \pm 0,52 ^c	
		7,5*	270	6,69	86,89 \pm 2,53 ^{dc}
			360	6,87	89,20 \pm 0,35 ^d
		Média de liberação (CV=1,21%)			

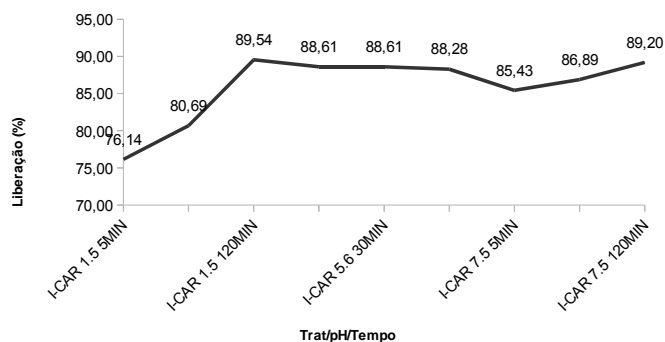
^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0.05).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

Ao analisar a Figura 16, nota-se que a liberação da levedura para o meio externo foi gradual até o tempo 120 minutos em pH 1,5 e manteve a mesma contagem até o fim do procedimento. Este comportamento foi o mesmo encontrado nos demais tratamentos, isto é, o fator responsável para a maior liberação das células para o meio externo continua sendo o pH ácido e a contagem constante até

o fim do processo é devida a resistência da levedura *Saccharomyces cerevisiae* às condições extremas de pH e enzimas digestivas.

Figura 16 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em iotacaragena.



Apesar do valor superior na retenção das leveduras, a iotacaragena promoveu a liberação de 86% do agente ativo encapsulado, demonstrando não ser indicado como material de parede neste sistema.

5.2.3 Digestão *In Vitro* do Probiótico Encapsulado em Mucilagens

As mucilagens como materiais encapsulantes são produtos inovadores e, portanto, não são encontrados artigos para futuras comparações.

a) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em mucilagem de linhaça (LIN)

A Tabela 19 apresenta que a mucilagem de linhaça promoveu melhor aprisionamento do agente encapsulado, demonstrando ser uma nova fonte de material encapsulante eficiente, liberando em média 73% do conteúdo inicial incorporado, isto é, manteve 27% do material encapsulado no interior da matriz, representando uma melhora de aproximadamente 18% na retenção das células quando comparado ao tratamento controle, pelo qual aprisionou apenas 8% das leveduras na esfera.

A difusão das células para o meio externo foi gradual, alcançando o valor mais alto de liberação em pH 1,5 no tempo 120 minutos e manteve-se contante até o término da simulação gastrointestinal, como melhor observado na Figura 17 (A). Portanto, além da característica de liberação controlada, a mucilagem também

conferiu eficiência na retenção das células no interior da esfera durante a digestão *in vitro*.

Tabela 19 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de linhaça e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,51	1,5*	5	4,77	63,51 \pm 1,13 ^a
		30	5,33	71,07 \pm 0,99 ^b
		120	5,61	74,69 \pm 0,22 ^{cd}
	5,6*	125	5,51	73,46 \pm 0,60 ^c
		150	5,58	74,32 \pm 0,83 ^{cd}
		240	5,67	75,60 \pm 0,66 ^d
		245	5,60	74,56 \pm 0,72 ^{cd}
	7,5*	270	5,53	73,74 \pm 0,54 ^{cd}
		360	5,68	75,70 \pm 0,62 ^d
		Média de liberação (CV=1,02%)		

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0.05).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

b) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em mucilagem de taro (TARO)

De acordo com a Tabela 20 e Figura 17 (B), nota-se que as esferas compostas por ágar-ágar e mucilagem de taro apresentaram os maiores valores de liberação, quando comparados a todos os tratamentos, inclusive ao controle. Estatisticamente (p<0,05), houve diferença apenas entre o pH 1,5 no tempo 5 minutos em relação aos outros períodos da simulação gastrointestinal. Supõe-se que algum composto da mucilagem possa ter prejudicado as características físico-químicas do ágar-ágar, para que possa ser explicado o resultado inferior ao controle. Nenhuma razão aparente foi encontrada na literatura.

Tabela 20 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de taro e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,27	1,5*	5	6,35	87,35 \pm 2,71 ^a
		30	6,79	93,32 \pm 0,68 ^b
		120	7,05	96,91 \pm 1,76 ^b
	5,6*	125	7,02	96,57 \pm 1,25 ^b
		150	6,94	95,43 \pm 1,17 ^b
		240	6,92	95,20 \pm 1,64 ^b
	7,5*	245	6,79	93,42 \pm 2,80 ^b
		270	6,78	93,21 \pm 2,32 ^b
		360	6,90	94,85 \pm 1,14 ^b
Média de liberação (CV=1,98%)				94,03

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

A liberação média das leveduras encapsuladas para o meio externo foi de 94,00%, aproximadamente 3,00% a mais que o tratamento controle (91,53%), mantendo aprisionado apenas 6,00% do material encapsulado durante o processo de digestão *in vitro*, demonstrando não ser um material adequado para encapsulação e estudos de liberação controlada.

c) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em mucilagem de inhame (INH)

Com a mucilagem de inhame o comportamento foi estatisticamente ($p < 0,05$) distinto dos demais durante a simulação gastrointestinal, e os resultados mostrados na Tabela 21.

A difusão das células para o meio externo foi gradual até o tempo 120 minutos em pH 1,5 e permaneceu contante até o tempo 30 minutos em pH 5,6. Após esse período, foi evidenciada uma queda de aproximadamente 4,00% na contagem, como melhor demonstrado na Figura 17 (C). Possivelmente, este desempenho possa ser algo intrínseco da matéria prima, pois não foi evidenciado este padrão com as demais mucilagens como materiais encapsulantes. A liberação média do microrganismo durante o processo foi de aproximadamente 84,00%, isto é, reteve 16,00% do material encapsulado no interior da esfera, representando uma melhora de 8,00% quando comparado ao tratamento controle.

Tabela 21 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de inhame e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,70	1,5*	5	5,87	78,79 \pm 0,85 ^a
		30	6,22	85,68 \pm 0,54 ^{cd}
		120	6,90	88,12 \pm 0,62 ^d
	5,6*	125	6,83	87,64 \pm 0,91 ^d
		150	6,83	86,86 \pm 0,61 ^d
		240	6,80	83,00 \pm 0,53 ^{cd}
		245	6,58	82,23 \pm 1,00 ^b
	7,5*	270	6,69	82,12 \pm 1,11 ^b
		360	6,87	83,11 \pm 2,64 ^{cb}
		Média de liberação (CV=1,37%)		

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

Diante destes resultados, é possível concluir que a mucilagem de inhame é uma alternativa de material encapsulante, aprisionando parte das células na matriz e conferindo liberação controlada.

d) Digestão *in vitro* do probiótico encapsulado em mucilagem de quiabo (QUI)

Este tratamento apresentou a menor média de liberação quando comparado aos demais avaliados, como demonstra a Tabela 22.

Tabela 22 – Contagem (log UFC/g) do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* liberado (% \pm desvio padrão) das cápsulas compostas por mucilagem de quiabo e ágar-ágar após a digestão *in vitro*.

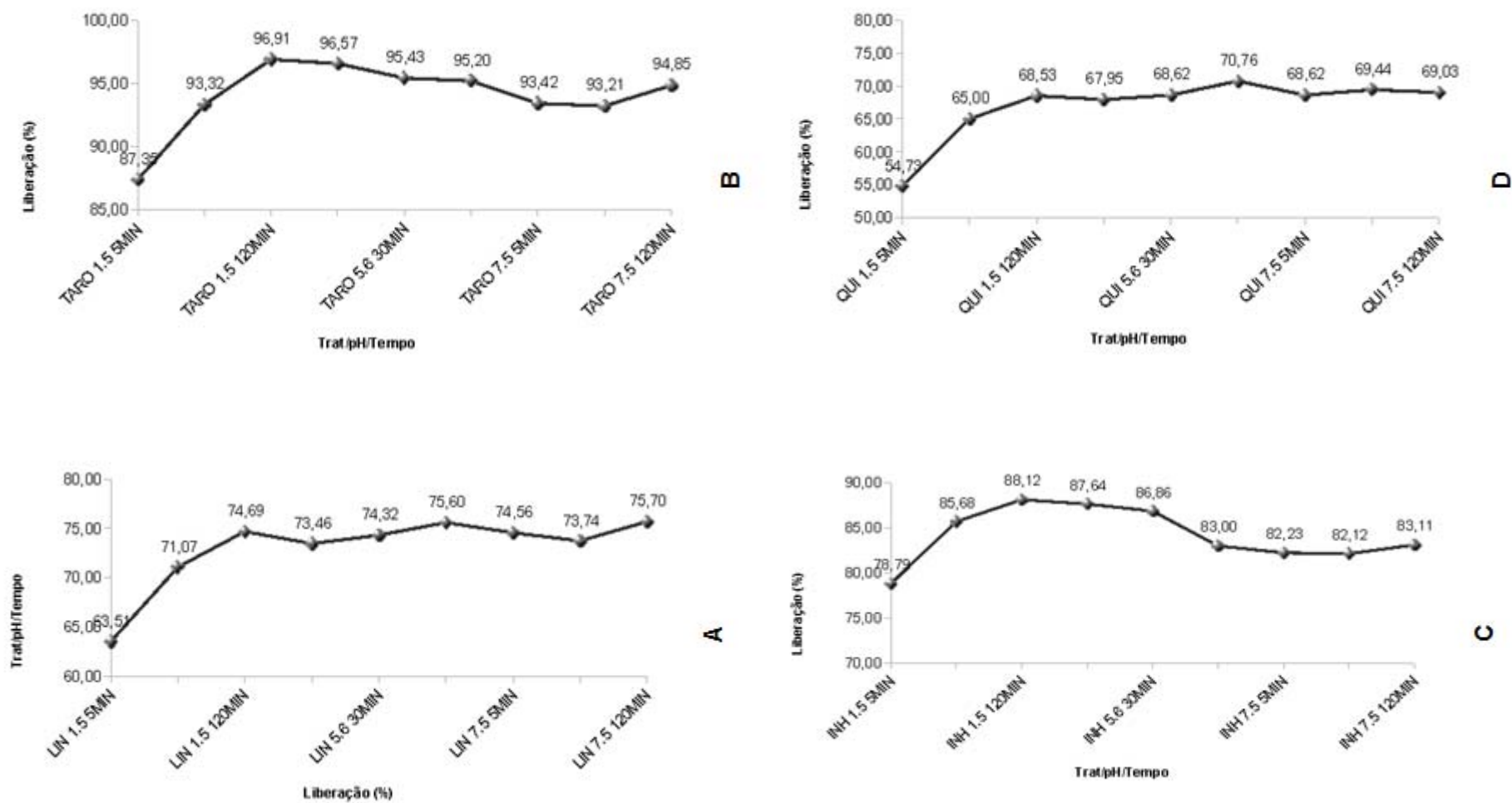
Contagem Inicial (log)	pH	Tempo (min)	Contagem Liberação (log)	Liberação (%)
7,54	1,5*	5	4,13	54,73 \pm 1,55 ^a
		30	4,90	65,00 \pm 0,41 ^b
		120	5,17	68,53 \pm 1,61 ^c
	5,6*	125	5,12	67,95 \pm 1,47 ^{bc}
		150	5,17	68,62 \pm 0,00 ^c
		240	5,33	70,76 \pm 0,84 ^c
	7,5*	245	5,17	68,62 \pm 0,23 ^c
		270	5,23	69,44 \pm 0,34 ^c
		360	5,20	69,03 \pm 1,64 ^c
		Média de liberação (CV=1,64%)		

