UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ZOOTECNIA E ENGENHARIA DE ALIMENTOS

FERNANDO EUSTÁQUIO DE MATOS JUNIOR

**Avaliação da viabilidade e funcionalidade de microrganismos probióticos
microencapsulados em partículas lipídicas recobertas por interação
eletrostática de polímeros**

PIRASSUNUNGA

2017

FERNANDO EUSTÁQUIO DE MATOS JUNIOR

Avaliação da viabilidade e funcionalidade de microrganismos probióticos microencapsulados em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros

VERSÃO CORRIGIDA

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Orientadora: *Profa. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade*

Coorientador: *Prof. Dr. Celso Gabriel Vinderola*

PIRASSUNUNGA

2017

Ficha catalográfica elaborada pelo
Serviço de Biblioteca e Informação, FZEA/USP,
com os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

MF363a   Matos Junior, Fernando Eustáquio
Avaliação da viabilidade e funcionalidade de
microrganismos probióticos microencapsulados em
partículas lipídicas recobertas por interação
eletrostática / Fernando Eustáquio Matos Junior ;
orientadora Carmen Sílvia Fávaro Trindade ;
coorientador Celso Gabriel Vinderola. --
Pirassununga, 2017.
147 f.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em
Engenharia de Alimentos) -- Faculdade de Zootecnia
e Engenharia de Alimentos, Universidade de São
Paulo.

1. Probióticos. 2. Lactobacilos. 3. Encapsulação.
4. Imunomodulação. I. Fávaro Trindade, Carmen Sílvia
, orient. II. Vinderola, Celso Gabriel, coorient.
III. Título.

FERNANDO EUSTÁQUIO DE MATOS JUNIOR

Avaliação da viabilidade e funcionalidade de microrganismos probióticos microencapsulados em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros

Tese apresentada à Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos da Universidade de São Paulo, como parte dos requisitos para a obtenção do título de Doutor em Ciências do programa de pós-graduação em Engenharia de Alimentos.

Área de Concentração: Ciências da Engenharia de Alimentos

Data da aprovação: 14/12/2017

Banca Examinadora:

Profª. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade – Orientadora
Universidade de São Paulo

Profª. Drª. Andrezza Maria Fernandes – Membro
Universidade de São Paulo

Profª. Drª. Adriane Elisabete Antunes de Moraes – Membro
Universidade Estadual de Campinas

Profª. Drª. Marta Mitsui Kushida – Membro
Universidade de São Paulo

Dr. Caue Ribeiro De Oliveira – Membro
Embrapa

Dedico esse trabalho ao meu pai, que no fim de sua caminhada, em silêncio e sem intenção, me ensinou que na vida nada tem valor quando se perde a oportunidade de amar e se sentir amado.

Agradecimentos

A Deus por toda sua bondade e cumplicidade. Das tantas e tantas vezes que hesitei em desanimar, foi em Deus que encontrei conforto e coragem. A Ele agradeço por plantar em meu coração a certeza que esse dia chegaria apesar de tantas desconfianças, medos e angustias. Por mais que parecesse que por muito tempo estivesse só, nunca conheci a solidão, pois em todos os momentos Deus esteve comigo.

À Prof. Dra. Carmen Sílvia Fávaro Trindade pela oportunidade dada de continuarmos trabalhando juntos no doutorado. Muito obrigado pelo seu profissionalismo, respeito, paciência e preocupação. Obrigado por não ter desistido de mim. Sou grato por ter aprendido com você através da convivência que é possível viver o meio acadêmico sem perder a sensibilidade humana e o respeito pelo próximo. Que a sua capacidade de acreditar nos sonhos das pessoas seja seu principal legado na vida de todos que cruzam seu caminho.

Ao Prof. Dr. Gabriel Vinderola pelos ensinamentos, oportunidade e contribuições neste trabalho.

Aos companheiros de laboratório, Talita, Volnei, Marluci, Júlia, Orfa, Mariana, Milla, Adja, Andressa. Muito obrigado pela convivência e pelos momentos compartilhados.

Aos colegas da Universidade Nacional do Litoral na Argentina, Patricia, Agostina, Elisa Guillermo, e em especial à Tizá, agradeço pela experiência da convivência e ensinamentos.

Agradeço aos técnicos e especialistas de laboratório da FZEA Marcelo, Guilherme, Carla, Rodrigo e Mônica, que tanto contribuíram de alguma forma para esse trabalho.

À FZEA/USP pela oportunidade de cursar o doutorado. É grande a minha gratidão e meu orgulho ao dizer que um dia fiz parte desta instituição. A dedicação e o amor pela USP de todos os envolvidos é algo que me faz acreditar que é possível sim oferecer educação com compromisso e de qualidade.

Agradeço ao Serviço de Pós-Graduação - SPG, com gratidão especial à Érica Ferraz, por sua conduta solidária e humana. Agradeço pela atenção especial dada em dois momentos muito importantes da minha vida que precisei contar de forma decisiva com o SPG.

Agradeço ao Sr. Ernesto e à Eneida, meus eternos amigos de Pirassununga. Qualquer palavra usada para agradecimento seria simplória diante do carinho que tenho por vocês.

Agradeço aos colegas de trabalho da UFAC que torceram pela conclusão deste doutorado. Agradeço pelo encorajamento.

Meu agradecimento aos alunos do curso de Nutrição da UFAC que me ensinam e desafiam diariamente. Um muito obrigado especial aos alunos que me incentivaram através da manifestação de torcida e carinho nessa reta final.

Ao CNPq e à Capes pelas bolsas de estudo concedidas.

Por fim, e mais importante, agradeço aqueles que amo. Gratidão eterna à minha mãe, Sandra. Seu exemplo de coragem e determinação me inspiram todos os dias. Nada disso estaria acontecendo sem o seu incentivo e dedicação. Obrigado por acreditar nos meus sonhos e por fazer possível e o impossível para que eles se tornassem realidade. Agradeço ao meu pai (*in memoriam*) que sempre se alegrou com as minhas conquistas, embora muitas

vezes não soubesse expressar sua felicidade. Muito obrigado por todo seu amor e pelos ensinamentos, sem eles talvez eu não chegaria até aqui.

Agradeço aos meus irmãos e tios, em especial à Dina que por tantas vezes me ajudou nesta caminhada.

Minha gratidão à minha esposa, companheira e amiga, Dâmaris. Minhas esperanças de que algo aconteceria e mudaria minha vida não me frustraram. Obrigado por trazer tanta felicidade aos meus dias. Seu carinho, cuidado e incentivo foram decisivos nessa fase final. Muito obrigado por todo seu amor e compreensão.

Toda vitória oculta uma abdicação. - *Simone de Beauvoir*

RESUMO

MATOS-JR, F.E. **Avaliação da viabilidade e funcionalidade de microrganismos probióticos microencapsulados em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros.** 2017. 147 f. Tese (Doutorado) – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

A microencapsulação tem sido utilizada promissora para melhorar a viabilidade de probióticos. Porém, pouco se sabe sobre o impacto desta na manutenção da funcionalidade do probiótico *in vivo*. Este trabalho teve como objetivo avaliar duas cepas de lactobacilos, encapsular essas cepas por um sistema envolvendo partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros e avaliar o efeito da encapsulação na manutenção da capacidade imunomoduladora das cepas. Na primeira etapa do estudo *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 foram avaliados quanto à resistência à lisozima e aos fluidos gastrointestinais simulados, perfil de hidrofobicidade da parede celular, susceptibilidade a antibióticos, atividade antagonista contra patógenos e capacidade de utilização de prebióticos. Em etapa seguinte as cepas foram encapsuladas e as microcápsulas avaliadas quanto à morfologia, tamanho e distribuição de partículas, umidade, atividade de água e efeito do pH e temperatura em sua estabilidade. Para avaliar a susceptibilidade dos microrganismos ao processo de encapsulação e estresse tecnológico, investigou-se o impacto do efeito da homogeneização com Ultra-Turrax, tolerância à temperatura, salinidade, diferentes pH e fluidos gastrointestinais simulados na viabilidade das bactérias. A viabilidade dos microrganismos durante a estocagem também foi estudada. Por fim, avaliou-se a manutenção da capacidade imunomoduladora dos microrganismos microencapsulados por meio da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias e determinação da capacidade protetora contra infecção de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* em modelo animal. Os microrganismos demonstraram resistência à lisozima, com taxas de sobrevivência superiores a 80%. O perfil de hidrofobicidade da parede celular, foi baixo, entre 8,47 e 19,19%. Demonstraram resistência apenas à vancomicina (35 µg) e eritromicina (15 µg). As duas cepas foram capazes de antagonizar o crescimento de *Escherichia coli* V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. Quanto

à capacidade de utilização de prebióticos, os microrganismos apresentaram comportamentos inversos, utilizaram preferencialmente inulina, raftilose 95 e lactulose. Nos testes de resistência aos fluidos gastrointestinais simulados constatou-se declínio significativo de células viáveis, com subtração de até 3,37 log UFC/mL. As cápsulas obtidas apresentaram formato típico e tamanhos médios de $80,12 \pm 1,89$ e $83,92 \pm 1,70$ μm . Condições de pH extremos (1,5 e 9,0) e temperatura superior a 50 °C comprometeram a estabilidade das cápsulas. A encapsulação melhorou significativamente a tolerância dos microrganismos às altas concentrações de sal e elevação de temperatura. Além disso, favoreceu a resistência dos microrganismos frente aos fluidos gastrointestinais simulados. A estabilidade dos microrganismos durante o período de estocagem também foi favorecida, após 120 dias de estocagem a 7 e 25 °C a concentração de microrganismos viáveis permaneceu superior a 7,0 log UFC/g. Nos testes *in vivo* para avaliação da manutenção da capacidade de imunomodulação constatou-se através de dosagem de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 e TNF- α) e IgA secretora, que a encapsulação não alterou a resposta imunológica provocada pelas cepas estudadas. Concluiu-se que os microrganismos apresentaram comportamento *in vitro* de acordo com o desejado para candidatos ao uso de probióticos. A microencapsulação foi bem-sucedida, proporcionando as duas cepas maior resistência frente às condições adversas e de estresse tecnológico.

Palavras-chave: Lactobacilos; Caracterização; Encapsulação; Coacervação complexa; Imunomodulação.

ABSTRACT

MATOS-JR, F.E. **Evaluation of the viability and functionality of microencapsulated probiotic microorganisms in lipid particles coated by electrostatic interaction of polymers.** 2017. 147 f. PhD. Thesis – Faculdade de Zootecnia e Engenharia de Alimentos, Universidade de São Paulo, Pirassununga, 2017.

Microencapsulation has been used successfully to improve the viability of probiotics microorganisms. The aim of this work was to evaluate two strains of lactobacilli, to encapsulate these strains by a system involving lipid particles coated by electrostatic interaction of polymers and to evaluate the effect of encapsulation in the maintenance of immunomodulatory capacity of these strains. In the first stage of the study *L. rhamnosus* 64 and *L. paracasei* BGP1 were evaluated for resistance to lysozyme and simulated gastrointestinal fluids, cell wall hydrophobicity profile, susceptibility to antibiotics, antagonist activity against pathogens and prebiotic utilization capacity. In the next step, the strains were encapsulated and the microcapsules evaluated regarding morphology, particle size and distribution, moisture, water activity and pH and temperature. The tolerance to temperature, salinity, different pH and simulated gastrointestinal fluids in the viability of the bacteria were also evaluated. The probiotics viability during the storage period was also studied. Finally, the maintenance of the immunomodulatory capacity of the encapsulated microorganisms was evaluated by means of the dosage of pro and anti-inflammatory cytokines and IgA. *L. rhamnosus* 64 and *L. paracasei* BGP1 demonstrated resistance to lysozyme, with survival rates above 80%. The hydrophobicity profiles of the cell wall were from 8.47 to 19.19%. Susceptibility to antibiotics also corroborated the literature, demonstrating resistance only to vancomycin (35 µg) and erythromycin (15 µg). The two strains were able to antagonize the growth of *Escherichia coli* V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 and *Listeria monocytogenes* ATCC 15313. As far as the capacity of using prebiotics the two strains of lactobacilli presented inverse behaviors, they used preferably inulin, raftilose 95 and lactulose. In the tests of resistance to the simulated gastrointestinal fluids it was verified a significant decline of viable cells, with subtraction of up to 3.37 log CFU / mL, justifying the application of encapsulation technology. In the

encapsulation step the capsules were produced with gum arabic, porcine gelatin and vegetable fat. The obtained capsules presented a typical format and average sizes of 80.12 ± 1.89 and 83.92 ± 1.70 μm . Extreme pH conditions (1.5 and 9.0) and temperature above 50 ° C compromised the stability of the capsules. The encapsulation significantly improved the tolerance of microorganisms to high salt concentrations and elevation of temperature. In addition, it favored the resistance of the microorganisms to the simulated gastrointestinal fluids. The stability of the microorganisms during the storage period was also favored, after 120 days of storage at 7 and 25 ° C the concentration of viable microorganisms remained higher than 7.0 log CFU / g. In the in vivo tests for evaluation of the maintenance of the immunomodulation capacity, the cytokines (IL-2, IL-6, IL-10 and TNF- α) and secretory IgA were determined, that encapsulation did not alter the immunological response by the strains of lactobacilli studied. It was concluded that the microorganisms presented in vitro behavior in accordance with the one desired for probiotic candidates. Microencapsulation was successful, giving both strains greater resistance to adverse conditions and technological stress.

Keywords: Lactobacillus; Characterization; Encapsulation; Complex coacervation; Immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** - Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LpBGP1) e *L. rhamnosus* 64 (Lr64) após exposição por 120 minutos à solução eletrolítica contendo 100 mg/L de lisozima 78
- Figura 2** - Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) após exposição por 300 minutos aos fluidos gastrointestinais simulados, sendo 120 minutos de exposição em fluidos gástricos simulados e 180 minutos de exposição em fluidos intestinais simulados 80
- Figura 3** - Utilização de inulina, lactulose, raftilose 95 (FOS) e povidexose por *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) durante o crescimento 86
- Figura 4** - Micrografias obtidas por microscopia ótica de coacervados produzidos com diferentes valores de pH: 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0 90
- Figura 5** - Avaliação rendimento do processo por meio da eficiência de decantação de coacervados produzidos com diferentes valores de pH (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0) 90
- Figura 6** - Micrografias obtidas por microscopia ótica (A) – LR: *L. rhamnosus* 64 e LP: *L. paracasei* BGP1, microscopia confocal (B) e microscopia eletrônica de varredura (C) de cápsulas carregadas com lactobacilos produzidas por coacervação complexa 92
- Figura 7** - Micrografias obtidas por microscopia ótica de cápsulas produzidas por coacervação complexa com diferentes valores de pH de ajuste (1,5, 3,0, 4,5, 7,5 e 9,0) para determinação do valor de pH ideal para o processo 94

Figura 8 - Micrografias de cápsulas carregadas com probióticos submetidas a diferentes temperaturas (40, 45 e 50 °C) capturadas por microscopia ótica (A) e microscopia confocal (B) para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade das cápsulas 95

Figura 9 - Resistência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) ao processo de homogeneização com Ultra-Turrax em diferentes velocidades (5500, 7000 e 8500 rpm) 100

Figura 10 - Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição a diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C) por 5 minutos 102

Figura 11 - Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição a diferentes concentrações de NaCl (1, 2,5 e 5%) por 120 minutos 102

Figura 12 - Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição por 300 minutos aos fluidos gastrointestinais simulados, sendo 120 minutos de exposição em fluidos gástricos simulados e 180 minutos de exposição em fluidos intestinais simulados 106

Figura 13 - Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) encapsulados por coacervação complexa durante estocagem 7 °C por 120 dias 109

Figura 14 - Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) encapsulados por coacervação complexa durante estocagem a 25 °C por 120 dias 109

Figura 15 - Níveis de sIgA total no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 10 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias 112

Figura 16 - Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 7 dias e foram desafiados com *Salmonella* e eutanasiados 10 dias depois do desafio. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias 113

Figura 17 - Níveis de citocina presente no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 10 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como média das concentrações da respectiva citocina (pg/mL de conteúdo intestinal) 114

Figura 18 - Níveis de citocinas produzidas no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 7 dias e foram desafiados com *Salmonella* e eutanasiados 10 dias depois do desafio. Os resultados estão expressos como média das concentrações da respectiva citocinas (pg/mL de conteúdo intestinal) 115

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Grupos e respectivos tratamentos recebidos para avaliação *in vivo* da segurança oral efeito da encapsulação na manutenção da capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 74

Tabela. 2 - Perfil de resistência a antibióticos de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 84

Tabela. 3 - Efeito antagonista de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 contra patógenos 85

