



**INSTITUTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIA E TECNOLOGIA DE
ALIMENTOS**

Mariana Alves Gragnani Vido

**MICROENCAPSULAÇÃO DE CULTURAS PROBIÓTICAS PARA APLICAÇÃO EM
FÓRMULAS INFANTIS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE APÓS O PREPARO**

CAMPINAS

2020

Mariana Alves Gragnani Vido

**MICROENCAPSULAÇÃO DE CULTURAS PROBIÓTICAS PARA APLICAÇÃO EM
FÓRMULAS INFANTIS E AVALIAÇÃO DA VIABILIDADE APÓS O PREPARO**

*Dissertação apresentada ao Instituto de
Tecnologia de Alimentos para obtenção do título
de Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos.*

Aluno: Mariana Alves Gragnani Vido

Orientador: Profa. Dra. Maria Isabel Berto

Coorientador: Dra. Adriana Torres Silva e Alves

Este exemplar corresponde à versão final da Dissertação defendida pela aluna Mariana Alves Gragnani Vido e orientada pelo Profa. Dra. Maria Isabel Berto.

CAMPINAS

2020

Ficha Catalográfica

Elaborada pela Bibliotecária Lucilene Paulina da Silva CRB/8 - 8507
Biblioteca Central do ITAL- Instituto de Tecnologia de Alimentos.

V654m Vido, Mariana Alves Gagnani.

Microencapsulação de culturas probióticas para aplicação em formulas infantis e avaliação da viabilidade após o preparo. Mariana Alves Gagnani Vido / Dissertação de Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos. Campinas, SP: ITAL – Instituto de Tecnologia de Alimentos, 2020.

52 f.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Isabel Berto.
Coorientadora: Dra. Adriana Torres Silva e Alves.

1. Probióticos. 2. Microencapsulação. 3. Fórmula infantil. 4. Spray drying. 5. *Limosilactobacillus reuteri*. I. ITAL / Tecnotat - Centro de Tecnologia de Laticínios. II. Vido, Mariana Alves Gagnani. III. Título.

Título em inglês: Microencapsulation of probiotic culture for application in infant formula and evaluation of viability after its preparation

Key-words: probiotics; microencapsulation; infant formula; spray drying; *Limosilactobacillus reuteri*.

Titulação: Mestre em Ciência e Tecnologia de Alimentos

Banca Examinadora: Dra. Maria Isabel Berto (orientadora)

Dra. Adriana Torres Silva e Alves (coorientadora)

Dr. Adriano Gomes da Cruz (titular)

Dra. Izabela Dutra Alvim (titular)

Data da Defesa: 24/11/2020

Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Este exemplar corresponde à redação final da Dissertação de Mestrado defendida por Mariana Alves Gragnani Vido, aprovada pela Comissão Julgadora em 24/11/2020.

Profa. Dra. Maria Isabel Berto
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(Presidente)

Dra. Adriana Torres Silva e Alves
Instituto de Tecnologia de Alimentos
(coorientadora)

Dr. Adriano Gomes da Cruz
Instituto Federal de Educação, Ciência e Tecnologia do Rio de Janeiro (titular)

Dra. Izabela Dutra Alvim
Instituto de Tecnologia de Alimentos (titular)

Dra. Patrícia Blumer Zacarchenco Rodrigues de Sá
Instituto de Tecnologia de Alimentos (suplente)

A ata de defesa de dissertação de mestrado com as respectivas assinaturas dos membros da banca encontra-se arquivada junto à documentação do aluno.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus por mais essa etapa vencida.

À professora Dra. Maria Isabel Berto que aceitou esse desafio sem hesitar e dedicou seu tempo para minha orientação durante todo o desenvolvimento desse trabalho.

À coorientadora, diretora e amiga Dra. Adriana Torres pelo incentivo, apoio, paciência e oportunidade.

À Dra. Izabela Dutra Alvim pela atenção e auxílio durante a realização dos ensaios.

Ao Dr. Gabriel Vinderola, que é uma inspiração, pelas sugestões e ensinamentos.

Aos amigos do TecnoLat/Ital que sempre me apoiaram e deixam meus dias mais leves e com muitas risadas, em especial Patrícia, Leila, Fabiana, Mirela e Cláudia.

Aos meus pais Milton e Suzeli pelo otimismo e pela força em todos os momentos.

Ao meu marido João Ricardo pela paciência e compreensão, sempre!

Sem vocês nada seria possível.

MUITO OBRIGADA POR TUDO!

RESUMO

O leite humano é considerado único em composição e apresenta benefícios evidentes, como menores probabilidades da ocorrência de diarreias, infecções respiratórias, alergias, hipertensão e diabetes. Na impossibilidade do aleitamento materno é importante a ingestão de bactérias probióticas pelos bebês já que o leite humano é uma fonte importante desses microrganismos que ajudam a colonizar o intestino e contribuem para a composição de uma microbiota intestinal saudável. As fórmulas infantis têm como objetivo imitar a composição e funcionalidade do leite humano, fornecendo ingredientes que refletem as informações mais recentes sobre o leite humano. Assim o objetivo deste trabalho foi avaliar a aplicação da técnica de microencapsulação por *spray drying* de uma cultura probiótica, *Limosilactobacillus reuteri*, para adição à uma fórmula infantil para lactentes, visando sua viabilidade após a reconstituição do produto em água à 70°C, conforme legislação, e passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Foram realizados testes preliminares para seleção do material encapsulante e condições de processo. Após esses testes utilizou-se uma fórmula infantil reconstituída a 20% como material encapsulante e temperaturas de entrada e saída do *spray dryer* de 170°C e 75°C, respectivamente. As micropartículas obtidas nesses ensaios foram acondicionadas em tubos criogênicos vedados com parafilm e armazenadas a 4°C e 25°C. As amostras foram avaliadas inicialmente quanto à eficiência da encapsulação, umidade, atividade de água, morfologia e diâmetro médio. A viabilidade do *L. reuteri* microencapsulado foi avaliada após diluir a fórmula infantil com as micropartículas em água à 70°C e após a exposição às condições gastrointestinais *in vitro*. A taxa de sobrevivência foi avaliada após 60 dias de armazenamento. As micropartículas obtidas nos ensaios tiveram eficiência da encapsulação de 90%, indicando que houve baixa morte celular no processo de atomização por *spray drying*. Os valores de atividade de água, umidade e diâmetro médio foram, em média, $0,1121 \pm 0,0160$, $2,10 \pm 0,35\%$ e $10,30 \pm 0,12 \mu\text{m}$, respectivamente. A viabilidade do *L.reuteri* após diluição à 70°C foi de 10^8 UFC/ml, reduzindo 1 log do inicial, e após a simulação pelo trato gastrointestinal *in vitro* foi de 10^6 e 10^7 UFC/ml, valores desejáveis para um produto probiótico. A microencapsulação por *spray drying* mostrou-se eficiente para obtenção de micropartículas com cultura probiótica *L. reuteri* para aplicação em fórmulas infantis, obtendo-se um número adequado de células viáveis após reconstituição à 70°C.

Palavras-chave: probióticos; microencapsulação; fórmula infantil; *spray drying*; *Limosilactobacillus reuteri*.

ABSTRACT

Human milk is considered unique and has obvious benefits, such as lower probabilities of diarrhea, respiratory infections, allergies, hypertension and diabetes. In the impossibility of breastfeeding, it is important for the breastfed infant to ingest probiotic bacteria, as human milk is an important source of these microorganisms that help colonize the intestine and contribute to the composition of a healthy intestinal microbiota. Infant formulas aim to imitate a composition and functionality of human milk that reflect the most recent information about human milk. The aim of this study was to evaluate the application of a microencapsulation technique of a probiotic culture, *Limosilactobacillus reuteri*, to incorporate in infant formula, aiming its stability after the dilution in water at 70°C and *in vitro* gastrointestinal simulation. Preliminary tests were carried out to select the encapsulating material and process conditions. After performing these tests, infant formula reconstituted at 20% was used as an encapsulating material and the spray dryer inlet and outlet of 170 ° C and 75 ° C, respectively. The microparticles obtained in these tests were placed in cryogenic tubes sealed with parafilm and stored at 4°C and 25°C. The samples were initially evaluated for encapsulation efficiency, humidity, water activity, morphology and average diameter. The viability of microencapsulated *L. reuteri* was evaluated after diluting the infant formula with microparticles in water at 70°C and exposure to *in vitro* gastrointestinal conditions. The survival rate was assessed after 60 days of storage. The microparticles obtained in the tests had an encapsulation efficiency of 90%, indicating that there was few cell death in the spray drying atomization process. The values of water activity, humidity and average diameter were, on average, 0.1121 ± 0.0160 , $2.10 \pm 0.35\%$ and $10.30 \pm 0.12\mu\text{m}$, respectively. The viability of *L.reuteri* after dilution at 70°C was 108 CFU/ml, reducing 1 log of the initial, and after *in vitro* simulation of gastrointestinal tract it was 10^6 and 10^7 CFU/ml, desirable values for a probiotic product. Spray drying microencapsulation was efficient to obtain microparticles with probiotic *L. reuteri* culture for application in infant formulas, obtaining an adequate number of viable cells after dilution at 70°C.

Key words: probiotics; microencapsulation; infant formula; spray drying; *Limosilactobacillus reuteri*.

SUMÁRIO

RESUMO.....	v
ABSTRACT	vi
SUMÁRIO.....	vii
LISTA DE TABELAS.....	ix
LISTA DE FIGURAS.....	x
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 OBJETIVOS	3
2.1 Objetivo principal	3
2.2 Objetivos específicos.....	3
3 Revisão Bibliográfica	4
3.1 Leite humano e fórmula infantil.....	4
3.2 Probióticos.....	7
3.3 Probióticos em fórmulas infantis	10
3.4 Microencapsulação.....	13
3.5 Bactérias termorresistentes em fórmulas infantis.....	16
4 MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1 Material.....	21
4.1.1 Preparo das micropartículas.....	21
4.1.2 Avaliação da viabilidade e determinação <i>in vitro</i> da resistência a digestão gastrintestinal da cultura probiótica.....	21
4.2 Métodos.....	21
4.2.1 Seleção e preparo da cultura probiótica	21
4.2.2 Ensaio para seleção dos materiais encapsulantes e temperaturas de entrada do equipamento (<i>spray dryer</i>).....	22
4.2.3 Preparo do material encapsulante.....	22
4.2.4 Produção das micropartículas	22
4.2.5 Eficiência da encapsulação	24
4.2.6 Caracterização das micropartículas	25

4.2.7	Avaliação da viabilidade de <i>Limosilactobacillus reuteri</i>	25
4.2.8	Determinação da umidade e atividade de água	25
4.2.9	Procedimento de reconstituição do pó na temperatura de 70°C e avaliação da resistência térmica do probiótico.....	25
4.2.10	Determinação <i>in vitro</i> da resistência da cultura probiótica a digestão gastrointestinal	27
4.2.11	Estabilidade das micropartículas em diferentes condições de estocagem 27	
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	28
5.1	Ensaio preliminares	28
5.1.1	Quantificação de <i>L. reuteri</i> e eficiência da encapsulação	28
5.1.2	Atividade de água e umidade.....	31
5.1.3	Monitoramento da temperatura de saída.....	32
5.2	Ensaio Finais	35
5.2.1	Quantificação de <i>L. reuteri</i> e eficiência da encapsulação	35
5.2.2	Atividade de água e umidade.....	36
5.2.3	Monitoramento da temperatura de saída.....	37
5.2.4	Caracterização das micropartículas	38
5.2.5	Avaliação da resistência térmica do probiótico.....	40
5.2.6	Determinação <i>in vitro</i> da resistência da cultura probiótica a digestão gastrointestinal	42
5.2.7	Estabilidade das micropartículas em diferentes condições de estocagem 43	
6	CONCLUSÕES.....	45
7	REFERÊNCIAS	46

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do leite humano e do leite de vaca.....	6
Tabela 2. Novos nomes para algumas espécies proeminentes de probióticos de <i>Lactobacillus</i>	9
Tabela 3. Valor D e z de <i>E. sakazakii</i> em fórmulas infantis em pó.....	19
Tabela 4. Materiais encapsulantes e temperaturas de entrada avaliados nos ensaios preliminares.....	22
Tabela 5. Quantificação de <i>L. reuteri</i> e eficiência da encapsulação.	28
Tabela 6. Taxa de sobrevivência de <i>L. reuteri</i> microencapsulado com leite desnatado 20% durante armazenamento a 4°C.....	29
Tabela 7. Taxa de sobrevivência de <i>L. reuteri</i> microencapsulado com fórmula infantil 20% durante armazenamento a 4°C.....	30
Tabela 8. Atividade de água e umidade das micropartículas obtidas nos ensaios preliminares.....	31
Tabela 9. Média e desvio padrão das temperaturas de saída dos ensaios de secagem..	32
Tabela 10. Quantificação de <i>L. reuteri</i> e eficiência da encapsulação.....	35
Tabela 11. Atividade de água e umidade das micropartículas de fórmula infantil 20%.	36
Tabela 12. Média e desvio padrão das temperaturas de saída dos ensaios de secagem à 170°C.	37
Tabela 13. Diâmetro médio e descritores de distribuição de tamanho das micropartículas.	39
Tabela 14. Taxa de sobrevivência do <i>L. reuteri</i> microencapsulado com fórmula infantil 20% diluída à 70°C.....	42
Tabela 15. Determinação da taxa de sobrevivência do <i>L. reuteri</i> após exposição simulada ao trato gastrointestinal.	43
Tabela 16. Taxa de sobrevivência de <i>L. reuteri</i> microencapsulado com fórmula infantil 20% durante armazenamento a 4 e 25°C.....	44

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Etapas do processamento do leite de vaca para a produção de fórmulas infantis.	5
Figura 2. Monitoramento da temperatura de saída.	24
Figura 3. Procedimento de reconstituição da fórmula infantil com micropartículas com cultura probiótica.	26
Figura 4. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de leite desnatado em spray dryer realizado a 130°C.	33
Figura 5. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de leite desnatado em spray dryer realizado a 170°C.	33
Figura 6. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de Fórmula Infantil em spray dryer realizado a 130°C.	34
Figura 7. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de Fórmula Infantil em spray dryer realizado a 170°C.	34
Figura 8. Morfologia celular de colônias de <i>L. reuteri</i>	36
Figura 10. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de fórmula infantil em <i>spray dryer</i> realizado a 170°C.	38
Figura 11. Gráfico de distribuição de tamanho de partículas das amostras Leite Desnatado (Linha Azul) e Fórmula Infantil (Linha Vermelha).	39
Figura 12. Morfologia obtida por microscopia ótica das amostras Leite desnatado (A) e Fórmula infantil (B). Barras = 20 micrômetros.	40
Figura 13. Perfil de resfriamento das fórmulas infantis hidratadas à 70°C, ensaio realizado em duplicata.	41

1 INTRODUÇÃO

O leite materno é o mais apropriado para alimentação da criança devido a sua composição nutricional, fornecendo exclusivamente as necessidades nutricionais nos primeiros seis meses de vida (ACKERBERG; LABUSCHAGNE; LOMBARD, 2012). A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda amamentação nos primeiros seis meses de vida, seguida de amamentação contínua com alimentos complementares por até dois anos ou mais (SALMINEN et al., 2020).

Um desenvolvimento intestinal saudável é de grande importância durante a infância. Isso contribui para o crescimento e desenvolvimento, garantindo a digestão e absorção de nutrientes. A colonização do trato gastrointestinal do bebê é um determinante crítico da microbiota intestinal, que condiciona uma interação crítica dos antígenos alimentares e do ambiente externo. A inserção de probióticos pode ser associada com benefícios como redução do risco de infecções gastrointestinais, risco reduzido de diarreia pela utilização de antibióticos, menor frequência de cólica e irritabilidade (EPIFANIO, 2012; SALMINEN et al., 2020).

A eficácia da adição de probióticos à fórmula infantil ainda não é conclusiva. No entanto, estudos continuam demonstrando os benefícios para a saúde do lactente em grandes ensaios clínicos randomizados, afirmando que o uso de probióticos demonstrou ser eficaz no tratamento da gastroenterite viral aguda e na prevenção da diarreia associada a antibióticos em crianças saudáveis, e especificamente em casos de enfermidades, como a redução da enterocolite necrosante (inflamação intestinal em que porções do intestino sofrem necrose - morte das células) em bebês prematuros. O fato de que os benefícios dos probióticos agora são reconhecidos pelo público é um indicador que a produção e compra de fórmulas suplementadas com probióticos pode aumentar (ACKERBERG et al., 2012; KENT & DOHERTY, 2014).

A Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) publicou, em 2011, as resoluções n.43, 44 e 45, que dispõem sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de partida (0-6 meses), fórmula de seguimento (a partir do 6º mês) e fórmulas infantis destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, respectivamente. Nesses regulamentos ficou estabelecido a obrigatoriedade de que a rotulagem traga a instrução que o produto deve ser preparado com água em temperatura não inferior a 70°C, inviabilizando a adição de probióticos nas fórmulas (*Bifidobacterium* resiste até 43-45°C e *Lactobacillus* até 35-40°C). Assim, a busca por alternativas e tecnologias disponíveis que

possibilitem a manutenção da quantidade dos microrganismos viáveis se torna necessária, pois entende-se que um requisito voltado para a segurança das fórmulas infantis não pode ser ignorado com o intuito de permitir a adição de um ingrediente opcional, mas de reconhecida importância para saúde, nesses produtos.