^{abc} Médias na mesma coluna seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($P < 0.05$).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

A difusão das células, analisadas estatisticamente ($p < 0,05$), foi gradual até os 120 minutos em pH 1,5, período em que atingiu o ponto máximo de liberação. A mucilagem conferiu a peculiaridade de liberar o menor número de células no início da digestão *in vitro* (54,73%), que é o período mais crítico, e manteve-se deste modo durante todo o processo, como demonstra a Figura 17 (D). A retenção de células no interior da matriz foi de 33,00%, evidenciando uma melhora de aproximadamente 25,00% quando comparado ao tratamento controle. Portanto, a mucilagem de quiabo demonstra ser um alternativo material encapsulante natural e mais eficiente que as gomas comumente usadas no mercado.

Figura 17 – Digestão in vitro do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em mucilagem de linhaça (A), taro (B), inhame (C) e quiabo (D).

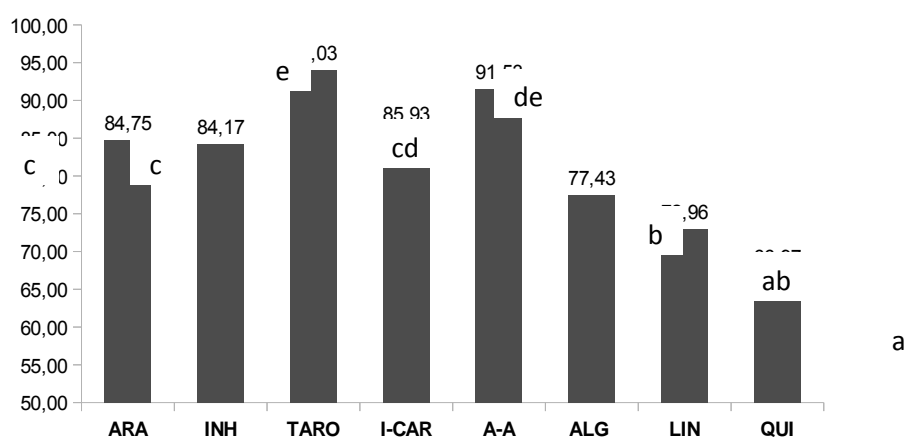


5.2.4 Digestão *In Vitro* de todos os Tratamentos: uma Visão Geral

De modo geral, os tratamentos adicionados de mucilagens apresentaram melhores efeitos quando comparados aos tratamentos com gomas. Esses resultados indicam que as mucilagens podem ser os materiais encapsulantes do futuro com um vasto mercado a ser explorado.

Levando em consideração a média de liberação do microrganismo da esfera, durante a simulação gastrointestinal, os melhores tratamentos foram apontados de acordo com a Figura 18, demonstrando que as cápsulas obtidas com mucilagem de quiabo foram mais eficientes numericamente, obedecendo a seguinte ordem crescente de liberação: QUI<LIN<ALG<INH<ARA<I-CAR<-A-A<TARO. Estatisticamente ($p<0,05$), o tratamento QUI não diferencia do tratamento LIN, demonstrado que ambos podem ser considerados como os mais eficientes na retenção de células no interior da esfera durante a digestão *in vitro*. Os tratamentos I-CAR e TARO também não apresentaram diferenças estatísticas quando comparados ao tratamento controle (A-A), indicando que a utilização de ambos não surtiram efeitos nas características de liberação controlada.

Figura 18 – Média de liberação (% log UFC/g) do probiótico *S. cerevisiae* das cápsulas compostas de ágar-ágar e diferentes gomas e mucilagens após a digestão *in vitro*.



^{abc} Médias entre as colunas seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes ($p < 0.05$).

Ding e Shah (2009) encapsularam microorganismos dos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* em diferentes materiais encapsulantes (goma xantana, guar e locusta, alginato de sódio e carragena) a uma concentração de

3,00% pelo método de emulsão. Após simulação gastrointestinal *in vitro*, concluíram que, em ordem crescente de viabilidade, a goma xantana, a carragena e o alginato de sódio apresentaram os melhores resultados, respectivamente.

Na Tabela 23 foram comparados pelo teste de Tukey, a nível de 5%, cada período (pH/Tempo) entre os diferentes tratamentos, para que se possa analisar a influência de cada pH/Tempo na liberação da levedura encapsulada nas diferentes composições. Nos diferentes períodos avaliados, foram encontradas várias diferenças estatísticas entre os tratamentos, porém, os tratamentos QUI, LIN e ALG prevaleceram como os melhores retentores de microrganismo na esfera durante todo o processo.

Tabela 23 – Comparação na liberação do probiótico *Saccharomyces cerevisiae* das cápsulas compostas de diferentes matrizes encapsulantes (%) nos diferentes tempos e pH's do processo de digestão *in vitro*.

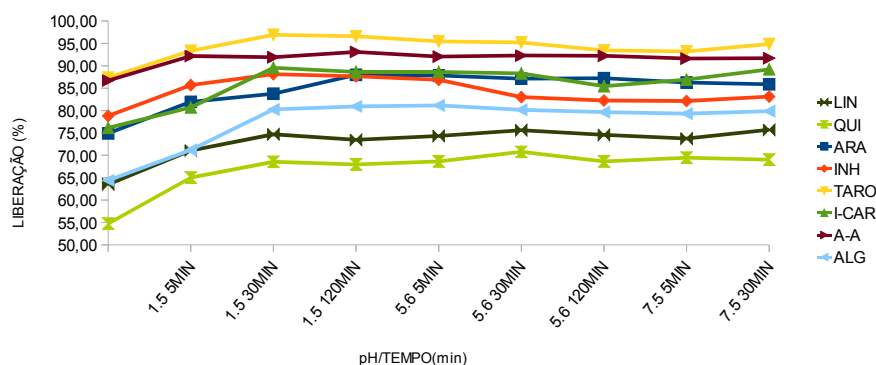
pH	Tempo (min)	INH	TARO	A-A	I-CAR	ALG	ARA	LIN	QUI
1,5*	5	78,79 ^a	87,35 ^a	86,70 ^a	76,14 ^{ab}	64,39 ^{cb}	74,90 ^{ab}	63,51 ^{cb}	54,73 ^c
	30	85,68 ^{ab}	93,32 ^a	92,18 ^a	80,69 ^b	71,19 ^c	81,94 ^b	71,07 ^c	65,00 ^c
	120	88,12 ^{bc}	96,91 ^a	91,91 ^{ab}	89,54 ^{bc}	80,24 ^{de}	83,75 ^{cd}	74,69 ^{ef}	68,53 ^f
5,6*	125	87,64 ^c	96,57 ^a	93,09 ^{ab}	88,61 ^{bc}	80,91 ^d	87,97 ^c	73,46 ^e	67,95 ^f
	150	86,86 ^c	95,43 ^a	92,06 ^{ab}	88,61 ^{bc}	81,14 ^d	87,82 ^{bc}	74,32 ^e	68,62 ^f
	240	83,00 ^{de}	95,20 ^a	92,28 ^{ab}	88,28 ^{bc}	80,16 ^e	87,10 ^{cd}	75,60 ^f	70,76 ^g
7,5*	245	82,23 ^{cd}	93,42 ^a	92,22 ^a	85,43 ^{bc}	79,64 ^d	87,21 ^b	74,56 ^e	68,62 ^f
	270	82,12 ^{cd}	93,21 ^a	91,61 ^{ab}	86,89 ^{bc}	79,30 ^d	86,25 ^c	73,74 ^e	69,44 ^f
	360	83,11 ^{de}	94,85 ^a	91,70 ^{ab}	89,20 ^{bc}	79,85 ^{ef}	85,86 ^{cd}	75,70 ^g	69,03 ^h

^{abc} Médias na mesma linha seguidas por diferentes letras minúsculas são significativamente diferentes (P < 0.05).

*pH 1,5 (pepsina 3g/L e lipase 0,9 mg/L), pH 5,6 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L), pH 7,5 (pancreatina 1g/L e oxgall 10 g/L).

Estas conclusões são melhores ilustradas no gráfico da Figura 19, onde é possível comparar todos os tratamentos avaliados em todos os períodos da simulação gastrointestinal *in vitro*.

Figura 19 – Digestão *in vitro* do probiótico *S. cerevisiae* encapsulado em mucilagens e gomas.



De acordo com os resultados dispostos anteriormente, foi possível concluir que, das esferas obtidas de gomas e mucilagens, o alginato de sódio e a mucilagem de quiabo demonstraram ser os materiais encapsulantes mais eficientes na retenção do agente encapsulado durante a simulação gastrointestinal *in vitro*, respectivamente, sendo as mucilagens de quiabo e linhaça superiores ao alginato de sódio em aspectos de liberação controlada.

5.3 VIABILIDADE DO PROBIÓTICO ENCAPSULADO E NÃO-ENCAPSULADO APÓS O PROCESSO DE EXTRUSÃO

Nenhum tratamento conseguiu manter viável o probiótico após o processo de extrusão. Os diferentes materiais encapsulantes não promoveram proteção física às leveduras, pois apresentaram a mesma mortalidade quando comparados as células não-encapsuladas. Não foi encontrada contagem de leveduras na farinha de milho (fubá) comercial antes da extrusão.

A temperatura de 70°C empregada no processo de extrusão, mesmo sendo comparativamente mais baixa que os processos comerciais (135°C), não foi branda o suficiente para manter a viabilidade das células após o processo. Mesmo porque, após o procedimento, os péletes produzidos apresentaram uma temperatura maior do que a aplicada inicialmente, devido à pressão promovida pelo processo.