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

% - Porcentagem; gramas/100 gramas ou gramas/100 mL

°C - Graus Celsius

µg - Micrograma

ANOVA - Análise de Variância

BHI - Infusão cérebro-coração

Cefe - Cefepima

Cefo - Cefoxitina

Ceft - Ceftriaxona

CUP - Capacidade de Utilização de Prebiótico

ELISA - Ensaio de Imunoabsorção Enzimática

Eri – Eritromicina

FGS - Fluido gástrico simulado

FIS - Fluido intestinal simulado

FOS - Fosfoligossacarídeos

g - grama

g/L - gramas/Litro

h - Hora

IgA - Imunoglobulina A

IL-10 - Interleucina 10

IL-2 - Interleucina 2

IL-6 - Interleucina 6

kPa - quilopascal

Kv - quilovolt

L - Litro

LPBGP1 -*Lactobacillus paracasei* BGP1

LR64 - *Lactobacillus rhamnosus* 64

M - Molar

m/m - massa/massa

m/v - massa/volume

min – Minuto

mL - Mililitros

MRS - *de Man, Rogosa and Sharpe*

MS - Moderadamente sensível

Neo - Neomicina

nm - Nanômetros

p/v - peso/volume

PBS - Tampão fosfato-salino

Pen - Penicilina

R - Resistente

rpm - Rotação por minuto

S - Sensível

sIgA - Imunoglobulina secretora

Tet - Tetraciclina

TGI - Trato gastrointestinal

TNF-α - Fator de necrose tumoral alfa

UFC – Unidade formadora de colônia

Van - Vancomicina

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	24
2. REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Probióticos e efeitos na saúde humana	27
2.1.1 Definição	30
2.1.2 Critérios de seleção e segurança	32
2.1.3 Dose recomendada	33
2.1.4 Mecanismos de ação	34
2.1.4.1 Proteção ecológica	34
2.1.4.2 Imunomodulação	35
2.1.4.3 Melhoria da digestão da lactose	37
2.1.4.4 Efeitos na constipação	38
2.1.4.5 Tratamento e prevenção de diarreias	40
2.1.4.6 Efeitos hipocolesterolêmicos	42
2.1.4.7 Efeitos anticarcinogênicos	44
2.1.4.8 Efeitos na infecção causada por <i>Helicobacter pylori</i>	45
2.1.4.9 Efeitos na obesidade	50
2.2 Microencapsulação de probióticos	52
2.2.1 Alimentos probióticos	52
2.2.1 Microencapsulação	55
2.2.3 Coacervação complexa	56

3. OBJETIVOS	61
3.1 Objetivo geral	61
3.2 Objetivos específicos	61
 4. MATERIAL E MÉTODOS	 62
4.1 Animais	62
4.2 Microrganismos	62
4.3 Material	63
4.4 Métodos	64
4.4.1 Avaliação <i>in vitro</i> de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64 quanto às características desejáveis para microrganismos probióticos	64
4.4.1.1 Resistência à lisozima	64
4.4.1.2 Resistência aos fluidos gastrointestinais simulados	64
4.4.1.3 Análise da hidrofobicidade da parede celular	65
4.4.1.4 Análise de susceptibilidade a antibióticos	65
4.4.1.5 Antagonismo <i>in vitro</i>	66
4.4.1.6 Utilização de prebióticos	67
4.4.2 Microencapsulação de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64 em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros	67
4.4.2.1 Produção das cápsulas carregadas com <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64	67
4.4.2.2 Determinação do pH ideal para produção das cápsulas	68
4.4.2.3 Análise morfológica e de tamanho das cápsulas	69
4.4.2.3.1 Microscopia ótica	69
4.4.2.3.2 Microscopia confocal	69

4.4.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura	69
4.4.2.3.4 Tamanho de partícula	69
4.4.2.4 Efeito do pH na estabilidade da cápsula	70
4.4.2.5 Efeito da temperatura na estabilidade da cápsula	70
4.4.2.6 Umidade e atividade de água das cápsulas	70
4.4.2.7 Sensibilidade dos microrganismos ao processo de encapsulação	70
4.4.2.8 Sensibilidade dos microrganismos ao processo de homogeneização em Ultra-Turrax	71
4.4.2.9 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados à temperatura	71
4.4.2.10 Tolerância dos microrganismos livre ou encapsulados à salinidade	71
4.4.2.11 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados	72
4.4.2.12 Avaliação da viabilidade dos microrganismos microencapsulados durante período de estocagem	72
4.4.3 Avaliação da capacidade imunomoduladora de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> livres ou microencapsulados por coacervação complexa	73
4.4.3.1 Manejo dos animais	73
4.4.3.2 Desenho experimental para procedimento de administração	73
4.4.3.2.1 Análise de translocação bacteriana	74
4.4.3.2.2 Determinação de imunoglobulina A secretora (IgAs) do conteúdo intestinal	74
4.4.3.2.3 Determinação de citocinas	75
4.4.3.3 Avaliação da capacidade protetora contra infecção de <i>Salmonella enterica</i> sorovar <i>Typhimurium</i>	75
4.5 Análises estatísticas	76

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	77
5.1 Avaliação <i>in vitro</i> de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64 quanto às características desejáveis para microrganismos probióticos	77
5.1.1 Resistência à lisozima	77
5.1.2 Resistência aos fluidos gastrointestinais simulados	79
5.1.3 Análise da hidrofobicidade da parede celular	81
5.1.4 Análise de susceptibilidade a antibióticos	83
5.1.5 Antagonismo <i>in vitro</i>	85
5.1.6 Utilização de prebióticos	85
5.2 Microencapsulação de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64 em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros	88
5.2.1 Determinação do pH ideal para produção das cápsulas	88
5.2.2 Análise morfológica e de tamanho das cápsulas	90
5.2.3 Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da cápsula	93
5.2.4 Umidade e atividade de água das cápsulas	96
5.2.5 Resistência dos microrganismos ao processo de encapsulação	97
5.2.6 Resistência dos microrganismos ao processo de homogeneização em Ultra-Turrax ...	99
5.2.7 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados à temperatura e salinidade .	101
5.2.8 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados	105
5.2.9. Avaliação da estabilidade dos microrganismos microencapsulados durante período de estocagem	108
5.3 Avaliação da manutenção da capacidade imunomoduladora de <i>L. paracasei</i> BGP1 e <i>L. rhamnosus</i> 64 livres ou microencapsulados por coacervação complexa	111

6. CONCLUSÃO	117

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	119

1. INTRODUÇÃO

Atribui-se ao russo Elie Metchnikoff as primeiras afirmações de que bactérias lácticas provenientes de leite fermentado seriam capazes de promover benefícios à saúde humana ao combaterem bactérias putrefativas residentes no intestino, as quais, segundo o cientista, seriam responsáveis por produzir substâncias tóxicas capazes de gerar danos ao organismo, e assim, reduzir a expectativa de vida do homem (ANUKAM; REID, 2007). Mais de 100 anos se passaram desde as primeiras observações de Metchnikoff e o interesse pelas bactérias benéficas cresceu consideravelmente. Em uma referência oposta ao termo “antibiótico”, atribuiu-se a essas bactérias o termo “probiótico” (ANUKAM; REID, 2007), termo do qual a definição foi reformulada várias vezes acompanhando a evolução dos achados científicos (SOCCOL et al., 2010). Atualmente, probióticos são definidos como microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002).

Os principais microrganismos classificados como probióticos pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SHARMA; DEVI, 2014). Quando ingeridos em quantidades capazes de promover alterações na ecologia microbiana desempenham seus benefícios através de diversos mecanismos, entre os quais destacam-se: 1) redução de microrganismos patogênicos através da exclusão competitiva (competição por sítios de ligação e nutrientes) e da produção de bacteriocinas; 2) estimulação do sistema imunológico; 3) síntese de vitaminas; 4) produção de ácido graxos de cadeia curta (acetato, propionato e butirato) através da fermentação de fibras; e 5) digestão da lactose reduzindo os efeitos da intolerância à lactose (ASHRAF; SHAH, 2014a).

Além dos benefícios citados benefícios ou através destes mecanismos, os probióticos são capazes de promover diversos outros efeitos benéficos ao organismo humano, alguns bem elucidados e outros ainda em fases iniciais de investigação. Entre eles pode-se citar: alívio dos sintomas de constipação intestinal (KAUR; GUPTA, 2002); prevenção e redução do

quadro de diarreias (HICKSON et al., 2007); inativação de substâncias carcinogênicas (PARVEZ et al., 2006); combate à *Helicobacter pylori* (FELLEY; MICHETTI, 2003; HOMAN; OREL, 2015); e ação hipocolesterolêmica (PAVLOVIĆ; STANKOV; MIKOV, 2012).

Em função dos benefícios atribuídos aos probióticos e ao aumento da conscientização da população em relação ao impacto da alimentação na manutenção da saúde e no surgimento de doenças, o interesse pelo consumo de alimentos contendo esses microrganismos cresceu de tal forma que hoje os alimentos contendo lactobacilos, bifidobactérias ou ambos, representam o principal grupo entre os alimentos classificados como funcionais (SHARMA; DEVI, 2014). Acredita-se que em 2014 o faturamento do mercado global de probióticos foi de 36,2 bilhões de dólares, sendo que a maior parte dessas cifras são provenientes da comercialização de produtos lácteos, setor que por questões tecnológicas é o maior produtor de alimentos funcionais contendo probióticos (COOK et al., 2012). Em 2020 acredita-se que o mercado envolvendo probióticos movimentará 100 bilhões de dólares, crescimento muito expressivo para um período de 6 anos (MACQUEEN; SURETTE; MOAYYEDI, 2017).

O grande desafio no desenvolvimento de alimentos probióticos está relacionado à sensibilidade destes microrganismos aos diversos fatores inerentes ao processo tecnológico dos alimentos, tais como temperatura elevada, valores de pH baixos ou elevados, presença de oxigênio, luz e/ou determinados ingredientes alimentícios (DE VOS et al., 2010). Além dos fatores envolvendo o processamento dos alimentos, deve-se considerar que as condições e tempo de estocagem, bem como as condições do trato gastrointestinal (TGI), em especial o pH do estômago, podem inativar ou reduzir a concentração de microrganismos presentes no alimento (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005).

Sendo a concentração ingerida de microrganismos um fator primordial para a alteração da ecologia microbiana, e conseqüentemente, para o desempenho dos benefícios proporcionados por esses microrganismos, a manutenção da viabilidade dos probióticos até o consumo e durante a passagem pelo TGI é muito importante. Por conta disso, a indústria

de alimentos vem desenvolvendo e testando uma série de alternativas, entre as quais a microencapsulação tem demonstrado resultados satisfatórios (ANAL; SINGH, 2007). Na microencapsulação o microrganismo é envolto por um uma camada de um material responsável por isola-lo do meio proporcionando proteção contra os fatores adversos e reduzindo sua atividade metabólica para evitar sua morte. Diversas técnicas e materiais são utilizados para microencapsular bactérias probióticas (DE VOS et al., 2010). A microencapsulação de bactérias além de promover proteção no alimento e na passagem pelo TGI, pode permitir liberação controlada do probiótico no intestino, algo altamente desejado.

Até pouco tempo o principal critério utilizado para determinar a eficiência de uma técnica de microencapsulação de probióticos era a capacidade de manter os microrganismos viáveis. Microencapsulava-se o microrganismo e avaliava sua resistência às condições do TGI e sua viabilidade ao longo do período de estocagem do produto (COOK et al., 2012). Quanto maior a proteção maior era a eficiência. Porém, estudos recentes têm questionado a utilização dos resultados de resistência e viabilidade como únicos critérios capazes de avaliar o quão uma técnica é adequada para microencapsulação de probióticos (CORONA-HERNANDEZ et al., 2013; SOLANKI et al., 2013). Isso porque tem-se identificado estruturas, em especial glicoproteínas da superfície celular (BRON et al., 2011; KONSTANTINOV et al., 2008), que seriam responsáveis por desencadear os benefícios probióticos no organismo humano e que podem ser destruídas sem necessariamente comprometer a viabilidade do microrganismo. Não só os efeitos do processamento, estocagem e passagem pelo TGI podem destruir essas estruturas, mas também o próprio processo de microencapsulação. Dessa forma, garante-se a viabilidade, sem necessariamente manter a capacidade de desencadear efeitos benefícios por parte das bactérias probióticas (SOLANKI et al., 2013).

Para contornar essa situação e assegurar que a técnica de microencapsulação é eficaz tanto na viabilidade das células bacterianas, bem como na preservação a funcionalidade do probiótico, torna-se necessário não somente avaliar a manutenção da viabilidade como vem sendo feito, mas também avaliar a funcionalidade. Esta última pode ser avaliada

comparando a capacidade imunomoduladora de bactérias microencapsuladas e bactérias livres. Através da dosagem de citocinas e de IgA secretora após administração das bactérias a camundongos é possível verificar se o processo de microencapsulação promoveu subtração na capacidade imunomodulatória do probiótico.

No presente projeto propõe-se microencapsular cepas de lactobacilos, uma comercial e outra isolada de fezes de neonato, e avaliar a eficiência da encapsulação em garantir não só a viabilidade das células, bem como sua funcionalidade probiótica. Até o momento a literatura é escassa de estudos que utilizaram a funcionalidade como critério de avaliação. Partindo desta motivação, o presente trabalho teve como objetivo testar um sistema inovador para microencapsulação de microrganismos probióticos e avaliar a manutenção da viabilidade e da capacidade imunomoduladora dos microrganismos após o processo de microencapsulação.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Probióticos e efeitos na saúde humana

Importantes avanços têm sido conquistados na área da medicina com a quebra do paradigma que enxergava os microrganismos como agentes exclusivamente nefastos à saúde humana. Hoje já se sabe que o corpo humano abriga mais de 100 trilhões de microrganismos que colonizam praticamente todas as superfícies do corpo expostas ao ambiente externo, incluindo a pele, cavidade oral, respiratório, urogenital e trato gastrointestinal (GERRITSEN et al., 2011). Esses microrganismos e o homem estabelecem uma verdadeira relação de mutualismo, onde os primeiros recebem nutrientes e um ambiente propício para se viver, e o segundo recebe proteção ecológica contra infecções ocasionadas por microrganismos patogênicos e estímulo constante do seu sistema de defesa, de modo a aperfeiçoá-lo para o combate de futuros invasores maléficos (BRANDT; SAMPAIO; MIUKI, 2006).

Dos sítios de colonização de microrganismos no corpo humano, nenhum outro chama mais atenção do que o trato gastrointestinal, seja pela quantidade ou pela diversidade de microrganismos (LANDMAN; QUÉVRAIN, 2016). O TGI do ser humano é um ecossistema altamente complexo e especializado que tem mais de 400 m² de área de superfície, constituindo a maior área de superfície do corpo depois do trato respiratório (GUPTA; GARG, 2009). Embora haja presença de microrganismos ao longo de todo trato gastrointestinal, o intestino, em especial o intestino grosso, é o ambiente que alberga o maior número de microrganismos, os quais em sua totalidade são designados como microbiota intestinal (GERRITSEN et al., 2011; JANDHYALA et al., 2015). Acredita-se que mais de 70% de todos os microrganismos no corpo humano estejam no intestino grosso, sendo esta população 10 vezes maior do número total de células do próprio organismos humano (SCHIPPA; CONTE, 2014).

Evidências sugerem que mais de 1000 espécies componham essa microbiota, sendo estas predominantemente pertencentes aos filos Bacteroidetes e Firmicutes, seguido por Proteobacteria e Actinobacteria (BAUMLER; SPERANDIO, 2016). Esta comunidade é comumente referida como um órgão metabólico oculto devido ao seu imenso impacto no bem-estar humano, incluindo o metabolismo do hospedeiro, a fisiologia, a nutrição e a função imune (GUINANE; COTTER, 2013).

É provável que o início do processo de colonização do TGI ocorra imediatamente após o nascimento, no entanto, começam a surgir evidências de que há presença de microrganismos no líquido amniótico no útero mesmo em neonatos saudáveis (JIMÉNEZ et al., 2008). Grande parte dos microrganismos colonizadores são oriundos do organismo materno e do ambiente, sendo transferidos ao recém-nascido durante sua passagem pelo canal vaginal e pelo contato com superfícies do corpo da mãe, em especial com as mamas e mãos (SALMINEN; ISOLAURI, 2006). Recentemente, o leite materno foi identificado como uma importante fonte natural de microrganismos, tendo um papel fundamental no processo de colonização intestinal (MARTÍN et al., 2003).

A microbiota intestinal, enquanto uma biomassa viva é altamente dinâmica, sua composição pode ser influenciada por diversos fatores, tais como dieta, idade, uso de medicamentos, consumo de bebidas alcoólicas, fumo, estresse, fadiga, ingestão de microrganismos (probióticos) e/ou ingredientes alimentares capazes de estimular o crescimento seletivo de microrganismos (prebióticos), entre outros (MANZONI; CAVALLINI; ROSSI, 2008). Embora seja um desafio definir a composição ideal de uma microbiota intestinal, tem-se designado como microbiota saudável àquela capaz de conservar e promover o bem-estar e a ausência de doenças, especialmente as doenças do trato gastrointestinal. Para o equilíbrio entre microbiota e hospedeiro utiliza-se o termo eubiose, enquanto o desequilíbrio é conhecido como disbiose (CARDING et al., 2015; SAAD, 2006).

Embora tenham sido identificados diversos fatores capazes de perturbar o equilíbrio microbiano do intestino, o processo de disbiose é complexo. Já se sabe que este desequilíbrio está relacionado com a patogênese vários transtornos intestinais e extra intestinais (CARDING et al., 2015). Dentre os transtornos associados é possível citar enfermidades como doenças autoimunes e autoinflamatórias, tais como alergias, obesidade e doenças intestinais inflamatórias, síndrome metabólica e doenças cardiovasculares (SCHIPPA; CONTE, 2014).

Diante sua importância para manutenção da saúde e prevenção de doenças, é crescente o interesse por estratégias capazes de modular a microbiota intestinal por meio da ingestão de microrganismos reconhecidamente benéficos (NATIVIDAD; VERDU, 2013). Neste contexto os microrganismos classificados como probióticos configuram como o principal grupo de interesse para manipulação da microbiota intestinal. Os probióticos são representados majoritariamente por bactérias pertencentes aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SHARMA; DEVI, 2014), embora bactérias de outros gêneros e até leveduras também sejam classificadas como probióticos (SAAD, 2006).

2.1.1 Definição

A introdução do termo probiótico à literatura científica é atribuída a Lilly e Stillwell, que em 1965 definiram probióticos como compostos ou extratos de tecidos capazes de estimular o crescimento microbiano ao constatar que substâncias produzidas por um protozoário foi capaz de estimular o crescimento de um outro protozoário. A escolha da dupla pelo termo probiótico não teve nenhuma relação com os achados do russo Elie Metchnikoff. A palavra que deriva do grego e significa “*para vida*”, teve sua escolha motivada como antônimo do termo antibiótico, utilizado para designar substâncias capazes de combater o crescimento microbiano.