Neste contexto, o objetivo deste projeto de dissertação é estudar a aplicação da técnica de microencapsulação por *spray drying* de uma cultura probiótica para adição à uma fórmula infantil para lactentes, visando sua viabilidade após o preparo e passagem pelo trato gastrointestinal simulado.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo principal

Estudar a aplicação da técnica de microencapsulação por *spray drying* de uma cultura probiótica para adição em fórmula infantil comercial e avaliar a sua viabilidade após a reconstituição do produto à 70°C e simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

2.2 Objetivos específicos

- Selecionar a cultura probiótica a ser empregada no estudo;
- Avaliar diferentes materiais encapsulantes e temperaturas de secagem e selecionar as melhores condições para o processo de microencapsulação por *spray drying*;
- Avaliar o diâmetro e as características morfológicas das micropartículas;
- Estudar a adição das micropartículas ao pó e a viabilidade da cultura após dissolução do mesmo a 70°C;
- Avaliar a viabilidade do probiótico após a simulação *in vitro* da passagem pelo trato gastrointestinal, em soluções ácidas e com sais biliares;
- Realizar a estocagem das micropartículas em diferentes temperaturas e avaliar a estabilidade durante o armazenamento.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Leite humano e fórmula infantil

O leite humano é uma fonte importante de bactérias probióticas que ajudam a colonizar o intestino do bebê e contribuem para a composição de uma microbiota intestinal favorável, incluindo *Lactobacillus* spp. e *Bifidobacterium* spp., com este gênero dominando a microbiota intestinal de um bebê de parto normal. O lactente em aleitamento materno geralmente tem um sistema imune mais saudável do que o alimentado com fórmulas. Pressupõem-se que as bactérias do leite humano são componentes bioativos que regulam o desenvolvimento do sistema imunológico de uma criança e atenuam processos de inflamação, criando um ambiente favorável, com composição mais completa de proteínas e mediadores da função imunológica, benefícios ainda deficientes na fórmula infantil (ANTUNES & PACHECO, 2009; SALMINEN et al., 2020).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda amamentação nos primeiros seis meses de vida, seguida de amamentação contínua com alimentos complementares por até dois anos ou mais. Amamentação ou intervenção nutricional durante o início da vida pode ajudar a prevenir o risco de doenças infecciosas e não transmissíveis durante infância e na idade adulta (SALMINEN et al., 2020).

Na inviabilidade do oferecimento do aleitamento materno, deve ser indicada uma fórmula infantil. A Anvisa publicou a RDC Nº 43 em 2011, para bebês de 01 a 06 meses, com a seguinte definição:

“Fórmula infantil para lactentes é o produto, em forma líquida ou em pó, utilizado sob prescrição, especialmente fabricado para satisfazer, por si só, as necessidades nutricionais dos lactentes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida”

A RDC Nº 44 de 2011 define fórmula infantil para bebês de 06 a 12 meses:

“Fórmula infantil de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância: produto, em forma líquida ou em pó, utilizado quando indicado, para lactentes saudáveis a partir do sexto mês de vida até doze meses de idade incompletos (11 meses e 29 dias) e para crianças de primeira infância saudáveis, constituindo-se o principal elemento líquido de uma dieta progressivamente diversificada”

Fórmula infantil é um composto à base de leite de vaca, ou de leite de outros animais, e/ou de outros ingredientes que foram aprovados para serem adequados à alimentação infantil, adicionada de nutrientes nas proporções e qualidades recomendadas (PANIAGO et al., 2017; WEFFORT, 2012).

As fórmulas têm se adequado em diversos aspectos, como qualidade dos nutrientes e composição, pois são desenvolvidas para reproduzir o leite materno. A

composição média das fórmulas infantis contém no pó, aproximadamente, 8-12% de proteínas, 40-45% de carboidratos e 50% de gorduras (EPIFANIO, 2017).

A origem das fórmulas infantis é o leite de vaca, que passa por processos tecnológicos (Figura 1) para ser utilizado na fórmula infantil, garantindo que a composição atenderá as necessidades nutricionais, digestibilidade, balanço de aminoácidos das proteínas, funcionalidade, compatibilidade com processo, composição, e adequação à legislação (RODRIGUES DE SÁ et al., 2017).



Figura 1. Etapas do processamento do leite de vaca para a produção de fórmulas infantis.

A densidade energética do leite de vaca é semelhante à do leite humano, de 60 a 70kcal/100ml, a mesma recomendada para as fórmulas infantis. As diferenças básicas entre o leite humano e o leite de vaca são as proteínas, lactose, minerais e gorduras (GARCIA et al., 2013). A Tabela 1 mostra o comparativo entre a composição do leite humano e o leite de vaca.

Tabela 1. Composição do leite humano e do leite de vaca.

Componentes	Leite humano	Leite de vaca
Água (g/100ml)	87,5	87,5
Energia (kcal/100ml)	66	65
Carboidratos (g/100ml)	7,0	4,6
Gorduras (g/100ml), entre os quais:	3,8	3,7
Ácidos Graxos (g/100ml)		
essenciais	0,4	0,1
saturados	1,9	1,1
insaturados	2,2	3,0
Proteínas (g/100ml)		
Caseína	0,25	2,6
Lactoalbumina	0,2	0,1
Lactoglobulina	-	0,3

Fonte: Adaptada de Sá et al., 2017.

O que mais diferencia o leite de vaca do leite humano é o tipo e quantidade de proteínas. As proteínas do soro do leite correspondem a aproximadamente 60 a 80%, com predominância da alfa-lactalbumina, importante na síntese de lactose, e no leite de vaca as proteínas do soro correspondem a 18%, com predominância da beta-lactoglobulina, potencialmente alergênica. O fato do leite de vaca possuir três vezes mais proteínas que o humano, resulta em uma maior carga proteica que deverá ser filtrada por um rim funcionalmente imaturo, aumentando a excreção de cálcio pela urina. A quantidade de lipídios do leite de vaca e leite materno são muito semelhantes, entretanto existem diferenças qualitativas. No leite humano, são facilmente digeríveis e fontes de ácidos graxos poli-insaturados e insaturados de cadeia intermediária, importantes para o primeiro mês de vida do bebê (RODRIGUES de SÁ et al., 2017).

A produção das fórmulas infantis foi regulamentada nos anos 80 pelo *Food and Drug Administration* (FDA), e desde então as empresas passam por um rigoroso controle. O FDA adota as recomendações da Academia Americana de Pediatria (AAP) e a principal agência regulamentadora, em nível internacional, é o *Codex Alimentarius Committe on Foods for Special Dietary* FAO/OMS. Com o avanço tecnológico, os produtos elaborados foram sendo desenvolvidos adequando as quantidades de macro e micronutrientes para compensar algumas deficiências digestivas absorptivas, evitar reações alérgicas e contribuir para diminuir a desnutrição secundária (WEFFORT, 2012). A Comissão do *Codex Alimentarius* FAO/OMS estabeleceu recomendações sobre fórmulas/composições e o Brasil as adotou em sua legislação para registro e comercialização das fórmulas infantis.

As fórmulas infantis são divididas em três categorias, segundo a Anvisa:

- (1) Fórmulas infantis para lactentes saudáveis durante os primeiros seis meses de vida, também conhecida como fórmula de partida (BRASIL, 2011a);
- (2) Fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças da primeira infância (12-36 meses) saudáveis, também conhecida como fórmula “de seguimento” (BRASIL, 2011b);
- (3) Fórmulas infantis de seguimento destinadas a necessidades dietoterápicas específicas, sendo utilizadas especialmente para atender as necessidades nutricionais decorrentes de alterações fisiológicas e/ou doenças temporárias ou permanentes (BRASIL, 2011c).

A suplementação de fórmulas infantis com prebióticos, probióticos e simbióticos que agem como moduladores da microbiota intestinal, além de aumentar a resistência às infecções intestinais e modular o sistema imunológico, tem sido proposta baseando-se em estudos observacionais, e no fato de que o leite materno também é fonte de probióticos e prebióticos. O gênero mais empregado na suplementação de fórmulas infantis é o *Bifidobacterium*, pois é predominante na microbiota intestinal de bebês amamentados. O leite de mulheres saudáveis contém de 10^3 a 10^4 UFC/ml de probióticos, representando uma fonte importante de bactérias para o intestino do bebê (RODRIGUES de SÁ et al., 2017).

Segundo a literatura internacional, tem sido sugerido que os probióticos devem estar presentes no alimento em quantidades mínimas de 10^6 UFC/g do produto pronto para consumo. Esta contagem mínima deve estar presente para fornecer seus benefícios potenciais ao hospedeiro (TAMIME et al., 2017; VANDENPLAS; HUYS; DAUBE, 2015). A legislação de 2011 para fórmula infantil determina que o conteúdo de bactérias viáveis deve estar entre 10^6 a 10^8 UFC/g do produto pronto para consumo. Em 2019, a ANVISA estabeleceu que cada empresa deve demonstrar, por meio de comprovação científica, qual a quantidade mínima sugerida para obtenção do benefício.

3.2 Probióticos

O termo probiótico significa “para a vida” e é usado para nomear bactérias associadas a efeitos benéficos para humanos e animais. Probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002), revisado pela *International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP)* em 2013 (HILL et al., 2014).

A seleção de bactérias probióticas tem como base o gênero, a origem (que deve ser preferencialmente humana), a estabilidade ao ácido estomacal e aos sais biliares, a capacidade de aderir à mucosa intestinal, a capacidade de colonizar temporariamente o trato gastrointestinal, a capacidade de produzir compostos antimicrobianos e a atividade metabólica no intestino. Probióticos são capazes de melhorar o equilíbrio microbiano intestinal e podem ser obtidos através de suplemento oral ou matriz alimentar que contenha

quantidade viável suficiente para alterar a microbiota (EPIFANIO, 2017; RAIZEL et al., 2011).

Os probióticos não são colonizadores permanentes, ou seja, não se multiplicam rapidamente. Dentre os diversos gêneros que integram este grupo, destacam-se o *Bifidobacterium* e o *Lactobacillus*, que são hóspedes naturais dos intestinos delgado e grosso. A capacidade de permanecer viável no local de destino e ser eficaz deve ser verificada para cada cepa potencialmente probiótica (SILVA et al., 2016).

O conceito de probióticos traz nas suas premissas o reconhecimento de um efeito benéfico para quem o utiliza. Apesar de alguns especialistas defenderem que esses efeitos benéficos podem ser atribuídos genericamente a grupos de microrganismos, no Brasil a abordagem regulatória adotada pela Anvisa requer a demonstração dos efeitos para a linhagem específica (ANVISA, 2017).

As principais linhagens probióticas são pertencentes às espécies *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus casei*, *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus reuteri*, *Lactobacillus rhamnosus*, *Lactobacillus paracasei*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium breve*, *Bifidobacterium infantis*, *Bifidobacterium lactis*, *Bifidobacterium longum*, e *Bifidobacterium adolescentes*. *Lactobacillus bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus* não são considerados probióticos, mesmo sendo benéficos ao organismo (NOGUEIRA, 2011).

O gênero *Lactobacillus* era muito heterogêneo, continha mais de 250 espécies, novas ferramentas analíticas permitiram aos cientistas ver que as espécies historicamente agrupadas como *Lactobacillus* eram muito diferentes uns dos outros geneticamente. Aplicando métodos mais atuais, um grupo global de cientistas colaborou para dividir este gênero em grupos de espécies intimamente relacionadas - que compartilham certas propriedades fisiológicas e metabólicas - sob novos nomes de gênero (POT et al., 2019).

A partir de abril de 2020, algumas espécies do grupo dos *Lactobacillus* foram realocadas em novos gêneros para um agrupamento mais preciso das suas características. Quase todos os novos gêneros propostos para este grupo começam com a letra "L", então a forma abreviada de gênero / espécie - como *L. reuteri* - permanecem inalterados. Alguns nomes de espécies e designações de linhagens não mudaram - apenas o gênero abrangente mudou (ZHENG et al., 2020). A Tabela 2 contém alguns microrganismos que tiveram sua nomenclatura alterada:

Tabela 2. Novos nomes para algumas espécies proeminentes de probióticos de *Lactobacillus*.

Nome usual	Novo nome
<i>Lactobacillus reuteri</i>	<i>Limosilactobacillus reuteri</i> .
<i>Lactobacillus casei</i>	<i>Lacticaseibacillus casei</i>
<i>Lactobacillus paracasei</i>	<i>Lacticaseibacillus paracasei</i>
<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	<i>Lacticaseibacillus rhamnosus</i>
<i>Lactobacillus brevis</i>	<i>Levilactobacillus brevis</i>
<i>Lactobacillus plantarum</i>	<i>Lactiplantibacillus plantarum</i>
<i>Lactobacillus salivarius</i>	<i>Ligilactobacillus salivarius</i>
<i>Lactobacillus fermentum</i>	<i>Limosilactobacillus fermentum</i>

Fonte: ISAPP Scienc (2020).

Os novos agrupamentos podem facilitar a compreensão de mecanismos comuns que mediam os benefícios probióticos para a saúde, porque as espécies mais intimamente relacionadas (e, portanto, são mais propensas a compartilhar características fisiológicas) são agrupadas sob o mesmo gênero (ZHENG et al., 2020).

As bifidobactérias são microrganismos gram positivos, não esporogênicos, anaeróbios; tem crescimento ótimo entre 37° e 41°C, com multiplicação máxima em 43-45°C e mínimo em 25-28°C. O pH ótimo é de 6,5 a 7,0, não havendo crescimento em pH <5,1 ou >8,0. As bactérias do gênero *Lactobacillus* são microaerófilas, com o crescimento favorecido por anaerobiose ou pressão reduzida de oxigênio, temperatura ótima de multiplicação entre 35 e 40°C e pH entre 5,5 e 6,2 (RAIZEL et al., 2011).

A microbiota humana é um ecossistema dinâmico estabelecido após o nascimento e composto por todos os microrganismos que vivem na superfície humana ou dentro do nosso corpo em relação naturalmente simbiótica com ele (GALLEGO & SALMINEN, 2016).

O trato gastrointestinal é estéril, e a colonização bacteriana do intestino começa no nascimento e continua ao longo da vida, com notáveis mudanças específicas por idade. Nas primeiras 24 horas de vida, pode-se encontrar número significativo de bactérias anaeróbias facultativas, micrococcos, estreptococos e coliformes. O nascimento, o tipo de parto, a qualidade da dieta (leite materno ou fórmula infantil) e se o paciente tem alta ou permanece em ambiente hospitalar, influencia na microbiota intestinal, que tende a instituir-se por volta dos 18 aos 24 meses e a manter-se estável durante toda a vida, considerada saudável quando há predomínio de *Bifidobacteria* e *Lactobacillus* (FAO/WHO, 2002).

A alimentação da criança é um fator determinante de sua saúde, essencialmente no primeiro ano de vida, resultando em um crescimento e desenvolvimento adequados. A recomendação do uso de probióticos na infância é para prevenção e tratamento de diarreias, pois alteram a microbiota intestinal e inibem o crescimento de bactérias

patogênicas, promovem digestão adequada, e modulação do sistema imunológico (BRANDÃO, 2014).

É possível citar o "efeito de barreira" ou "resistência à colonização" como uma atividade benéfica da microbiota intestinal, ou seja, as bactérias já presentes neste ambiente evitam a proliferação de outros microrganismos recém-ingeridos, incluindo patógenos. Por isso, o consumo de probióticos através de suplementação pode contribuir para a saúde do hospedeiro. Lactobacilos e bifidobactérias produzem, através da atividade fermentativa, compostos orgânicos (p. ex. ácido láctico, peróxido de hidrogênio e ácido acético) que aumentam a acidez intestinal, e bacteriocinas, que são proteínas metabolicamente ativas que auxiliam na destruição de microrganismos indesejáveis, inibindo a proliferação bacteriana e o dano ao epitélio intestinal. Os probióticos podem também reforçar as junções intercelulares no trato gastrointestinal, pois, distúrbios na microbiota, alteram a permeabilidade intestinal, fenômeno chamado "*leaky gut*", o que diminui a seletividade intestinal às macromoléculas. Além disso, estes microrganismos também competem por nutrientes, fator primordial no controle de patógenos (KAMADA et al., 2013; NOGUEIRA, 2011; RAIZEL et al., 2011; VANDENPLAS et al., 2015)

3.3 Probióticos em fórmulas infantis

Probióticos e prebióticos são adicionados à fórmula infantil para promover uma microbiota intestinal semelhante à de um bebê alimentado com leite materno para favorecer um crescimento ideal, desenvolvimento e diminuir infecções (ACKERBERG et al., 2012).

A ISAPP definiu prebiótico como um "substrato que é utilizado seletivamente por microrganismos hospedeiros, conferindo um benefício à saúde" (GIBSON et al., 2017). São substâncias não digeríveis que estimulam seletivamente o crescimento e/ou atividade de bactérias no cólon, melhorando assim a saúde do hospedeiro. Os prebióticos mais amplamente estudados são inulina, frutooligossacarídeo (FOS) e galactooligossacarídeo (GOS). Quando probióticos e prebióticos são administrados simultaneamente, são chamados simbióticos. O prebiótico melhora a sobrevivência das bactérias probióticas e estimula a atividade dessas no trato gastrointestinal (EPIFANIO, 2012).

Os prebióticos estão sendo adicionados a fórmulas infantis pois estão presentes na composição do leite materno, e são eficazes na prevenção de diversas doenças e na proteção imunológica do bebê por ser uma substância bioativa (BRANDÃO, 2014).

A Anvisa permite a adição de probióticos em fórmulas infantis desde que sigam alguns critérios de acordo com a legislação, como a comprovação, através de revisão

sistemática de ensaios clínicos publicada em revistas científicas indexadas, da segurança, do efeito desejado e a ausência de efeitos adversos da cepa.

Geralmente, as fórmulas infantis com probióticos utilizam *Bifidobacterium* spp. Ou *Lactobacillus* spp., pois seu consumo é considerado seguro de acordo com a lista QPS (*Qualitative Presumption of Safety* - Presunção Qualitativa de Segurança) de bactérias, da União Europeia. Nos Estados Unidos, existe um sistema não obrigatório de avaliação de segurança, fornecido pelo FDA que analisa os arquivos de segurança de cepas probióticas específicas a serem incluídas no chamado Inventário de Notificação GRAS (*Generally Recognized as Safe* - Geralmente Reconhecido como Seguro), que é atualizado continuamente (O'TOOLE; MARCHESI; HILL, 2017).