Likimani e Sofos (1990) estudaram a resistência de esporos de *Bacillus globigii* durante extrusão de uma mistura de milho/soja. Os autores concluíram que nas temperaturas de extrusão mais altas (100, 120 e 140° C) os efeitos destrutivos à viabilidade são grandes, apesar de haver também diminuição

do número de esporos à temperatura de 80°C. Biourge et al. (1998) relataram que a resistência do *Bacillus* CIP 5832 ao processo de extrusão é mínima e resulta em perda de 99% de esporos.

Uma das alternativas para o uso de probióticos em rações extrusadas seria a infusão à vácuo de um óleo misturado com probióticos sobre os péletes à temperatura ambiente, sugere Kazarjan (2011). Porém, o produto deve ser capaz de ter um prazo de validade (“vida de prateleira”) duradoura e manter-se estável durante o período de administração, comenta Fernandes et al. (s.d.), o que pode ser alcançado através da microencapsulação do agente probiótico.

Segundo Maluta et al. (2007) para não haver perda considerável da eficiência de um probiótico contendo microorganismos, o mesmo deve ser adicionado à ração após o processo de extrusão. Os mesmos autores comprovaram que, ao adicionar o probiótico comercial, liofilizado, termo-resistente, encapsulado, composto de *Bacillus cereus* (ATCC 9634) $4,0 \times 10^8$ UFC/g e *Bacillus subtilis* (CCT 3131) $4,0 \times 10^8$ UFC/g, após o processo de extrusão, a contagem total de esporos na ração extrusada permaneceu praticamente inalterada durante 12 meses de estocagem.

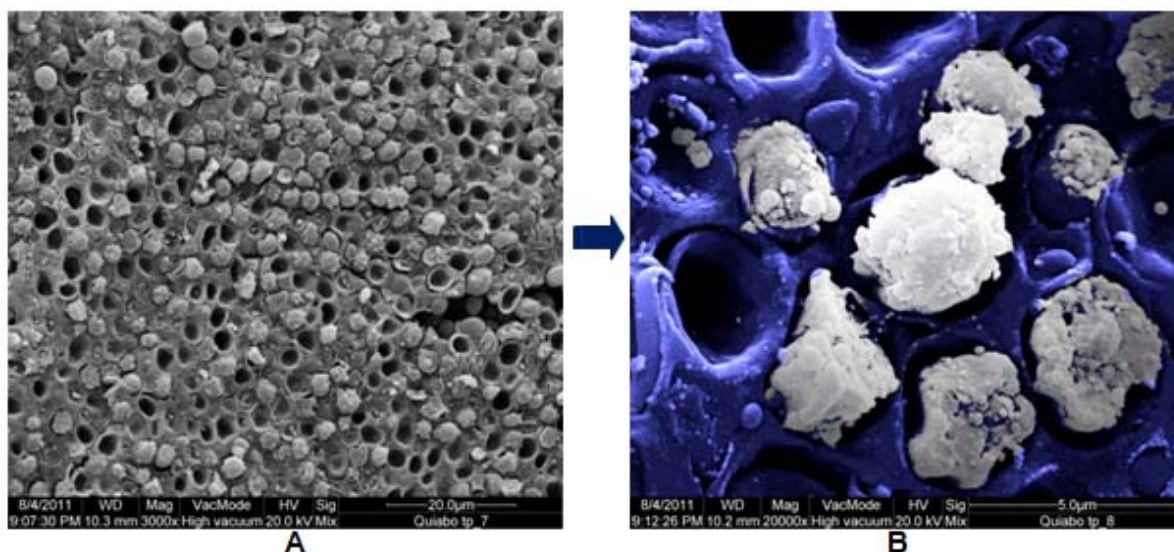
A inclusão de leveduras encapsuladas em rações peletizadas já é uma realidade, como cita Gomes (2011). Porém, a aplicação de probióticos, encapsulados ou não, continua sendo um grande desafio para a incorporação em rações extrusadas para animais, como evidenciado neste trabalho. Os materiais encapsulantes estudados demonstraram não apresentar proteção física ao material encapsulado, devido à inviabilidade do probiótico após o processo de extrusão. Entretanto, os materiais de parede compostos por mucilagens comprovaram ser eficientes em desafios químicos, como na digestão *in vitro*, pois mantiveram a estrutura física íntegra até o final do procedimento.

5.4 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)

Através da MEV foi possível visualizar com clareza o envolvimento completo do microrganismo pela matriz, como demonstrado na Figura 20, na qual se observou um sistema de “colméias” que aprisionam a levedura no meio encapsulante. Nos exemplos da Figura 22, imagens com aumentos de 20.000, 10.000, 5.000 e 2.400 vezes, tornaram presumível a existência de uma proteção

física às células através dos materiais encapsulantes obtidos de gomas (alginato de sódio, goma arábica e iota-carragena) e mucilagens (linhaça, inhame, taro e inhame) juntamente com 4% de ágar-ágar, avaliados nesta pesquisa.

Figura 20 – Microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 3.000 (A) e 20.000 (B) vezes de leveduras encapsuladas em mucilagem de quiabo apresentando um sistema de “colméia”. (**Arte:** Ana Cristina Lopes).



Na tentativa de diferenciar as matrizes pela microscopia eletrônica, foram preparadas cápsulas com e sem o probiótico, em diferentes aumentos, demonstrados nas Figuras 23 e 24. Porém, não foi possível encontrar diferenças visíveis entre os materiais encapsulantes através das imagens.

Em todos os tratamentos foi possível observar a presença de poros de tamanhos distintos em toda a extensão das esferas, o que pode ter sido ocasionado pela produção de gás pelas leveduras durante o processo de encapsulação até o período de secagem, pois nas cápsulas produzidas sem a levedura (Figuras 23 e 24, coluna C) não foram encontrados orifícios. A grande quantidade de fissuras pode ter influenciado a liberação do microrganismo da cápsula, o que pode explicar a alta difusão de microrganismos para o meio externo logo no início da digestão *in vitro*, além da influencia do pH ácido. Segundo Santos et al. (2005) a presença de poros e fissuras pode comprometer a eficiência da microencapsulação como barreira, entretanto, este problema pode ser resolvido através da aplicação de uma segunda cobertura externa sobre a matriz. O ideal

seria obter paredes contínuas, uniformes, sem fissuras, rachaduras ou rompimentos, o que é fundamental para garantir uma menor permeabilidade a gases, maior proteção e retenção do recheio.

Outros fatores também podem influenciar no controle da taxa de liberação de um agente bioativo, como a expansão do volume de microcápsulas, devido à hidratação, assim como a permeabilidade da cápsula, da área de superfície em contato com o meio aquoso, e a concentração intracapsular do agente diluído dentro da cápsula, explica Correa (2003). Estas afirmações poderiam explicar parte dos fenômenos ocorridos durante os experimentos neste trabalho, pois o ágar-ágar absorve uma quantidade de água equivalente a 20 vezes o seu próprio peso (ADITIVOS e INGREDIENTES, 2008), além da relação material encapsulante e encapsulado de 1:2, respectivamente, o que pode ter comprometido o total aprisionamento das células, como observado na Figura 22 (J,K,L), facilitando a liberação da levedura para o meio externo.

Foi realizada uma média das medidas de diâmetro das leveduras (Figura 23) e foi obtido um valor de 3,8 μm , observado na Figura 21, o que também foi reportado por Ahimou et al. (2003).

Figura 21 – Medidas de diâmetro de células de *Saccharomyces cerevisiae* encapsulada obtidas por microscopia eletrônica de varredura (5.000 x).

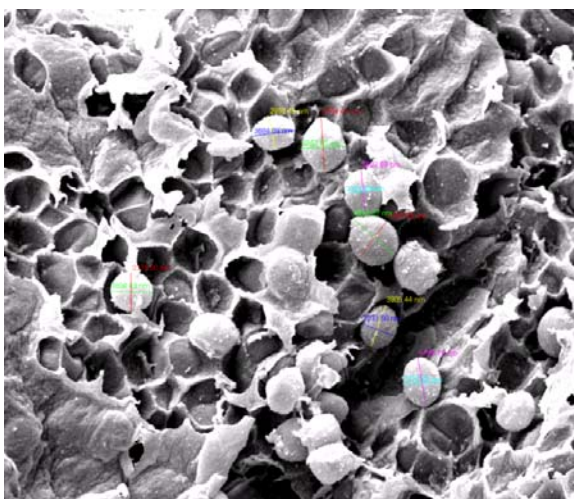


Figura 22 – Microscopia eletrônica de varredura com um aumento de 20.000 vezes (A,B,C), 10.000 vezes (D,E,F), 5.000 vezes (G,H,I) e 2.400 vezes (J,K,L). (**Arte:** Ana Cristina Lopes).