Dez anos mais tarde Parker (1974) propôs uma nova definição ao termo introduzido por Lilly e Stillwell. Parker ao estudar suplementos alimentares animais que promoveram benefícios ao hospedeiro, incluindo alteração da microbiota intestinal, sugeriu que probióticos seriam organismos e substâncias capazes de contribuir para o equilíbrio microbiano intestinal. Embora a sugestão de Parker de certa forma tenha contribuído para definição atual do termo probiótico, naquela época sua proposta foi considerada insatisfatória e inadequada. Segundo Fuller (1989), que mais tarde também apresentou uma proposta de definição para probióticos, a definição de Parker era imprecisa, pois a palavra substância poderia incluir antibióticos, os quais apresentam efeito contrário aos probióticos. De acordo com Fuller, probióticos deveriam ser considerados como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o animal hospedeiro melhorando o equilíbrio de sua microbiota intestinal.

Pouco tempo depois, Havenaar e Huis In't Veld (1992) apresentaram uma importante contribuição quanto ao aprimoramento da definição de probióticos. Esses autores propuseram que probióticos seriam culturas puras ou mistas de microrganismos vivos, bactérias e leveduras, que quando administrados aos animais ou ao homem, teriam efeitos benéficos ao hospedeiro promovendo equilíbrio da sua microbiota intestinal. Neste mesmo ano, a dupla, em conjunto com um terceiro pesquisador, publicou um importante estudo

envolvendo a seleção de cepas para uso como probióticos (HAVENAAR; BRINK; HUIS IN 'T VELD, 1992).

Outra importante definição foi sugerida durante o 21º Congresso Internacional de Ecologia Microbiana e Doenças, realizado na França em 1996, sediado pelo Instituto Pasteur. Na ocasião, Labip (1996) sugeriu como definição que probióticos seriam microrganismos que quando ingeridos em quantidades suficientes apresentariam à saúde do hospedeiro efeitos positivos que vão além dos efeitos nutricionais convencionais.

Com ascensão dos probióticos como objeto de estudo, e conseqüentemente, o aumento de publicações envolvendo estes microrganismos, surgiu a necessidade de estabelecer uma definição consensual ao termo probiótico. Nesse momento, importantes entidades tiveram um papel fundamental para definição do termo. Em 1999, o Instituto Federal de Proteção da Saúde e de Medicina Veterinária (BgVV) da Alemanha, atualmente conhecido como Instituto Federal de Avaliação dos Riscos (BfR), definiu probióticos como determinados microrganismos vivos, que quando atingem o intestino em quantidades suficientes e forma ativa, exercem benefícios para a saúde. No mesmo ano, a Comissão Europeia de Ação Concentrada em Ciência dos Alimentos Funcionais na Europa, órgão subordinado ao Instituto Internacional de Ciências da Vida, publicou um documento de consenso com os conceitos científicos de alimentos funcionais na Europa, no qual o termo probiótico foi definido como um ingrediente alimentar microbiano vivo que é benéfico para a saúde (SCIENTIFIC CONCEPTS OF FUNCTIONAL FOODS IN EUROPE CONSENSUS DOCUMENT, 1999).

Finalmente, em 2001 a Organização das Nações Unidas para a Alimentação e a Agricultura (FAO) e a Organização Mundial de Saúde em uma consulta realizada a um grupo de pesquisadores com expertise na área, estabeleceu em Córdoba, na Argentina, a definição mundialmente aceita até o presente momento, a qual diz de que probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro.

2.1.2 Critérios de seleção e segurança

Como já mencionado, a microbiota intestinal é composta por um elevado número de microrganismos de diferentes espécies. A maioria destes não representa perigo ao homem, entretanto, nem todos são considerados microrganismos probióticos (SOCCOL et al., 2010). Para que um microrganismo seja considerado como tal, é preciso que uma série de critérios sejam atendidos, em geral estes critérios envolvem a precisa identificação do microrganismo, determinação de segurança, caracterização funcional *in vitro* e comprovação de benefícios *in vivo* (GUPTA; GARG, 2009; REID, 2016).

Durante muito tempo recomendou-se fortemente que a cepa candidata ao uso como probiótico fosse de origem humana (SAAD, 2006). Entretanto, hoje há um número crescente de estudos envolvendo microrganismos isolados de fontes diversas para uso como probiótico a humanos, exemplos são as cepas de lactobacilos isoladas da fermentação do queijo (ZAGO et al., 2011) ou da fermentação do cacau (SANTOS et al., 2016). Além do critério quando a origem, todo microrganismo utilizado como probiótico deve apresentar identificação taxonômica precisa, não podem possuir histórico de patogenicidade e devem ser desprovidos de capacidade de transferência de genes de resistência (FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2002; UPADHYAY; MOUDGAL, 2012).

Como é necessário que os probióticos cheguem vivos e em concentrações adequadas ao intestino para que possa desempenhar suas funções, também se espera que eles apresentem resistência às condições adversas do trato gastrointestinal (DE VOS et al., 2010). Dessa forma, devem ser tolerantes aos fluidos gastrointestinais, que incluem, ácido gástrico, sais biliares, enzimas pancreáticas digestivas. Ao chegarem ao intestino os microrganismos probióticos devem ser capazes de aderir e colonizarem a mucosa intestinal mesmo que temporariamente, sendo desejável que apresentem velocidade específica de crescimento elevada. Devem produzir substâncias antimicrobianas contra as bactérias patogênicas e capacidade de influenciar atividade metabólica local (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005; GBASSI; VANDAMME, 2012).

Probióticos recebem a classificação de GRAS – (“*Generally Recognized as Safe*”) e são bem tolerados. Um número significativo de estudos clínicos controlados envolvendo lactobacilos e bifidobactérias não revelaram efeitos maléficos causados por esses microrganismos (KANMANI et al., 2013). Estudos realizados com a administração desses microrganismos na dose de 10^6 - 10^9 UFC/dia por aproximadamente um ano não constataram nenhum efeito adverso (OUWEHAND, 2017).

Alguns autores como Didari et al. (2014) e Doron e Snyderman (2015), no entanto, sugerem cautela quanto a utilização de probióticos em determinadas situações, especialmente em pacientes criticamente doentes em unidades de terapia intensiva, lactentes criticamente doentes, pacientes pós-operatórios e pacientes com imunidade significativamente comprometida. Há relatos na literatura de atuações oportunistas indesejável de probióticos em função da bacteremia e fungemia. Em 2010, Sanders et al. publicaram uma importante revisão de literatura abordando os cuidados necessários na avaliação de segurança de microrganismos candidatos ao uso como probióticos.

2.1.3 Dose recomendada

A dosagem necessária para garantir os efeitos probióticos é sem dúvida um dos tópicos mais discutidos e polêmicos na literatura científica pertinente ao tema. O que pode ser considerado como consenso até o momento é a necessidade da ingestão contínua para a ocorrência de efeitos (SAAD, 2006). A grande dificuldade em estabelecer valores reside no fato de que a dose efetiva de probióticos é influenciada por uma multiplicidade de variáveis, entre elas o benefício probiótico desejado e microrganismo (OUWEHAND, 2017). Sabe-se que os níveis populacionais do probióticos devem ser suficientemente elevados para ter um impacto no local onde se espera que ele desenvolva a sua função. Em ecologia microbiana considera-se que um microrganismo influi no ecossistema onde ele se encontra somente quando a sua população é igual ou superior a 10^7 UFC/g ou UFC/ml do conteúdo (RIBEIRO, 2008).

Em 2017, Ouwehand apresentou uma importante contribuição à comunidade científica ao elaborar uma revisão sobre a dose-resposta de probióticos relatadas em dezenas de estudos, através disso o autor tentou encontrar alguma correlação quanto uma dosagem ideal. O autor constatou que a dose-resposta é uma característica cepa-dependente. A maioria dos estudos relatam dosagem de 10^7 UFC/dia a 10^{11} UFC/dia. Quanto maior a dosagem, maior seria a eficácia do probiótico, entretanto, isso não é regra. Em alguns casos, como no estudo de Whorwell et al. (2006) que avaliou a eficácia de *Bifidobacterium infantis* 35624 de atenuar o processo inflamatório em mulheres com síndrome do intestino irritável verificou-se que o aumento da dosagem de 10^8 UFC/dia para 10^{11} UFC/dia não potencializou o efeito do probiótico, em contrapartida, a dosagem de 10^6 UFC/dia não apresentou diferenças significativa quando comparado com o placebo.

2.1.4 Mecanismos de ação

2.1.4.1 Proteção ecológica

A proteção ecológica atribuída aos probióticos está relacionada com a capacidade de manter a microbiota intestinal saudável. Esse equilíbrio é atingido através do aumento de bactérias benéficas e a redução dos microrganismos que afetam de maneira negativa o bem-estar do homem (SÁNCHEZ et al., 2016). Compreender como os probióticos interagem com os microrganismos indesejáveis conferindo uma proteção ecológica é o primeiro passo para o entendimento de qualquer outra alegação de benefício atribuída a eles (GERRITSEN et al., 2011).

Diversos mecanismos têm sido propostos com a finalidade de esclarecer a ação protetora dos probióticos na ecologia microbiana no intestino. Muitos autores acreditam que os probióticos são capazes de alterar a ecologia intestinal através da competição exclusiva com os demais microrganismos ali presentes. Os processos de competição por nutrientes, competição por sítio de ligação e produção de substâncias antimicrobianas são os mais citados na literatura (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; SOCCOL et al., 2010).

O mecanismo de competição por nutrientes é considerado de grande importância, uma vez que a disponibilidade de nutrientes representa um fator limitante ao crescimento microbiano. Embora o intestino seja uma rica fonte de nutrientes provenientes da dieta, muitos microrganismos requerem para seu crescimento determinados nutrientes que chegam ao cólon em quantidades limitadas (LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007; SINGH et al., 2011; UPADHYAY; MOUDGAL, 2012).

Outro importante fator que faz com que os probióticos promovam uma proteção ecológica é a competição por receptores intestinais para adesão. As bactérias patogênicas necessitam se aderir aos receptores da mucosa intestinal para que possam desempenhar suas ações (SAHA et al., 2012; SERVIN; COCONNIER, 2003). Quando os probióticos estão presentes aderidos à mucosa intestinal, formando uma espécie de barreira física, o número de receptores disponíveis se torna limitado, o que faz com que bactérias patogênicas como *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, *Yersinia enterocolitica* e *Escherichia coli*, não se liguem a esses receptores e sejam excluídas por competição (CARDING et al., 2015).

A produção de algumas substâncias com atividade antimicrobiana já foi identificada em várias cepas de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*. Estudos têm sugerido que bifidinas produzidas por bifidobactérias tem ação efetiva contra *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ANUKAM; REID, 2007; REID, 2016). Muitos autores acreditam que a capacidade das bactérias probióticas de produzirem substâncias nefastas às bactérias patogênicas contribuiria para redução da carga microbiana indesejável aumentando a proporção de bactérias benéficas no cólon (OELSCHLAEGGER, 2010).

2.1.4.2 Imunomodulação

O intestino é o maior órgão do sistema imunológico do corpo, e como tal, é a localização para a maioria dos linfócitos e outras células do sistema de defesa. Diariamente é exposto a diversos corpos estranhos, incluindo componentes da dieta e microrganismo patogênicos, que em determinadas circunstâncias poderiam ser letais. Dessa forma, o desenvolvimento

da função imunológica normal do intestino é vital para a sobrevivência. Sabe-se que sua maturidade é dependente do antígeno apropriado de exposição e seu processamento, além de uma barreira intestinal intacta (ASHRAF; SHAH, 2014b; GUPTA; GARG, 2009; MORAIS; JACOB, 2006).

A primeira interação que as bactérias ingeridas têm com o sistema imunológico ocorre através do contato com tecido linfóide associado ao trato gastrointestinal (GALT). A partir desse contato, diferentes componentes do sistema de defesa da mucosa são ativados para que seja iniciada a formulação de uma resposta específica na tentativa de mediar a exclusão do microrganismo, impedindo sua aderência epitelial e penetração (PICARD et al., 2005; SARKAR; MANDAL, 2016). O que se sabe hoje, é que as células epiteliais reconhecem as bactérias patogênicas e seus componentes e liberam citocinas pró-inflamatórias, mas não reagem de maneira negativa perante os probióticos (WAITZBERG, 2009).

Além de não serem reconhecidos como patógenos, os probióticos exercem uma considerável influência no crescimento e manutenção da resposta imune. Os estudos indicam essa ação tanto na resposta imune específica quanto na não específica do hospedeiro contra antígenos potencialmente nocivos (OELSCHLAEGGER, 2010).

Para funcionar como eficazes agentes profiláticos contra doenças comuns, os probióticos devem reforçar os elementos da imunidade inata e adquirida do sistema imune da mucosa. Como a mucosa é primeira linha de defesa do corpo, seu sistema de defesa é fundamental para a proteção contra patógenos invasores. O sistema imune da mucosa consiste em componente físico (muco), molecular (proteínas antimicrobianas) e componentes celulares que agem sinergicamente para prevenir micróbios invasores do corpo. A desregulação ou comprometimento do sistema imune da mucosa está implicado em uma série de doenças inflamatórias, como colite ulcerativa e doença celíaca, bem como a susceptibilidade aumentada ao câncer e infecção (WEST et al., 2009).

Os probióticos podem influenciar o sistema imune através de seus produtos metabólitos, componentes da parede celular e DNA. Dessa forma, os efeitos imunomoduladores podem ser alcançados mesmo com bactérias probióticas mortas, através, por exemplo, do peptidoglicano ou fragmento de material genético (OELSCHLAEGGER, 2010; YAN; POLK, 2011). O DNA bacteriano probiótico é reconhecido de maneira diferente por células epiteliais, diferente das bactérias patogênicas que evocam a fosforilação de vias de quinase reguladas por sinalização extracelular e ativação do ativador de proteína (WAITZBERG, 2009).

Os probióticos já foram relacionados com o aumento da resposta imune celular inespecífica caracterizada pela ativação de macrófagos, células *Natural Killer* (NK), linfócitos T citotóxicos específicos, modulação da liberação de imunoglobulina A e com a liberação de várias citocinas anti-inflamatórias (ASHRAF; SHAH, 2014a; YAN; POLK, 2011). Outro benefício já demonstrado está voltado para estimulação das células dendríticas. Essas são células apresentadoras de antígenos encontradas ao longo do intestino e capturam amostras de antígenos entéricos e os apresentam a células T inativas resultando em sua ativação e diferenciação (ASHRAF; SHAH, 2014a).

A influência dos probióticos na modulação do sistema imunológico tem conduzido estudos envolvendo o uso destes microrganismos em condições específicas, tais como alergias (FURRIE, 2005; ÖZDEMIR, 2010; YANG; LIU; YANG, 2013), doenças inflamatórias (NG et al., 2009; SHEIL; SHANAHAN; O'MAHONY, 2007) doença da imunodeficiência adquirida (AIDS) (D'ANGELO; REALE; COSTANTINI, 2017; REID, 2010), entre outras.

2.1.4.3 Melhoria da digestão da lactose

A capacidade dos probióticos de promover melhoria na digestão da lactose, e assim, contribuir para redução dos sintomas associados à intolerância à lactose é frequentemente citada em revisões que abordam os benefícios dos probióticos em humanos (DE VRESE; SCHREZENMEIR, 2008; MARTEAU, 2002; SINGH et al., 2011; UPADHYAY; MOUDGAL, 2012), entretanto, a maioria dessas revisões não apresenta estudos que comprovem tal benefício.

A intolerância à lactose é causada pela deficiência da enzima β -galactosidase a nível intestinal, resultando na impossibilidade de digerir esse dissacarídeo (SHARMA; DEVI, 2014). Os indivíduos que apresentam essa deficiência desenvolvem diarreia, flatulência, dor abdominal, podendo até apresentar febres logo após o consumo de leite. Sendo que esses sintomas variam de acordo com o grau da intolerância (SINGH et al., 2011).

A redução dos sintomas da intolerância à lactose é atribuída redução do conteúdo em lactose no iogurte devido à fermentação pelas bactérias produtoras de ácido láctico; à atividade da β -galactosidase das próprias bactérias que produzem o iogurte; e à menor velocidade de esvaziamento gástrico deste em relação ao leite (RIBEIRO, 2008; VARAVALLO; THOMÉ; TESHIMA, 2008). De mecanismos que não envolvem o consumo de iogurte, mas a ingestão direta de probióticos, acredita-se que os microrganismos possam liberar as enzimas no lúmen intestinal quando sofrem lise (STAUDACHER, 2015)

Espécies de *Bifidobacterium* e *Lactobacillus* têm sido frequentemente utilizadas na produção de iogurtes e outros produtos do leite fermentado. Sendo a intolerância à lactose, provavelmente é uma das utilizações mais antigas dos probióticos, pois desde há muito se sabe que o iogurte é muito melhor tolerado que o leite pelos indivíduos intolerantes à lactose (VARAVALHO et al., 2008). Entretanto, os resultados ainda são inclusivos. Em uma revisão sistemática realizada por Levri et al. (2005) em que avaliaram 10 estudos clínicos não encontraram associação significativa entre a ingestão de probióticos e a redução dos sintomas relacionados à intolerância à lactose.

2.1.4.4 Efeitos na constipação

A constipação é uma condição muito frequente que afeta crianças e adultos. É considerada um sintoma, não uma doença. Dessa forma, trata-se de um sintoma debilitante caracterizado por frequência evacuatória menor do que três vezes por semana, com fezes secas e duras que levam a defecação dolorosa. Ao exame físico uma massa palpável fecal é frequentemente encontrada no abdômen e no reto. Essa condição pode resultar em alguns

desconfortos como a distensão e dor abdominal, cefaleia, tontura e falta de apetite (BEKKALI et al., 2007; WOJTYNIAK; SZAJEWSKA, 2017).