O Comitê de Nutrição da Sociedade Europeia de Gastroenterologia e Nutrição Pediátrica (ESPGHAN) publicou, em 2004, um parecer sobre as informações disponíveis dos efeitos da adição de probióticos em fórmulas infantis. Alguns estudos demonstraram que a administração de *Bifidobacterium lactis* reduziu a prevalência de diarreia nosocomial, o risco de gastroenterite por rotavírus e levou a uma significativa baixa taxa de disseminação de rotavírus. Também foi reportado uma redução significativa de dermatite atópica em crianças que possuem alergia ao leite de vaca que consumiram fórmula infantil com o probiótico. A maioria dos estudos não apresentaram dados do efeito dos mesmos sobre crescimento, nem positivo, nem negativo. Concluiu-se que o melhor efeito comprovado dos probióticos em crianças é a redução da duração de gastroenterite aguda infecciosa. Foi recomendado que, ao adicionar probióticos em produtos para crianças, deve-se utilizar somente cepas para as quais a identidade e a estabilidade tenham sido demonstradas e consideradas seguras quanto a adição ao alimento (AGOSTONI et al., 2004).

Por fim, o Comitê reconheceu que há evidências que alguns probióticos tem benefícios na saúde e bem-estar, mas os dados publicados sobre os efeitos clínicos são limitados. Até mais estudos estarem disponíveis, não é possível concluir que os efeitos clínicos da suplementação de probióticos são preventivos ou terapêuticos para qualquer doença na infância (AGOSTONI et al., 2004).

Em 2011, uma nova revisão sistemática feita pelo Comitê de Nutrição da ESPGHAN foi publicada, com evidências relativas à segurança e os efeitos sobre a saúde de fórmulas suplementadas com probióticos e/ou prebióticos. Foi concluído que, em lactentes saudáveis, o consumo de fórmula suplementada com probióticos não causa preocupações de segurança sobre o crescimento e efeitos adversos. A ingestão de probióticos pode ser associada com alguns benefícios clínicos, como redução do risco de infecções

gastrointestinais, redução do uso de antibióticos e menor frequência de cólica e/ou irritabilidade (BRAEGGER et al., 2011).

Uma revisão em trabalhos sobre recém-nascidos que receberam exclusivamente fórmulas infantis com simbióticos, probióticos ou prebióticos com o objetivo de determinar os efeitos dessas fórmulas em desfechos clínicos, quando comparada a ingestão de fórmula sem esses componentes, e analisar se os simbióticos são superiores aos probióticos ou prebióticos. Os bebês que consumiram as fórmulas com simbióticos não tiveram efeito significativo no crescimento (ganho de peso, altura e circunferência da cabeça), mas aumentaram significativamente a frequência da evacuação; os que consumiram os probióticos não tiveram efeito significativo no crescimento, não tiveram perda de peso, porém a fórmula foi bem tolerada e tiveram a contagem de enterobactérias reduzida significativamente; os que consumiram os prebióticos tiveram efeito significativo no ganho de peso e aumentaram a frequência de evacuações (MUGAMBI et al., 2012).

Brandão (2013) avaliou a maneira que os prebióticos e probióticos são utilizados no tratamento de diversas patologias, principalmente no sistema gastrointestinal, na pediatria. A adição de prebióticos aumentou a produção de ácidos graxos de cadeia curta, diminuiu o pH intestinal e a produção de fezes foi de consistência similar a bebês recém-nascidos a termo e prematuros amamentados com leite materno, além da mistura de frutooligossacarídeo (FOS) e galactooligossacarídeo (GOS) ter promovido crescimento de bifidobactérias e lactobacilos. O consumo de FOS e inulina proporcionaram barreira contra microrganismos patógenos, melhoraram absorção de nutrientes e trânsito gastrointestinal. Tais benefícios sugerem a recomendação de seu uso em crianças constipadas pois aumentam também a retenção de água das fezes, melhorando a consistência e a frequência das evacuações. Quanto ao consumo de probióticos, os bebês prematuros internados em Unidade de Terapia Intensiva Neonatal que foram suplementados ficaram seis dias a menos do que os demais. Nesse trabalho, há evidências limitadas na eficácia no tratamento da diarreia aguda e persistente e prevenção de diarreia associada a antibióticos.

Apesar dos estudos com resultados positivos, não é recomendado o uso contínuo de fórmula suplementada com probióticos em lactentes saudáveis devido à falta de dados sobre os efeitos em longo prazo desse consumo. Os dados disponíveis são limitados para ter conclusões confiáveis sobre o efeito dos simbióticos, probióticos e prebióticos sobre os resultados clínicos em crianças alimentadas com fórmulas, pois há uma deficiência de publicações que evidenciam os benefícios do uso contínuo de fórmulas infantis suplementadas (BRAEGGER et al., 2011; MUGAMBI et al., 2012; SALMINEN et al., 2020).

Desta maneira, fica clara a importância da continuidade dos estudos que esclareçam e avaliem os efeitos a longo prazo do uso de fórmulas infantis com a adição dos prebióticos e probióticos. Também é importante o estudo de tecnologias que viabilizem a manutenção e viabilidade desses microrganismos após o preparo do leite. Nesse âmbito, a microencapsulação é a técnica foco deste trabalho, cujos fundamentos e aplicações são abordados na sequência.

3.4 Microencapsulação

A encapsulação é baseada em um processo físico, químico ou físico-químico para prender uma substância em um material para produzir micropartículas. A microencapsulação é uma tecnologia que permite a proteção de células bacterianas para uso na indústria de alimentos, aumentando seu grau de sobrevivência, através da proteção contra condições adversas às quais são expostos durante o processamento e armazenamento dos alimentos, e também durante a passagem pelo trato gastrointestinal, onde devem resistir ao decurso por esse sistema (BURGAIN et al., 2011; NUNES et al., 2015).

O encapsulamento de componentes bioativos pode ser usado em muitas aplicações na indústria de alimentos: controlando a reação de oxidação, mascarando sabores, cores e odores, proporcionando liberação controlada, prolongando a vida de prateleira, entre outros. A encapsulação de probiótico é usada para proteger as células contra um ambiente adverso. O ativo, também chamado de material do núcleo, é disperso em uma matriz chamada parede. Este material de transporte deve ser capaz de formar uma barreira para proteger a substância encapsulada (BURGAIN et al., 2011).

A secagem por atomização pode ser considerada como um método de microencapsulação mais popular, e tem sido investigada como um meio de estabilizar bactérias probióticas em várias matrizes alimentares, na maioria das vezes composta de proteínas, polissacarídeos, açúcares e combinações entre estes. As células a serem encapsuladas são dispersas em uma solução do agente encapsulante, e depois esse sistema é atomizado, dispersando o produto líquido em forma de pequenas gotículas em uma corrente de ar quente, obtendo-se a evaporação da água e a subsequente solidificação, formando micropartículas sólidas. Os parâmetros de atomização influenciam nas propriedades do pó, como densidade, formato, distribuição de tamanho, e o teor final de umidade (CHÁVEZ & LEDEBOER, 2007; SILVEIRA et al., 2013).

Para a formação desse tipo de partícula, diferentes agentes têm sido utilizados, sozinhos ou em conjunto para microencapsular culturas probióticas, tais como alginato, goma arábica, goma gelana, maltodextrina, amido, derivados do leite como proteínas

(caseínas e proteínas do soro), leite em pó desnatado e soro de leite, prebióticos (inulina, oligofrutose, polidextrose), entre outros (NUNES et al., 2015).

O alginato de cálcio é usado para o microencapsulamento devido à sua simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade e baixo custo. Esta substância possui sensibilidade ao ambiente ácido, mas isso pode ser compensado pela mistura de alginato com outros compostos poliméricos, ou revestindo as cápsulas por outro composto, como o amido, que é comumente usado e tem sido mostrado que resulta em uma melhora da eficácia do probiótico. Uma mistura de goma xantana e gelatina tem sido usada e apresenta alta resistência a condições ácidas. O ftalato de acetato de celulose é usado para controlar a liberação de drogas no intestino pois não é solúvel em pH menor que 5, mas é solúvel em pH maior que 6. O microencapsulamento de bactérias probióticas usando acetato ftalato celulose fornece proteção para microrganismos em condições simuladas do trato gastrointestinal. O amido resistente é uma superfície ideal para a aderência de células probióticas e não é digerido pelas enzimas pancreáticas (amilases) no intestino delgado, por isso pode atingir o intestino grosso, onde será fermentado, e isso pode melhorar a entrega do probiótico em um estado viável e metabolicamente ativo ao intestino. As proteínas do leite são veículos naturais para as células probióticas e têm excelentes propriedades de gelificação e esta especificidade tem sido recentemente explorada para encapsular probióticos (BURGAIN et al., 2011).

A influência do preparo do inóculo na sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* encapsulado pela técnica de extrusão e liofilizado foi avaliada por Orosco & Kunigk (2012) através de três métodos de preparo: (1) adição direta da cultura comercial (liofilizada), (2) ativação da cultura em leite desnatado, e (3) cultivo da cultura em caldo MRS e recuperação das células na fase estacionária de crescimento (número total de células mantêm-se constante – que foi com 24h de cultivo). A contagem da cultura liofilizada antes dos preparos era de 10^{10} UFC/g, armazenada a -18°C . A diferença entre microrganismo ativado em leite com as células na fase estacionária foi de 0,3 log UFC/g, e com a adição direta foi de 1,5 log UFC/g. Após 21 dias, as culturas foram avaliadas e a contagem permaneceu constante (10^9 UFC/g) no armazenamento a 5°C no vácuo, concluindo que o preparo do inóculo que será encapsulado influencia na contagem de células viáveis após o processamento.

Micheline et al. (2009) desenvolveram micropartículas com probióticos (*Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium animalis*) e prebiótico (inulina) por secagem em *spray dryer*, avaliando-as em soluções tampão acetato pH4,5 e tampão fosfato pH 6,0 e 7,5. As culturas probióticas foram reativadas em leite desnatado reconstituído e caldo MRS, e a solução utilizada para secagem foi composta por acetato ftalato de celulose,

maltodextrina, glicerol, tween 80, leite e inulina. A temperatura de entrada (*inlet*) para secagem do *L. acidophilus* foi 110°C, enquanto que para o *B. animalis* diversas temperaturas foram testadas (110°C, 130°C e 160°C). Após a secagem, avaliou-se a liberação de células nas soluções tampão após 60, 120 e 180 minutos. As contagens mais baixas (10^2 e 10^4 UFC/g) foram no pH 4,5 em todos os tempos, ou seja, as partículas não solubilizaram nesse pH; em pH 6,0 as contagens ficaram entre 10^5 e 10^7 UFC/g. As contagens mais altas foram do pH 7,5, variando entre 10^6 e 10^8 UFC/g, sendo que a maior concentração de células viáveis foi nas micropartículas secas a 110°C, concluindo que a utilização da inulina e do acetato ftalato celulose é viável, pois as partículas apresentaram um perfil de liberação controlada.

A técnica de *spray drying* é uma das mais comumente empregadas na microencapsulação de probióticos, entretanto, o efeito do uso de temperaturas elevadas no processo de evaporação na diminuição da viabilidade de probióticos encapsulados deve ser estudado. Essas temperaturas são a causa mais provável para a sobrevivência insatisfatória. A mortalidade das bactérias começa a ocorrer durante o processo de secagem e continua durante o armazenamento. É conhecido que uma série de condições devem ser cumpridas para proteger os probióticos durante a secagem e o armazenamento, como a temperatura e tempo de secagem, pois são sensíveis à temperatura e a mortalidade é proporcional ao tempo de exposição, portanto, o tempo de aquecimento deve ser o mais curto possível. O material de parede funciona como uma barreira contra ambientes agressivos e pode aumentar a estabilidade, especialmente no trato gastrointestinal, e no armazenamento, pois os probióticos devem ser protegidos do calor, oxigênio, luz e umidade (CHÁVEZ & LEDEBOER, 2007).

A técnica de *spray drying* foi utilizada por Fritzen-Freire et al. (2012) para microencapsular *Bifidobacterium* BB-12 em soluções compostas por leite reconstituído desnatado (LRD) com inulina, LRD com oligofrutose e inulina, e LRD com oligofrutose para avaliar o efeito da adição de prebióticos na viabilidade do probiótico após secagem e durante armazenamento a 4°C e -18°C. A temperatura de entrada no equipamento (*inlet*) foi 150°C. Após 180 dias, todas as partículas apresentaram quantificação de células viáveis acima de 6 log UFC/g. Este fato sugere que a inulina teve um efeito positivo na proteção das bifidobactérias durante o processo de encapsulação, provavelmente porque atuou como um termoprotetor para as células submetidas ao processo de secagem.

Nunes et al. (2015) citam de uma maneira geral os estudos conduzidos neste âmbito, mostrando que a proteção das células através do método de *spray drying*, é função da cepa utilizada, temperaturas de entrada e saída no equipamento e do tipo de agente encapsulante. Dentre os agentes encapsulantes utilizados nesse processo, os

termoprotetores vêm sendo indicados para melhorar viabilidade das culturas probióticas (BURGAIN et al., 2011). Alguns compostos com propriedades termoprotetoras já foram relatados, como: trealose, leite desengordurado, amido granular, combinações com prebióticos e proteína de soro de leite (CRITTENDEN et al., 2001; DESMOND et al., 2002).

Penhasi (2015) avaliou a aplicação de polímeros inteligentes (polímeros sensíveis que possuem capacidade de se regenerar uma vez que danificados) na formulação de microencapsulação de bactérias probióticas para a fórmula infantil em pó reconstituída a 70°C. Foi elaborada uma micropartícula de camada dupla contendo hidroxipropilmetilcelulose (HPMC) como uma camada interna e externa, e uma camada de revestimento inteligente, baseada numa combinação de hidroxipropilcelulose (HPC) e de um gel termorreversível. A proteção proporcionada pela camada de revestimento inteligente é o resultado da formação de gel do polímero após exposição à alta temperatura, que impede ainda mais a penetração de água quente, conseqüentemente, protegendo as bactérias durante a exposição à água a 70°C.

As micropartículas foram misturadas com fórmula infantil em pó reconstituída com água pré-aquecida a 70°C e agitada durante 5 min, sendo posteriormente resfriada a 40°C e a viabilidade das bactérias foi determinada após atingir essa temperatura. Os resultados mostraram que a microencapsulação forneceu às bactérias proteção superior em água a 70°C, resultando em contagens de células viáveis de $7,1 \times 10^{10}$ a $8,2 \times 10^{10}$ UFC/g, e também que esse polímero se dissolve imediatamente após resfriamento e as bactérias são totalmente libertadas. Isso ocorre porque o polímero forma um gel que faz com que a espessura da camada de revestimento aumente e se desintegre de uma só vez imediatamente após o resfriamento. Portanto, a desintegração das micropartículas é muito mais rápida, tornando as micropartículas com probióticos adequadas para produtos submetidos a tratamento térmico em pelo menos uma fase de sua preparação (PENHASI, 2015).

3.5 Bactérias termorresistentes em fórmulas infantis

Em 2004, a *Food and Agriculture Organization* (FAO) e a *World Health Organization* (WHO) reuniram especialistas para discutir sobre *Enterobacter sakazakii* e outros microrganismos de interesse em fórmula infantil em pó, pela necessidade de fornecer uma alimentação segura a todas as crianças. O escopo do encontro foi doenças em bebês (<1 ano) ligadas a microrganismos (ou suas toxinas) associados à fórmula infantil em pó.

Em 2007, *E. sakazakii* foi reclassificado como *Cronobacter* spp. O novo gênero é composto por 6 espécies: *Cronobacter sakazakii*; *C. turicensis*; *C. malonaticus*; *C.*

muytjensii e *C. dublinensis*. *Cronobacter* spp. são sinônimos de *E. sakazakii* e, portanto, essa nomenclatura aparecerá no trabalho pois algumas referências foram publicadas antes dessa alteração.

A bactéria é gram-negativa, móvel, em forma de bastonete, não formadora de esporos e cresce em condições aeróbicas e anaeróbicas. É considerado um patógeno oportunista, encontrado comumente no ambiente e nos alimentos. Os compostos semelhantes à enterotoxina são produzidos por algumas cepas (FAO/WHO, 2004)

Breeuwer et al. (2003) realizaram um estudo para demonstrar que *E. sakazakii* não é particularmente termotolerante, mas pode se adaptar ao estresse osmótico e seco. A resistência de sobrevivência à temperatura e/ou calor de uma bactéria são quantificadas pelos parâmetros de resistência térmica valores D e Z (STUMBO, 1973). O valor D é definido como o intervalo de tempo que ocasiona uma redução de 10 vezes (ou 1 ciclo logarítmico) na população de um microrganismo, e é função da temperatura, isto é, determina-se um valor D para cada temperatura. O valor Z é o intervalo de temperatura que ocasiona uma variação de 10 vezes (ou 1 ciclo logarítmico) no valor D. Os D e Z não são aplicáveis somente para representar a resistência térmica dos microrganismos. São encontradas na literatura, valores de resistência térmica para componentes nutricionais e relacionados à qualidade, como teor de vitaminas grau de cozimento do produto.

No estudo de Breeuwer et al. (2003) foi determinado o valor $D_{58^{\circ}\text{C}}$ para a fase estacionária de *E. sakazakii* em cinco ensaios independentes e variou de 0,39 a 0,60 min com um valor médio de 0,48, e o valor z de 3,1 e 3,6°C, respectivamente; o tratamento térmico na fórmula infantil reconstituída não influenciou o valor D. Os valores D de outras Enterobacteriaceae variaram de 0,1 a 0,9 a 58°C. Apenas *Salmonella* e *Escherichia coli* foram mais resistentes (2,4 e 1,2 min a 60°C, respectivamente). Os valores de D encontrados no trabalho indicaram que *E. sakazakii* não é particularmente termorresistente, entretanto, o estudo demonstrou que a fase estacionária *E. sakazakii* é relativamente resistente a temperaturas elevadas (45°C) e a capacidade de crescer até 47°C fornece uma vantagem competitiva em ambientes secos, como encontrado em fábricas de leite em pó, e assim aumenta o risco de contaminação pós-pasteurização no produto acabado.