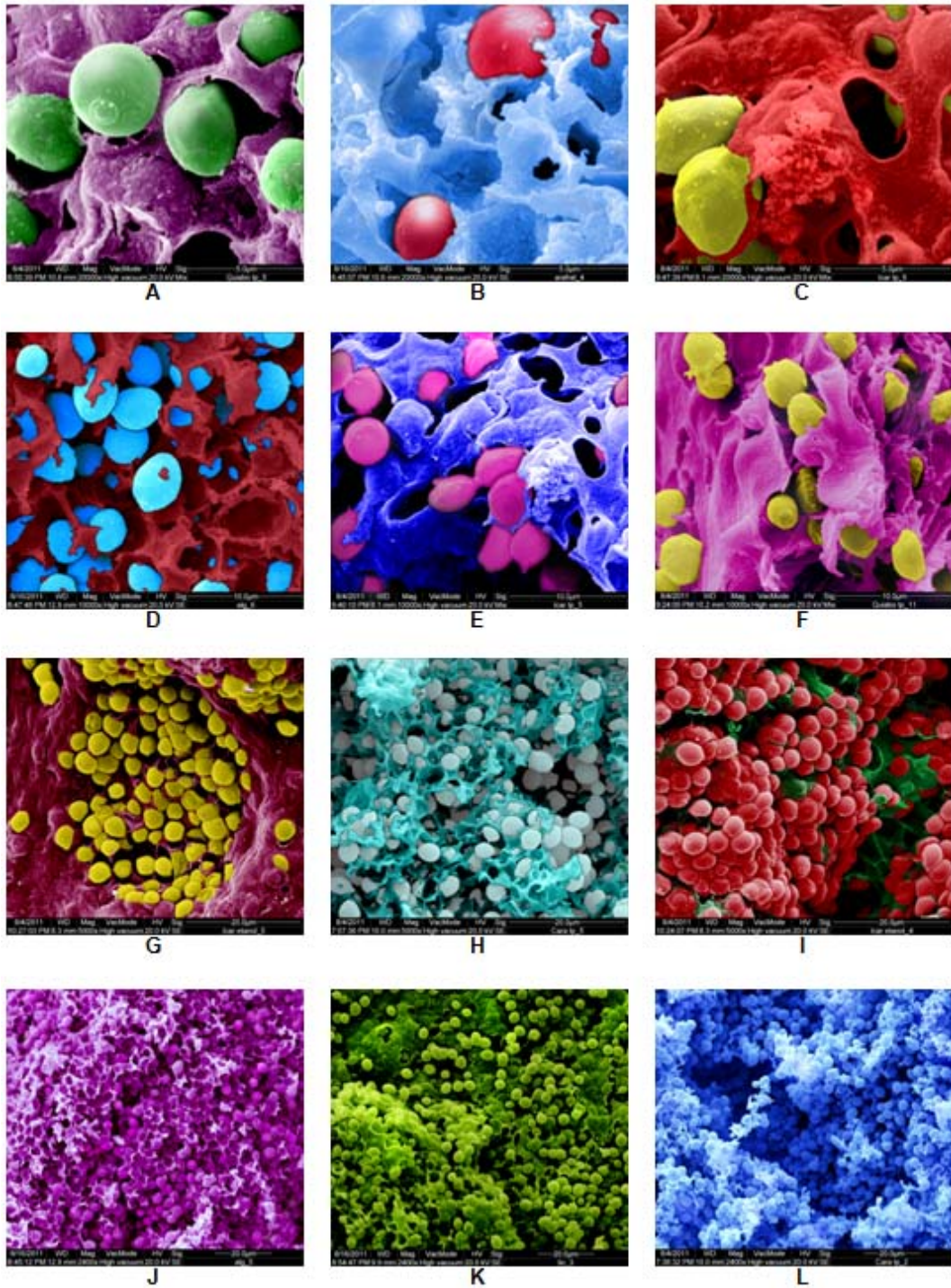


Figura 23 – Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos compostos por gomas A-A, ALG, ARA e I-CAR, sendo nas colunas A- aumento de 50 vezes com levedura, B- aumento de 600 vezes com levedura e C- aumento de 600 vezes sem levedura. (Arte: Ana Cristina Lopes).

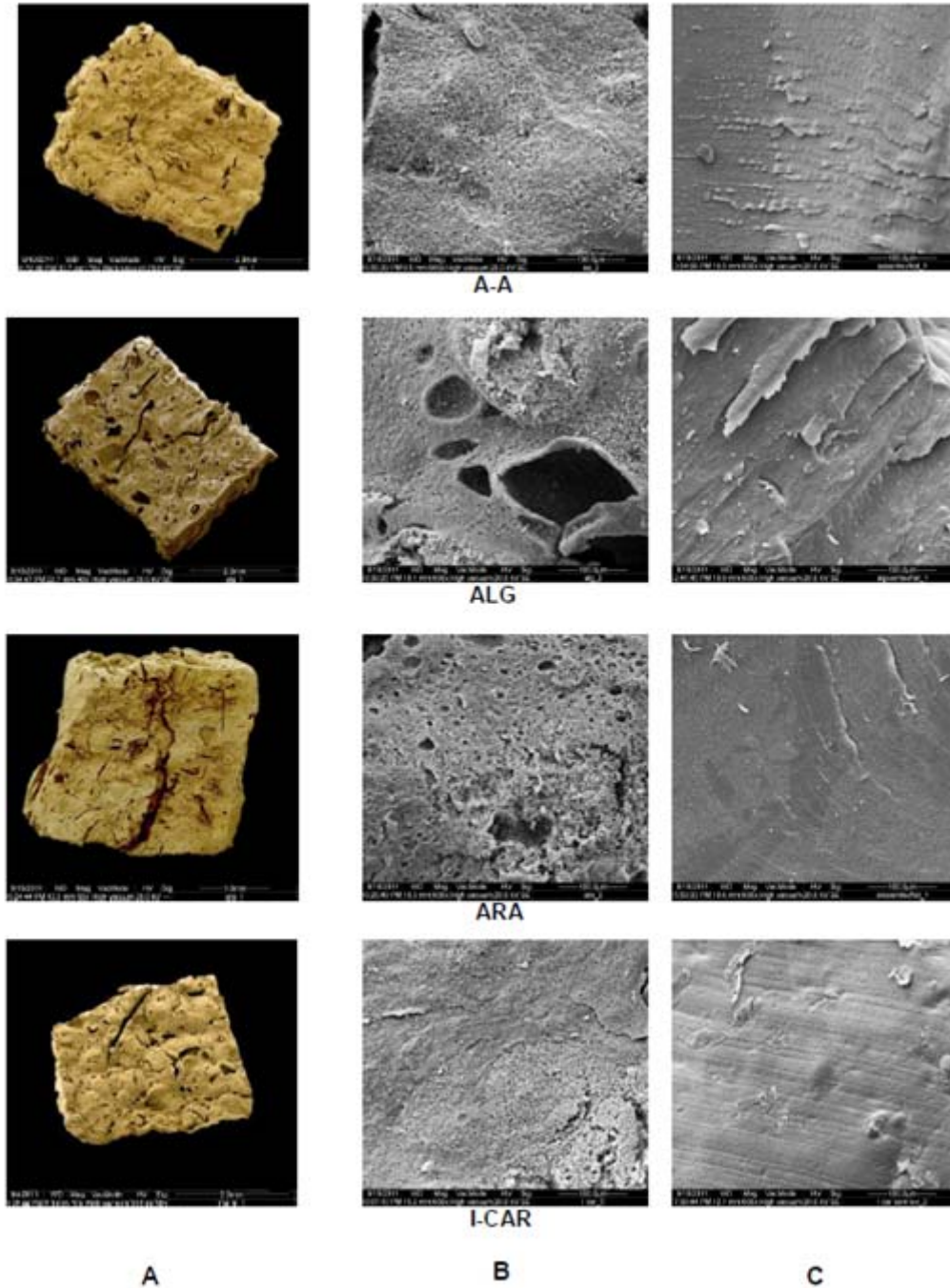
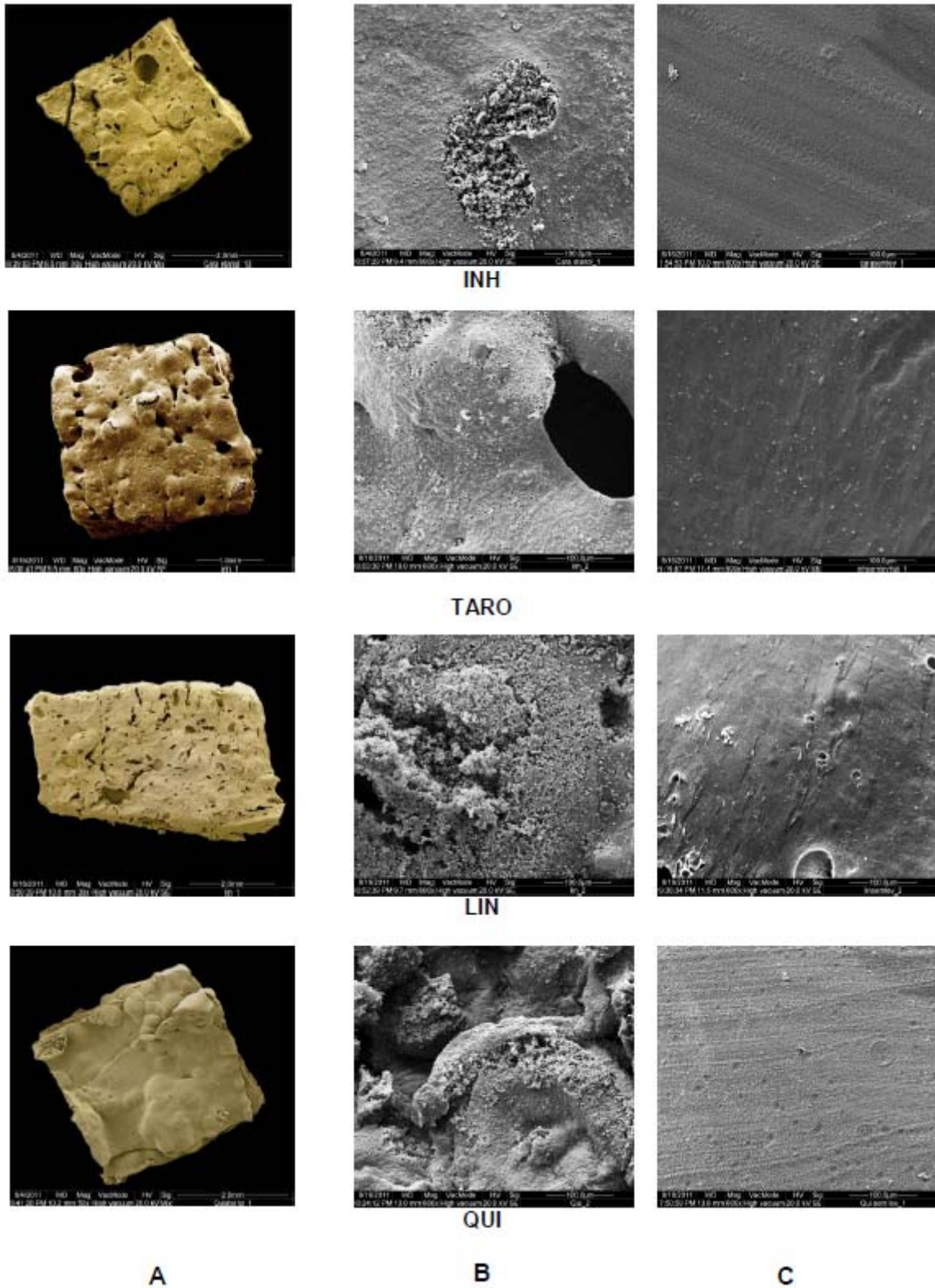


Figura 24 – Microscopia eletrônica de varredura dos tratamentos compostos por mucilagens INH, I-CAR, TARO, LIN e QUI, sendo nas colunas A-aumento de 50 vezes com levedura, B- aumento de 600 vezes com levedura e C-aumento de 600 vezes sem levedura. (**Arte: Ana Cristina Lopes**).



Através da microscopia eletrônica de varredura foi possível concluir que não existem diferenças visuais entre as microfotografias de todos os tratamentos, sejam compostos por gomas ou mucilagens. Porém, todos apresentaram uma proteção física, através do material encapsulante, conferida às leveduras. Outro fator importante foi a presença de poros e fissuras encontradas nas superfícies da esfera, que poderiam provocar uma difusão rápida das células para o meio externo, assim como a influencia da quantidade de agente encapsulante utilizado e o intumescimento da cápsula em meio aquoso.