As principais funções do cólon são absorver água e eletrólitos, conduzir as fezes a partir do intestino delgado e armazenar as fezes, especialmente no sigmoide, antes das evacuações. Após as refeições podem ocorrer contrações colônicas de grande amplitude, denominadas reflexo gastrocólico, que se propagam a partir do sigmoide proximal em direção a sua porção terminal, empurrando a massa fecal para o interior do reto. O reflexo evacuatório inicia-se com a chegada do bolo fecal na ampola retal. Com a dilatação retal, os receptores sensíveis ao estiramento determinam o relaxamento do esfíncter interno do ânus (reflexo reto anal), permitindo que o conteúdo retal seja percebido de modo discriminado para gases, líquidos ou fezes pastosas. Neste momento, o indivíduo pode decidir pela eliminação de flatos ou pela contração voluntária do esfíncter externo até chegar ao local apropriado para defecar (MORAIS e MAFFEI, 2002).

A capacidade dos probióticos de contribuir para o alívio e prevenção da constipação está relacionada com dois mecanismos que se correlacionam. O primeiro estaria ligado ao combate à disbiose intestinal geralmente frequente em indivíduos com constipação. O acúmulo constante de fezes no cólon causa efeitos negativos sob microbiota intestinal aumentando a quantidade de bactérias putrefativas e patogênicas. Dessa forma, a ação dos probióticos seria promover o restabelecimento para uma microbiota saudável, alterando sua composição ao reduzir o número de bactérias putrefativas. Essa redução pode ocorrer através da produção de ácidos, principalmente ácido láctico e ácidos graxos de cadeia curta, que torna o ambiente intestinal bastante desfavorável à proliferação de desses microrganismos. O segundo mecanismo está relacionado com a interferência desses ácidos no peristaltismo intestinal. Um pH mais baixo aumenta o peristaltismo do cólon e, posteriormente, poderia diminuir o tempo de trânsito colônico (CHMIELEWSKA; SZAJEWSKA, 2010; MARTÍNEZ-MARTÍNEZ; CALABUIG-TOLSÁ; CAULI, 2017)

Chmielewska e Szajewska (2010) realizaram uma revisão sistemática sobre o uso de probióticos para tratamento e prevenção da constipação. Segundo esses autores, a principal conclusão da análise é que há escassez de provas disponíveis a partir de estudos controlados para avaliar com segurança os efeitos da administração de probióticos sobre a constipação. Todas as conclusões são baseadas em estudos isolados, alguns dos quais tinham um número limitado de participantes e apresentavam limitações metodológicas, assim, as conclusões devem ser interpretadas com cautela. Repetir os estudos com as estirpes probióticas que provaram ser eficazes se faz necessário. A escassez de dados não permite concluir se um probiótico em particular é mais eficaz do que outro.

2.1.4.5 Tratamento e prevenção de diarreias

Os mecanismos pelos quais os probióticos são capazes de influenciar no tratamento e prevenção de diarreias vêm sendo extensivamente estudado há muito tempo, fazendo desse benefício um dos mais bem documentados na literatura científica (DE VRESE; OFFICK, 2010; HICKSON et al., 2007; UPADHYAY; MOUDGAL, 2012).

A diarreia consiste na eliminação anormal de fezes, líquidas ou moles, em grande quantidade e frequentemente acompanham o hiperperistaltismo intestinal. Qualquer condição (infecções, intoxicações, inflamações etc.) que comprometa o funcionamento normal do intestino delgado ou do grosso pode levar a esse quadro, trazendo como principais consequências as perdas de água e eletrólitos (VARAVALLO, THOMÉ e TESHIMA, 2008).

A terapia de reidratação associada ao uso de probióticos hoje é considerada uma eficiente alternativa para o tratamento de diarreias. Acredita-se que os probióticos tenham efeitos preventivos assim como curativos em diversos tipos de diarreia de etiologia diferentes (LEAHY et al., 2005; DE VRESE e MARTEAU, 2007; GRUPTA e GARG, 2009).

Os estudos da atuação dos probióticos na diarreia associada a antibióticos vêm conduzidos há muito tempo. Hoje essa alegação de saúde é aceita e praticada em diversos hospitais do mundo inteiro, principalmente nos Estados Unidos e em países da Europa. Os estudos são estimulados pelo fato da diarreia representar um grande risco a saúde especialmente importante em crianças, para os quais os antibióticos são prescritos com frequência (JOHNSTON, SUPINA e VOHRA, 2006). Contardo et al., (2005), recordam bem, que diarreia associada a antibióticos tem sido associada a um aumento do número de dias de hospitalização e um alto custo em medicina.

A diarreia é um efeito colateral comum em indivíduos submetidos a tratamentos de radioterapia. Muitos autores acreditam a radioterapia tem um efeito profundo na mucosa e microbiota intestinal, alterando sua composição, permeabilidade e motilidade. Seu efeito necrosante faz com que o epitélio fique sem cobertura celular e com diminuição das vilosidades, causando diarréias intensas (MUEHLBAUER et al., 2009). Nesse sentido, diversos estudos têm investigado o potencial uso de probióticos para pacientes com câncer com diarreia relacionada ao tratamento.

Em um estudo duplo-cego, controlado com placebo, Delia et al, (2007) avaliaram a eficácia dos probióticos na prevenção de diarréias induzidas por radiação. O estudo contou com a participação de quatrocentos e noventa e pacientes que foram submetidos à radioterapia pós-operatória após cirurgia para câncer de cólon, reto ou cervical. A partir do primeiro dia de radioterapia, os pacientes receberam um sachê contendo *B. longum*, *B. breve*, *B. infantis*, *L. casei*, *L. plantarum*, *L. acidophilus*, *L. delbruekii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus salivarius* subsp. *Thermophilus* ou placebo. Os parâmetros de eficácia foram incidência e severidade da diarreia induzida por radiação e o número diário de evacuações. Os resultados mostram que quadros de diarréias foram mais frequentes no grupo que recebeu placebo quando comparado com o grupo que recebeu as culturas probióticas.

Apesar dos resultados positivos, Muehlbauer et al. (2009) reportam bem que antes de recomendações definitivas possam ser feitas, são necessárias mais pesquisas para

determinar a cepa probiótica, dosagem e calendário de administração que é mais eficaz para a prevenção e tratamento de da diarreia induzida por radioterapia.

2.1.4.6 Efeitos hipocolesterolêmicos

Desde que Shaper et al. (1963) e Mann e Spoerry (1974), observaram que homens africanos das tribos de guerreiros Samburu e Maasai apresentaram redução nos níveis de colesterol sérico após consumo de grandes quantidades de leite fermentado, cresceu cada vez mais o interesse nos possíveis efeitos benéficos de lactobacilos e bifidobactérias no metabolismo lipídico humano (PEREIRA e GIBSON, 2002).

Vários estudos in vitro e in vivo têm fornecido evidências experimentais para apoiar o papel dos probióticos na redução do colesterol sérico e na melhoria do perfil lipídico (LYE et al., 2009). No entanto, os dados científicos que consta até o presente momento são controversos, necessitando de mais investigações (SCHEINBACH, 1998).

Assim como nos outros benefícios atribuídos aos probióticos, os efeitos hipolipemiantes são espécie e cepa específicos (SOOMRO, 2002). A principal dificuldade em extrapolar para humanos os resultados encontrados em ratos, está no fato da modulação dos lipídios sanguíneos induzida por probióticos não ser similar em animais e humanos, devido principalmente às diferenças no metabolismo do colesterol entre as espécies (MANZONI, CAVALLINI e ROSSI, 2008).

Os mecanismos pelos quais os probióticos afetam as concentrações de colesterol permanecem em estudo (MANZONI, CAVALLINI e ROSSI, 2008). Algumas hipóteses têm sido propostas, as quais incluem: assimilação do colesterol pelas bactérias (PEREIRA e GIBSON, 2002); incorporação do colesterol à parede celular das células bacterianas (GILLILAND et al., 1985); desconjugação enzimática dos sais biliares e alteração do metabolismo lipídico pela atuação dos ácidos graxos de cadeia curta (WALKER e GILLILAND, 1993; BEGLEY et al., 2006).

Segundo Pereira e Gibson (2002), as bactérias probióticas teriam a capacidade de assimilar e/ou incorporar colesterol à parede celular, tornando indisponível a sua absorção do intestino para a corrente sanguínea. Avaliando a capacidade de assimilação de colesterol por diversas bactérias probióticas, esses pesquisadores relataram que *B. infantis* ATCC 15697 foi capaz de incorporar colesterol do meio de cultura MRS suplementado com ácidos biliares e colesterol.

A desconjugação de ácidos biliares é explicada através do fato de algumas cepas bacterianas probióticas serem capazes de produzir enzimas que promoveriam essa desconjugação, as chamadas hidrolase de sais biliares (HSB) (BEGLEY et al., 2006). Dois mecanismos são propostos para explicar a influência das ações dessas enzimas na concentração de colesterol. O primeiro envolve a circulação entero-hepática. Segundo Begley et al., (2006), sais biliares desconjugados são menos eficientemente reabsorvidos quando comparados aos ácidos biliares conjugados, o que resulta em aumento da excreção desses ácidos nas fezes. Com a redução da reabsorção, aumenta a demanda de colesterol para síntese de ácidos biliares que precisam ser repostos, com isso ocorre redução das concentrações plasmáticas de colesterol (PARK et al, 2007). No segundo mecanismo, a redução do colesterol plasmático se daria por uma menor absorção, à medida que há uma co-precipitação do colesterol juntamente com os ácidos biliares desconjugados.

Em relação à atuação dos ácidos graxos de cadeia curta, a redução das concentrações de colesterol está baseada na inibição da síntese de colesterol hepático e/ou ao aumento da redistribuição do colesterol do plasma para o fígado (HARA et al., 1998). Diferentes caminhos metabólicos têm sido demonstrados para a formação dos AGCC e a composição da microbiota intestinal pode interferir nos níveis produzidos (MANZONI, CAVALLINI e ROSSI, 2008). O propionato é amplamente metabolizado no fígado, é gliconeogênico e pode inibir a lipogênese. Entretanto, o efeito do propionato sobre o metabolismo do colesterol é controverso (HARA et al., 1998).

Vários estudos vêm sendo conduzidos na tentativa de elucidar os mecanismos de ação dos probióticos e identificar cepas com capacidade de produzir efeito hipocolesterolêmico no hospedeiro. Esses estudos esbarram na dificuldade de selecionar populações específicas para compor a amostra e definir as doses a serem administradas e a duração (MANZONI, CAVALLINI e ROSSI, 2008).

Kieling et al. (2002), desenvolveram um estudo randomizado, duplo-cego e controlado com placebo envolvendo 29 mulheres para avaliar o efeito hipocolesterolêmico de iogurte suplementado com *L. acidophilus* 145 e *B. longum* 913. O estudo teve duração de 21 semanas, envolvendo a administração de 300 g/dia de iogurte. Os resultados obtidos mostraram que a fração de HDL-C foi aumentada de forma significativa ($P < 0,05$) de 0,3 mmol/L e a relação de LDL / HDL colesterol diminuiu de 3,24-2,48.

2.1.4.7 Efeitos anticarcinogênicos

Além dos efeitos favoráveis contra doenças causadas por um desequilíbrio da microbiota intestinal, várias observações experimentais que indicara um potencial protetor dos probióticos contra o desenvolvimento de tumores no cólon (CARDING et al., 2015; GUPTA; GARG, 2009; KUMAR et al., 2010).

O câncer de cólon corresponde a terceira causa de morte mais comum por neoplasia no mundo. Diversos são os estudos que tentam estabelecer relações entre bactérias e esse tipo de câncer. Já se sabe que diversos metabólitos bacterianos são carcinogênicos, como por exemplo, os fecapentanos, as nitrosaminas, o fenol, o indol, as aminas, a amônia, entre outros (ZIEMER e GIBSON, 1988). Dessa forma, segundo Benadi e Rossi (2009), o grande interesse por probióticos aumenta a partir da possibilidade de se modular beneficamente a microbiota intestinal no sentido de diminuir bactérias associadas a doenças colônicas.

Os mecanismos pelos quais os probióticos podem inibir o câncer de cólon não estão ainda completamente caracterizados. No entanto, há evidências de: alteração das atividades metabólicas da microbiota intestinal, alteração das condições físico-químicas do cólon, ligação de possíveis carcinógenos, produção de ácidos graxos de cadeia curta, produção de compostos antitumorais e antimutagênicos, elevando a resposta imunológica do hospedeiro (FOTIADIS, et al., 2008). Outros estudos sugerem que a microbiota normal pode influenciar a carcinogênese por produzir enzimas (glicosidase, β -glucuronidase, azoreductase e nitrorreductase) que se transformam em agentes cancerígenos ativos. A hipótese é que certos probióticos podem proteger o hospedeiro desta atividade reduzindo essas enzimas do lúmen intestinal (BROWN e VALIERE, 2004).

Embora existam vários estudos que fornecem boas evidências para a ação probiótica contra a incidência de câncer, os mecanismos precisos ainda não foram elucidados. Estudos de longo prazo são necessários para fornecer provas suficientes para os efeitos anticarcinogênicos de probióticos (SHARMA; DEVI, 2014; WANG et al., 2017b).

2.1.4.8 Efeitos na infecção causada por *Helicobacter pylori*

Helicobacter pylori (*H. pylori*) é um microrganismo Gram-negativo, pelo qual estima-se que 60% da população mundial esteja infectada (TROVISQUEIRA; MOREIRA, 2014). Os países em desenvolvimento apresentam maiores prevalência de infecção por *H. pylori*, o que sugere relação da contaminação com as condições higiênico-sanitárias, implicando alimentos, água e solo como importantes meios transmissão (BROWN, 2000), além da transmissão pessoa-pessoa via oral-oral ou fecal-oral (KODAIRA; ESCOBAR; GRISI, 2002).

A *H. pylori* é uma bactéria que se destaca pela particularidade de ter como sítio de colonização a mucosa gástrica, ambiente hostil para maioria dos microrganismos por conta do reduzido valor de pH encontrado no interior estomacal. Para se adaptar ao ambiente gástrico este microrganismo se vale da sua capacidade de produzir urease, que hidrolisa a

ureia em dióxido de carbono e amônia e eleva o pH nos arredores da bactéria (HOMAN; OREL, 2015).

Acredita-se que na maioria dos casos a infecção por *H. pylori* seja adquirida na infância (PACIFICO et al., 2014) e que muitas pessoas não apresentam sintomas ao longo da vida. Por outro lado, sabe-se que a infecção pela bactéria está altamente associada à ocorrência de doenças gastrointestinais, incluindo inflamação gástrica, úlcera péptica, câncer gástrico e linfoma de tecido linfoide associado à mucosa gástrica (YANG; LU; LIN, 2014). Em 2002, Kodaira, Escobar e Grisi apontaram que a *H. pylori* está envolvida com a morte pelo menos 1 milhão de indivíduos anualmente em todo mundo.

Nenhum dos antimicrobianos é eficaz o suficiente para eliminar *H. pylori* quando administrado em monoterapia, apenas uma combinação destes pode acabar efetivamente com a bactéria (PATEL; SHAH; PRAJAPATI, 2017). A combinação de um inibidor da bomba de prótons e dois antibióticos (claritromicina mais amoxicilina ou metronidazol) tem sido a terapia de primeira linha recomendada (HOMAN; OREL, 2015; PACIFICO et al., 2014), entretanto, tem-se verificado crescente insucesso no tratamento em decorrência do desenvolvimento de cepas resistentes a estas drogas (HOMAN; OREL, 2015; ZHANG et al., 2015). Ademais, a terapia tripla pode ocasionar diversos vários efeitos adversos, como disbiose acompanhada de diarreia, náuseas e alteração no paladar, que podem conduzir à descontinuação do tratamento (PATEL; SHAH; PRAJAPATI, 2017). Em função disso, a busca por terapias alternativas vem sendo fortemente encorajada no campo da pesquisa. Como algumas cepas probióticas têm demonstrado efeito inibitório *in vitro* sobre *H. pylori*, a suplementação com probióticos tem sido investigada como uma possível terapia coadjuvante à terapia com antibióticos e inibidor da bomba de prótons (HASSAN; ŠUDOMOVÁ, 2016; HOMAN; OREL, 2015; TALEBI BEZMIN ABADI, 2017).

Os estudos têm demonstrado que os probióticos atuam contra a *H. pylori* por vários mecanismos imunológicos e não imunológicos (HOMAN; OREL, 2015). Entre os mecanismos não imunológicos, as cepas probióticas probióticos são capazes de influenciar o crescimento

bacteriano pela secreção de substâncias antimicrobianas, competição por sítio de adesão e pela estimulação da produção epitelial de muco envolvido na barreira de proteção do tecido gástrico (LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007; RUGGIERO, 2014).

Entre as substâncias antimicrobianas produzidas por cepas probióticas capazes de inibir o crescimento da *H. pylori* destacam-se os peróxidos de hidrogênio, bacteriocinas, ácidos graxos de cadeia curta e ácido láctico. Este último, em especial, promove um efeito adicional pela de redução do pH, o que pode inibir a ação da urease, comprometendo o principal mecanismo de adaptação do patógeno às condições do epitélio gástrico (HOMAN; OREL, 2015; LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007).