Estudo realizado por Edelson-Mammel & Buchanan (2004) determinou a resistência térmica de *E. sakazakii* e avaliou o efeito da hidratação com água em diferentes temperaturas. O ensaio térmico para determinação da resistência térmica foi feito com a cultura a aproximadamente 10^8 UFC/ml. A cepa mais resistente ao calor a 58°C foi determinada em cinco temperaturas (56, 58, 60, 65 e 70°C) para calcular o valor z, que foi de 5,6°C.

Para avaliar o efeito da hidratação com água, um teste foi realizado reidratando a fórmula infantil em pó contendo a cepa a um nível de aproximadamente 10^6 UFC/ml de fórmula quando reidratada em mamadeiras individuais, onde nenhuma inativação ocorreu com água a 50°C , 1-D de inativação foi observada com 60°C , e 4-D ou mais de inativação foi observada com a temperatura da água acima de 70°C . Os resultados do estudo atual indicam que uma abordagem alternativa é reidratar a fórmula infantil em pó com o uso de água a uma temperatura de 70°C ou mais. Considerando que os níveis de *E. sakazakii* observados na fórmula infantil em pó foram geralmente de 1 UFC/100g de fórmula desidratada ou menos, um tratamento 4-D garantiria que uma porção não conteria essa bactéria entérica (EDELSON-MAMMEL & BUCHANAN, 2004).

Iversen, Lane & Forsythe (2004) avaliaram a temperatura de crescimento de *E. sakazakii* a 10^4 em fase estacionária incubados entre 37 e 47°C . A leitura foi realizada em espectrofotômetro após 24 e 48h; todas as cepas cresceram a 37 e 44°C após 24h; nenhum crescimento foi observado a 47°C após 24h. As taxas de crescimento específicas foram medidas nos meios microbiológicos não seletivos com temperaturas que variaram de 6 a 49°C ; todas as cepas cresceram entre 6 e 45°C , sendo a temperatura ótima entre 37 e 43°C . A resistência térmica foi determinada em temperatura de banho entre 54 e 62°C e o tempo necessário em cada temperatura para que a contagem diminuísse 1 ciclo log (valor D) foi determinado comparando o número de sobreviventes em relação ao tempo, usando análise de regressão linear. O valor z (aumento da temperatura exigido para o valor D reduzir 10x) foi determinado analisando a melhor linha de ajuste do valor $\log_{10}D$ em relação à temperatura. Os resultados estabeleceram valor $D_{54^\circ\text{C}}$ na faixa de 10,2 a 16,4 minutos e valor $D_{62^\circ\text{C}}$ na faixa de 0,2 a 0,4 minutos. O valor z médio foi de $5,7^\circ\text{C}$. Esses valores são similares ao de outras enterobactérias, como *Salmonella* em leite em pó reconstituído. Usando o tempo de redução decimal para o microrganismo a 60°C de 1,1 min e o valor z de $5,7^\circ\text{C}$, é previsível que o tempo de redução decimal em $71,2^\circ\text{C}$ seja 0,7s. Logo, o processo de pasteurização rápida ($71^\circ\text{C}/15\text{s}$) resultará em uma redução de 21 log na contagem viável do organismo. A Tabela 3 resume os valores de valor D e z de *E. sakazakii* determinados em fórmulas infantis em pó, citados anteriormente.

O tratamento térmico é indicado como objetivo de reduzir os riscos associados a essa bactéria na fórmula infantil em pó. O uso eficaz de tratamentos térmicos requer informações precisas sobre a resistência térmica do microrganismo alvo, sendo suficiente para inativá-lo enquanto os nutrientes são preservados. Embora a resistência térmica do *E. sakazakii* seja maior do que alguns patógenos entéricos, tem sido relatado ser menos resistente que *Listeria monocytogenes*. Pasteurização padrão têm sido relatadas como eficazes para a destruição de *E. sakazakii* (EDELSON-MAMMEL; BUCHANAN, 2004;

IVERSEN; LANE; FORSYTHE, 2004). Na Tabela 3 pode ser visto uma listagem dos valores D e z.

Tabela 3. Valor D e z de *E. sakazakii* em fórmulas infantis em pó.

Valor D (min)							Valor z	Referência	
53°C	54°C	56°C	58°C	60°C	62°C	65°C 70°C	(°C)		
8,3	6,4	1,1	0,27				3,1	Breeuwer et al.,2003a	
20,2	7,1	2,4	0,34				3,6		
			0,4						
			0,48						
			0,50						
		21,1	9,9	4,4		0,6	0,07	5,6	Edelson-Mammel & Buchanan, 2004b
		±2,7	±0,8	±0,4		±0,3			
	16,4	5,1	2,6	1,1	0,3			5,8	Iversen et al., 2004c
	±0,67	±0,27	±0,48	±0,11	±0,12			±0,40	
	11,7	3,9	3,8	1,8	0,2			5,7	Iversen et al., 2004d
	±5,80	±0,06	±1,95	±0,82	±0,11			±0,12	

Fonte: Adaptado de FAO/WHO, 2006.

a Valores de D em 4 diferentes cepas de *E. sakazakii* determinadas em tampão fosfato.

b Valor D para cepa caracterizada como a mais resistente ao calor das examinadas no estudo.

c Dados da cepa de *E. sakazakii*.

d Dados da cepa encapsulada de *E. sakazakii*

Esses trabalhos foram discutidos no encontro dos especialistas da FAO e WHO, onde algumas recomendações à FAO, OMS, Codex, e seus países membros foram feitas, como a de utilizar fórmulas que tenham sido submetidas a um procedimento eficaz de descontaminação (a reconstituição com água quente ou aquecimento da fórmula reconstituída), mesmo sendo reconhecido que ainda existem faltas de dados científicos relacionados a *E. sakazakii* em fórmula infantil, como fontes e fatores contribuintes associados a surtos e casos esporádicos de doença, ecologia, taxonomia, características e virulência (FAO/WHO, 2004).

A Anvisa divulgou quatro Resoluções - RDC n.43, n.44, n.45, e n.46, onde foram estabelecidos critérios específicos de identidade, composição, qualidade e segurança de fórmulas infantis, bem como requisitos de rotulagem para esses produtos, e entre eles a obrigatoriedade de informar, no rótulo, que o produto deve ser reconstituído com água fervida e posteriormente resfriada a temperatura não inferior a 70°C. Esse critério foi adotado com base nas diretrizes da FAO/WHO, referenciadas no Código de Práticas de Higiene para Fórmulas Infantis em Pó para Lactentes e Crianças de Primeira Infância do *Codex Alimentarius* (CAC/RCP 66 – 2008). O rótulo também deve informar o tempo médio de espera após a fervura para atingir a temperatura de diluição de 70°C e instruções sobre a importância de testar a temperatura da fórmula antes de administrá-la, evitando queimaduras.

O documento do *Codex Alimentarius* reconhece que em certas situações, como quando há alta confiança na qualidade microbiológica do produto e adesão às boas práticas na preparação, manejo e uso da fórmula, ou quando há componentes termossensíveis na fórmula, estratégias alternativas de manejo do risco estão disponíveis para a temperatura de diluição de 70°C, recomendada pela FAO/OMS (ANVISA, 2014; EDELSON-MAMMEL & BUCHANAN, 2004).

Em relação a não viabilidade dos probióticos na temperatura de diluição recomendada, entende-se que um requisito voltado para a segurança de fórmulas infantis não pode ser ignorado com o intuito de permitir a adição de um ingrediente opcional nesses produtos (ANVISA, 2014).

A Agência Francesa para a Segurança Alimentar (Agence Française de Sécurité des Produits Alimentaires – AFSSA, 2003) recomenda que o rótulo das fórmulas infantis com probióticos contenha instruções de preparo, armazenamento e aquecimento específicos para garantir a sobrevivência do número de microrganismo desejável até o momento do consumo, e deve ser claramente indicado que o aquecimento excessivo causa a morte de probióticos e, portanto, o desaparecimento dos efeitos associados à sua presença. A indicação é preparar a fórmula com água à temperatura ambiente (CHERBUT et al., 2003).

A Health Canada (2015) orientou o uso de água resfriada a 70°C para bebês de maior risco (bebês prematuros e com baixo peso ao nascer com menos de dois meses de idade ou bebês imunocomprometidos), e informou que também é seguro preparar fórmulas infantis com água à temperatura ambiente (37°C) após ter sido fervida, se a fórmula for consumida imediatamente após a preparação.

O Food and Drug Administration publicou em setembro de 2016 o guia “Rotulagem de Fórmula Infantil: Orientação para Indústria”, onde sob o título “Instruções para Preparação e Uso” informou que este deve conter, para fórmula infantil, o peso e o volume da fórmula em pó a ser reconstituída, sem nenhuma informação sobre temperatura de reconstituição e tipo de água a ser utilizada.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

4.1.1 Preparo das micropartículas

Cultura probiótica liofilizada de *Limosilactobacillus reuteri* LRE 02 (DSM 23878)
(Probiotical - Itália)
Caldo MRS (Merck)
Cloreto de sódio - NaCl (Synth)
Fórmula infantil Aptamil® (Danone)
Leite em pó desnatado (Piracanjuba)

4.1.2 Avaliação da viabilidade e determinação *in vitro* da resistência a digestão gastrointestinal da cultura probiótica

Caldo MRS (Merck)
Ágar MRS (Merck)
Cisteína (Inlab)
Peptona (Difco)
Sais biliares (Inlab)
Ácido clorídrico - HCl (Synth)
Hidróxido de sódio - NaOH (Synth)
Cloreto de sódio - NaCl (Synth)
Fosfato de sódio bibásico - Na₂HPO₄ (Dinâmica)
Fosfato monopotássico - KH₂PO₄ (Inlab)
Pepsina (Inlab)
Gerador de anaerobiose (Prolab)

4.2 Métodos

4.2.1 Seleção e preparo da cultura probiótica

A cultura selecionada para esse estudo foi *Limosilactobacillus reuteri*, pois é uma das bactérias presentes no leite materno, apresenta consumo seguro para lactentes e é comercialmente disponível para suplementação infantil na forma de probiótico.

Uma quantificação inicial da cultura foi feita previamente para analisar qual seria o melhor tempo de incubação para o microrganismo apresentar crescimento favorável para ser exposto à secagem por atomização em *spray dryer*. Foram inoculados 1% do

microrganismo em caldo MRS e a incubação feita à 37°C. As contagens foram feitas após 18 e 24h de incubação.

Após a determinação do melhor tempo de incubação da cultura, a cepa de *Limosilactobacillus reuteri* liofilizada foi ativada duas vezes em caldo MRS 0,1% v/v e incubada a 37°C/18 horas. Após o crescimento, o meio fermentado foi fracionado em tubos estéreis e centrifugados a 4677xg (6000 rpm) a 4°C/12 minutos. O sobrenadante foi descartado e o precipitado lavado com solução salina (0,85%) e centrifugado novamente. Esse procedimento foi realizado duas vezes. Esse concentrado celular foi disperso nas soluções encapsulantes.

4.2.2 Ensaios para seleção dos materiais encapsulantes e temperaturas de entrada do equipamento (*spray dryer*)

Foram avaliados dois tipos de material encapsulante em duas temperaturas de entrada, conforme a Tabela 4.

Tabela 4. Materiais encapsulantes e temperaturas de entrada avaliados nos ensaios preliminares.

Material encapsulante	Critério de seleção (<i>inlet</i>)
Leite desnatado reconstituído à 20%	130°C
	170°C
Fórmula infantil à 20%	130°C
	170°C

Os ensaios foram realizados em triplicata.

Nestes ensaios após a produção das micropartículas, as mesmas foram acondicionadas em frascos de vidro e vedados com parafilm, e estocadas na temperatura de 4°C por 140 dias.

4.2.3 Preparo do material encapsulante

Leite desnatado em pó e fórmula infantil, ambas na concentração de 20%, foram diluídos em água destilada e autoclavados a 112°C por 10 minutos para serem avaliados como soluções encapsulantes (material de parede).

4.2.4 Produção das micropartículas

A produção de micropartículas seguiu o mesmo procedimento nos ensaios preliminares e nos demais. Para o processo de microencapsulação, o concentrado celular obtido no item 4.2.2 foi adicionado às soluções encapsulantes preparadas como descrito no item 4.2.4 e submetidos a secagem no *spray dryer* (B290, Büchi, Suíça) com bico

atomizador intermediário de 1,5 mm de diâmetro) com temperatura de entrada nos ensaios preliminares descritas acima. Após a produção as micropartículas foram acondicionadas em frascos

Após a seleção do material e temperaturas mais adequadas para o processo de microencapsulação, o concentrado celular foi adicionado à solução encapsulante selecionada e submetidos a secagem no *spray dryer* na temperatura também selecionada previamente. A temperatura de saída foi controlada através dos parâmetros *aspirator* (aspiração) e *pump* (bomba). O monitoramento dessa temperatura foi feito por um termopar conectado ao módulo de aquisição de dados *myPCLab* (Figura 2), cujo software supervisor permitiu acompanhamento em tempo real da temperatura de saída do produto do *spray* bem como armazenamento de seus dados para posterior análise. O acompanhamento do perfil da temperatura de saída em processos de secagem em *spray dryer* não é uma técnica usualmente praticada em estudos de secagem, mas é de grande valia, pois permite checar a reprodutibilidade dos ensaios quanto à manutenção da temperatura entre as replicatas, e/ou checar a influência da ocorrência de oscilações de temperaturas nos resultados de viabilidade obtidos. O presente trabalho apresenta o perfil de temperatura de saída de cada replicata, bem como a média e desvio padrão de cada ensaio para discussão deste item.

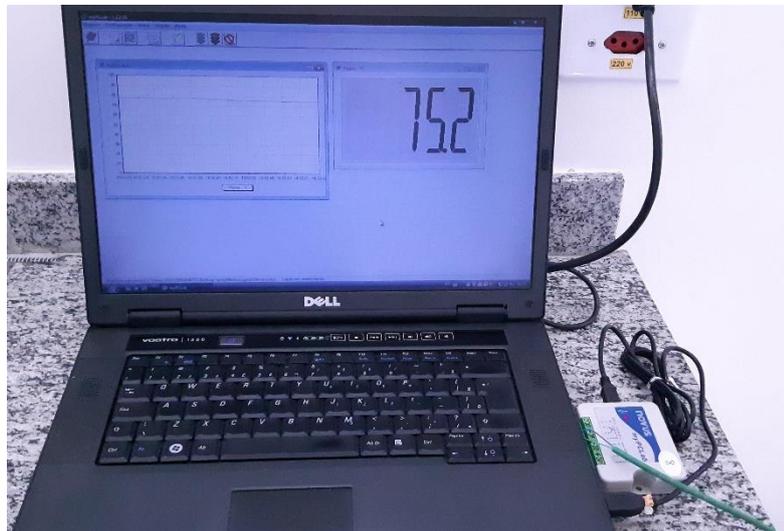
As micropartículas obtidas nestes experimentos finais foram acondicionadas em frascos adequados, vedados com parafilm e estocadas nas temperaturas 4 e 25°C.



Mini spray dryer Buchi B-290 e o termopar conectado ao computador para monitorar temperatura de saída.



Termopar acoplado ao equipamento.



Software e módulo de aquisição de dados *myPCLab*.

Figura 2. Monitoramento da temperatura de saída.

4.2.5 Eficiência da encapsulação

A eficiência de encapsulação (EE%) é a porcentagem de células viáveis na micropartícula após o processo de microencapsulação. É calculada utilizando a seguinte equação (1) (ETCHEPARE et al., 2020).

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

EE = eficiência da encapsulação em %.

*N*₀ = número de células viáveis na matriz encapsulante antes da secagem.

N = número de células viáveis no pó.

4.2.6 Caracterização física das micropartículas

O diâmetro médio e as distribuições de tamanho das micropartículas secas com fórmula infantil e leite desnatado foram determinados por difração a laser no analisador de tamanho de partícula LV950-V2 (Horiba, Kyoto, Japão). Para essa análise, as amostras foram dispersas em etanol absoluto, sendo adicionadas à câmara de amostras do equipamento até atingir os índices de transmitância adequados para a realização de leitura.

O tamanho médio de partícula foi expresso com o diâmetro médio (D50) e o índice de polidispersidade (span) foi obtida pela equação (2).

$$Span = (D90 - D10/D50) \quad \text{Eq (2)}$$

Onde D10, D50, D90 correspondem ao diâmetro da distribuição acumulada de 10, 50 e 90 % da população.

As morfologias e microestruturas das amostras foram avaliadas por microscopia ótica.

4.2.7 Avaliação da viabilidade de *Limosilactobacillus reuteri*

Para a contagem das células viáveis de *L. reuteri* nas micropartículas 1g das micropartículas foram reidratadas durante 30 minutos em 9 ml de água peptonada 0,1% à temperatura ambiente, de acordo com metodologia proposta por Picot et al. (2004), seguindo para diluição seriada e plaqueamento pela técnica *drop plate* (gotejamento) em ágar MRS e incubação em anaerobiose à 37°C/72h.

Após o procedimento das contagens, colônias desenvolvidas no meio foram isoladas e caracterizadas quanto à morfologia, observada em microscópio Zeiss com objetiva 100x e ocular 10x, metodologia descrita em HARRIGAN (1998).

4.2.8 Determinação da umidade e atividade de água

A umidade foi determinada por secagem direta em estufa a 105°C, conforme metodologia do Instituto Adolfo Lutz (ZENEBO; ASCUET; TIGLEA, 2008).

A atividade de água (a_w) foi determinada por meio de medidor de atividade de água digital (AquaLab®) logo após as amostras serem recolhidas do *spray dryer*.