6 CONCLUSÕES

a) Métodos de encapsulação:

- O método por solidificação ou imobilização em cubos de ágar-ágar empregado, foi o mais adequado para se obter esferas rígidas de levedura, além de ser uma técnica rápida;
- A base do material encapsulante, o ágar-ágar, apresentou a desvantagem de ser um produto de alto custo, além de apresentar alta absorção de água, o que favorece o inchamento das cápsulas.

b) Simulação gastrointestinal *in vitro*:

- A levedura, *Saccharomyces cerevisiae*, apresentou 94% de viabilidade após a digestão *in vitro*;
- De maneira geral, os materiais encapsulantes compostos por mucilagens apresentaram maior retenção do microrganismo no interior da esfera quando comparados aos tratamentos com gomas comerciais, além de promoverem proteção ao material encapsulado em desafios químicos, como na digestão *in vitro*, mantendo a sua estrutura física íntegra até o final do procedimento;
- Em ordem crescente de liberação, os tratamentos ficaram dispostos da seguinte maneira: QUI (66,97%) < LIN (72,96%) < ALG (77,43%) < INH (84,17%) < ARA (84,75%) < I-CAR (85,93%) < A-A (91,53%) < TARO (94,03%).

c) Viabilidade do probiótico encapsulado e não-encapsulado após o processo de extrusão:

- Os materiais encapsulantes estudados demonstraram não apresentar proteção física ao material encapsulado, devido à inviabilidade do probiótico após o processo de extrusão;
- A incorporação de probióticos, encapsulados ou não, em rações extrusadas para animais, continuam sendo um grande desafio.

d) Microscopia eletrônica:

- Não existiram diferenças visuais entre as microfotografias de todos os tratamentos, sejam compostos por gomas ou mucilagens;
- Todos os materiais encapsulantes proporcionaram proteção física à levedura;
- Todas as esferas obtidas apresentaram poros e fissuras, o que pode ter contribuído para a difusão rápida das células para o meio externo;
- A concentração de agente ativo utilizada, em relação ao material encapsulante, foi muito alta.

7 SUGESTÕES PARA TRABALHOS FUTUROS

- Estudar as mucilagens de quiabo e linhaça como materiais encapsulantes em outros métodos de microencapsulação, incorporando um agente ativo diferente;
- Aplicar coberturas de proteção nas microcápsulas para conferir menor difusão das células para o meio externo e, com isso, aprimorar estudos de liberação controlada e resistência térmica;
- Avaliar a viabilidade do material encapsulado nas diferentes cápsulas em processamentos térmicos mais brandos, como na peletização de rações.

REFERÊNCIAS

- ABREU LIMA, GUILHERME JULIO DE. **Uso de Polímero Natural do Quiabo como Auxiliar de Floculação e Filtração em Tratamento de Água e Esgoto**. 2007. Dissertação de Mestrado. Universidade do Estado do Rio de Janeiro UERJ.
- ADITIVOS E INGREDIENTES. Ágar ou ágar-ágar, o mais antigo ficocolóide. **Revista Aditivos e Ingredientes**. n.56 - maio/junho 2008 Disponível em: <www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/87.pdf>. Acesso em 21. Jul. 2011.
- ADITIVOS E INGREDIENTES. Carragenas: kappa, iota ,lambda , mu,nu e theta!. **Revista Aditivos e Ingredientes**. n.61 - março/abril 2009. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/materias/101.pdf>. Acesso em 22.jul.2011.
- ADITIVOS E INGREDIENTES. A goma acácia: by colloïdes naturels. **Revista Aditivos e Ingredientes**. n.79 - Junho 2011. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/aditivos_e_ingredientes/edicoes_materias.php?id_edicao=61>. Acesso em 20.ago. 2011.
- ADHIKARI, K., MUSTAPHA, A., GRU" N, I. U., & FERNANDO, L. (2000). Viability of microencapsulated bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, 83, 1946–1951.
- AINSLEY REID, A. et al. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca²⁺-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. **Journal of Microencapsulation**. v. 22. p. 603-619. 2005.
- AGARGEL. **Propriedades**. 2003. Disponível em: <<http://www.agargel.com.br/carragena-tec.html>>. Acesso em: 19.ago.2011.
- AHIMOU, F., A. TOUHAMI, D Y. F. Dufrene. Real-time imaging of the surface topography of living yeast cells by atomic force microscopy. **Yeast** **20**: p. 25–30. 2003.
- ALVES-FILHO, J.R.; GARCIA, S. Resistência de L. casei probiótico encapsulados com alginato, revestidos ou não com quitosana em condições gastrointestinais simuladas. In: ENCONTRO ANUAL DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA, 17., 2008, Foz do Iguaçu. **Anais...** Foz do Iguaçu: EAIC, 2008.
- ANDERSON, E.; LOWE, H.J. The composition of flaxseed mucilage. **J Biol Chem**. 168: p.289–297. 1997.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends Food Sci Technol**, 2007; 18: p. 240-251.

ANNAN, N.T., BORZA A.D.; TRUDELSTRUP, L.H. "Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions" **Food research international**. ISSN 0963-9969, v. 41, n.2. p. 184-193. 2008.

ANVISA (2004). Alimentos - **Comissões tecnocientíficas de assessoramento em alimentos funcionais e novos alimentos**. ANVISA. Disponível em: <<http://www.anvisa.gov.br>>. Acessado em 20/jun/2011.

ANVISA (2005). **Alimentos com alegações de propriedades funcionais e ou de saúde, novos alimentos/ingredientes, substâncias bioativas e probióticos**. ANVISA. Acessado em: 20 jun. 2011. OMS. Health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria. 2001.

AZEREDO, H. M. C. Encapsulação: Aplicação à tecnologia de alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara, 2005, v. 16, n.1, p. 89-97.

BABU, G., NITHYALAKSHMI, V. Influence of prebiotic composition on probiotic survivability in calcium alginate coated symbiotic microcapsules at thermal incubation. **Agricultural Journal**. v.6, n.5. p. 231-236. 2011.

BEHERA, S.; KAR, S.; MOHANTY, R.C. et al. Comparative study of bio-ethanol production from mahula (*Madhuca latifolia* L.) flowers by *Saccharomyces cerevisiae* cells immobilized in agar agar and Ca-alginate matrices. **Applied Energy**. v. 87. p. 96-100. 2010.

BELLAVER. C. Processamento da soja e suas implicações na alimentação de suínos e aves. In: Congresso Brasileiro de Soja, 1999, Londrina. **Anais...** Londrina: Embrapa Soja, 1999. p.183-199.

BERTIPAGLIA; ABAKER, L. M. et al . Alterações bromatológicas em soja e milho processados por extrusão. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, v.37. n.11. Novembro, 2008. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-35982008001100016&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 25.ago.2011.

BIOURGE, V.; VALLET, C.; LEVESQUE, A.; SERGHERAET, R.; CHEVALIER, S.; ROBERTON, J.L. The use of probiotics in the diet of dogs. **J. Nutrition**, Vannes, v.128, n.12, p. 2730-2732, 1998.

BOSCARIOLI, M. P. M. **Influência de prebióticos na encapsulação de bactérias probióticas adicionadas em sorvete**. – São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM, 2010 p. 73 Dissertação de Mestrado – Programa de Pós-Graduação. Análise e Otimização de Processos Industriais e Embalagem – Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia. São Caetano do Sul, SP, 2010.

BRITO, C.O. et al . Adição de complexo multienzimático em dietas à base de soja extrusada e desempenho de pintos de corte. **Rev. Bras. Zootec.** Viçosa, v.35. n.2. Abril 2006. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S151635982006000200017&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 26 ago. 2011.

BRUMANO, G.; GATTÁS, G.. Soja integral extrusada na alimentação de aves e suínos. **Nutritime**. v.2, n.14. Viçosa - MG, 2004. Disponível em: <http://www.nutritime.com.br/arquivos_internos/artigos/014V1N3P134_146_NOV2004.pdf>. Acesso em: 26 ago. 2011.

BUZZI, V. **Microesferas de polissacarídeos por redes poliméricas interpenetrantes (rpi) para o estudo e modulação do perfil de liberação do piroxicam**. 2009. p. 62. Dissertação de Mestrado. Engenharia de Processos na Universidade da Região de Joinville.

CAFÉ, M.B et al . Determinação do Valor Nutricional das Sojas Integrais Processadas para Aves. **Rev. Bras. Cienc. Avic.** Campinas. v.2, n.1, abril 2000. Disponível em: <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516635X2000000100010&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 26 ago. 2011.

CHANG HN, SEONG GH, YOO IK, PARK JK, SEO JH. Microencapsulation of recombinant *Saccharomyces cerevisiae* cells with invertase activity in liquid-core alginate capsules. **Biotechnol Bioeng**. 1996, p. 51–62.

CHEN, H.H.; XU, S.; WANG, Z. Gelation properties of flaxseed gum. **Journal of Food Engineering**. 77. p. 295–303. 2006.

CHEESON, A. Probiotics and other intestinal mediators. In: COLE, D.J.A.; WISEMAN, J.; VARLEY, M.A. (Ed.). **Principles of pig science**. Nottingham, University Press of Nottingham, 1994. Cap. 13. p. 197-214.

COOK, M. T.; TZORTZIS, G.; CHARALAMPOPOULOS, D. et al. Production and Evaluation of Dry Alginate-Chitosan Microcapsules as an Enteric Delivery Vehicle for Probiotic Bacteria. **Biomacromolecules**. v.12. p. 2834–2840. 2011.

CORREA, R. M. **Preparo e caracterização de microcápsulas obtidas por polimerização iônica para alimentação de larvas de peixe**. Dissertação. Campinas, SP: [s.n.]. 2003.

COSKUNER, Y.; KARABABA, E. Some physical properties of flaxseed (*Linum usitatissimum* L.). **J. Food Eng.**, v.78, n.3, p. 1067-1073, 2007.

COSTA, F., OLIVEIRA, F., SILVA, J., et al. Desempenho de pintos de corte alimentados com rações contendo soja integral extrusada em diferentes temperaturas, durante as fases pré-inicial e inicial. **Ciência Animal Brasileira**, 2006. Disponível em: <<http://www.revistas.ufg.br/index.php/vet/article/view/392>>. Acesso em: 22 set. 2011.

COSMÉTICOS & PERFUMES. Encapsulação. **Revista Cosméticos e Perfumes**. v. 6, n. 38. 2005. Disponível em: <http://www.insumos.com.br/cosmeticoseperfumes/pdf/encapsulamento_n%2038.pdf>. Acesso em: 17 ago. 2011.

COSTA, L.F. Leveduras na nutrição animal. **Revista Eletrônica Nutritime**, v.1, n.1, p.1-6, 2004.

CUNHA, F. O. V. **Desenvolvimento de redes de polímeros interpenetrantes (IPN) para aplicação como eletrólito polimérico**. Tese (Doutorado em Engenharia) – Escola de Engenharia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre. 2005.