Já a competição por sítio de adesão culmina na eliminação da *H. pylori* por exclusão competitiva. A adesão do patógeno ao tecido gástrico representa a fase inicial do processo de colonização, sendo imprescindível para o desfecho das doenças associadas ao microrganismo. Alguns estudos, como o de Mukai et al., (2002) que avaliou os efeitos de *L. reuteri* na adesão do patógeno, têm demonstrado que cepas probióticas apresentam capacidade de inibir a ligação de *H. pylori* a receptores específicos de glicolípidos asialo-GMI e sulfatida. Neste mesmo contexto, algumas pesquisas têm demonstrado resultados exitosos na redução da *H. pylori* através da colonização prévia por probióticos, especialmente cepas lactobacilos capazes de resistir ao pH estomacal e manter-se aderidas ao epitélio indisponibilizando o sítio de adesão ao patógeno (KABIR et al., 1997).

Por fim, outro mecanismo não imunológico que tem sugerido ação de probióticos contra *H. pylori* envolve a produção de mucina, uma muco produzido por células estomacais que atua como barreira de proteção do tecido gástrico (LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007). Sabe-se que a produção de mucina é comprometida em indivíduos acometidos com infecção por *H. pylori*. Tal comprometimento deve-se ao fato do patógeno suprimir a expressão de genes envolvidos com a produção desta glicoproteína, em especial MUC5AC e MUC1 (BYRD; BRESALIER, 2000; SKOOG et al., 2012). No entanto, algumas cepas

de lactobacilos têm demonstrado capacidade de acicatar a secreção de mucina pelo estímulo da expressão do gene MUC3 (HOMAN; OREL, 2015).

Em relação aos mecanismos de ação imunológica, acredita-se que os probióticos possam atuar na modulação da secreção de citocinas pró-inflamatórias, reduzindo seus níveis. Sabe-se que a resposta inflamatória à infecção por *H. pylori* é caracterizada pela liberação de vários mediadores inflamatórios, como quimiocinas e citocinas (LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007). A interleucina 8 (IL-8) tem um papel crucial no desenvolvimento do processo inflamatório da mucosa gástrica em decorrência da infecção com *H. pylori* e tem sido associada ao prognóstico negativo das doenças associadas à infecção do patógeno (LEE et al., 2013). Após sua liberação, a IL-8 atua como uma quimiocinas atraindo neutrófilos e monócitos para mucosa gástrica, provocando uma cascata de reações. Essas reações culminam na produção de fator de necrose tumoral α (TNF- α), IL-1, IL-4, IL-5, IL-6 e Interferon- γ . Embora complexa, essa resposta imunológica é se mostra incapaz de debelar a infecção, no entanto, sustenta o processo inflamatório (BÄCKHED et al., 2003; LESBROS-PANTOFLICKOVA; CORTHÉSY-THEULAZ; BLUM, 2007), que acaba por propiciar a ocorrência de doenças relacionadas à infecção da *H. pylori*.

Alguns achados têm sugerido que probióticos, em especial, lactobacilos, teriam capacidade de inibir a produção de IL-8 induzida pelo receptor *Toll-like* 4 (TLR4) ativado por *H. pylori* (ZHOU et al., 2008). Recentemente, Panpetch et al. (2016) demonstraram que *Lactobacillus salivarius* B37 e B60 foram capazes de inibir a produção de IL-8 em células epiteliais gástricas estimuladas por *H. pylori*. De acordo com esses autores, polissacarídeos, lipídios e proteínas ou inclui múltiplos componentes, tais como glicoproteínas e lipoproteínas produzidas pelos probióticos seriam os responsáveis pela supressão da produção de IL-8. Thiraworawong et al. (2014), também relataram resultados promissores da ação de *Lactobacillus plantarum* XB7 na redução da produção de IL-8. Alguns autores, como Kim et al. (2008), sugerem que os ácidos linoleicos conjugados produzidos por cepas de lactobacilos seria um dos componentes responsáveis pelos efeitos anti-inflamatórios na infecção por *H. pylori*.

Os estudos em humanos envolvendo os probióticos na terapia da infecção contra *H. pylori* têm sido objetos de importantes meta-análises (DANG et al., 2014; FENG et al., 2017; LÜ et al., 2016; WANG et al., 2017a; ZHANG et al., 2015; ZHU et al., 2014). Nessas meta-análises, o efeito benéfico dos probióticos na redução dos efeitos colaterais decorrentes da antibioticoterapia favorecendo a continuidade do tratamento é o ponto consensual. Já a contribuição dos probióticos na erradicação da *H. pylori* não é um relato presente em todos os estudos analisados.

Na meta-análise elaborada por Lü et al. (2016) que incluiu treze ensaios clínicos randomizados envolvendo um total de 2306 pacientes, concluiu que quando em conjunto a terapia tripla (antibióticos e inibidor de bomba de prótons) a suplementação com *Lactobacillus* sozinho ou de várias cepas em conjunto foi eficaz na melhoria das taxas de erradicação *H. pylori*. Sendo que a suplementação com *Lactobacillus* sozinho não diminuiu significativamente a incidência geral de efeitos colaterais da antibioticoterapia. Não somente, os autores também constaram que a suplementação de probiótico antes, durante ou depois da terapia de erradicação do patógeno melhorou as taxas de erradicação, independentemente da duração da suplementação. Por outro lado, somente a suplementação de probiótico durante o tratamento foi capaz de reduzir a incidência de efeitos colaterais.

Zhang et al. (2015) analisaram dados sobre 6997 participantes de 45 ensaios clínicos randomizados. A análise estatística revelou que o uso de probióticos mais terapia padrão foi associado a um aumento na taxa de erradicação de *H. pylori*. Além disso, a incidência de eventos adversos foi de 21,44% no grupo probiótico e 36,27% no grupo controle, o que fez com que os autores concluíssem que probióticos mais a terapia padrão reduziram significativamente o risco de eventos adversos.

Um outra meta-análise publicada recentemente, Wang et al. (2017) analisaram cento e quarenta estudos com um total de 20.215 pacientes. Mais de 10 estratégias probióticas foram complementadas na terapia de erradicação de *H. pylori*. As taxas de erradicação e eventos adversos foram 84,1 e 14,4% no grupo probiótico, enquanto 70,5 e 30,1% no grupo

controle. Em geral, os probióticos suplementados foram eficazes para melhorar a eficácia da erradicação do patógeno e para diminuir a incidência de eventos adversos, apesar de alguns subtipos ineficazes. Os autores também constataram que na terapia tripla de 7 dias e 14 dias, as cepas de *Lactobacillus acidophilus* foram as que apresentaram resultados ligeiramente mais satisfatórios.

2.1.4.9 Efeitos na obesidade

Em 2004 a comunidade científica foi surpreendida com os achados de Bäckhed et al. que demonstraram que a microbiota intestinal seria um importante fator ambiental envolvido na regulação do armazenamento de gordura corporal. Esses pesquisadores constataram que a convencionalização de camundongos *germe-free* C57BL/6 com uma microbiota normal colhida da parte distal do intestino de camundongos criados convencionalmente ocasionou um aumento de 60% no teor de gordura corporal e resistência à insulina em 14 dias apesar da redução da ingestão de alimentos. Os autores justificaram esses resultados defendendo a ideia de que a microbiota intestinal aumentaria a eficiência na extração de energia no lúmen, além de promover aumento da expressão de fatores transcricionais chaves para aumentar a lipogênese no fígado, favorecendo, assim, o armazenamento de triglicerídeos nos adipócitos.

No ano seguinte, o mesmo grupo de pesquisadores publicou um novo estudo demonstrando que a obesidade altera a microbiota intestinal. Camundongos obesos em comparação com camundongos magros apresentaram uma redução de 50% de bactérias da divisão Bacteroidetes e aumento proporcional de bactérias da divisão Firmicutes, sugerindo assim, um padrão na composição microbiana relacionada à obesidade (LEY et al., 2005). Outros estudos constataram que tal característica também se aplica aos humanos (ABDALLAH ISMAIL et al., 2011; ARMOUGOM et al., 2009; MILLION et al., 2013), inclusive, às crianças (BERVOETS et al., 2013; IGNACIO et al., 2017).

Por fim, a consolidação da associação entre obesidade e microbiota intestinal ocorreu em 2006, quando Turnbaugh et al. demonstraram em um estudo envolvendo camundongos e humanos que a maior eficiência na extração de energia no lúmen intestinal promovida pela microbiota é uma característica transmissível, visto que a colonização de camundongos *germ-free* com uma "microbiota obesa" resultou em um aumento significativo no teor de gordura corporal total em comparação com a colonização com uma "microbiota magra". Motivados por estes achados, diversos estudos começaram a serem desenvolvidos na tentativa de elucidar o papel dos microrganismos presentes no intestino na obesidade (KASAI et al., 2015; KOLIADA et al., 2017; LOUIS et al., 2016).

Embora os mecanismos que relacionem a microbiota intestinal à obesidade não estejam totalmente esclarecidos, é possível encontrar na literatura científica revisões que reúnem os mecanismos já propostos (LÓPEZ-CEPERO; PALACIOS, 2015; MUSSO; GAMBINO; CASSADER, 2010; SHEN; OBIN; ZHAO, 2013; SILVA; SANTOS; BRESSAN, 2013).

Um dos mecanismos propostos sugere que pessoas obesas apresentam maior capacidade de extrair energia da dieta por possuírem em sua microbiota maiores proporções de microrganismos produtores e oxidantes de H_2 , o que resultaria em maior fermentação de polissacarídeos indigeríveis com produção de monossacarídeos, dissacarídeos e ácidos graxos de cadeia curta, os quais podem ser absorvidos pelo organismo, convertidos em gordura estocável, promovendo ganho de peso (BÄCKHED et al., 2007; MEKKES et al., 2014; ZHANG et al., 2009a). Sendo que os ácidos graxos de cadeia curta quando produzidos de forma excessiva após absorvidos podem estimular a lipogênese no fígado (BÄCKHED et al., 2007).

A influência da microbiota na obesidade conduziu à ideia de que a manipulação da composição do ecossistema microbiano no intestino poderia representar uma nova linha para o tratamento da obesidade, e assim, surgiram as associações entre probióticos e obesidade (DARDMEH et al., 2016; MEKKES et al., 2014; TANIDA et al., 2008; WHITE, 2015).

É incontestável a importância dos resultados obtidos até o presente momento sobre o papel da microbiota intestinal na etiologia e/ou manutenção da obesidade. O acelerado avanço dos estudos desde 2004 após os achados de Bäckhed et al. justifica o entusiasmo de que a modulação da microbiota através da administração de probióticos pode representar uma nova linha para prevenção e tratamento da obesidade. A segurança e a ausência de efeitos adversos são dois fatores que pontuam a favor de uma possível terapia utilizando probióticos, a qual muito provavelmente seria bem tolerada e apropriada para o uso a longo prazo (KOBYLIAK et al., 2016). Entretanto, é necessária muita prudência antes de associar probióticos como linha terapêutica. Como muito bem colocado por Dahiya et al. (2017), algumas questões cruciais ainda não foram respondidas, ou ainda apresentam respostas contraditórias, entre elas a determinação de qual ou quais grupos microbianos de fato seriam responsáveis por causar obesidade, e a identificação de quais cepas de probióticos e respectiva dosagem poderiam favorecer a alteração da microbiota intestinal causando impacto nos mecanismos relacionados com a influência da microbiota intestinal na obesidade.

2.2 Microencapsulação de probióticos

2.2.1 Alimentos contendo probióticos

Durante muito tempo as principais funções da alimentação foram fornecer nutrientes para atender os requisitos metabólicos e proporcionar ao consumidor uma sensação de satisfação e bem-estar (GRANATO et al., 2010). Entretanto, com o aumento da conscientização da estreita relação entre alimentação e o surgimento de doenças crônicas não transmissíveis, essa concepção vem mudando (LÄHTEENMÄKI, 2013). Hoje já se sabe que uma alimentação saudável tem o papel não somente de manter o estado de saúde, como também é capaz atuar na prevenção de doenças (MENRAD, 2003).

Neste contexto surgiram os alimentos funcionais, que trazem como proposta potencializar as funções fisiológicas de modo a prevenir doenças, além de promover a nutrição básica. O termo "alimento funcional" foi usado pela primeira vez no Japão, na década de 1980, para

produtos alimentícios fortificados com componentes especiais que possuem efeitos fisiológicos vantajosos (SIRÓ et al., 2008). Hoje os alimentos funcionais representam uma importante categoria de alimentos, para qual espera-se um faturamento de US\$ 149 bilhões em 2018 (GINEIKIENE; KIUDYTE; DEGUTIS, 2017). Esses alimentos são caracterizados pela presença de componentes bioativos, entre os quais se destacam vitaminas antioxidantes, fitoesteróis, ômega-3, fibras, prebióticos e microrganismos probióticos (SIRÓ et al., 2008; VALLS et al., 2013).

Os alimentos contendo microrganismos probióticos representam uma das categorias mais importantes entre os alimentos considerados funcionais. De acordo com Agrawal (2005), já em 2005 os alimentos contendo probióticos eram responsáveis por uma fatia de 65% do mercado de alimentos funcionais. O número significativo de estudos comprovando seus benefícios à saúde humana desses microrganismos, o forte marketing explorando esses resultados e o aperfeiçoamento dos processos tecnológicos na indústria de alimentos contribuíram para que os alimentos probióticos sejam produzidos e conhecidos (CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005; GOBBETTI; CAGNO; DE ANGELIS, 2010; GRANATO et al., 2010; PRADO et al., 2008).

Inicialmente, o desenvolvimento de produtos contendo probióticos era quase totalmente concentrado na indústria de laticínios. Normalmente, os probióticos eram adicionados aos alimentos como parte do processo de fermentação (MISHRA; MISHRA, 2012), dessa forma, praticamente todos os produtos carreadores de probióticos disponíveis no mercado eram lácteos, entre os quais incluem leites fermentados, sorvetes, vários tipos de queijo, alimentos para bebês, leite em pó, sobremesas de produtos lácteos congelados e bebidas à base de soro de leite (GRANATO et al., 2010; MOHAMMADI; MORTAZAVIAN, 2011). Atualmente essa realidade vem sendo modificada, cada vez mais é possível encontrar microrganismos probióticos sendo carreados por produtos não-lácteos, como alimentos à base de frutas, cereais, soja e carne (GRANATO et al., 2010; PRADO et al., 2008; VIJAYA KUMAR; VIJAYENDRA; REDDY, 2015).

A comercialização de alimentos probióticos está sujeita a requisitos regulamentares globais que têm se tornado cada vez mais rigorosos nos últimos anos (BURGAIN et al., 2011). Dois dos principais requisitos com significativo resguardo nas legislações envolvendo probióticos referem-se à alegação de funcionalidade e a viabilidade dos probióticos no produto (BURGAIN et al., 2011; CHAMPAGNE; GARDNER; ROY, 2005; PINEIRO; STANTON, 2007). As exigências quanto a viabilidade dos microrganismos probióticos é baseada no fato de que a promoção de efeitos benéficos está associada à quantidade de microrganismos que chegam ao intestino do hospedeiro após a ingestão de um alimento probiótico (ISLAM, 2010; OUWEHAND, 2017). Muitos estudos têm sugerido como consumo adequado de probióticos a ingestão a um nível de 10^8 - 10^9 UFC/g por dia, equivalente a 100g de um produto alimentar com 10^6 - 10^7 UFC/g (KAILASAPATHY, 2002). No Brasil, por exemplo, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (2008), por meio da Comissão Tecnocientífica de Assessoramento em Alimentos Funcionais e Novos Alimentos, determinou que a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante. A legislação brasileira ressalta que valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove eficácia.

O grande desafio em atender as legislações quanto à quantidade mínima de bactérias probióticas em alimentos, deve-se ao fato de que esses microrganismos são susceptíveis a diversos fatores que podem causar morte celular e, conseqüentemente, subtração no quantitativo de células vivas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; ISLAM, 2010). A sobrevivência probiótica é afetada por fatores associados ao processamento e armazenamento do alimento (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010). Entre esses fatores é possível citar: pH, acidez titulável, oxigênio molecular, atividade da água, presença de sal, açúcar e produtos químicos como peróxido de hidrogênio, bacteriocinas, aromatizantes artificiais e agentes corantes (TRIPATHI; GIRI, 2014). O tratamento térmico, temperatura de incubação, taxa de resfriamento do produto, materiais de embalagem, métodos de armazenamento e escala de produção também são importantes fatores inerentes ao processamento do alimento que podem interferir na viabilidade probiótica. Por fim, fatores microbiológicos que envolvem as estirpes de probióticos, taxa e proporção de inoculação também são citados como importantes (TRIPATHI; GIRI, 2014).

Ainda que todos os desafios envolvendo o processamento de alimentos contendo probióticos sejam superados e quantidade mínima de células viáveis seja assegurada, a passagem pelo trato gastrointestinal também é um ponto crítico que pode causar redução de células viáveis e comprometer os efeitos benéficos esperados, especialmente pela ação dos ácidos gástrico e biliares (SHORI, 2017).

A possibilidade de proporcionar proteção às células probióticas com uma barreira física e as isole evitando exposição às condições adversas do processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal tem sido é uma abordagem que atualmente recebe interesse considerável (GBASSI; VANDAMME, 2012). Tal possibilidade pode ser garantida pela tecnologia de microencapsulação.

2.2.2 Microencapsulação

A microencapsulação tem sido uma importante tecnologia empregada em diversos setores industriais, incluindo o de alimentos (GIBBS et al., 1999). Em teoria a microencapsulação consiste no empacotamento de materiais em estado sólido, líquido ou gasoso, formando estruturas geralmente denominadas como microcápsulas ou micropartículas. Neste processo uma partícula designada como ingrediente ativo, recheio ou núcleo, é recoberta por um outro material designado como material de parede ou agente encapsulante ou carreador (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015; NAZZARO et al., 2012; SARAIO; ARORA, 2017).