4.2.9 Procedimento de reconstituição do pó na temperatura de 70°C e avaliação da resistência térmica do probiótico

Para a reconstituição do produto à 70°C, 2,5g das micropartículas foram adicionadas à 25g fórmula infantil e homogeneizadas em um frasco tipo *schott*. Após adicionou-se 150 ml de água à 70°C e resfriada em torneira com água corrente até atingir

43°C (temperatura de mamadeira). A temperatura do líquido durante sua homogeneização foi monitorada por um sensor de temperatura tipo termopar inserido ao *schott* através de uma rolha de silicone acoplada na sua tampa cujo sinal foi acompanhado em e registrado em tempo real pelo módulo de aquisição de dados *myPCLab*. A Figura 3 ilustra algumas etapas desse processo.

Para avaliar a resistência térmica do probiótico, após a reconstituição do produto à 70°C, foi realizada uma diluição seriada e plaqueamento pela técnica *pour plate* em ágar MRS e incubação em anaerobiose à 37°C/72h, para quantificação das células viáveis de *L. reuteri*.

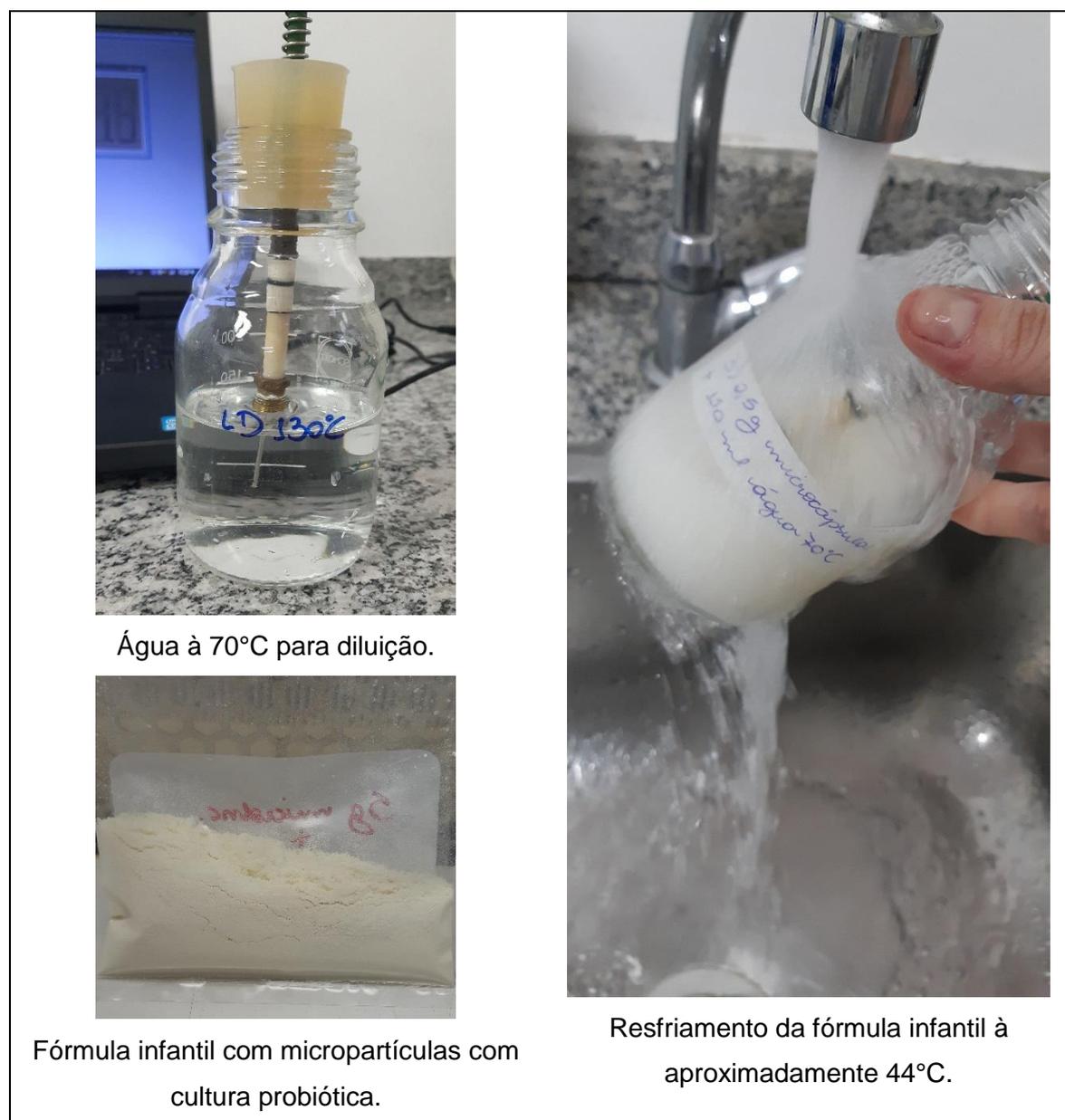


Figura 3. Procedimento de reconstituição da fórmula infantil com micropartículas com cultura probiótica.

4.2.10 Determinação *in vitro* da resistência da cultura probiótica a digestão gastrintestinal

A tolerância ao trato gastrointestinal foi determinada conforme descrito por Mortazavian et al. (2008) com algumas adaptações. Os microrganismos microencapsulados foram expostos, após a diluição à 70°C, a uma simulação de solução gástrica (pH 2,0) e intestinal (pH 7,5) sucessivamente.

O suco gástrico simulado foi preparado com ácido clorídrico e pepsina, ajustando o pH para 2,0 com NaOH 1N. A solução intestinal simulada foi preparada por dispersão de sais biliares em tampão fosfato 0,1M pH 7,5.

Adicionou-se 1ml do produto probiótico a tubos contendo 9ml de solução gástrica e incubou-se em banho de água à 37°C por 30 minutos; em seguida, 1 ml desta mistura foi transferida para tubos contendo 9ml de solução intestinal e incubamos em banho de água à 37°C por 60 minutos, seguindo para diluição seriada e plaqueamento pela técnica *drop plate* (gotejamento) em ágar MRS e incubação em anaerobiose à 37°C/72h.

4.2.11 Estabilidade das micropartículas em diferentes condições de estocagem

A estabilidade das micropartículas durante a estocagem foi avaliada pela taxa de sobrevivência, parâmetro que mensura o número de células viáveis durante o armazenamento e é calculado pela relação mostrada na Equação (3) (BAO et al., 2010).

$$TS\% = (\log N / \log N_0) \cdot 100 \quad \text{Eq (3)}$$

TS = taxa de sobrevivência%.

*N*₀ = número de células viáveis no pó antes do armazenamento.

N = número de células viáveis no pó.

As micropartículas dos ensaios preliminares foram armazenadas à 4°C, durante 140 dias, em vidro fechado hermeticamente; as micropartículas dos ensaios finais foram armazenadas à 4 e 25°C, durante 60 dias, em porções de 1,5g em tubos criogênicos e vedados com parafilm.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Ensaios preliminares

5.1.1 Quantificação de *L. reuteri* e eficiência da encapsulação

A Tabela 5 apresenta a quantificação de *L. reuteri* nas micropartículas utilizando leite desnatado e fórmula infantil como materiais encapsulantes e temperaturas de entrada (inlet) no spray de 130 e 170° C. A eficiência da encapsulação dos processos empregando estas condições também foi determinada e os resultados constam na mesma tabela.

Tabela 5. Quantificação de *L. reuteri* e eficiência da encapsulação.

		Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/g ¹)					
		LD 20% ²			FI 20% ³		
		Inicial	Temperatura de entrada		Inicial	Temperatura de entrada	
130°C	170°C		130°C	170°C			
Ensaio 01	A	1,03E+12	3,40E+10	2,20E+10	3,90E+12	2,62E+10	2,20E+10
	B	8,70E+11	2,96E+10	2,58E+10	4,70E+12	2,10E+10	2,34E+10
	C	9,60E+11	2,44E+10	2,30E+10	4,30E+12	2,38E+10	2,64E+10
	Média	9,53E+11	2,93E+10	2,36E+10	4,30E+12	2,37E+10	2,39E+10
	LOG	11,98	10,47	10,37	12,63	10,37	10,38
	EE (%) ⁴		87,38	86,59		82,12	82,15
Ensaio 02	A	1,17E+11	2,46E+09	1,96E+09	1,18E+11	2,42E+09	2,14E+09
	B	1,25E+11	1,94E+09	2,06E+09	1,31E+11	2,04E+09	1,96E+09
	C	1,24E+11	2,20E+09	2,20E+09	1,13E+11	2,64E+09	1,94E+09
	Média	1,22E+11	2,20E+09	2,07E+09	1,21E+11	2,37E+09	2,01E+09
	LOG	11,09	9,34	9,32	11,08	9,37	9,30
	EE (%) ⁴		84,27	84,04		84,59	83,96
Ensaio 03	A	1,05E+11	3,14E+09	2,02E+09	1,14E+11	2,26E+09	1,90E+09
	B	1,08E+11	3,24E+09	2,10E+09	1,20E+11	2,48E+09	1,84E+09
	C	1,09E+11	2,80E+09	2,16E+09	1,12E+11	2,12E+09	1,76E+09
	Média	1,07E+11	3,06E+09	2,09E+09	1,15E+11	2,29E+09	1,83E+09
	LOG	11,03	9,49	9,32	11,06	9,36	9,26
	EE (%) ⁴		85,99	84,50		84,61	83,74

UFC/g¹: unidade formadora de colônia por grama do pó.

LD 20%²: micropartículas de leite desnatado reconstituído 20%.

FI 20%³: micropartículas de fórmula infantil reconstituída 20%.

EE (%)⁴: eficiência da encapsulação.

Como pode-se observar os valores obtidos nos ensaios utilizando leite desnatado como material encapsulante variaram entre 84,27 e 87,38% quando secos à 130°C, e 84,04

e 86,59 quando secos à 170°C, mantendo uma média bem similar. Utilizando a fórmula infantil variaram entre 82,12 e 84,61% quando secos à 130°C, e 82,15 e 83,96% quando secos à 170°C, valores ligeiramente menores comparando com o leite desnatado.

As Tabelas 6 e 7 apresentam as taxas de sobrevivência durante o armazenamento de 140 dias das micropartículas que utilizaram leite desnatado e fórmula infantil como encapsulante, respectivamente.

Tabela 6. Taxa de sobrevivência de *L. reuteri* microencapsulado com leite desnatado 20% durante armazenamento a 4°C.

		Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/g ¹)					
		Temperatura de entrada					
		130°C			170°C		
		0 dias	75 dias	140 dias	0 dias	75 dias	140 dias
Ensaio 01	A	3,40E+10	3,60E+09	3,80E+09	2,20E+10	1,80E+09	8,80E+08
	B	2,96E+10	3,40E+09	5,40E+09	2,58E+10	1,80E+09	1,00E+09
	C	2,44E+10	2,40E+09	2,40E+09	2,30E+10	1,80E+09	9,60E+08
	Média	2,93E+10	3,13E+09	3,87E+09	2,36E+10	1,80E+09	9,47E+08
	LOG	10,47	9,50	9,59	10,37	9,26	8,98
	TS (%) ²		90,72	91,59		89,23	86,53
Ensaio 02	A	2,46E+09	3,10E+09	1,60E+09	1,96E+09	2,20E+09	2,10E+09
	B	1,94E+09	3,00E+09	1,50E+09	2,06E+09	1,80E+09	2,20E+09
	C	2,20E+09	2,80E+09	1,80E+09	2,20E+09	2,00E+09	2,00E+09
	Média	2,20E+09	2,97E+09	1,63E+09	2,07E+09	2,00E+09	2,10E+09
	LOG	9,34	9,47	9,21	9,32	9,30	9,32
	TS (%) ²		101,39	98,62		99,83	100,06
Ensaio 03	A	3,14E+09	9,60E+08	9,80E+08	2,02E+09	8,80E+08	6,40E+08
	B	3,24E+09	6,40E+08	1,10E+09	2,10E+09	9,40E+08	8,00E+08
	C	2,80E+09	8,20E+08	9,20E+08	2,16E+09	8,40E+08	7,20E+08
	Média	3,06E+09	8,07E+08	1,00E+09	2,09E+09	8,87E+08	7,20E+08
	LOG	9,49	8,91	9,00	9,32	8,95	8,86
	TS (%) ²		93,90	94,88		96,00	95,03

UFC/g¹: unidade formadora de colônia por grama.

TS (%)²: taxa de sobrevivência.

Tabela 7. Taxa de sobrevivência de *L. reuteri* microencapsulado com fórmula infantil 20% durante armazenamento a 4°C.

		Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/g ¹)					
		Temperatura de entrada					
		130°C			170°C		
		0 dias	75 dias	140 dias	0 dias	75 dias	140 dias
Ensaio 01	A	2,62E+10	1,60E+09	9,40E+08	2,20E+10	9,80E+08	2,60E+08
	B	2,10E+10	1,60E+09	8,40E+08	2,34E+10	1,00E+09	3,00E+08
	C	2,38E+10	1,70E+09	9,60E+08	2,64E+10	1,00E+09	3,60E+08
	Média	2,37E+10	1,63E+09	9,13E+08	2,39E+10	9,93E+08	3,07E+08
	LOG	10,37	9,21	8,96	10,38	9,00	8,49
	TS (%) ²		88,81	86,37		86,69	81,77
Ensaio 02	A	2,42E+09	8,60E+08	5,80E+08	2,14E+09	8,60E+08	7,00E+08
	B	2,04E+09	1,00E+09	7,00E+08	1,96E+09	9,80E+08	9,40E+08
	C	2,64E+09	9,60E+08	4,60E+08	1,94E+09	1,10E+09	6,20E+08
	Média	2,37E+09	9,40E+08	5,80E+08	2,01E+09	9,80E+08	7,53E+08
	LOG	9,37	8,97	8,76	9,30	8,99	8,88
	TS (%) ²		95,72	93,49		96,64	95,41
Ensaio 03	A	2,26E+09	8,00E+08	1,50E+08	1,90E+09	7,60E+08	5,80E+08
	B	2,48E+09	5,20E+08	1,50E+08	1,84E+09	5,00E+08	7,00E+08
	C	2,12E+09	7,00E+08	1,60E+08	1,76E+09	7,20E+08	6,00E+08
	Média	2,29E+09	6,73E+08	1,53E+08	1,83E+09	6,60E+08	6,27E+08
	LOG	9,36	8,83	8,19	9,26	8,82	8,80
	TS (%) ²		94,33	87,46		95,21	94,97

UFC/g¹: unidade formadora de colônia por grama.

TS (%)²: taxa de sobrevivência.

As taxas de sobrevivência no armazenamento durante 140 dias de *L. reuteri* microencapsulado à 130°C no leite desnatado variaram entre 90,72 e 101,39%, e à 170°C variaram entre 86,53 e 100%. A amostra com maior taxa, que foi seca com temperatura de entrada à 170°C, apresentou a mesma contagem desde o início, indicando estabilidade durante o armazenamento.

As micropartículas de fórmula infantil secas à 130°C tiveram taxa de sobrevivência entre 86,37 e 95,72%, e secas à 170°C variaram entre 81,77 e 96,64%. Quando se avaliou as repetições a 170°C também foi verificado estabilidade durante o armazenamento.

Os materiais encapsulantes e a temperatura de entrada apresentaram diferenças pequenas nas contagens e sobrevivência no armazenamento, assim outros parâmetros foram utilizados para a seleção, como atividade de água, umidade e tempo de secagem.

5.1.2 Atividade de água e umidade

A Tabela 8 apresenta os resultados das análises de atividade de água das micropartículas obtidas nos ensaios preliminares.

Tabela 8. Atividade de água e umidade das micropartículas obtidas nos ensaios preliminares.

		Atividade de água e umidade							
		LD 20% ¹				FI 20% ²			
		Temperatura de entrada (<i>inlet</i>)							
		130°C		170°C		130°C		170°C	
		Aw ³	U(%) ⁴	Aw ³	U(%) ⁴	Aw ³	U(%) ⁴	Aw ³	U(%) ⁴
Ensaio 1	A	0,2388	5,12	0,3616	7,51	0,1154	1,88	0,0632	1,45
	B	0,2423	5,06	0,3836	7,1	0,0973	1,91	0,0636	1,18
	C	0,2508	5,03	0,3752	7,11	0,1141	1,72	0,0694	1,28
	Média	0,2440	5,07	0,3735	7,24	0,1089	1,84	0,0654	1,30
	Desvio padrão	0,0062	0,0458	0,0111	0,2339	0,0101	0,1021	0,0035	0,1365
Ensaio 2	A	0,1186	3,61	0,2499	5,17	0,1368	2,08	0,1202	1,79
	B	0,1199	3,54	0,2493	5,3	0,1449	2,27	0,1242	2,52
	C	0,1242	3,56	0,2511	5,4	0,1508	1,87	0,1324	1,81
	Média	0,1209	3,57	0,2501	5,29	0,1442	2,07	0,1256	2,04
	Desvio padrão	0,0029	0,0361	0,0009	0,1153	0,0070	0,2001	0,0062	0,4158
Ensaio 3	A	0,1465	3,97	0,2163	4,77	0,09	1,44	0,1235	2,09
	B	0,1479	3,96	0,2126	4,8	0,0908	1,58	0,1193	1,7
	C	0,1621	3,92	0,2077	5,07	0,0947	1,61	0,1197	1,78
	Média	0,1522	3,95	0,2122	4,88	0,0918	1,54	0,1208	1,86
	Desvio padrão	0,0086	0,0265	0,0043	0,1652	0,0025	0,0907	0,0023	0,2060

LD 20%¹: micropartículas de leite desnatado reconstituído 20%.

FI 20%²: micropartículas de fórmula infantil reconstituída 20%.

Aw³: atividade de água.

U(%)⁴: umidade.

As culturas secas à 170°C com leite desnatado reconstituído apresentaram os maiores valores de a_w , sendo que no ensaio 2 esse valor ficou elevado (0,3735) comparando com os valores dos demais ensaios. Após essa secagem o filtro da saída de ar, que coleta as partículas residuais do ciclone, foi trocado, pois pode interferir na performance do equipamento. Os ensaios seguintes apresentaram uma a_w menor (entre 0,0654 e 0,2501). As formulações com fórmula infantil apresentaram valores menores de a_w em ambas temperaturas de entrada (130 e 170°C).