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

DESAI, K. G. H., AND PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**. v.23, n.7, 1361-1394. 2005.

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

DING, W.K. .; SHAH N.P. Effect of Various Encapsulating Materials on the Stability of Probiotic Bacteria. **J. Food Sci**. v.74. p. M100-M107. 2009.

DINAKAR, P., & MISTRY, V. V. Growth and viability of *Bifidobacterium bifidum* in cheddar cheese. **Journal of Dairy Science**, 77, p. 2854–2864. 1994.

EMEJE, M.O.; ISIMI, C.Y.; KUNLE O.O. Evaluation of Okra gum as a dry binder in Paracetamol tablet formulations. **Continental J Pharm Science**. v.3. p. 15–22. 2007.

FARIA, H. G. Considerações sobre dietas experimentais para animais de laboratório: formulações, aplicações, fornecimento e efeitos experimentais. **Simpósio de Bioterismo da FIOCRUZ-PE**. 2010.

FÁVARO-TRINDADE et al. Microencapsulação de produtos alimentícios. **Braz. J. Food Technol**. v.11. n.2. p. 103-112. abr./jun. 2008.

FEED & FOOD. Microencapsulação de microorganismos probióticos. **Revista Feed & Food**. n.52. p. 82-84. agosto,2011. Disponível em: <<http://www.mflip.com.br/pub/curuca/>>. Acesso em: ago. 2011.

FERNANDES, P.C.C.; SILVA, A.V.; RODRIGUEZ, N.M.; FERREIRA, C.L.L.F. **Viabilidade do uso de probióticos na alimentação de cães**. s.d. Disponível em: <<http://www.vetnil.com.br/adm/trabalhos/viabilidade.pdf>>. Acesso em: 20 nov. 2011.

FLEMMING, J.S. **Utilização de leveduras, probióticos e mananoligosacarrídeos (MOS) na alimentação de frangos de corte**. Tese de Doutorado. Universidade Federal do Paraná. Curitiba. 2005, 109 p.

FONSECA, E.W. **Nascimento da Utilização da mucilagem de inhame (*Dioscorea spp*) como melhorador na produção de pão de forma**. p. 79. Lavras : UFLA, 2006.

FONSECA, A.C.S.; SREBERNICH, S. M. Avaliação sensorial de barras de cereais diet utilizando como agente ligante goma acácia. In: ENCONTRO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA PUC, 15., 2010, Campinas. **Anais...** Campinas, 2010.

FRANCO, S. G.; PEDROSO, A. C.; GRIGOLETTI, C. et al. Efeitos da inclusão de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) associados ou não a antibióticos na alimentação de frangos de corte. **Ciência Animal Brasileira**, v.6, n.2, p. 79-85, 2005.

FULLER R. Probiotics in man and animals. **Journal Applied Bacteriology** 1989; v.66, p. 55-61.

FURLAN, R. L.; MACARI, M.; LUQUETTI, B. C. Como avaliar os efeitos do uso de prebióticos, probióticos e flora de exclusão competitiva. In: **Simpósio Técnico de Incubação, Matrizes de Corte e Nutrição. 5., 2004, Balneário Camboriú. Anais eletrônicos... Balneário Camboriú: ACAV, 2004. p. 06-28.**

GEORGE, M.; ABRAHAM, T.E. Polyionic hydrocolloids for the intestinal delivery of protein drugs:Alginate and chitosan — a review. **J Control Release**. 2006. v.114, p.1-14.

GIL de los SANTOS, J. R.; GIL-TURNES, C. G. Probióticos em avicultura. **Cienc. Rural**, Santa Maria, v.35, n.3, June 2005. Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S010384782005000300042&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 19 oct. 2011.

GILLILAND, S.E. Acidophilus milk products. A review of potential benefits to consumers. **J. Dairy Sci. Savoy**, v.72, p. 2483-2494, 1989.

GLICKSMAN, M. Gum Technology in Food industry. **Academic Press**, USA. p. 11–16. 1969.

GLORIA, B. A.; GUERREIRO, S. M. C. **Anatomia Vegetal**. Viçosa: UFV, 2003. p. 438.

GOMES, M. A. B. **Aditivos Probióticos, Prebióticos e Simbióticos na Alimentação Animal**. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/58133451/Aditivos-probioticos-prebioticos-e-simbioticos-na-alimentacao-animal>>. Acesso em 25.ago.2011.

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

GRANGEIRO, M.G.A.; FUENTES, M.F.F.; FREITAS, E.R.; et al. Inclusão da levedura de cana-de-açúcar (*Saccharomyces cerevisiae*) em dietas para frangos de corte. **Revista da Sociedade Brasileira de Zootecnia**. v.30, n.3, p. 766-73, 2001.

GRIGOLETTI, C.; FRANCO, S. G.; FLEMMING, J. S.; BACILA, M. *Saccharomyces cerevisiae* na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, Curitiba, v.7, n.2, p. 151-157, 2002.

GUILLOU S, BESNARD V, EL MURR N, FEDERIGHI M. Viability of *Saccharomyces cerevisiae* cells exposed to low-amperage electrolysis as assessed by staining procedure and ATP content. **Int J Food Microbiol**. 2003, v.88, n.1, p. 85-89.

HIROSE, K.; ENDO, K.; HASEGAWA, K. A convenient synthesis of lepidimoide from okra mucilage and its growth-promoting activity in hypocotyls. **Carbohydrate polymers**, p. 9–19. 2004.

HOLLISTER, A. G.; CORRIER, D. E.; NISBET, D. J.; et al. Effect of Cecal Cultures Encapsulated in Alginate Beads or Lyophilized in Skim Milk and Dietary Lactose on Salmonella Colonization in Broiler Chicks. **Poult Sci**, 1994. 73: p 99-105

IBGE - **Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo agropecuário 2006:** Brasil, Grandes Regiões e Unidades da Federação. ISSN 0103-6157. Censo agropec, Rio de Janeiro, p.1-777, 2006. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br/home/estatistica/economia/agropecuaria/censoagro/brasil_2006/Brasil_censoagro2006.pdf>. Acesso em: 27.jul. 2011.

ISLAM, A.M.; PHILLIPS, G.O.; SLJIVO, M.J. 1997. A review of recent developments on the regulatory, structural and functional aspects of gum arabic. **Food Hydrocoll.** 11, p. 493–505.

IWAKI, Y. O. **Eletrólitos sólidos poliméricos a base de alginato de sódio.** Dissertação (Mestrado em Ciência e Engenharia de Materiais) – Universidade de São Paulo, São Carlos. 91 f. 2010.

JAMAI., L, SENDIDE, K., ETTAYEBI, K., ERRACHIDI, F., HAMDOUNI-ALAMI, O., TAHRI-JOUTI, MA., MCDERMOTT, T., ETTAYEBI, M. Physiological difference during ethanol fermentation between calcium alginate-immobilized *Candida tropicalis* and *Saccharomyces cerevisiae*. **FEMS Microbiol Lett.** v.2, n.9, p. 204-375, 2001.

JUSTEN, A.P.; FRANCO, M.L.R.S.; MONTEIRO, A.R.G.;MIKCHA, J.M.G.; GASPARINO, E. DELBEM, A.B. Inclusión de harina de pescado en snacks. **Revista Infopesca Internacional.** n.47. Jul. set. 2011. p. 35-39. Disponível em: <<http://lista.rds.org.hn/pipermail/tilapia/attachments/20111017/74b94112/attachment-0001.pdf>>. Acesso em: 19. nov. 2011.

KANAYAMA, J.S.; PEZZATO, A.C.; SARTORI, J.R.; DUCATTI, C. FASCINA, V.B.; ZEFERINO, C.P.; SILOTO, E.V. **Deteção da levedura de cana-de-açúcar utilizada na alimentação de frangos de corte através da técnica dos isótopos estáveis.** Águar de Lindóia – SP. Zootec. 2009.

KAZARJAN, A. Development and production of extruded food and feed products compromising probiotic micro-organism. Tallinn University of Technology. *Thesis.* Faculty of Science-Department of applied chemistry and biotechnology. 2011.

KILL, J.L., MARTINS, M.G., COLNAGO, G.L., HAESE, D., BUNSEN, S., BELISÁRIO, J.A., CARVALHO, M.A.G. Levedura de álcool de cana de açúcar na alimentação de frangos de corte de 1 a 21 dias de idade. In: ZOOTEC, 2005, Campo Grande. **Anais...** Campo Grande, 2005.

KISS M.A.; VENYIGE T, STEFANOVITS-BANYAI E. Extractive fermentation of ethanol using alginate gel co-entrapped yeast cells (*Sacchoromyces bayanus*) and lipase enzyme. **Eng. Life Sci.** 2004. 4. n.5, p. 460 – 464.

KOYAMA, K.; SEKI, M. Cultivation of yeast and plant cells entrapped in the low-viscous liquid-core of an alginate membrane capsule prepared using polyethylene glycol. **J Biosci Bioeng.**, v.97, n.2, p. 111-8. 2004.

KRASAEKOOPT, W., BHANDARI, B., & DEETH, H. 2003. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, n.13, p. 3–13.

KRASAEKOOPT W, BHANDARI B, DEETH HC. 2006. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads in yoghurt from UHT- and conventionally treated milk during storage. **Food Sci Technol – Leb**, v.39, n.177, p. 83

KUHN, K. R. **Gelificação a frio de proteínas do soro e fibras de linhaça através da adição de sais de cálcio ou sódio**. USP. 2009. Disponível em: <http://www.fea.unicamp.br/alimentarium/ver_documento.php?did=738&pid=3&p=38&order=titulo>. Acesso em: 21 .jul. 2011.

KUMAR, R.; PATIL, M.B.; PATIL, S.R. et al. Evaluation of disintegrating properties of *Abelmoschus esculentus* mucilage. **Int J Pharm Tech Res**, v.1, n.241, p. 6. 2009.

LANDIM, E.M.C. **Obtenção, caracterização e avaliação da estabilidade de pigmentos naturais microencapsulados**. Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza. 80 f. 2008.

LEE, K.; HEO, T. Survival of Bifidobacterium longum immobilized in calcium alginate beads in simulated gastric juices and bile salt solution. **Applied and Environmental Microbiology**, v.66, n.2, p. 869–873. 2000.

LEE., K.H.; CHOI, I. S.; GYU KIM, Y. et al. Enhanced production of bioethanol and ultrastructural characteristics of reused *Saccharomyces cerevisiae* immobilized calcium alginate beads. **Bioresource Technology**. 2011.

LIKIMANI, T.A. & SOFOS, J.N. Bacterial spore injury during extrusion cooking of corn/soybean mixtures. **Intern. J. Food Microbiol.**, v.11, p. 243-250, 1990.