De acordo com o tamanho da cápsula ou partícula obtida, estas são classificadas em macro, micro e nanocápsulas. Não há uma padronização quanto aos limites de tamanho para classificação, no entanto, sabe-se que o tamanho obtido está intimamente ligado com a técnica utilizada e materiais utilizados (núcleo e material de parede). O tamanho obtido pode influir de maneira significativa na aplicação desejável das cápsulas (FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

Diversas são as finalidades do processo de encapsulação. Na indústria alimentícia a encapsulação de ingrediente alimentícios tem sido utilizada para mascaramento de sabor e/ou odor desagradáveis, redução da volatilidade e reatividade, promoção de liberação controlada e proteção ao material ativo contra condições ambientais desfavoráveis, tais como presença de oxigênio e pH extremos (KUANG; OLIVEIRA; CREAN, 2010).

A escolha do material encapsulante e da técnica guarda correlação com o objetivo da encapsulação, que consequentemente está relacionado com o tipo de liberação apropriada para o material ativo. Diferentes técnicas produzem cápsulas ou partículas capazes de liberarem seu material ativo através de ruptura mecânica, biodegradação, variação de temperatura e de pH e difusão (ARSHADY, 1993; SHAHIDI; HAN, 1993; SHEKHAR et al., 2010). Inúmeros materiais podem ser utilizados como agente encapsulantes, entre os mais comuns estão amidos, goma arábica, ágar, alginato, maltodextrinas, quitosana, celulose, caseína, gelatina, ácidos graxos, ceras e gorduras hidrogenadas (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; FAVARO-TRINDADE; PINHO, 2008).

Já em relação aos métodos de microencapsulação, há uma significativa variedade distribuída em métodos físico, químicos e físico-químicos. Entre os mais estudados e utilizados é possível citar *spray drying*, *spray chilling/spray congealing*, leiteo fluidizado, coacervação simples, coacervação complexa e lipossomas (FÁVARO-TRINDADE, PINHO e ROCHA, 2008). Cada método apresentará vantagens e desvantagens devendo sua escolha estar associada com os objetivos almejados com a microencapsulação, as características do material que se deseja encapsular, assim como as características do material com o qual deseja-se encapsular (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

2.2.3 Coacervação complexa como técnica de microencapsulação

Coacervação complexa é considerado um método de encapsulação físico-químico de baixo custo que envolve a utilização de polímeros com cargas inversas, geralmente proteínas e polissacarídeos, que são misturados em solução para formar um revestimento em torno do

componente que se deseja encapsular por meio das alterações de pH e temperatura (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010). O processo envolve basicamente três etapas: separação de fases, deposição e solidificação (DESAI; JIN PARK, 2005). O material ativo é disperso ou emulsionado em solução de um dos dois polímeros, em seguida é misturado com a solução do segundo polímero. Sob aquecimento, a mistura de polímeros tem seu pH ajustado para que ocorra a oposição de cargas entre os polímeros e a interação eletrostática. Neste momento ocorre a deposição do complexo polimérico sobre o material ativo que se deseja encapsular. A solidificação da cobertura do complexo ocorre por ação do resfriamento do sistema. Após resfriamento o sistema é mantido em repouso para decantação e recolhimentos das cápsulas (DESAI; PARK, 2005; GOUIN, 2004; SOLANKI et al., 2013). As cápsulas formadas são então recolhidas por filtração ou centrifugação suave e podem ser secas por liofilização ou secagem em spray (ROKKA; RANTAMÄKI, 2010; SOLANKI et al., 2013). Por muito tempo, utilizou-se a coacervação complexa para encapsulação prioritariamente de compostos hidrofóbicos, entretanto, atualmente há um significativo número de estudos envolvendo o uso da técnica para encapsulação de compostos hidrofílicos (SOUZA, 2016).

A produção bem-sucedida de cápsulas por coacervação complexa é dependente de alguns parâmetros, entre eles pH, força iônica, densidade de carga e proporção entre núcleo e encapsulante, (DANIELS; MITTERMAIER, 1995; JOSHI; RAWAT; BOHIDAR, 2018; KAYITMAZER; KOKSAL; KILIC IYILIK, 2015; OBERMEYER et al., 2016; SOUZA, 2016). Dentre estes, o pH tem recebido especial atenção (DANIELS; MITTERMAIER, 1995), devido ao fato do pH afetar a formação do complexo proteína-carboidrato pela capacidade de influenciar o grau de ionização do grupo funcional da proteína (grupo amino) e do carboidrato (grupo carboxila) (SIOW; ONG, 2013).

Diversos polímeros, proteínas e polissacarídeos, são utilizados para produção de cápsulas por coacervação complexa, com destaque para gelatina suína, proteínas do soro do leite, caseína, goma arábica, goma xantana, alginato e pectina (THIES, 2007). Mais recentemente, diversos polímeros tem sido testados como alternativas especialmente à gelatina suína e

goma arábica, entre eles é possível citar a proteína isolada da ervilha (KLEMMER et al., 2012) isolado proteico de chia, goma da semente de chia (TIMILSENA et al., 2016) e a goma de cajueiro (COMUNIAN et al., 2016). As combinações de polímeros para produção de cápsulas por coacervação complexa são diversas, sendo a mais comum a combinação formada por gelatina e goma arábica (SOUZA, 2016). Em 2016, Comunian e Favaro-Trindade apresentaram à comunidade científica uma importante revisão sobre a utilização de biopolímeros no processo de microencapsulação por coacervação complexa.

A coacervação complexa tem sido amplamente utilizada na indústria farmacêutica e de alimentos. Diversos ingredientes alimentícios já foram submetidos à microencapsulação por coacervação complexa, entre eles ácidos graxos ômega 3 (COMUNIAN et al., 2016; DE CONTO; GROSSO; GONÇALVES, 2013; ERATTE et al., 2014; ZHANG et al., 2009b), vitaminas (COMUNIAN et al., 2013a; JUNYAPRASERT et al., 2001; ROCHA-SELMÍ; FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2013; SILVA et al., 2012), edulcorantes (SANTOS et al., 2014, 2015) e flavors (THIES, 2007) e outros como luteína, eugenol e extrato de própolis (NORI et al., 2011; QV; ZENG; JIANG, 2011; SHINDE; NAGARSENKER, 2011).

Alguns pesquisadores já lançaram mão à técnica de coacervação complexa para microencapsular bactérias probióticas. De acordo com Oliveira et al., (2007a), a coacervação complexa seguida por desidratação das cápsulas é uma técnica altamente promissora em função de sua alta capacidade de carga (acima de 99%) e facilidade de liberação controlada por tensão mecânica, temperatura e mudanças de pH. Além disso, não envolve o uso de solventes orgânicos ou temperaturas elevadas, o que poderia promover prejuízo à viabilidade das células probióticas.

Oliveira et al. (2007a), provavelmente em um dos primeiro relatos da literatura do uso da coacervação complexa para encapsular probióticos, utilizaram caseína e pectina como polímeros para produzir cápsulas recheadas com *B. lactis* e *L. acidophilus*. Após a produção das cápsulas as mesmas eram desidratadas através de spouted-bed drying. Embora os autores tenham considerado que os polímeros utilizados foram adequados na produção das

cápsulas, a encapsulação por coacervação complexa seguida por spouted-bed drying não foi eficiente na proteção dos microrganismos a valores de pH semelhantes a aqueles encontrados no estômago humano. No mesmo ano, Oliveira et al. (2007b), relataram uma nova tentativa de utilizar a coacervação complexa para encapsular *B. lactis* e *L. acidophilus* com pectina e caseína, submetendo as capsulas à secagem em spray drying. Foi verificado que os microrganismos microencapsulados mostraram-se mais resistentes às condições ácidas do que as células livres. *L. acidophilus* microencapsulado manteve sua viabilidade para um período de armazenamento mais longo em ambas as temperaturas (7 e 37°C). Além disso, o processo utilizado e o material da parede foram eficientes na proteção dos microrganismos em estudo contra as condições gastrointestinais simuladas, no entanto, *B. lactis* microencapsulado perdeu a sua viabilidade antes do final do tempo de armazenamento, 120 dias.

Em 2014, Hernández-Rodríguez et al. promoveram a microencapsulação de *L. plantarum* por meio da coacervação complexa utilizando proteína do soro do leite e k-carragena. De acordo com os autores a encapsulação aumentou significativamente a viabilidade dos microrganismos após exposição aos fluidos gastrointestinais simulados. Durante o processo de produção das cápsulas foi constatado que a proporção dos polímeros utilizados e o pH afetaram significativamente as propriedades do coacervado. A proporção de polímero influenciou até mesmo a capacidade de proteção das células bacterianas, de acordo com os pesquisadores quando a proteína estava em concentração elevada na proporção proteínas:polissacarídeos verificou-se capacidade de sobrevivência das células aumentada.

Ainda em 2014, Bosnea, Moschakis e Biliaderis publicaram um importante estudo envolvendo o uso da coacervação complexa para microencapsulação de probióticos. Embora os autores tenham desconsiderados os estudos anteriores ao afirmarem a proposta de microencapsular probióticos por coacervação complexa era um feito inédito, o estudo merece destaque por ter explorado o uso da coacervação complexa com estratégia de proteger bactérias probióticas contra diversas condições de estresse tecnológico. Os autores utilizaram proteína do soro e goma arábica como polímeros para encapsular *L. paracasei*

subsp. *Paracasei* (E6) e *L. paraplantarum* (B1). Diversas análises foram realizadas, além de melhorar a viabilidade dos probióticos frente aos fluidos gastrointestinais simulados, os autores demonstram que a encapsulação também foi eficiente em proteger as células bacterianas após exposição à altas temperaturas e elevadas concentrações de sal. A viabilidade das células durante o armazenamento refrigerado também foi favorecida pela encapsulação.

Embora a microencapsulação de probióticos venha sendo utilizado de forma exitosa, atualmente admite-se que mesmo que essa tecnologia seja capaz de aumentar a taxa de sobrevivência dos probióticos, isso não implica necessariamente na manutenção de funcionalidade do probiótico (de Vos et al., 2010). Mais recentemente, com os avanços da genômica e da nutrigenômica tem sido possível identificar e caracterizar nos probióticos as moléculas efetoras que induzem respostas específicas no sistema intestinal (BRON; VAN BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2011; KLEEREBEZEM; VAUGHAN, 2009). Tem-se descoberto que muitas dessas moléculas efetoras, grande parte formada por glicoproteínas, estão localizadas na superfície da célula bacteriana (BRON; VAN BAARLEN; KLEEREBEZEM, 2011; KONSTANTINOV et al., 2008). A ocorrência dos efeitos benéficos dos probióticos depende diretamente da capacidade de preservar a integridade dessas moléculas efetoras que podem ser comprometidas pelas condições adversas envolvidas do processo tecnológico do alimento, durante a passagem pelo trato gastrointestinal do hospedeiro e até mesmo durante o processo de microencapsulação (BETORET et al., 2011; KONSTANTINOV et al., 2008). Nesse sentido, a manutenção da integridade das moléculas efetoras é tão importante quanto o aumento da taxa de sobrevivência dos microrganismos (DE VOS et al., 2010).

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar duas cepas de lactobacilos quanto ao potencial probiótico por meio de testes *in vitro*, desenvolver um sistema inovador para microencapsulação de microrganismos probióticos e avaliar a manutenção da viabilidade e da capacidade imunomoduladora dos microrganismos após o processo de microencapsulação.

3.2 Objetivos específicos

a – Caracterizar as cepas de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 quanto à resistência à lisozima e aos fluidos gastrointestinais simulados, perfil de hidrofobicidade da parede celular, susceptibilidade a antibióticos, atividade antagonista contra patógenos e capacidade de utilização de prebióticos;

b – Encapsular *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros e avaliá-las quanto à morfologia, tamanho e distribuição de tamanho, umidade, atividade de água e efeito do pH e temperatura;

C – Avaliar a susceptibilidade dos microrganismos encapsulados quanto aos processos de encapsulação e homogeneização com Ultra-Turrax, tolerância à temperatura, salinidade, diferentes pH, fluidos gastrointestinais simulados e estabilidade durante período de estocagem;

d – Avaliar a manutenção da capacidade imunomoduladora de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 microencapsulados por meio da dosagem de citocinas pró e anti-inflamatórias e determinação da capacidade protetora contra infecção de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium* em modelo animal.

4. ANIMAIS, MICRORGANISMOS, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Animais

Para os ensaios *in vivo* da capacidade imunomoduladora das cepas de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1, livres ou microencapsuladas, foram utilizados camundongos BALB/c, machos, de cinco a seis semanas de idade, fornecidos pelo Centro de Experimentações Biológicas e Biotério da Faculdade de Ciências Veterinárias da Universidade Nacional do Litoral (Esperanza, Santa Fe, Argentina). Previamente ao início do estudo o projeto foi submetido à apreciação e aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Nacional do Litoral.

4.2 Microrganismos

L. rhamnosus 64 isolado a partir de fezes humana de neonatos (Vinderola et al., 2008) e *L. paracasei* BGP1 (Clerici-Sacco, Cadorago, Itália), doado gentilmente pela Sacco Brasil, foram os microrganismos avaliados neste estudo.

Escherichia coli V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313, provenientes da coleção de microrganismos do Instituto de Lactología Industrial da Universidade Nacional do Litoral – INLAIN, UNL/CONICET – (Santa Fe, Argentina) foram utilizados para os testes de antagonismo *in vitro*.

Salmonella enterica sorovar *Typhimurium*, também da coleção de microrganismos do Instituto de Lactología Industrial, foi utilizada para em testes *in vivo* para determinar capacidade protetora das cepas de lactobacilos estudadas contra a infecção deste patógeno.

4.3 Material

Para o cultivo das cepas de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 utilizou-se o meio de cultura MRS – *de Man, Rogosa and Sharpe* – (Biokar, Beauvais, França) nas formas de caldo e ágar. O meio de cultura infusão cérebro-coração – BHI (Oxoid, Hampshire, Reino Unido), na forma de caldo, foi utilizado para ativação e cultivo dos microrganismos aplicados nos testes de antagonismo *in vitro*.

Para as análises de avaliação do potencial probiótico por meio de testes *in vitro* das cepas de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 utilizou-se lisozima, pepsina da mucosa do estômago suíno, pancreatina, tripsina bovina, η -hexadecano e glicose produzidos pela Sigma-Aldrich (St. Louis, EUA), sais biliares – *Oxgall* produzidos pela Difco (Hampshire, Reino Unido), cefepime (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), eritromicina (15 μ g), neomicina (30 μ g), penicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g) e vancomicina (30 μ g) produzidos pela Laborclin (Vargem Grande, Brasil), inulina (Orafti, Pemuco, Chile), polidextrose (Clariant, Suzano Brasil), raftilose 95 (FOS) (Sensus, Roosendaal, Holanda) e lactulose (Galena, São Paulo, Brasil).

Para o processo de microencapsulação utilizou-se goma arábica (Dinâmica Química Contemporânea, Diadema, Brasil), gelatina suína (Gelnex, Itá, Brasil) e gordura vegetal TRI-CS48 com ponto de fusão de 43 °C (Triângulo Alimentos, Itápolis, Brasil). Para caracterização das cápsulas por microscopia confocal foi utilizado *Nile Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) como corante.

4.4 Métodos

4.4.1 Avaliação *in vitro* de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 quanto às características desejáveis para microrganismos probióticos

4.4.1.1 Resistência à lisozima

A análise de resistência à lisozima foi realizada conforme descrito por Vizoso-Pinto et al. (2006) e Zago et al. (2011) com modificações detalhadas a seguir. Inicialmente, os microrganismos crescidos em *overnight* em 10 ml de caldo MRS a 37 °C foram centrifugados, lavados duas vezes e ressuspensos em 2 mL com tampão fosfato (0.1 M, pH 7,0). Em seguida, 10 % da suspensão bacteriana foi inoculada em uma solução eletrolítica estéril (SEE) (SEE; 0,22 g/L CaCl₂, 6,2 g/L NaCl, 2,2 g/L KCl, 1,2 g/L NaHCO₃) na presença de 100 mg/L de lisozima (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA). Para controle, a suspensão bacteriana também foi inoculada em SEE sem lisozima. A taxa de sobrevivência foi calculada como porcentagem de UFC/mL após 30 e 120 min comparando com a contagem em UFC/mL determinada no tempo zero.

4.4.1.2 Resistência aos fluidos gastrointestinais simulados

A avaliação *in vitro* da resistência dos microrganismos livres em fluido gástrico simulado (FGS) e fluido intestinal simulado (FIS) foi realizada de acordo com o método descrito por Gbassi et al. (2009). O FGS foi composto por 9 g/L de cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil), 3 g/L de pepsina da mucosa do estômago suíno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em água destilada e pH ajustado para 1,8 com ácido clorídrico. O FIS foi preparado com 9 g/L de cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil), 10 g/L de pancreatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 9 g/L de tripsina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) e 3 g/L de sais biliares - *Oxgall* (Difco, Hampshire, Reino Unido) em água destilada e pH ajustado para 6,5 com hidróxido de sódio. Os microrganismos foram inoculados no FGS e mantidos a 37 °C, sob agitação. Foram realizadas contagens de células viáveis em MRS nos tempos 0, 60 e 120 minutos. Em seguida, o material remanescente da análise de FGS foi inoculado em FIS, procedendo com

adequado controle e ajuste do pH e contagem de células viáveis em MRS após 0, 90 e 180 minutos.