A_w abaixo de 0,25 indica estabilidade do produto desidratado, podendo prolongar a vida útil das bactérias probióticas microencapsuladas devido à limitação de água disponível para a multiplicação microbiana. Valores entre 0,11 e 0,23 impede morte celular durante armazenamento (CHÁVEZ & LEDEBOER, 2007; DIANAWATI et al., 2016).

As formulações com fórmula infantil apresentaram os menores valores de umidade, variando entre 1,30 e 2,07%. Algumas micropartículas com o leite desnatado como encapsulante apresentaram valores maiores que 5%, sobretudo as que foram secas com temperatura de entrada à 170°C. Para garantir a estabilidade dos produtos secos, uma umidade abaixo de 5% é desejada (ZENEBOON et al., 2008).

5.1.3 Monitoramento da temperatura de saída

A partir dos dados de temperatura de saída adquiridos pelo *software myPCLab*, foi possível elaborar gráficos para correlacionar as variações de temperaturas com os resultados das quantificações dos microrganismos e eficiência das encapsulações (valores de EE% da Tabela 5), além de verificar que os ensaios tiveram certa reprodutibilidade, pois o perfil de temperatura de saída foi semelhante. As figuras a seguir mostram a temperatura de saída das replicadas (ensaios 1, 2 e 3) dos processos de secagem em *spray dryer* do leite desnatado a 130 e 170°C (Figuras 4 e 5) e fórmula infantil (Figuras 6 e 7).

A Tabela 9 mostra as médias e desvios padrões (DP) das temperaturas de saída de cada replicata, com intuito de quantificar a oscilação representada graficamente nas Figuras 1 a 4. Considerando o valor médio da temperatura de saída de cada ensaio e respectivos desvios padrões, pode se verificar uma variação na temperatura baixa de saída do produto, de no máximo $\pm 3,4^\circ\text{C}$.

Tabela 9. Média e desvio padrão das temperaturas de saída dos ensaios de secagem.

	Monitoramento da temperatura de saída (<i>outlet</i>)							
	LD 20% ¹				FI 20% ²			
	Temperatura de entrada							
	130°C		170°C		130°C		170°C	
	Média	DP ³	Média	DP ³	Média	DP ³	Média	DP ³
Ensaio 1	75,9	1,73	77,1	1,66	77,4	3,19	77	0,94
Ensaio 2	78,9	5,69	75,9	1,59	77,6	1,02	76,7	1,3
Ensaio 3	77,2	3,36	77,1	1,72	76,7	0,75	77,8	1,35

LD 20%¹: micropartículas de leite desnatado reconstituído 20%.

FI 20%²: micropartículas de fórmula infantil reconstituída 20%.

DP³: desvio padrão.

No ensaio 2 de secagem na formulação de leite desnatado, a temperatura oscilou muito na formulação LD 130°C, levando a um maior valor do desvio padrão e a um menor valor de eficiência de encapsulação (EE2 = 84,27%) comparado aos valores dos ensaios 1 (EE1= 87,38%) e 2 (EE3 =85,99). Na secagem 2 do LD a 170°C ocorreu um pico de temperatura no final do ensaio, que não afetou significativamente o valor do desvio padrão, mas pode ter afetado a eficiência de encapsulação, que foi menor (EE2 = 84,04%) quando comparada aos ensaios 1 e 2 (EE1= 86,59%; EE3 =84,50).

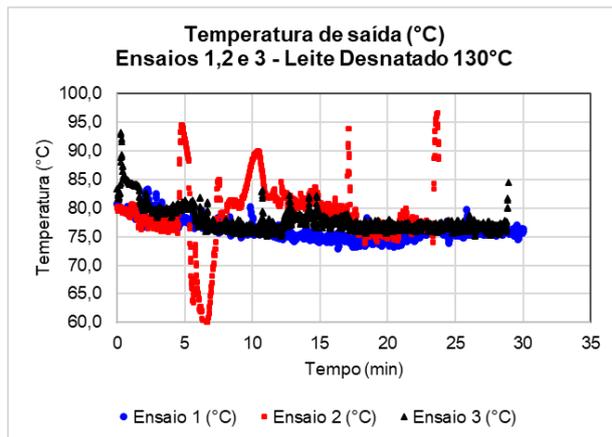


Figura 4. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de leite desnatado em spray dryer realizado a 130°C.

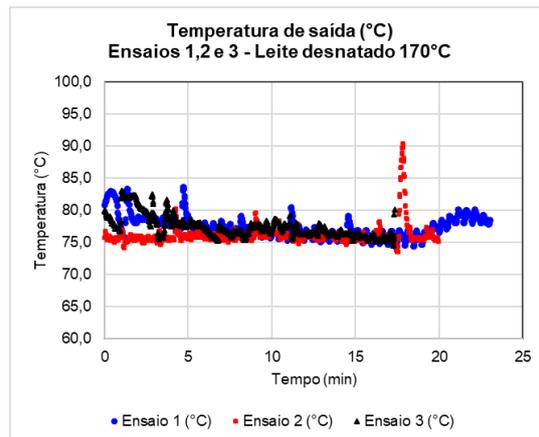


Figura 5. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de leite desnatado em spray dryer realizado a 170°C.

No ensaio E1 com a fórmula infantil a 130°C (Figura 4), que apresentou um pico de temperatura no final da secagem e maior desvio padrão também foi constatado menor valor da eficiência de encapsulação (EE1=82,12%), comparado com os demais ensaios da triplicata (EE2=84,59% e EE3 84,61%). No processo de secagem a 170°C com Fórmula infantil (Figura 5), as oscilações de temperatura não foram superiores a 1,5°C e a as eficiências de encapsulação variaram em no máximo 1,8% (82,15% no E1 a 83,96% no E2).

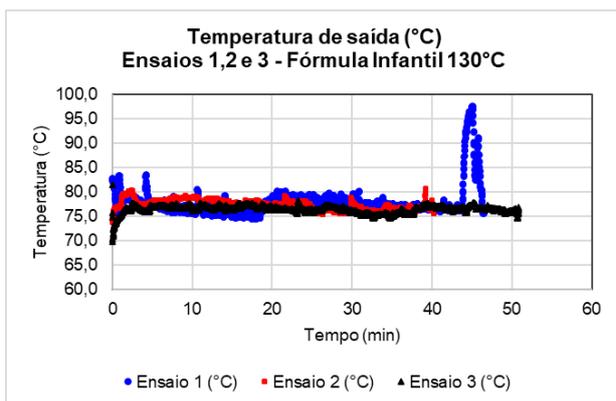


Figura 6. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de Fórmula Infantil em spray dryer realizado a 130°C.

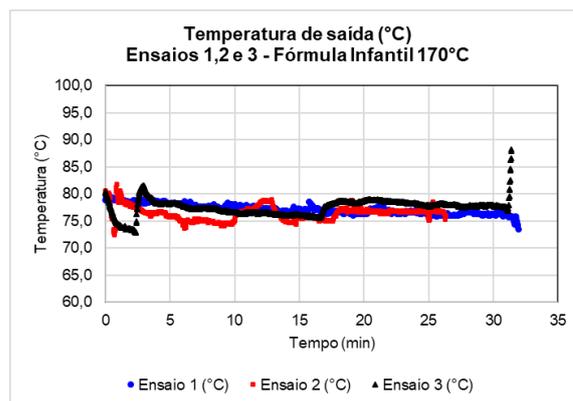


Figura 7. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de Fórmula Infantil em spray dryer realizado a 170°C.

As formulações que tiveram as temperaturas de saída que menos oscilaram e com os menores valores de desvio padrão foram as secas com temperatura de entrada à 170°C, tanto com leite desnatado quanto fórmula infantil.

Considerando a quantificação dos probióticos, ambos materiais encapsulantes demonstraram proteger o microrganismo do calor durante a secagem e no armazenamento. As microencapsulações que utilizaram fórmula infantil como material de parede apresentaram menor umidade e atividade de água.

A temperatura de entrada apresentou pequenas diferenças entre 130 e 170°C na sobrevivência do microrganismo. A temperatura de saída controlada para ficar próximo a 75°C demonstrou ter maior influência na sobrevivência dos microrganismos. De uma maneira geral também pôde-se correlacionar pelos levantamentos descrito anteriormente que variações nas temperaturas de saída afetam a eficiência de encapsulação, inferindo que o monitoramento e controle desta temperatura é um parâmetro importante a ser considerado processo de encapsulação.

Avaliando todos os parâmetros e resultados obtidos, a fórmula infantil foi escolhida como material encapsulante e a temperatura de entrada de 170°C e manter a temperatura de saída em 75°C.

5.2 Ensaios Finais

5.2.1 Quantificação de *L. reuteri* e eficiência da encapsulação

A Tabela 10 apresenta a quantificação de *L. reuteri* e a eficiência da encapsulação após a secagem utilizando fórmula infantil como material encapsulante e com temperatura de entrada de 170°C no *spray dryer*.

Tabela 10. Quantificação de *L. reuteri* e eficiência da encapsulação.

Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/g ¹)			
Micropartículas de fórmula infantil 20%			
		Inicial	170°C
Ensaio 01	A	6,40E+12	4,06E+11
	B	7,20E+12	4,00E+11
	C	6,20E+12	3,92E+11
	Média	6,60E+12	3,99E+11
	LOG	12,82	11,60
	EE (%) ²		90,50
Ensaio 02	A	6,00E+12	4,00E+11
	B	8,80E+12	4,04E+11
	C	7,20E+12	4,28E+11
	Média	7,33E+12	4,11E+11
	LOG	12,87	11,61
	EE (%) ²		90,27
Ensaio 03	A	5,80E+12	4,12E+11
	B	8,00E+12	3,96E+11
	C	6,40E+12	4,02E+11
	Média	6,73E+12	4,03E+11
	LOG	12,83	11,61
	EE (%) ²		90,47

UFC/g¹: unidade formadora de colônia por grama.

EE (%)²: eficiência da encapsulação.

Os valores obtidos nos ensaios variaram entre 90,27 e 90,50%, superiores aos encontrados nos ensaios preliminares, indicando que houve pouca morte celular no processo de secagem por *spray drying*.

A Figura 8 mostra a morfologia celular das colônias desenvolvidas no ágar MRS adicionado de cisteína HCl após a secagem por *spray drying*.

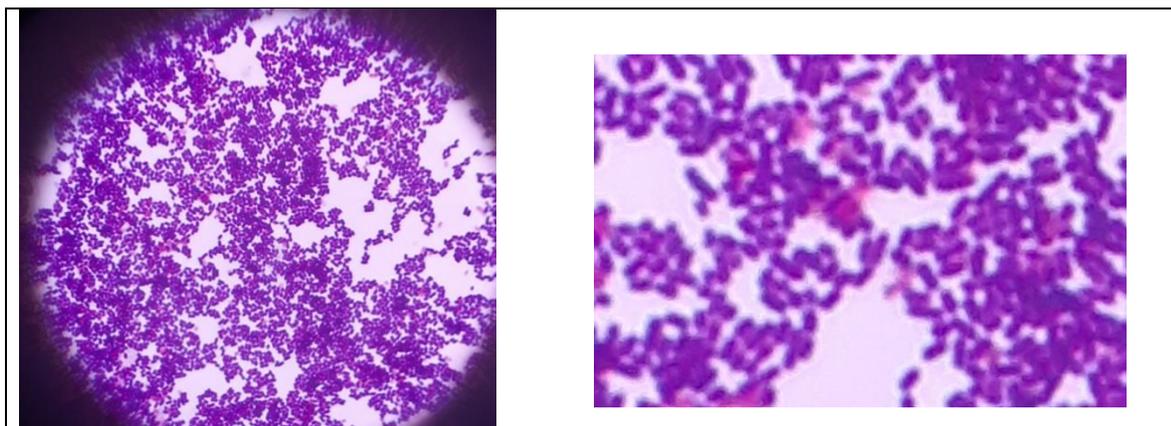


Figura 8. Morfologia celular de colônias de *L. reuteri*.

5.2.2 Atividade de água e umidade

A Tabela 11 apresenta os resultados das análises de atividade de água das micropartículas de fórmula infantil 20%.

Tabela 11. Atividade de água e umidade das micropartículas de fórmula infantil 20%.

Atividade de água e umidade			
Micropartículas de Fórmula Infantil 20%			
		Aw ¹	U% ²
Ensaio 1	A	0,1053	1,91
	B	0,1084	1,98
	C	0,1105	1,96
	Média	0,1081	1,95
	Desvio padrão	0,0026	0,04
Ensaio 2	A	0,1341	2,49
	B	0,1298	2,49
	C	0,1254	2,54
	Média	0,1298	2,51
	Desvio padrão	0,0044	0,03
Ensaio 3	A	0,0967	1,89
	B	0,0983	1,88
	C	0,1004	1,80
	Média	0,0985	1,86
	Desvio padrão	0,0019	0,05

Aw¹: atividade de água.

U%²: umidade.

Os valores de atividade de água ficaram entre 0,0985 e 0,1298, ou seja, apresentaram atividade de água abaixo de 0,25, desejável para garantir estabilidade no

armazenamento do produto, impedindo morte celular pois indica menos água disponível para reações bioquímicas (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007). Valores similares foram obtidos por Dianawati et al. 2016 e Fritzen-Freire et al., 2012, onde o primeiro estudo teve uma variação de 0,073 e 0,406, sendo que o produto com atividade de água maior teve valores baixos de células viáveis, demonstrando a importância desse parâmetro para obter micropartículas estáveis. A investigação de WEINBRECK et al., 2010 mostrou que valores de atividade de água >0,7 prejudicou a estabilidade de *L. rhamnosus* GG microencapsulados, reduzindo o número de células viáveis (>10 log₁₀) em duas semanas, confirmando que atividade de água tem uma forte correlação com a viabilidade de bactérias probióticas secas em *spray dryer*.

O teor de umidade, que está relacionado à eficiência de encapsulação de microrganismos, é um parâmetro importante para produtos desidratados. Valores mais altos afetam os aspectos tecnológicos, microbianos e propriedades físicas de produtos em pó (GUERGOLETTTO; BUSANELLO; GARCIA, 2017). A umidade das micropartículas variou entre 1,86 e 2,51%, dentro do previsto pelos ensaios preliminares, sendo que para garantir a estabilidade dos produtos secos, uma umidade abaixo de 5% é desejada (ZENEBOON et al., 2008). Guergoletto et al. (2017) obteve valores de umidade entre 2,7 e 4% secando *L. reuteri* LR92 em *spray dryer* em diferentes materiais encapsulantes, obtendo satisfatório número de células viáveis; Chávez e Ledebor (2007), produziram micropartículas com umidade entre 3,8 e 6%, e constataram que diferenças mínimas no teor de umidade do pó afetam muito estabilidade no armazenamento.

5.2.3 Monitoramento da temperatura de saída

Os ensaios tiveram certa reprodutibilidade, pois o perfil de temperatura de saída foi semelhante. A Figura 9 mostra a temperatura de saída das triplicatas (ensaios 1, 2 e 3) dos processos de secagem em *spray dryer* de fórmula infantil à 170°C. A Tabela 12 mostra que as temperaturas ficaram bem próximas nas triplicatas.

Tabela 12. Média e desvio padrão das temperaturas de saída dos ensaios de secagem à 170°C.

Monitoramento da temperatura de saída				
Fórmula infantil 20%				
	Média (°C)	Desvio padrão (°C)	T.mín. (°C)	T.máx. (°C)
Ensaio 1	76,8	1,02	75,8	77,8
Ensaio 2	77,1	1,16	75,9	78,3
Ensaio 3	77,0	0,62	76,4	77,6

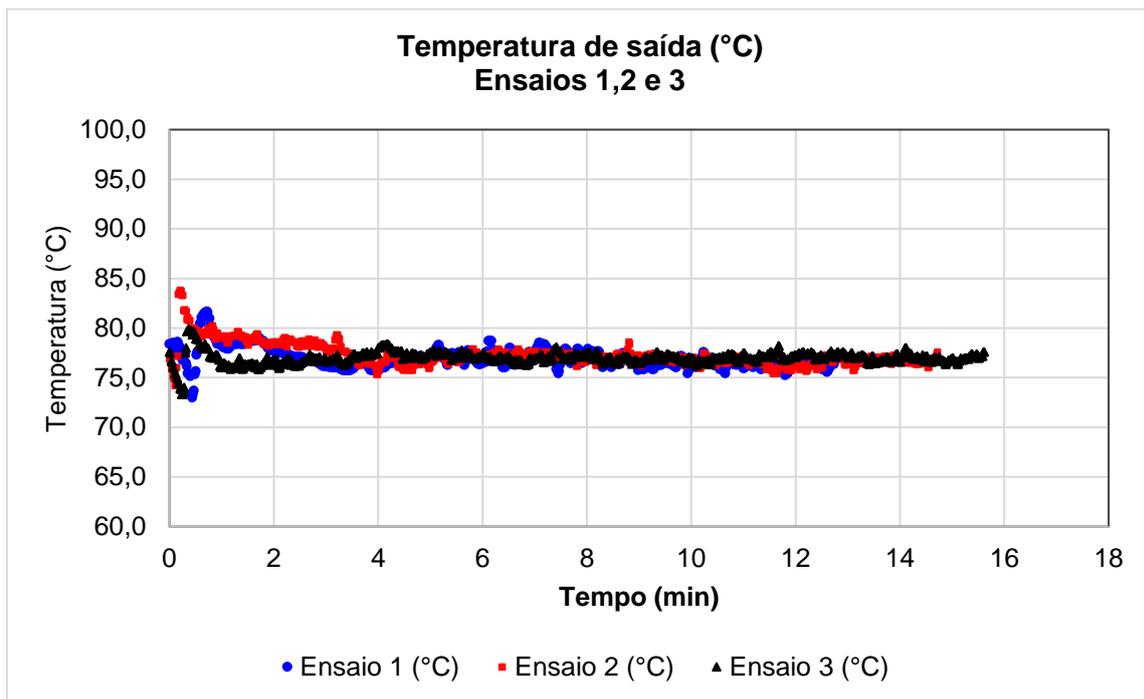


Figura 9. Temperatura de saída dos ensaios 1, 2 e 3 do processo de secagem de fórmula infantil em *spray dryer* realizado a 170°C.