LIMA, A.M.F. **Estudo de propriedades físico-químicas de alginato de Sódio, pectina e blendas em solução e no estado sólido com aplicação em sistema de liberação de fármacos**. 2006. p. 182. Tese (Doutorado em Química) – Departamento de Química, Universidade Federal de Santa Catarina. 2006.

LIMA¹, G. J. A. **Uso de Polímero natural do quiabo como auxiliary de floculação e filtração em tratamento de água e esgoto**. 2007. p. 113. 29,7 cm. Dissertação – Universidade do Estado do Rio de Janeiro – UERJ.

LIMA², M. F. **Efeitos da temperatura de expansão e da peletização no valor energético de rações para frangos de corte**. Universidade Estadual do Norte Fluminense Darcy Ribeiro, maio 2007.

LIN, H.; HUANG, A. S. Chemical composition and some physical properties of a water-soluble gum in taro. **Food Chemistry**, v.40. p. 403-409, 1993.

LISERRE, A.M.; et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in Modified Alginate-chitosan Beads and Evaluation of Survival in Simulated Gastrointestinal Conditions. **Food Biotechnology**, 2007, v.21, p.1–16.

LODDI, M. M.; GONZÁLES, E.; TAKITA, T. S.; et al. Uso de probiótico e antibiótico sobre o desempenho, o rendimento e a qualidade de carcaça de frangos de corte. **Revista Brasileira de Zootecnia**. v.29. n.4. p. 1124-1131. 2000.

LUSTOSA, B. H.; LEONEL, M.; MISHCHAN, M. M.; FILHO, J.D. Efeito das condições de extrusão sobre a cor de produtos expandidos de farinha de mandioca. In: CONGRESSO BRASILEIRO DA MANDIOCA – MANDIOCA BIOENERGIA, ALIMENTOS E RENDA, 12., 2007, Paranaíba. **Anais...** Paranaíba, 2007.

MACHADO, D.A.V. et al. Levedura (*Saccharomyces cerevisiae*) *Spray-Dry*, autolizada e parede celular de levedura na alimentação de frangos de corte. **Vet. e Zootec**. 2010. dez.; v.17, n.4, p. 541-551.

MADENE, A.; MURIEL, J.; SCHER, J.; DESOBRY, S. Flavour encapsulation and controlled release – a review. **International Journal of Food Science and Technology**, Oxford, v.41, n.1, p. 1-21, 2006.

MADRIGAL, A. G. M.,. **Determinación de la Viabilidad de Bifidobacterium Bifidum Inmovilizado**, Tratado Bajo Condiciones Gastrointestinales Humanas Simuladas in Vitro. Instituto Politécnico Nacional. México, julho de 2009. Disponível em:
<http://www.biotechnologia.upibi.ipn.mx/recursos/posgrado/Tesis/mc_amendoza.pdf>. Acesso em: ago. 2011.

MAIORKA, A. et al . Utilização de Prebióticos, Probióticos ou Simbióticos em Dietas para Frangos. **Rev. Bras. Cienc. Avic.**, Campinas, v.3, n.1, janeiro, 2001. Disponível em
<http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516635X2001000100008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em 26 ago.2011.

MAITROT, H., PAQUIN, C., LACROIX, C., & CHAMPAGNE, C. P. Production of concentrated freeze-dried cultures of *Bifidobacterium longum* in k-carrageenan-locust bean gum gel. **Biotechnology Techniques**. v.11, p. 527–531. 1997.

MALUTA, R. ; SANTANA, A.M. ; ÁVILA, F.A.; MAIORKA, A.; RIGOBELLO, E. C. Avaliação da capacidade de imunoestimulante de probiótico termo resistentes e de sua estabilidade em rações extrusada e farelada usadas na dieta de cães. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE MEDICINA VETERINÁRIA, 34., 2007, Santos. **Anais...** Santos, 2007.

MANDAL S., PUNIYA, A.K. & SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated *Lactobacillus casei* NCDC-298. **International Dairy Journal** 16. p. 1190-1195. 2006.

MANOLOV, R.F.; KAMBOUROVA, M.S.; EMANUILOVA, E.I. Immobilization of *Bacillus stearothermophilus* Cells by Entrapment in Various Matrices. **Process Biochemistry**, v.30, n.2, p. 141-144. 1995.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G., FONDÉN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **Int. Dairy J.**, Amsterdam, v.12, p.173-182, 2002.

MATSUBARA, S. T.; NÓBREGA, L. O.; GARCIA, S. CASTRO-GOMEZ, R. J. H. Crescimento e Microencapsulação de *Bifidobacterium lactis Bb12*. Probiótico em soro de leite contendo inulina e goma acácia. In: REUNIÃO ANUAL DA SBPC, 58., 2011, Florianópolis. **Anais...** Florianópolis, 2011. Disponível em: <http://www.sbpnet.org.br/livro/58ra/JNIC/RESUMOS/resumo_2419.html>. Acesso em: 22 ago. 2011.

DEPIERI, R. A.; PANIZZI, A. R. Efeitos do envelhecimento e tipo de alimento no desgaste da dentição mandibular, área do canal alimentar e salivar em pentatomídeos fitófagos, e danos em sementes de soja. In: CONGRESSO BRASILEIRO DE ENTOMOLOGIA, 23., 2010, Natal. **Anais...** Natal: EMPARN, 2010. CD-ROOM.

MAYO, S. A. **Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central.** Manaus, INPA, p. 672-687, 1999.

MEURER, Regis Fernando Pastorelo. **Avaliação de diferentes formas físicas de rações para frangos de corte.** Curitiba, 2009. 50 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias). Setor de Ciências Agrárias, Universidade Federal do Paraná.

MILAGRE H. M. S.; MILAGRE C. D. F.; MORAN P. J. S. et al. Reduction of ethyl benzoylformate mediated by *Saccharomyces cerevisiae* entrapped in alginate fibers with double gel layers in a continuously operated reactor. **Enzyme and Microbial Technology**. v.37, n.1, p.121-125. 2005.

MISHRA, S. P. Polyacrylonitrile-grafted Okra mucilage: a renewable reservoir to polymeric materials. **Carbohydr. Polym.** v.68. p. 95–100. 2007.

MOKARRAM, R. R.; MORTAZAVI, S. A.; HABIBI N. F.S. The influence of multi stage alginate coating on survivability of potential probiotic bacteria in simulated gastric and intestinal juice. **Food Res.** 2009, p. 1040–1045.

MONEGO, M. A. **Goma da linhaça (*Linum usitatissimum* L.) para uso como hidrocolóide na indústria alimentícia.** 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Centro de Ciências Rurais Programa de Pós Graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal de Santa Maria, Rio Grande do Sul.

NAGANO, F.H.; FERNANDES, E.A.; SILVEIRA, M.M.; et al. Efeito da peletização e extrusão da ração pré-inical sobre o desempenho final de frangos de corte. **Revista Brasileira de Ciência Avícola.** Campinas, v.5, p.35. 2003.

NASCIMENTO, R.L.; et al. Sistemas de Liberação Controlada de Crotoxina a Partir de Matriz Polimérica: uma Alternativa para o Tratamento de Câncer. **Revista Ciências em Saúde.** v.1, n.2, jun 2011.

NICODEMO, M. L. F. **Uso de aditivos na dieta de bovinos de corte**. Campo Grande: Embrapa Gado de Corte, 2001. p. 54. -- (Documentos / Embrapa Gado de Corte, ISSN 1517- 3747106).

OGAJI, I.; NNOLI, O. Film coating potential of okra gum using paracetamol tablets as a model drug. **Asian J Pharm.** v.4, n.4. 2010.

OKOJIE, V.U.; OSUIDE, M.O.; AIGBOKHIAN. A. A Study of Some Physico-chemical Characteristics of Cashew Tree Exudate Anacardium Occidentale. **Adv. Nat. & Appl. Sci. Res.** v.8. p 259-263. 2010.

OKOYE, E. I.; ONYEKWELY, A.O.; KUNLE, O. O. et al. Okra gum- an economic choice for the amelioration of capping and lamination in tablets. **Annals of Biological Research.** v.2, n.2, p. 30-42, 2011.

OLIVEIRA, et al. Desempenho de Frangos de Corte nas Fases de Crescimento e Final Alimentados com Rações Contendo Soja Integral Extrusada em Diferentes Temperaturas. **R. Bras. Zootec.**, v.34, n.6, p.1950-1955, 2005.

OLIVEIRA, L. B. **Efeito de goma acácia e inulina na viabilidade de bactérias probióticas e nas características físico-químicas de leite fermentado simbiótico**. São Caetano do Sul, SP: CEUN-EEM. 2008. p. 104. Dissertação (mestrado) Escola de Engenharia Mauá do Centro Universitário do Instituto Mauá de Tecnologia, São Caetano do Sul, SP. 2008

OLIVEIRA, A. A. **Avaliação de diferentes formas físicas da ração para alimentação de frangos de corte**. Dissertação (mestrado) Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-Graduação em Zootecnia. f. 58. 2009.

OMS. **Food and agriculture organization of the United Nations**. WHO-World Health Organizazation. Evaluation of health and nutricional porperties of probiotics in food including powder milk with live lactic and bactéria. Córdoba, 2001.

ORTIZ, Á.; REUTO, J.; FAJARDO, E. et al. **Evaluación de la capacidad probiótica "in vitro" de una cepa nativa de Saccharomyces cerevisiae**. Universitas Scientiarum [en línea] 2008, v.13 [citado 2011-09-20]. Disponível em : <<http://redalyc.uaemex.mx/src/inicio/ArtPdfRed.jsp?iCve=49913205>>.

PEDRALLI, G.; CARMO, C.A.S.; CEREDA, M.; et al. **Uso de nomes populares para as espécies de Araceae e Dioscoreaceae no Brasil**. Horticultura Brasileira, Brasília, v.20, n.4, p. 530-532, dezembro 2002.

PELICANO, E.R.L.; SOUZA, P.A.; SOUZA, H.B.A. Prebióticos e probióticos na nutrição de aves. **Ciências Agrárias e da Saúde**. 2002, v.2, n.1, p. 59-64.

PENNACCHIA et al., "Isolation of Saccharomyces cerevisiae Strains from Different Food Matrices and their Preliminary Selection for a Potential Use as Probiotics," **J. Appl. Microbiol.** v.105, n.6, p. 1919–1928, 2008.

PIMENTEL, L. F; JACOME, J. A. T.; MOSQUEIRA, V. C. F. S. Nanotecnologia farmacêutica aplicada ao tratamento da malária. **Rev. Bras. Cienc. Farm.** 2007, v.43, n.4, p. 503-514.