4.4.1.3 Análise da hidrofobicidade da parede celular

Para avaliar o perfil de hidrofobicidade da parede celular das duas cepas de lactobacilos, promoveu-se o crescimento bacteriano em 10 mL de caldo MRS por 16 h a 37 °C. Findando o período de crescimento, procedeu-se com centrifugação a 6000 rpm por 6 minutos e dupla lavagem com tampão fosfato (0.1 M, pH 7,0). Os cultivos foram suspensos no mesmo tampão, e a densidade óptica (AO) ajustada para, aproximadamente, 1,0 a 560 nm. Em seguida, adicionou-se 0,6 ml de η -hexadecano (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) a 3,0 mL da suspensão bacteriana e, após homogeneização por 2 minutos em vortex, incubou-se a 37 °C, por 1 hora, para a separação das fases. A fase aquosa inferior foi removida cuidadosamente com uma pipeta de Pasteur estéril e a absorbância (A1) foi registrada a 560 nm seguindo o método descrito por Vinderola e Reinheimer (2003) e Duary et al. (2011). Para determinar os resultados, expressos em porcentagem de adesão bacteriana ao solvente, utilizou-se a seguinte fórmula:

$$H \% = (1 - A1/A0) \times 100 \quad (1)$$

Onde: A0 é a absorbância inicial ajustada; e A1 é a absorbância obtida da fase aquosa inferior resultante da mistura de η -hexadecano à suspensão bacteriana.

4.4.1.4 Análise de susceptibilidade a antibióticos

As duas cepas foram submetidas à análise de sensibilidade a oito antibióticos: cefepime (30 μ g), cefoxitina (30 μ g), ceftriaxona (30 μ g), eritromicina (15 μ g), neomicina (30 μ g), penicilina (10 μ g), tetraciclina (30 μ g) e vancomicina (30 μ g). Para determinação da susceptibilidade foi adotado o método de Kirby & Bauer descrito em Oplustil et al. (2010). Uma suspensão de 10^8 UFC/mL de cada cepa estudada foi semeada em placas contando ágar MRS. Em seguida, discos de papel embebidos com os antibióticos em concentrações supracitadas foram colocados na

superfície do meio de cultura, sendo essas placas posteriormente incubadas por 48 h a 37 °C. Transcorrido o tempo de incubação, os possíveis halos inibitórios formados em cada disco foram medidos. Os resultados obtidos foram analisados qualitativamente, classificando os microrganismos em sensíveis, moderadamente sensíveis ou resistente ao antibiótico testado de acordo com a padronização preconizada pelo *Clinical and Laboratory Standards Institute* (CLSI, 2013).

4.4.1.5 Antagonismo *in vitro*

Para avaliação da atividade antagonista “*in vitro*” das duas cepas de lactobacilos foi adotado o método de difusão em ágar (SCHILLINGER; LÜCKE, 1987). Para tal, foram preparadas placas de Petri contendo ágar BHI previamente inoculado com cultivo de 24 horas dos respectivos patógenos testados (*Escherichia coli* V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313) em concentração de 10⁶ UFC/mL. Após a solidificação do ágar na placa foram realizados poços, perfurações de aproximadamente 5 mm de diâmetro, onde se adicionou 50µL de cultivo das cepas de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1. Findada esta etapa, as placas foram incubadas a 37 °C por 48 h sob condição de aerobiose. Para leitura dos resultados adotou-se como resultado positivo de inibição a formação de halos com diâmetro igual ou superior a 1 mm conforme proposto por Belicová, Mikulášová e Dušinský (2013).

Ademais, verificou-se também a capacidade inibitória do sobrenadante neutralizado livre de células proveniente do meio de cultivo das cepas de lactobacilos com intuito de avaliar a presença de substâncias inibitórias extracelulares produzidas durante o crescimento celular bacteriano. Tal avaliação foi realizada conforme metodologia proposta por Uhlman, Schillinger, Rupnow, & Holzapfel (1992) e detalhada por Vizoso Pinto et al., (2006). Os sobrenadantes foram obtidos a partir do cultivo *overnight* de células de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 em caldo MRS mantidos em aerobiose a 37 °C por 48h. Cumprido o tempo estabelecido para cultivo, seguiu-se com centrifugação da cultura a 7200 × g durante 10 minutos. A neutralização do sobrenadante foi realizada com solução estéril de NaOH 5 M, sendo que para garantir a esterilidade o mesmo foi submetido à fervura durante 5 min. O

procedimento para avaliação de inibição foi realizado de acordo com a explicação supracitada, entretanto, ao invés de adicionar inóculo, os poços foram preenchidos com 50µL de sobrenadante. Não diferente do exposto, a formação de halos com diâmetro igual ou superior a 1 mm foi utilizada para determinar o resultado como positivo para inibição.

4.4.1.6 Utilização de prebióticos

A capacidade de utilização de quatro prebióticos: inulina, polidextrose, raftilose P95 (FOS) e lactulose foram avaliadas nesse estudo seguindo protocolo descrito por Zago et al. (2011). Glicose (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi utilizada como controle positivo. Inicialmente, todos os prebióticos e a glicose foram solubilizados em água destilada e esterilizada por filtração. As cepas foram inoculadas (1,5% de inóculo) em tubos de ensaio contendo 3 ml de caldo MRS modificado, o qual continha 2% de cada um dos quatro prebióticos ou glicose como única fonte de carbono. Os tubos foram encubados a 37 °C por 24 h em condições de aerobiose. A utilização dos prebióticos e da glicose foi avaliada por mensuração da densidade ótica a 560 nm (OD560) de cada cultura. A taxa de crescimento celular na presença de cada prebiótico foi calculada de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{Taxa de crescimento} = [((\text{MRSp} - \text{MRSb}) * 100) / (\text{MRSg} - \text{MRSb})] \quad (2)$$

Onde: MRSp é MRS com cada prebiótico, MRSb é o MRS sem fonte de carbono (controle negativo) e MRSg é o MRS com glicose (controle positivo).

4.4.2 Microencapsulação de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros

4.4.2.1 Produção das cápsulas carregadas com *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64

As cápsulas carregadas com *L. paracasei* BGP1 ou *L. rhamnosus* 64 foram preparadas pela técnica de coacervação complexa baseando-se no método descrito por Comunian et al.

(2013), como adaptações detalhadas a seguir. Inicialmente, a gordura vegetal obtida foi fundida a 7 °C acima do seu ponto de fusão (PF 43 °C). O inóculo obtido por centrifugação do microrganismo crescido em MRS (16 h, 37 °C) foi adicionado à gordura fundida em concentração de 10^9 UFC/g. Realizada essa etapa, foi adicionada à mistura de microrganismo e gordura uma solução de gelatina (2,5 % m/v) para obtenção de uma emulsão (O/A). A obtenção dessa emulsão se deu por meio de homogeneização em Ultra-Turrax a 7000 rpm durante 90 segundos. Posteriormente, foi adicionada à emulsão uma solução aquosa de goma arábica (2,5 % m/v) mantendo a mistura sob agitação com barra magnética. Para promoção do processo de coacervação o pH da mistura foi ajustado para 4,5 com solução de NaOH 4M, valor este determinado por meio de teste descrito na próxima seção. Até este passo, todo processo foi realizando mantendo a mistura sob aquecimento a 50 °C para que não ocorresse solidificação da gordura e gelificação da gelatina. Somente após o ajuste do pH a temperatura da mistura foi reduzida até atingir 10 °C utilizando banho de gelo. O material coacervado foi mantido a 7 °C por 24 horas para decantação das partículas coacervadas. Por fim, as cápsulas foram congeladas e submetidas à desidratação por sublimação em liofilizador (Terroni, São Carlos, Brasil), com tempo de processo de 24 horas, pressão de 1–0.1 kPa, temperatura de condensação de -20 °C e temperatura final de 30 °C. Após o processo de desidratação as cápsulas foram estocadas em potes de vidro, ao abrigo da luz, na presença de oxigênio e mantidas a 7 ± 1 e 25 ± 1 °C.

4.4.2.2 Determinação do pH ideal para produção das cápsulas

Foram avaliados cinco valores de pH (3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0) para determinar qual seria o ideal para produção das cápsulas. A escolha do pH foi realizada considerando a formação de cápsulas com morfologia típica para técnica – cápsulas esféricas com núcleo aparente (SANTOS et al., 2015) –, e rendimento do processo por meio da eficiência de decantação das cápsulas após 24 horas de estocagem a 7 ± 1 °C, por meio de avaliação visual. Tal determinação foi baseada na descrição realizada por Siow & Ong (2013).

4.4.2.3 Análise morfológica e de tamanho das cápsulas

4.4.2.3.1 Microscopia ótica

Para análise por microscopia ótica foi utilizado o microscópio ótico BIO3 – Bel Photonics (MB, Itália) com captação de imagens por câmera digital. As imagens foram capturas pelo software BELView disponibilizado pelo fabricante do microscópio. As cápsulas foram avaliadas úmidas imediatamente após o processo de coacervação.

4.4.2.3.2 Microscopia confocal

Para microscopia confocal foi utilizado um microscópio invertido com fluorescência (Leica, DMIRBE, Nova Iorque, Estados Unidos) equipado com câmera digital (QImaging QICAM 12-bit). Para coloração das cápsulas foi utilizado corante *Nile Red* (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) na fase oleosa (5 % m/m) seguindo metodologia utilizada por Santos et al. (2015). As cápsulas foram avaliadas úmidas, 12 horas após o processo de coacervação.

4.4.2.3.3 Microscopia eletrônica de varredura

Para microscopia eletrônica de varredura as cápsulas desidratadas foram aderidas em fita de carbono dupla-face e observadas em um microscópio Hitachi TM 3000 (Hitachi, Tóquio, Japão) com voltagem de aceleração de 5 Kv, conforme descrito por Comunian et al. (2013).

4.4.2.3.4 Tamanho de partícula

O tamanho das cápsulas e a distribuição de tamanhos foram determinados utilizando um analisador de partículas por difração à laser SALD- 201V, (Shimadzu, Kyoto, Japão) conforme descrito por Comunian et al. (2013). Para análise as cápsulas úmidas foram suspensas água destilada.

4.4.2.4 Efeito do pH na estabilidade da cápsula

A estabilidade das cápsulas foi avaliada em cinco valores de pH: 1,5, 3,0, 4,5, 7,5 e 9,0. Para tal, as cápsulas foram mantidas por 30 minutos em água destilada com os respectivos valores de pH ajustados com solução de HCl ou NaOH. Findando o tempo estabelecido, as cápsulas foram submetidas à análise morfológica por meio de microscopia ótica.

4.4.2.5 Efeito da temperatura na estabilidade da cápsula

A estabilidade térmica das cápsulas foi avaliada em três temperaturas: 40, 50 e 60 °C. As cápsulas suspensas em água destilada foram submetidas ao aquecimento nas temperaturas supracitadas por 2 minutos e posteriormente avaliadas por meio de microscopia ótica. Ademais, utilizando microscopia confocal foram avaliadas as alterações morfológicas de cápsulas coradas com *Nile Red* submetidas ao aquecimento de 45 e 50 °C no próprio equipamento.

4.4.2.6 Umidade e atividade de água das cápsulas

A umidade e atividade de água das cápsulas úmidas e desidratadas foram determinadas utilizando um analisador de umidade (MB35 Ohaus, Pine Brook, EUA) e um analisador de atividade de água Aqualab (Decagon Devices, Pullman, EUA), respectivamente, conforme Matos-Jr, Comunian, Thomazini, & Favaro-Trindade (2017).

4.4.2.7 Sensibilidade dos microrganismos ao processo de encapsulação

Para avaliar a sensibilidade das duas cepas ao processo de encapsulação por coacervação complexa, os microrganismos foram submetidos à contagem em três momentos: a) na massa celular adicionada à gordura; b) nas cápsulas úmidas após o processo de decantação e; c) nas cápsulas desidratadas. Para determinar o conteúdo de microrganismos nas cápsulas pesou-se 2 g de cápsulas (peso seco) e prosseguiu com aquecimento a 50 °C por 30 segundos para rompimento e liberação dos microrganismos, diluição seriada em solução de citrato de

sódio 2 % (p/v), plaqueamento em ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 h sob condição de aerobiose.

4.4.2.8 Sensibilidade dos microrganismos ao processo de homogeneização em Ultra-Turrax

Para avaliar a sensibilidade dos microrganismos ao processo de homogeneização em Ultra-Turrax, as cepas crescidas *overnight* (16 h) em caldo MRS foram lavadas duas vezes (6000 rpm / 6 min / 7 °C) e ressuspensas (2 ml de dispersão de células) em 10 ml de tampão fosfato salino (0,1 M, pH 7,2). A suspensão foi submetida à homogeneização em Ultra-Turrax por 90 segundos a 5500, 7000 e 8500 rpm. Antes e depois do processo de homogeneização os microrganismos foram submetidos à contagem em ágar MRS com incubação a 37 °C, por 48 h, sob condição de aerobiose.

4.4.2.9 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados à temperatura

O estudo da tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados à temperatura foi realizado baseando-se na metodologia descrita por Bosnea et al. (2014) com modificações descritas a seguir. Os microrganismos livres crescidos *overnight* (16 h) em caldo MRS foram lavados duas vezes (6000 rpm / 6 min / 7 °C) e ressuspensos (2 ml de dispersão de células) em tampão fosfato salino (0,1 M, pH 7,2). As cápsulas carregadas com microrganismos (2 g de cápsulas) também foram suspensas em tampão fosfato salino para análise. Microrganismos livres e encapsulados foram expostos às temperaturas de 40, 50 e 60 °C durante 5 minutos. Antes e depois da exposição térmica os microrganismos foram submetidos à contagem em ágar MRS.

4.4.2.10 Tolerância dos microrganismos livre ou encapsulados à salinidade

A tolerância dos microrganismos livres e microencapsulados a três concentrações salinas foi determinada conforme metodologia descrita por Bosnea et al. (2014), com modificações. Como na avaliação de tolerância térmica, os microrganismos livres crescidos *overnight* (16 h) em caldo MRS foram lavados duas vezes (6000 rpm / 6 min / 7 °C) e ressuspensos (2 mL de

dispersão de células) em tampão fosfato salino (0,1 M, pH 7,2). As cápsulas carregadas com microrganismos (2 g de cápsulas) também foram suspensas em tampão fosfato salino. Microrganismos livres e encapsulados foram expostos à solução de NaCl a 1, 2,5 ou 5,0 % (p/v) durante 2 horas a 37 °C. A tolerância foi determinada pela diferença de contagem dos microrganismos em ágar MRS antes e após a exposição.

4.4.2.11 Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados

A avaliação *in vitro* da resistência dos microrganismos livres em fluido gástrico simulado (FGS) e fluidos intestinal simulado (FIS) foi realizada de acordo com o método descrito por Gbassi et al. (2009). O FGS foi composto por 9 g/L de cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil), 3 g/L de pepsina da mucosa do estômago suíno (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) em água destilada e pH ajustado para 1,8 com ácido clorídrico. O FIS foi preparado com 9 g/L de cloreto de sódio (Synth, Diadema, Brasil), 10 g/L de pancreatina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), 9 g/L de tripsina bovina (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA), e 3 g/L de sais biliares - *Oxgall* (Difco, Hampshire, Reino Unido) em água destilada e pH ajustado para 6.5 com hidróxido de sódio. Os microrganismos foram inoculados no FGS e mantidos a 37 °C, sob agitação. Foram realizadas contagens de células viáveis com MRS nos tempos 0, 60 e 120 minutos. Em seguida, o material remanescente da análise de FGS foi inoculado em FIS, procedendo com adequado controle e ajuste do pH e contagem de células viáveis com MRS após 0, 90 e 180 minutos.

4.4.2.12 Avaliação da viabilidade dos microrganismos microencapsulados durante período de estocagem

Após o processo de desidratação as cápsulas foram estocadas em potes de vidro, ao abrigo da luz, na presença de oxigênio e mantidas a 7 ± 1 e 25 ± 1 °C. A avaliação da viabilidade dos microrganismos foi realizada por meio de contagem de células viáveis nos tempos 0, 30, 60, 90 e 120 dias. Para determinar o conteúdo de microrganismos nas cápsulas pesou-se 2 g de cápsulas (peso seco) e prosseguiu com aquecimento a 50 °C por 30 segundos para rompimento e liberação dos microrganismos, diluição seriada em solução de citrato de sódio

2 % (p/v), plaqueamento em ágar MRS e incubação a 37 °C por 48 h sob condição de aerobiose.

4.4.3 Avaliação da manutenção da capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 livres ou microencapsulados por coacervação complexa

4.4.3.1 Manejo dos animais

Quarenta e quatro animais foram utilizados no estudo. Após o recebimento dos camundongos, os mesmos foram mantidos por 1 semana no biotério do Instituto de Lactología Industrial para aclimação à temperatura de 21 ± 1 °C, ciclo claro/escuro de 12h/12h, com taxas de renovação total de ar 20 volumes/h e com acesso *ad libitum* à dieta padrão para roedores (Cooperación, Buenos Aires, Argentina) e água.

4.4.3.2 Desenho experimental para procedimento de administração

Para avaliar a segurança oral dos microrganismos e o efeito da encapsulação na manutenção da capacidade imunomoduladora das duas cepas estudadas, os camundongos foram divididos em 6 grupos (4 animais por grupo). Durante 10 dias consecutivos, os camundongos receberam, por meio de gavagem, doses diárias de 0,3 ml contendo microrganismos livres, encapsulados, solução salina ou cápsulas vazias, conforme apresentado na Tabela 1.

As doses diárias recebidas por cada animal dos grupos 1 a 4 continham 10^7 UFC/mL de lactobacilos, independente da forma de apresentação do probiótico (livre ou encapsulado). Para administração, os microrganismos livres, cápsulas carregadas ou vazias foram suspensos em solução salina estéril. Após 10 dias de administração os camundongos foram anestesiados com coquetel de cetaminaxilazina, xilazina e acepromazina, e eutanasiados por deslocamento cervical. Diferentes tecidos foram extraídos para realização das análises descritas abaixo.

Tabela 1. Grupos e respectivos tratamentos recebidos para avaliação *in vivo* da segurança oral efeito da encapsulação na manutenção da capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64.