Um dos pontos críticos no processo de secagem por *spray drying*, principalmente quando o princípio ativo é uma cultura probiótica, é a temperatura de saída, pois o material permanece em contato com esse ar por um tempo prolongado, diferente da temperatura de entrada que permanece em contato por alguns segundos. Nestes ensaios, conseguiu-se um melhor controle ainda da temperatura de saída e reprodutibilidade dos três ensaios. Considerando as médias e desvios padrões, a variação máxima da temperatura de saída durante os três ensaios foi somente de 75,8 e 78,3°C. Essa estabilidade da temperatura de saída pode ter colaborado para a eficiência da encapsulação ter sido acima de 90%, confirmando que a temperatura na qual o produto sai da câmara de secagem é o principal parâmetro que afeta a viabilidade de culturas secas por *spray drying* (GOLOWCZYC et al., 2010; LAVARI et al., 2014).

5.2.4 Caracterização das micropartículas

5.2.5 Tamanho

A Tabela 13 apresenta o diâmetro médio das micropartículas e a distribuição de tamanho.

Tabela 13. Diâmetro médio e descritores de distribuição de tamanho das micropartículas.

	Diâmetro médio e descritores de distribuição de tamanho			
	D10	D50	D90	SPAN
Leite desnatado	4,75 ± 0,15	7,88 ± 0,11	13,01 ± 0,37	1,05 ± 0,06
Fórmula infantil	6,80 ± 0,05	10,30 ± 0,12	21,43 ± 2,77	1,42 ± 0,25

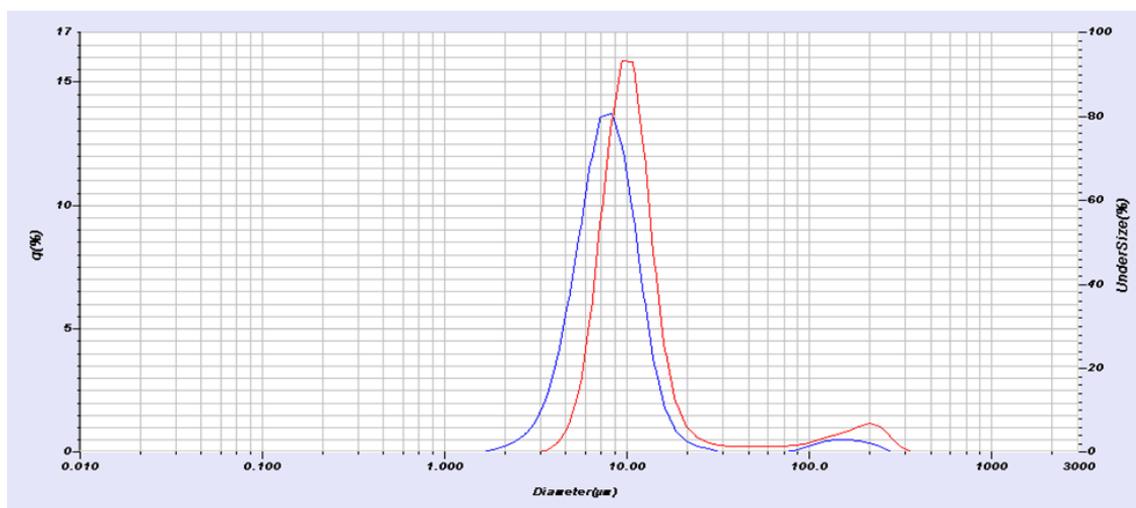


Figura 10. Gráfico de distribuição de tamanho de partículas das amostras Leite Desnatado (Linha Azul) e Fórmula Infantil (Linha Vermelha).

As micropartículas de leite desnatado apresentaram diâmetro médio (D50) de 7,88 μm e polidispersidade de 1,05, valores menores comparando com as de fórmula infantil, que obteve diâmetro médio de 10,30 μm e polidispersidade de 1,42, isso porque a fórmula contém óleos vegetais com ácidos graxos essenciais, minerais e vitaminas, que contribuem para um ligeiro aumento da viscosidade da dispersão e, conseqüentemente, diâmetro das micropartículas após a secagem. Os valores de diâmetro médio e span observados foram típicos de produtos obtidos por atomização e estão dentro da faixa de tamanho observada na literatura científica para micropartículas produzidas por *spray drying*. Fritzen-Freire et al., 2012 relataram diâmetro médio variando de 14,45 a 18,78 μm para micropartículas produzidas por *spray drying* contendo leite desnatado reconstituído e prebióticos como inulina e oligofrutose. Tonon et al. (2011) apresentaram valores de diâmetro médio entre 7,95 e 17,88 μm e span variando de 2,16 a 2,65, utilizando goma arábica como material encapsulante e temperatura de entrada à 170°C.

5.2.5.1 Morfologia

As micropartículas apresentaram formato esférico e tamanhos variados. As imagens da microscopia (Figura 8) mostram a formação de micropartículas para ambos materiais encapsulantes. A aparência da superfície das micropartículas é muito similar a outras amostras obtidas por *spray drying* apresentadas em outros trabalhos (ALVIM et al., 2016; FADINI et al., 2018; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; FRITZEN-FREIRE et al., 2012), indicando estabilidade da estrutura das micropartículas.

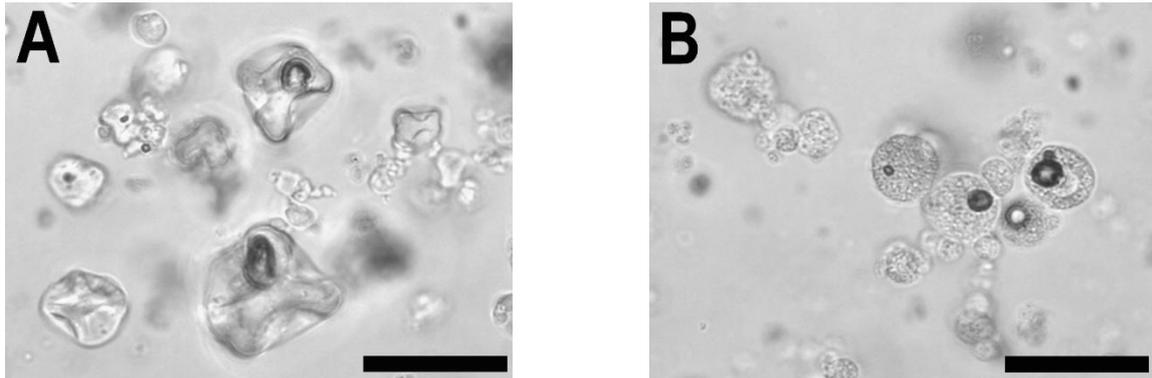


Figura 11. Morfologia obtida por microscopia ótica das amostras Leite desnatado (A) e Fórmula infantil (B). Barras = 20 micrômetros.

5.2.6 Avaliação da resistência térmica do probiótico

O resfriamento das fórmulas hidratadas à 70°C, até aproximadamente 43°C, foi realizado em aproximadamente 2 minutos, conforme perfil na Figura 7, indicando que os microrganismos não ficaram por um tempo prolongado a uma temperatura alta.

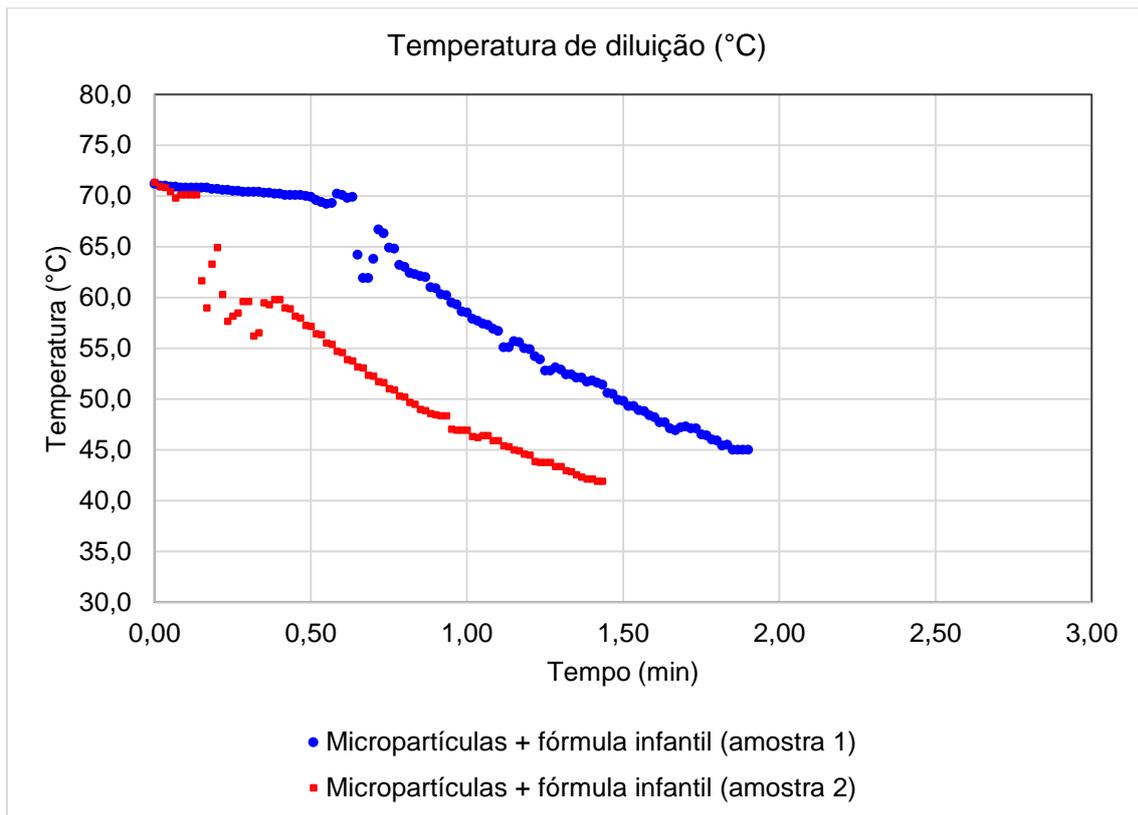


Figura 12. Perfil de resfriamento das fórmulas infantis hidratadas à 70°C, ensaio realizado em duplicata.

As micropartículas utilizadas nesse ensaio foram as obtidas nos ensaios finais 1, 2 e 3, juntadas para compor uma só amostra. O ensaio foi realizado em duplicata utilizando a mesma fórmula infantil. A Tabela 14 apresenta a taxa de sobrevivência do *L. reuteri* após a exposição a temperatura de 70°C.

Tabela 14. Taxa de sobrevivência do *L. reuteri* microencapsulado com fórmula infantil 20% diluída à 70°C.

Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/ml ¹)			
		Micropartículas + fórmula infantil (1)	Micropartículas + fórmula infantil (2)
Inicial	A	4,00E+09	3,20E+09
	B	3,20E+09	4,20E+09
	C	3,80E+09	4,40E+09
	Média	3,67E+09	3,93E+09
	LOG	9,56	9,59
	Após diluição à 70°C	A	5,80E+08
B		7,40E+08	9,00E+08
C		7,00E+08	9,80E+08
Média		6,73E+08	8,47E+08
LOG		8,83	8,93
TS (%)²		73,60	66,70

UFC/ml¹: unidade formadora de colônia por mililitro.

TS (%)²: taxa de sobrevivência em porcentagem.

O ensaio foi realizado em duplicata. As taxas de sobrevivência foram de 66,70 e 73,60%, sendo que o número de células viáveis ficou em 10⁸ UFC/ml, um valor desejado para produtos probióticos conforme Brandão, 2014, Salminen et al., 2020, e Tabbers et al., 2011, e dentro do recomendado pela Anvisa nas resoluções n.43 e 44, de 2011, que determinou que o conteúdo de bactérias viáveis em fórmulas infantis deve estar entre 10⁶ a 10⁸ UFC/g do produto pronto para consumo.

5.2.7 Determinação *in vitro* da resistência da cultura probiótica a digestão gastrointestinal

A Tabela 15 apresenta a taxa de sobrevivência da cultura probiótica *L. reuteri* microencapsulado após exposição simulada ao trato gastrointestinal.

Tabela 15. Determinação da taxa de sobrevivência do *L. reuteri* após exposição simulada ao trato gastrointestinal.

Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/ml ¹)		
	Após diluição à 70°C	
	Micropartículas + fórmula infantil (1)	Micropartículas + fórmula infantil (2)
Inicial	6,80E+08	8,40E+08
LOG	8,83	8,92
Após solução gástrica	6,60E+08	1,40E+08
LOG	8,82	8,15
TS (%)²	99,85	91,28
Após solução intestinal	6,20E+06	1,60E+07
LOG	6,79	7,20
TS (%)²	76,90	80,72

UFC/ml¹: unidade formadora de colônia por mililitro.

TS (%)²: taxa de sobrevivência em porcentagem.

Podemos observar que após a exposição a solução gástrica a taxa de sobrevivência foi alta, de 91,28 e 99,85%, não reduzindo nem 1 log na contagem. Após a exposição à solução intestinal essa taxa caiu para 76,90 e 80,72%, reduzindo 2 logs (10^8 a 10^6), mas ainda apresentando uma quantidade desejada de células viáveis, de acordo com literatura (Dianawati et al., 2016; Tamime et al., 2017).

A sobrevivência de células de *L. reuteri* tratadas com suco gástrico e sais biliares simulados foi significativamente melhor quando encapsulado no trabalho de Muthukumarasamy et al. (2006), indicando que o desempenho das técnicas de microencapsulação e do material encapsulante produzem melhor sobrevivência no suco gástrico e intestinal.

5.2.8 Estabilidade das micropartículas em diferentes condições de estocagem

A Tabela 16 apresenta a taxa de sobrevivência das micropartículas armazenadas à 4 e 25°C por 60 dias.

Tabela 16. Taxa de sobrevivência de *L. reuteri* microencapsulado com fórmula infantil 20% durante armazenamento a 4 e 25°C.

		Quantificação de <i>L. reuteri</i> (UFC/g ¹)			
		Inicial	0 dias	60 dias	
				4°C	25°C
Ensaio 1		6,60E+12	3,99E+11	3,20E+11	1,25E+11
	LOG	12,82	11,60	11,51	11,10
	TS (%) ²		90,49	99,17	95,65
Ensaio 2		7,33E+12	4,11E+11	3,43E+11	7,60E+10
	LOG	12,87	11,61	11,54	10,88
	TS (%) ²		90,27	99,32	93,69
Ensaio 3		6,73E+12	4,03E+11	2,67E+11	8,47E+10
	LOG	12,83	11,61	11,43	10,93
	TS (%) ²		90,47	98,46	94,16

UFC/g¹: unidade formadora de colônia por grama.

TS(%)²: taxa de sobrevivência.

As taxas de sobrevivência no armazenamento durante 60 dias à 4°C de *L. reuteri* microencapsulado variaram entre 98,46 e 99,32%, e à 25°C variaram entre 93,69 e 95,65% e reduziram 1 log em duas amostras, indicando que o armazenamento refrigerado é o mais indicado para cultura probiótica seca por *spray drying*, pois apresentou mais estabilidade durante o armazenamento.

6 CONCLUSÕES

A técnica de microencapsulação por *spray drying* utilizada mostrou-se viável para obtenção de micropartículas com cultura probiótica *Limosilactobacillus reuteri* LRE 02 (DSM 23878), obtendo micropartículas com número elevado de células viáveis.

A fórmula infantil reconstituída a 20% como material encapsulante e a temperatura do ar de entrada na secagem à 170°C mostraram-se adequados para a proteção da cultura durante a secagem por *spray drying*, sendo que a viabilidade, atividade de água e umidade ficaram dentro do esperado segundo a literatura.

O monitoramento do processo pelo módulo de aquisição de dados *myPCLab* gerou maior confiabilidade quanto à reprodutibilidade dos ensaios na manutenção da temperatura de saída, além de permitir a avaliação de sua influência neste processo de secagem.

A utilização da microencapsulação com fórmula infantil como material encapsulante teve um efeito termoprotetor, possibilitando a proteção da cultura probiótica após a diluição do pó à 70°C e a passagem simulada ao trato gastrintestinal, sendo assim adequada para aplicação em fórmulas infantis.

As micropartículas apresentaram tamanho médio entre 7,88 e 10,30 µm, o que é adequado para a aplicação em alimentos.

As micropartículas obtidas se mostraram estáveis durante armazenamento à 4°C, mantendo a contagem no mesmo log inicial; o armazenamento à 25°C apresentou uma taxa de sobrevivência um pouco menor, mas ainda com uma quantidade elevada de células viáveis.

7 REFERÊNCIAS

ACKERBERG, T. S.; LABUSCHAGNE, I. L.; LOMBARD, M. J. The use of prebiotics and probiotics in infant formula. **South Africa Family Practice**, [S. l.], v. 54, n. 4, p. 321–323, 2012.

AGOSTONI, Carlo et al. Probiotic Bacteria in Dietetic Products for Infants: A Commentary by the ESPGHAN Committee on Nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, [S. l.], v. 38, p. 365–374, 2004.

ALVIM, Izabela Dutra; STEIN, Mirella Abreu; KOURY, Isabela Paes; DANTAS, Fiorella Balardin Hellmeister; CRUZ, Carla Léa de Camargo Vianna. Comparison between the spray drying and spray chilling microparticles contain ascorbic acid in a baked product application. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 65, p. 689–694, 2016. DOI: 10.1016/j.lwt.2015.08.049.

ANTUNES, A. E. C.; PACHECO, M. T. B. **Leite para adultos: mitos e fatos frente à ciência**. São Paulo: Varela, 2009.