QI, W.; YU, W.; XIE, YI. Optimization of *Saccharomyces cerevisiae* culture in alginate-chitosan-alginate microcapsule. **Biochemical Engineering Journal**, n.25, p. 151-157. 2005.

RAJKOWSKA, K.; KUNICKA-STYCZYNSKA, A. Probiotic properties of yeasts isolated from chicken feces and kefir. **Pol J Microbiol**. 2010. v.59, n.4, p. 63.

RAPACCI, M.; RAMOS, V.A. Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado com diferentes materiais de encapsulamento para adição em granolas comerciais. Resumo. In: SEMINÁRIO DA INICIAÇÃO CIENTÍFICA E IX MOSTRA DE PESQUISA DA PUCPR, 15., **Anais...** Disponível em: <<http://www2.pucpr.br/reol/index.php/PIBIC2007?dd1=1206&dd99=view>>. Acesso em: 22 ago. 2011.

REIS, R. C.; ASCHERI, D. P. R.; DEVILLA, I. A. Propriedades físicas do tubérculo e propriedades químicas e funcionais do amido de inhame (*Dioscorea* sp.) CULTIVAR SÃO BENTO. **Revista de Agrotecnologia**. v.1. n.1 (Out. 2010).

RE, M. I. Microencapsulação em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v.27, n. 162, p. 25-29, jul. 2000.

RIBEIRO, R., FLEMMING, J.; BACILA, A.. Uso de leveduras (*saccharomyces cerevisiae*), parede celular de leveduras (scw), ácidos orgânicos e avilamicina na alimentação de frangos de corte. **Archives of Veterinary Science**, América do Norte, 13, jun. 2009. Disponível em: <<http://ojs.c3sl.ufpr.br/ojs2/index.php/veterinary/article/view/13140/9810>>. Acesso em: 18 jun. 2011.

RUBIO, M. A. et al . *Identificación preliminar in vitro de propiedades probióticas en cepas de S cerevisiae*. **Rev. MVZ Cordoba**, Córdoba, v.13, n.1, jan. 2008 . Disponível em: <http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S01220268200800010007&lng=pt&nrm=iso>. Acessos em: 20 set. 2011.

SAFARIK, I., SABATKOVA, Z., & SAFARIKOVA, M. Invert sugar formation with *Saccharomyces cerevisiae* cells encapsulated in magnetically responsive alginate microparticles. **Journal of Magnetism and Magnetic Materials**. 2009.

SANTOS, E. S. **Inhame (*Dioscorea* spp.)**: aspectos básicos da cultura. João Pessoa: EMEPA-PB, 1996. p. 158.

SANTOS, E.S. dos. Esclarecimentos sobre as denominações dos gêneros *Dioscorea* e *Colocasia*. In: SIMPÓSIO NACIONAL SOBRE AS CULTURAS DO INHAME E DO TARO, 1., 2002. João Pessoa, PB. **Anais ...** João Pessoa: Emepa, 2002. v.1., 312 p. p.303-305.

SANTOS, A. B.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Preparo e caracterização de microcápsulas de oleoresina de páprica obtidas por atomização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, Campinas, v.25, n.2, p. 322-326. 2005.

SANTOS, E.S., CEREDA, M.P., PEDRALLI G. E PUIATTI, M. Denominações populares das espécies de Dioscorea e Colocasia no Brasil. **Tecnol. & Ciên. Agropec.** João Pessoa, v.1, n.1, p.37-41, set. 2007.

SANTOS, F. P.; BRUNIERA, L. B.; GARCIA, C. E. R. Carragena: uma visão ambiental. **Terra e cultura.** n.47, Ano 24, ago./dez. 2008. Disponível em: <http://www.unifil.br/portal/arquivos/publicacoes/Revista_47_completa.pdf>. Acesso em: 19 ago. 2011.

SANTIN, E., A. MAIORKA, M. MACARI, M. et al. Performance and intestinal mucosa development of broiler chickens fed diet containing *Saccharomyces cerevisiae* cell wall. **J. Applied Poult. Res.** v.10, p. 236-244. 2001.

SARAIVA, Z. F. **Composição dos alimentos e bromatologia ii.** Faculdade Assis-gurgacz. Cascavel. 2007. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/50655173/55/GOMAS-E-MUCILAGENS>>.

SENG CHAN, E.; LING WONG, S.; PHONG LEE, P. et al. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers.** v.83. p. 225–232. 2011.

SHEU, T.Y; MARSHALL, R.T. Microentrapment of Lactobacilli in alginate gels. **Journal of Food Science.** v.54, n.3, p. 557-551, 1993.

SILVA, A. L. B. B.; SILVA, E. O. **Conhecendo materiais poliméricos.** Universidade Federal do Mato Grosso. 2003. 84 p. Disponível em: <<http://pt.scribd.com/doc/54924150/28/RESINAS-E-GOMAS-NATURAIS>>.

SILVA, C.V. **Melhoramento Genético do Quiabeiro.** 2004. Disponível em: <<http://www.ufv.br/dbg/bioano01/div11.htm>>. Acesso em: 09 jul. 2011.

SILVA, VERA SÔNIA NUNES DA. **Estudo dos efeitos nutricionais da farinha de polpa e mucilagem extraída do quiabo (*Hibiscus esculentus* L.).** Campinas, SP: [s.n.], 2006. Tese (doutorado) Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Engenharia de Alimentos.

SILVA, C.C. **Avaliação do uso de leveduras (*Saccharomyces cerevisiae*) inativas e hidrolizadas nas dietas iniciais de leitões.** Claudia Cassimira da Silva, Pirassununga, 2009.

SINDIRAÇÕES. Nacional da Indústria de Alimentação Animal. Indústria de Ração Cresceu mais de 5% Em 2010. Setor de Alimentação Animal. Boletim Informativo do Setor. março 2011. Disponível em <<http://www.sindiracoes.org.br/images/stories/noticias/boletim%20mar%20E7o%20%202011%20final.pdf>>. Acesso em: 26 ago. 2011.

STEFÉ, C. A.; ALVES, M. A. R.; RIBEIRO, R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos. **Saúde e Ambiente em Revista.** Duque de Caxias. v.3. n.1. p. 16-33. 2008.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Health and Environment Journal**, v.7, n.2, 2006.

SUBRATA, S.; MANDAL, L.; BANERJEE, G.C.; SARKAR, S. Comparative efficiency of different types of yeast on the performance of broilers. **Indian Veterinary Journal. Chennsi**, v.73, n.2, p. 224-226, 1996.

SUN, Z.J.; LI, S.Y.; LV, G.J. et al. Metabolic response of different osmo-sensitive *Saccharomyces cerevisiae* to ACA microcapsule. **Enzyme and microbial technology**. v.42, n.7 p. 576-582. 2008.

TACO. **Tabela Brasileira de Composição de Alimentos**, 2.ed., Campinas, 2006. Núcleo de Estudos e Pesquisas em Alimentação – NEPA. Disponível em: <http://www.unicamp.br/nepa/taco/contar/taco_versao2.pdf>. Acesso em: 20. jul. 2011.

TANAKA, H.; KAMOGAWA, T.; AOYAGI, H. et al. Invertase production by *Saccharomyces cerevisiae* protoplasts immobilized in strontium alginate gel beads. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v.89, p. 498-500. 2000.

TANOUE, H. SIMOZONO, H. Chemical and rheological properties of viscous polysaccharides from three species of yam (*Dioscorea*) **Nippon Shokuhin Kyogo Gakkaishi**.1991; v.38, p. 751–757.

TEIXEIRA, A.S.; CAVALCANTI, J.S.; OST, P.R. et al. Probióticos em rações para frangos de corte utilizando farinha de carne e ossos com diferentes níveis de contaminação bacteriana. **Ciência Agrotécnica**. v.27. n.4. p. 927-933. 2003.

THU B., SMIDSROD O.; SKJÅK-BRAEK G., **Alginate gels**: Some structure function correlations relevant to their use as immobilization matrix for cells, In: Wijffels R., et al., *Immobilized Cells, Basics and Applications*, Elsevier Science, the Netherlands, 1996, p. 19–30.

TOURNUT, J.R. Probiotics. In: Reunião da sociedade brasileira de zootecnia, 35, 1998, Botucatu. **Anais...** Botucatu: SBZ, 1998, p.179-199.

TURBIANI, F. R. B. **Desenvolvimento e caracterização de filmes ativos de alginato de sódio reticulados com benzoato de cálcio**, Campinas, SP: [s.n.], 2007.

TURNER, J.L.; DRITZ, P.S.S.; MINTON, J.E. Review: Alternatives to conventional antimicrobials in swine diets. **The Professional Animal Scientist**, v.17., p. 217-226, 2001.

VASSILEVA, A.; BURHAN, N.; BESCHKOV, V. et al. Cyclodextrin lucanotransferase production by free and agar gel immobilized cells of *Bacillus circulans* ATCC 21783. **Process Biochemistry**, v.38, p. 1585-1591, 2003.

WALSH, P. K., F. V. ISDELL, S. M. NOONE, M. G. O'DONOVAN & D. M. MALONE, 1996. Growth patterns of *saccharomyces cerevisiae* microcolonies in alginate and

carrageenan gel particles: Effect of physical and chemical properties of gels. **Enzyme Microbiology Technology**, p. 366-372.

WANAUPATHUMKUL, A.; CHITPRASERT, P. **Effects of heat from pelleted-chicken feed production on survival of *Lactobacillus reuteri* KUB-AC5 encapsulated with aluminium-carboxymethylcellulose gel.** Kasetsart University, Bangkok (Thailand). Faculty of Agro-Industry. Department of Biotechnology. 2009. Disponível em: <<http://agris.fao.org/?query=%2Bauthor:%22Areewan%20Wanaupathumkul%22>>. Acesso em: ago. 2011.

WHISTLER, R.L.; BEMILLER, J.N. 1973. In: **Industrial Gums**, Academic Press. New York. London. p. 5-13.

YING, D.Y.; PARKAR, S.; LUO, X.X. et al. 2007. Microencapsulation of probiotics using kiwifruit polysaccharide and alginate chitosan. **Acta Hort.** (ISHS) 753:801-808. Disponível em: <http://www.actahort.org/books/753/753_105.htm>.

ZHOU, Z.D.; LI, G.Y.; LI, Y.J. Immobilization of *saccharomyces cerevisiae* alcohol dehydrogenase on hybrid alginate-chitosan beads. **Int J. Biol. Macromol**, 2010. jul., v.47, n.1, p. 21-6.

ZHU, H.; WAKAYAMA; SUZUKI, T. et al. Entrapment of *Rhodobacter sphaeroides* RV in Cationic Polymer/Agar Gels for Hydrogen Production in the Presence of NH₄⁺. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v.88, n.5. p. 507-512. 1999.