ANVISA. Informe Técnico nº. 59/2014 – Diluição de fórmulas infantis a temperatura de 70° C e risco de infecção por *Enterobacter sakazakii* (*Cronobacter* spp.). . 2014.

ANVISA. Probióticos: construção da lista de linhagens probióticas. [S. l.], p. 1–14, 2017. Disponível em:

http://portal.anvisa.gov.br/documents/3845226/0/Análise+das+Linhagens+de+Probióticos+__23042018.pdf/6e37da13-2151-4330-85b0-0f449dbb0e95.

ANVISA. Guia nº21/2019. GUIA PARA INSTRUÇÃO PROCESSUAL DE PETIÇÃO DE AVALIAÇÃO DE PROBIÓTICOS PARA USO EM ALIMENTOS, [S. l.]. . 2019.

BAO, Yan; ZHANG, Yanchao; ZHANG, Yong; LIU, Yong; WANG, Shuiquan; DONG, Ximei; WANG, Yanyan; ZHANG, Heping. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, [S. l.], v. 21, n. 5, p. 695–701, 2010. DOI: 10.1016/j.foodcont.2009.10.010. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2009.10.010>.

BRAEGGER, Christian et al. Supplementation of infant formula with probiotics and/or prebiotics: A systematic review and comment by the ESPGHAN committee on nutrition. **Journal of Pediatric Gastroenterology and Nutrition**, [S. l.], v. 52, n. 2, p. 238–250, 2011. DOI: 10.1097/MPG.0b013e3181fb9e80.

BRANDÃO, Igor Macedo. Utilização de prebióticos e probióticos em pediatria. **Scire Salutis**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 84–98, 2014. DOI: 10.6008/ess2236-9600.2013.002.0008. BRASIL. RDC nº43, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes. . 2011 a.

BRASIL. RDC nº44, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância. . 2011 b.

BRASIL. RDC nº45, de 19 de setembro de 2011. Dispõe sobre o regulamento técnico para fórmulas infantis para lactentes destinadas a necessidades dietoterápicas específicas e fórmulas infantis de seguimento para lactentes e crianças de primeira infância destinadas. . 2011 c.

BREEUWER, P.; LARDEAU, A.; PETERZ, M.; JOOSTEN, H. M. Desiccation and heat tolerance of *Enterobacter sakazakii*. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 95, n. 5, p. 967–973, 2003. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2003.02067.x.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; SCHER, J. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, [S. l.], v. 104, n. 4, p. 467–483, 2011. DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2010.12.031.

CANADA. Recommendations for the Preparation and Handling of Powdered Infant Formula (PIF). . 2015.

CHÁVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: Optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, [S. l.], v. 25, n. 7–8, p. 1193–1201, 2007. DOI: 10.1080/07373930701438576.

CHERBUT, Mme C.; BEAUFRÈRE, M. B.; GHISOLFI, M. J.; TURCK, M. D.; VIDAILHET, M. M.; BERTA, J. L.; DANAN, Mme C.; RAZANAMAHEFA, Mme L.; VANRULLEN, Mme I. **Alimentation Infantile et Modification de la Flore Intestinale**. [s.l: s.n.].

CRITTENDEN, R.; LAITILA, A.; FORSELL, P.; MÄTTÖ, J.; SAARELA, M.; MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLÄRINEN, P. Adhesion of Bifidobacteria to Granular Starch and Its Implications in Probiotic Technologies. **Applied and Environmental Microbiology**, [S. l.], v. 67, n. 8, p. 3469–3475, 2001. DOI: 10.1128/AEM.67.8.3469-3475.2001.

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. **Journal of Applied Microbiology**, [S. l.], v. 93, n. 6, p. 1003–1011, 2002. DOI: 10.1046/j.1365-2672.2002.01782.x.

DIANAWATI, Dianawati; MISHRA, Vijay; SHAH, Nagendra P. Viability, Acid and Bile Tolerance of Spray Dried Probiotic Bacteria and Some Commercial Probiotic Supplement Products Kept at Room Temperature. **Journal of food science**, [S. l.], v. 81, n. 6, p. M1472–M1479, 2016. DOI: 10.1111/1750-3841.13313.

EDELSON-MAMMEL, Sharon G.; BUCHANAN, Robert L. Thermal Inactivation of *Enterobacter sakazakii* in Rehydrated Infant Formula. **Journal of Food Protection**, [S. l.], v. 67, n. 1, p. 60–63, 2004.

EPIFANIO, Matias. Prebióticos e probióticos nas fórmulas infantis: o que temos de evidência? **Boletim Científico de Pediatria**, [S. l.], v. 1, n. 1, p. 8–12, 2012.

EPIFANIO, Matias. **Componentes das fórmulas infantis: O que temos no horizonte?** **International Journal of Nutrology**. [s.l: s.n.].

ETCHEPARE, Mariana de Araujo; NUNES, Graciele Lorenzoni; NICOLOSO, Bruna Righi; BARIN, Juliano Smanioto; MORAES FLORES, Erico Marlon; DE OLIVEIRA MELLO, Renius; RAGAGNIN DE MENEZES, Cristiano. Improvement of the viability of encapsulated probiotics using whey proteins. **Lwt**, [S. l.], v. 117, n. September 2019, 2020. DOI: 10.1016/j.lwt.2019.108601.

FADINI, Ana Lúcia; ALVIM, Izabela Dutra; RIBEIRO, Isabela Porto; RUZENE, Lucas Geraldini; SILVA, Lidiane Bataglia Da; QUEIROZ, Marise Bonifácio; MIGUEL, Ana Maria Rauen de Oliveira; CHAVES, Francisco Celio Maia; RODRIGUES, Rodney Alexandre Ferreira. Innovative strategy based on combined microencapsulation technologies for food

application and the influence of wall material composition. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 91, n. January, p. 345–352, 2018. DOI: 10.1016/j.lwt.2018.01.071. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2018.01.071>.

FAO/WHO. **Probiotics in food**. Córdoba.

FAO/WHO. **Enterobacter sakazakii and other microorganisms in powdered infant formula** **Microbiological Risk Assessment Series**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2004. DOI: 10.22401/jnus.13.3.33.

FAO/WHO. **Enterobacter sakazakii and Salmonella in Powdered Infant Formula: meeting report** **Microbiological Risk Assessment Series**. Geneva: Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization, 2006. DOI: 10.1111/j.1365-2621.2008.01833.x.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 19, n. 4, p. 485–494, 2002. DOI: 10.1080/02652040210140715.

FDA. **Labeling of Infant Formula: Guidance for Industry**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <http://www.fda.gov/FoodGuidances>.

FRITZEN-FREIRE, Carlise B.; PRUDÊNCIO, Elane S.; AMBONI, Renata D. M. C.; PINTO, Stephanie S.; NEGRÃO-MURAKAMI, Aureanna N.; MURAKAMI, Fabio S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, [S. l.], v. 45, n. 1, p. 306–312, 2012. DOI: 10.1016/j.foodres.2011.09.020.

GALLEGO, Carlos Gómez; SALMINEN, Seppo. Novel Probiotics and Prebiotics: How Can They Help in Human Gut Microbiota Dysbiosis? **Applied Food Biotechnology**, [S. l.], v. 3, n. 2, p. 72–81, 2016. Disponível em: www.journals.sbm.ac.ir/afb.

GARCIA, Carlos Eduardo Rocha; PALUDO, Paola Augusta Yaegashi; GLOIN, Samanta Daliana; STRAPASSON, Giovanna Chipon; COSTA, Camila; WILLE, Grace Maria Ferreira de Castro. Fórmulas infantis para alimentação dispensadas em farmácias. **Visão acadêmica**, [S. l.], v. 14, n. 1, 2013.

GIBSON, Glenn R. et al. **Expert consensus document: The International Scientific Association for Probiotics and Prebiotics (ISAPP) consensus statement on the definition and scope of prebiotics** **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**. [s.l.]: Nature Publishing Group, 2017. DOI: 10.1038/nrgastro.2017.75. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/nrgastro.2017.75>.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A. G.; DE ANTONI, G. L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 50, n. 1, p. 7–12, 2010. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2009.02759.x.

GUERGOLETTTO, Karla Bigetti; BUSANELLO, Marli; GARCIA, Sandra. Influence of carrier agents on the survival of *Lactobacillus reuteri* LR92 and the physicochemical properties of fermented juçara pulp produced by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, [S. l.], v. 80, n. February, p. 321–327, 2017. DOI: 10.1016/j.lwt.2017.02.038. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.038>.

HARRIGAN, Wilkie F. **Laboratory methods in food microbiology**. San Diego: Academic Press, 1998.

HILL, Colin et al. Expert consensus document: The international scientific association for probiotics and prebiotics consensus statement on the scope and appropriate use of the term probiotic. **Nature Reviews Gastroenterology and Hepatology**, [S. l.], v. 11, n. 8, p. 506–514, 2014. DOI: 10.1038/nrgastro.2014.66.

IVERSEN, C.; LANE, M.; FORSYTHE, S. J. The growth profile, thermotolerance and biofilm formation of *Enterobacter sakazakii* grown in infant formula milk. **Letters in Applied Microbiology**, [S. l.], v. 38, n. 5, p. 378–382, 2004. DOI: 10.1111/j.1472-765X.2004.01507.x.

KAMADA, Nobuhiko; SEO, Sang-Uk; CHEN, Grace Y.; NÚÑEZ, Gabriel. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. **Nature Reviews Immunology**, [S. l.], v. 13, n. 5, p. 321–335, 2013. DOI: 10.1038/nri3430.

KENT, Robert M.; DOHERTY, Sinéad B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, [S. l.], v. 64, p. 567–576, 2014. DOI: 10.1016/j.foodres.2014.07.029. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2014.07.029>.

LAVARI, Luisina; PÁEZ, Roxana; CUATRIN, Alejandra; REINHEIMER, Jorge; VINDEROLA, Gabriel. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, [S. l.], v. 81, n. 3, p. 267–274, 2014.

MICHELINI, Ricardo P.; LISERRE, Alcina M.; MENEZES, Cristiano; MORENO, Izildinha; ANTUNES, Adriane E. C.; CHAVES, Gustavo. Aplicação da técnica de secagem em “spray dryer” para produção de micropartículas com microrganismos probióticos. Campinas, 2009.

MORTAZAVIAN, A. M.; AZIZI, A.; EHSANI, M. R.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J. A. Survival of encapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) after the product exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Milchwissenschaft**, [S. l.], v. 63, n. 4, p. 427–429, 2008.

MUGAMBI, Mary N.; MUSEKIWA, Alfred; LOMBARD, Martani; YOUNG, Taryn; BLAAUW, René. Synbiotics, probiotics or prebiotics in infant formula for full term infants: A systematic review. **Nutrition Journal**, [S. l.], v. 11, n. 1, 2012. DOI: 10.1186/1475-2891-11-81.

MUTHUKUMARASAMY, Parthiban; WOJTAS, PA; A HOLLEY, Richard. Stability of *Lactobacillus reuteri* in different types of microcapsules. **Journal of Food Science**, [S. l.], v. 71, n. 1, p. 20–24, 2006. Disponível em: www.ift.org.

NOGUEIRA, JANAÍNA CÂNDIDA RODRIGUES. Probióticos - Revisão da Literatura. **Revista Brasileira de Ciências da Saúde**, [S. l.], v. 15, n. 4, p. 487–492, 2011. DOI: 10.4034/rbcs.2011.15.04.16.

NUNES, Graciele Lorenzoni; SILVA, Thaianne Marques Da; HOLKEM, Augusto Tasch; SCHLEY, Vitor; MENEZES, Cristiano Ragagnin De. Microencapsulação de culturas probióticas: princípios do método de spray drying. **Ciência e Natura**, [S. l.], v. 37, n. 5, p.

10–16, 2015. DOI: 10.5902/2179-460X19742. Disponível em:
<http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=467547645015>.

O'TOOLE, Paul W.; MARCHESI, Julian R.; HILL, Colin. Next-generation probiotics: The spectrum from probiotics to live biotherapeutics. **Nature Microbiology**, [S. l.], v. 2, n. April, p. 1–6, 2017. DOI: 10.1038/nmicrobiol.2017.57. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.1038/nmicrobiol.2017.57>.

OROSCO, Isabela Maciel; KUNIGK, Cynthia Jurkiewicz. **INFLUÊNCIA DO PREPARO DO INÓCULO NA SOBREVIVÊNCIA DE BACTÉRIAS PROBIÓTICAS ENCAPSULADAS LIOFILIZADAS**. [s.l: s.n.].

PANIAGO, Evellyn de Oliveira; SARMENTO, Ulana Chaves; ANDRADE, Osmar Ferreira De; BOAS, July Elen Vilas; FIGUEIREDO, Priscila Silva; GUIMARÃES, Rita de Cássia Avellane Da. **Fórmula infantil industrializadas: impacto na informação nutricional**. [s.l: s.n.].

PENHASI, Adel. Microencapsulation of probiotic bacteria using thermo-sensitive sol-gel polymers for powdered infant formula. **Journal of Microencapsulation**, [S. l.], v. 32, n. 4, 2015. DOI: 10.3109/02652048.2015.1028497. Disponível em:
<http://dx.doi.org/10.3109/02652048.2015.1028497>.

PICOT, Arnaud; LACROIX, Christophe. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 505–515, 2004. DOI: 10.1016/j.idairyj.2003.10.008.

POT, Bruno; SALVETTI, Elisa; MATTARELLI, Paola; FELIS, Giovanna E. The potential impact of the Lactobacillus name change: The results of an expert meeting organised by the Lactic Acid Bacteria Industrial Platform (LABIP). **Trends in Food Science and Technology**, [S. l.], v. 94, n. April, p. 105–113, 2019. DOI: 10.1016/j.tifs.2019.07.006. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2019.07.006>.

RAIZEL, Raquel; SANTINI, Eliana; KOPPER, Andressa Magali; FILHO, Adilson Domingos dos Reis. Efeitos do consumo de probióticos, prebióticos e simbióticos para o organismo humano. **Ciência & Saúde**, [S. l.], v. 4, n. 2, p. 66–74, 2011.

RODRIGUES DE SÁ, Patrícia B. Zacarchenc.; ALVES, Adriana T. Silva e; OLIVEIRA, Maricê Nogueira De; BOGSAN, Cristina Stewart; GUIMARÃES, Jonas de Toledo; PIMENTEL, Tatiana Colombo; CRUZ, Adriano Gomes Da; ANTUNES, Adriane Elisabete Costa. Leites infantis. *In*: **Processamento de leites de consumo**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2017. p. 195–217.

SALMINEN, Seppo; STAHL, Bernd; VINDEROLA, Gabriel; SZAJEWSKA, Hania. Infant Formula Supplemented with Biotics: Current Knowledge and Future Perspectives. **Nutrients**, [S. l.], p. 1–20, 2020. DOI: 10.3390/nu12071952. Disponível em:
https://www.mdpi.com/2072-643/12/7/1952?utm_source=researcher_app&utm_medium=referral&utm_campaign=RES_R_MRKT_Researcher_inbound.

SILVA, Paulo Henrique Fonseca Da et al. Lácteos e nutrição. *In*: **Química, bioquímica, análise sensorial e nutrição no processamento de leite e derivados**. Rio de Janeiro: Elsevier Editora Ltda, 2016. p. 221–258.

SILVEIRA, Arlan Caldas Pereira; PERRONE, Ítalo Tuler; JÚNIOR, Paulo Henrique RODRIGUES; CARVALHO, Antônio Fernandes De. Secagem por spray: uma revisão. **Rev. Inst. Laticínios Cândido Tostes**, [S. l.], v. 68, n. 391, p. 51–58, 2013.

STUMBO, C. R. **Thermobacteriology in Food Processing**. 2. ed. [s.l: s.n.].

TABBERS, M. M.; DE MILLIANO, I.; ROSEBOOM, M. G.; BENNINGA, M. A. Is *Bifidobacterium breve* effective in the treatment of childhood constipation? Results from a pilot study. **Nutrition Journal**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 19, 2011. DOI: 10.1186/1475-2891-10-19. Disponível em: <http://www.nutritionj.com/content/10/1/19>.

TAMIME, A. Y.; SAARELA, M.; WSZOLEK, M.; GHODDOUSI, H.; LINARES, D. M.; SHAH, N. P. Production and Maintaining Viability of Probiotic Micro-organisms in Dairy Products. In: **Probiotic Dairy Products**. Chichester, UK: John Wiley & Sons, Ltd, 2017. p. 67–164. DOI: 10.1002/9781119214137.ch4. Disponível em: <http://doi.wiley.com/10.1002/9781119214137.ch4>.

TONON, Renata V.; GROSSO, Carlos R. F.; HUBINGER, Míriam D. Influence of emulsion composition and inlet air temperature on the microencapsulation of flaxseed oil by spray drying. **Food Research International**, [S. l.], v. 44, n. 1, p. 282–289, 2011. DOI: 10.1016/j.foodres.2010.10.018. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2010.10.018>.

VANDENPLAS, Yvan; HUYS, Geert; DAUBE, Georges. **Probiotics: An update** *Jornal de Pediatria* Elsevier Editora Ltda, , 2015. DOI: 10.1016/j.jped.2014.08.005.

WEFFORT, V. R. S. Avanços nutricionais em fórmulas infantis. **Pediatria Moderna**, [S. l.], v. 48, n. 4, p. 115–120, 2012.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M. L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, [S. l.], v. 136, n. 3, p. 364–367, 2010. DOI: 10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.004. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2009.11.004>.

ZENEBON, Odair; ASCUET, Neus Sadocco; TIGLEA, Paulo. **Métodos físicos-químicos para análise de alimentos**. [s.l: s.n.].

ZHENG, Jinshui et al. A taxonomic note on the genus *Lactobacillus*: Description of 23 novel genera, emended description of the genus *Lactobacillus* beijerinck 1901, and union of *Lactobacillaceae* and *Leuconostocaceae*. **International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology**, [S. l.], v. 70, n. 4, p. 2782–2858, 2020. DOI: 10.1099/ijsem.0.004107.