Grupos	Tratamentos
Grupo 1	<i>L. paracasei</i> BGP1 livre
Grupo 2	<i>L. rhamnosus</i> 64 livre
Grupo 3	Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de <i>L. paracasei</i> BGP1
Grupo 4	Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de <i>L. rhamnosus</i> 64
Grupo 5	Cápsulas vazias obtidas por coacervação complexa
Grupo 6	Solução salina estéril (grupo controle)

4.4.3.2.1 Análise de translocação bacteriana

A segurança oral dos microrganismos foi avaliada por meio da investigação de translocação bacteriana da microbiota entérica para o fígado e baço. Para isso, os dois tecidos foram extraídos assepticamente dos animais, homogeneizados em PBS e plaqueados (1 mL) em ágar Mac Conkey de acordo com metodologia descrita por Vinderola et al. (2005). Após o período de incubação, 37 °C por 48 h, verificou-se a ocorrência de crescimento bacteriano. O resultado foi expresso qualitativamente em positivo (presença de bactérias nas placas) ou negativo (ausência de bactérias nas placas).

4.4.3.2.2 Determinação de imunoglobulina A secretora (IgAs) do conteúdo intestinal

A determinação do nível de IgA secretada foi feita pelo método de ELISA de captura seguindo metodologia descrita por (RODRIGUES et al., 2000) e (SOUZA et al., 2012). Para análise foi utilizado o conteúdo intestinal obtido após a remoção do intestino através de cortes nas junções gastroduodenal e ileocecal. O conteúdo intestinal foi retirado, pesado e lavado com salina tampão fosfato pH 7,2. Ao PBS foi adicionado 1% (v/v) de inibidor de protease. Depois de centrifugado a 2000 x g, por 30 minutos, a 4°C, o sobrenadante foi

recolhido e armazenado a -20 °C. A concentração de sIgA total foi determinada utilizando-se um padrão de IgA purificado. A leitura a 492 nm foi feita em um leitor de placas de ELISA (Thermo Scientific Multiskan Spectrum, Wilmington, EUA). Os resultados foram expressos como µg de sIgA/g de conteúdo intestinal calculadas a partir da curva padrão.

4.4.3.2.3 Determinação de citocinas

Para dosagem de citocinas (IL-2, IL-6, IL-10 e TNF-α) o conteúdo do intestino delgado foi recuperado com auxílio de uma pinça, utilizada para pressionar o tubo intestinal para recolhimento do conteúdo vasado em uma das extremidades seguindo metodologia descrita por (ZACARÍAS et al., 2017). O conteúdo intestinal foi pesado e diluído 1:4 em PBS suplementado com coquete antiprotease a 1% (v/v). Após centrifugação (2000 × g, 30 min, 4 ° C), o sobrenadante foi recolhido e mantido congelado a -70 °C para a dosagem das citocinas por ELISA usando kits comerciais. O procedimento de análise foi realizado conforme protocolo fornecido pelo fabricante.

4.4.3.3 Avaliação da capacidade protetora contra infecção de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*

Para avaliação da capacidade protetora dos microrganismos livre ou encapsulados contra a infecção de *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, foram utilizados 44 camundongos divididos em 6 grupos (4 animais por grupo). Durante 10 dias consecutivos, os camundongos receberam, por meio de gavagem, doses diárias de 0,3 ml contendo microrganismos livres, encapsulados, solução salina ou cápsulas vazias, conforme apresentado na Tabela 1. As doses diárias recebidas por cada animal dos grupos 1 a 4 continham 10⁷ UFC/mL de lactobacilos, independente da forma de apresentação do probiótico (livre ou encapsulado). No décimo dia os animais foram infectados com *Salmonella enterica* sorovar *Typhimurium*, dosagem única de (10⁶ UFC/animal).

Sete dias após a infecção com patógenos os camundongos foram anestesiados com coquetel de cetaminaxilazina, xilazina e acepromazina, e eutanasiados por deslocamento cervical.

Executou-se a retirada do fígado e baço para verificação de translocação bacteriana conforme metodologia exposta acima. O conteúdo intestinal também foi coletado para dosagem de IgA e citocinas, conforme metodologias descritas em tópicos anteriores.

4.5 Análises estatísticas

Com exceção dos ensaios em animais (realizados uma vez), todos os demais testes foram realizados com pelo menos duas repetições e análises em triplicata. Os dados foram analisados usando Análise de Variância (ANOVA) com auxílio do software GraphPad Prism version 6.0. As diferenças entre médias foram detectadas pelo teste de Tukey. Os dados foram considerados significativamente diferentes quando $p < 0,05$.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Avaliação *in vitro* de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 quanto às características desejáveis para microrganismos probióticos

5.1.1 Resistência à lisozima

Recentemente, alguns pesquisadores têm sugerido o uso de probióticos para promoção da saúde oral (BIZZINI et al., 2012; HAUKIOJA, 2010; SAHA et al., 2012), encorajando, assim, a realização de pesquisas que desenvolvam veículos para entrega de probióticos na cavidade oral.

Neste contexto, algumas das pesquisas publicadas até momento (HEINEMANN; CARVALHO; FAVARO-TRINDADE, 2013; SAHA et al., 2013) propõem a incorporação de bactérias probióticas em filmes de desintegração oral possibilitando que os probióticos componham a microbiota transitória da mucosa bucal e dentes, permitindo sua ação protetora contra microrganismos patogênicos promotores de doenças dentárias. Para esse tipo de aplicação o estudo da sensibilidade do probiótico à lisozima presente na saliva é crucial, uma vez que essa enzima tem se mostrado eficaz na morte de vários tipos de bactérias gram-positivas o promover a ruptura da parede celular (KÖLL et al., 2008).

Além disso, como já visto por Zago et al. (2011), a sensibilidade de lactobacilos à lisozima é uma característica cepa-dependente. Quando incorporado em um alimento, a sensibilidade do microrganismo à lisozima pode não ser tão preocupante, uma vez que o tempo de exposição é muito curto. Todavia, é prudente avaliar tal sensibilidade considerando que pode haver um somatório deletério da secreção bucal com as secreções gástricas e intestinais.

As duas cepas estudadas apresentaram resultados satisfatórios de resistência à lisozima, sendo que *L. paracasei* BGP1 foi mais resistente que *L. rhamnosus* 64 ($p < 0,05$), conforme

pode ser observado na Figura 1. Após exposição por 120 minutos à solução eletrolítica estéril com 100 mg/L de lisozima, diluição que simula as condições *in vivo* da saliva, *L. rhamnosus* 64 apresentou redução de 1,8 log UFC/mL, enquanto *L. paracasei* BGP1 sofreu redução de 0,83 log UFC/mL.

Figura 1. Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LpBGP1) e *L. rhamnosus* 64 (Lr64) após exposição por 120 minutos à solução eletrolítica contendo 100 mg/L de lisozima.

Valores próximos aos obtidos têm sido relatados por outros autores. Vizoso Pinto et al. (2006) também avaliaram a resistência de *L. johnsonii* LA1 à lisozima expondo o microrganismo por 60 minutos à solução contendo a enzima em concentração semelhante e constatarem redução de 1 ciclo logarítmico em relação a concentração inicial do microrganismo.

Zago et al. (2011) avaliaram a sensibilidade à lisozima de 27 cepas de *L. plantarum* isoladas de queijos. Os resultados obtidos variaram entre 3,24 e 99,97% de sobrevivência após 120 minutos de exposição à solução contendo 100 mg/L de lisozima, sendo que 15 cepas apresentaram sobrevivência superior a 68%, resultado considerado pelos autores como satisfatório.

Köll et al. (2008), que avaliaram a sensibilidade de 22 cepas de lactobacilos selecionadas especificamente como candidatos a probióticos para atuação na saúde oral verificaram que através da determinação da presença de zona de inibição de crescimento todas as cepas foram resistentes à lisozima em concentrações que variaram entre 0,2 e 10 mg/mL.

5.1.2 Resistência aos fluidos gastrointestinais simulados

Para que os probióticos ingeridos alcancem o lúmen intestinal, seu principal sítio de atuação, devem ser capazes de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal (TGI), que incluem, pH baixo e presença de sais biliares (COOK et al., 2012; DE VOS et al., 2010). Para que se tenha impacto fisiológico é desejável que os probióticos cheguem ao TGI em concentrações superiores a 6 log UFC/g (SAAD, 2006).

Neste trabalho, após análise de resistência aos fluidos gastrointestinais foram observados comportamentos distintos quanto à sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 após exposição por 120 minutos aos fluidos gástricos simulados (FGS) ($p < 0,05$). Enquanto a população de *L. rhamnosus* 64 sofreu redução de 1,31 log UFC/g, a subtração na contagem de *L. paracasei* BGP1 foi de 3,37 log UFC/g (Figura 2). Já o comportamento das duas cepas frente à exposição aos fluidos intestinais simulados (FIS) por 180 minutos não apresentou distinção ($p > 0,05$), *L. rhamnosus* 64 apresentou redução de 1,64 log UFC/g e *L. paracasei* BGP1 sofreu redução de 1,71 log UFC/g.

Findado o teste de resistência aos fluidos gastrointestinais (FGS + FIS), constatou-se que *L. rhamnosus* 64 apresentou contagem final de 6,05 log UFC/g, enquanto a contagem final de *L. paracasei* BGP1 foi de 3,92 log UFC/g.

Resultados de decréscimos significativos da concentração de células viáveis de lactobacilos expostos aos fluidos gastrointestinais têm sido apresentados por diversos autores. Ilha, da Silva, Lorenz, de Oliveira Rocha, & Sant'Anna (2015) caracterizando *L. paracasei* relataram subtração de 4,25 log UFC/mL após exposição dos microrganismos a pH 2,0 por 3 horas.

Ding & Shah (2007) avaliaram a resistência de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* em pH 2,0 com 2 horas de exposição e relataram decréscimo de 6,69 e 6,61 log UFC/mL, para cada microrganismo, respectivamente. Pimentel-González, Campos-Montiel, Lobato-Calleros, Pedroza-Islas, & Vernon-Carter (2009) reportaram que *L. rhamnosus* ao ser exposto sob condições gástricas simuladas a pH 2,3 por 2 horas apresentou decréscimo de 1,87 log UFC/mL em relação sua concentração inicial.

É prudente ressaltar que a comparação de resultados de resistência aos fluidos gastrointestinais de microrganismos candidatos a utilização como probióticos exige muita cautela. A literatura apresenta vários estudos como uma variedade significativa de metodologias para tal análise, em geral a variação reside nos valores de pH e tempo de exposição utilizados nos testes.

Figura 2. Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) após exposição por 300 minutos aos fluidos gastrointestinais simulados, sendo 120 minutos de exposição em fluidos gástricos simulados e 180 minutos de exposição em fluidos intestinais simulados.

Embora a concentração remanescente de *L. rhamnosus* 64 seja limítrofe ao preconizado, é necessário atentar-se ao fato que em uma possível aplicação destes microrganismos em uma matriz alimentícia, possíveis perdas de células viváveis durante o período de estocagem do produto poderiam comprometer a concentração do probiótico após a passagem pelo TGI, provocando valores de concentração final inferiores 6 log UFC/g. Quando as demais propriedades desejáveis para microrganismos probióticos são atendidas, mas se constata resistência aos fluidos gastrointestinais aquém do desejado, é possível lançar mão à tecnologia de microencapsulação de probióticos que tem demonstrado eficácia satisfatória para aumentar a sobrevivência desses microrganismos frente às condições do TGI (BOSNEA et al., 2014; COOK et al., 2012; DE VOS et al., 2010; ISLAM, 2010; PEDROSO, THOMAZINI, HEINEMANN, & FAVARO-TRINDADE, 2012).

Dependendo dos resultados dos demais testes de caracterização das duas cepas quanto as propriedades desejáveis para probióticos, tanto *L. rhamnosus* 64, como *L. paracasei* BGP1, podem ser candidatos à aplicação da técnica de microencapsulação objetivando proteção frente aos fluidos gastrointestinais, e consequente manutenção da viabilidade celular.

Nos estudos de DING & SHAH, (2007), PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., (2009) e ILHA et al., (2015) os desempenhos dos microrganismos frente ao teste de resistência às condições gastrointestinais simuladas justificaram a aplicação de técnicas de microencapsulação a fim de melhorar a resistência.

5.1.3 Análise da hidrofobicidade da parede celular

Considerável atenção tem sido dada ao perfil de hidrofobicidade da parede celular na caracterização de microrganismo com potencial probiótico. Embora a hidrofobicidade não seja o único fator relacionado ao complexo processo de adesão de microrganismos no epitélio intestinal, alguns autores afirmam que o estágio inicial desta fixação seja mediado por interações físico-químicas que incluem a hidrofobicidade e cargas (BARBOSA, SILVA, MARTINS, & NICOLI, 2005; PELLETIER et al., 1997).

Acredita-se que quanto maior a hidrofobicidade da superfície do microrganismo, maior seria sua capacidade de adesão (KOS et al., 2003; ROSENBERG; GUTNICK; ROSENBERG, 1980). Além disso, no caso do presente estudo, teoricamente, quanto maior a hidrofobicidade da parede celular do probiótico, maior a possibilidade de retê-lo na partícula lipídica, portanto maior seria a eficiência do processo de encapsulação.

Embora exista a afirmação de que lactobacilos geralmente apresentam superfície celular de natureza hidrofóbica (GARCÍA-CAYUELA et al., 2014), é possível encontrar estudos com os mais variados valores de hidrofobicidade, incluindo valores abaixo de 10% (DHEWA et al., 2010; ZAGO et al., 2011) e acima de 90% (MANGONI et al., 2011; VAN COILLIE et al., 2007).

Neste estudo *L. rhamnosus* 64 apresentou 19,19% e *L. paracasei* BGP1 8,47% de hidrofobicidade, valores baixos, porém, dentro da faixa encontrada na literatura. Os resultados de estudos que também avaliaram cepas de *L. rhamnosus* e *L. paracasei* sustentam a afirmação que o perfil de hidrofobicidade da superfície celular, assim como várias outras características esperadas em microrganismos probióticos, é cepa-dependente.

Pelletier et al. (1997) cita valores entre 8,3 e 9,6 % e 8,7 e 26,5 % de hidrofobicidade para cepas de *L. paracasei* e *L. rhamnosus*, respectivamente. Xu, Jeong, Lee, & Ahn (2009) relataram valores de hidrofobicidade próximos de 25 e 46 % para *L. paracasei* e *L. rhamnosus* GG, respectivamente. Polak-Berecka, Waśko, Paduch, Skrzypek, & Sroka-Bartnicka (2014) também utilizaram hexadecano como solvente para avaliação da hidrofobicidade de *L. rhamnosus* e encontraram valores entre 11 e 16 %.

No entanto, cabe a ressalva de que embora seja desejável que um probiótico apresente superfície externa de natureza hidrofóbica para que tenha capacidade de suportar os efeitos do peristaltismo intestinal da corrente de fluidos intestinais e não ser eliminando, está não deve ser uma característica limitante na seleção de probióticos, como bem observado por

Santos et al. (2016), pois existem probióticos com notáveis características funcionais positivas que apresentam baixa hidrofobicidade.

5.1.4 Análise de susceptibilidade a antibióticos

Os resultados da análise de susceptibilidade a antibióticos das duas cepas de lactobacilos estudadas encontram-se resumidos na Tabela 2. *L. rhamnosus* 64 apresentou sensibilidade a cinco dos oito antibióticos testados, apresentando sensibilidade moderada à penicilina e tetraciclina, e resistência à eritromicina. Já *L. paracasei* BGP1 apresentou sensibilidade à penicilina, sensibilidade moderada à eritromicina e tetraciclina. Ambas as cepas apresentaram resistência à vancomicina, sendo que tal característica tem sido relatada em diversos estudos, tanto recentes (AAZAMI et al., 2014; HAGHSHENAS et al., 2015; SANTOS et al., 2016), quanto em estudos mais antigos (HAMILTON-MILLER; SHAH, 1998). Em suma, o perfil de resistência de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 aos antibióticos avaliados não divergiu da literatura (GUEIMONDE et al., 2013; KÖLL et al., 2008; SANTOS et al., 2016; SHARMA; DEVI, 2014; VIZOSO PINTO et al., 2006).

A resistência de probióticos à drogas antibacterianas não necessariamente motiva preocupações, pelo contrário, a utilização de probióticos resistentes pode ser útil para restauração da microbiota intestinal após tratamento com uso de antibióticos (GUEIMONDE et al., 2013). Todavia, configura-se um problema quando a resistência é transferível, permitindo que microrganismos patogênicos adquiram resistência por intermédio de bactérias utilizadas como probióticos (BERNARDEAU et al., 2008; SHARMA et al., 2014). A resistência de cepas de lactobacilos à eritromicina e vancomicina detectada em nossos testes tem sido relatada na literatura como resistência intrínseca sem risco de transferência horizontal (AMMOR; BELÉN FLÓREZ; MAYO, 2007; GAD; ABDEL-HAMID; FARAG, 2014; RABIA; SHAH, 2011).

Tabela. 2 Perfil de resistência a antibióticos de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1

Cepas	Antibióticos							
	Cefe	Cefo	Ceft	Eri	Neo	Pen	Tet	Van
<i>L. rhamnosus</i> 64	S	S	S	R	S	MS	MS	R
<i>L. paracasei</i> BGP1	S	S	S	MS	S	S	MS	R

Antibióticos: cefepima – (Cefe) (30 µg), cefoxitina (Cefo) (30 µg), ceftriaxona (Ceft) (30 µg), eritromicina (Eri) (15 µg), neomicina (Neo) (30 µg), penicilina (Pen) (10 µg), tetraciclina (Tet) (30 µg) e vancomicina (Van) (30 µg). Onde: S: sensível, MS: moderadamente sensível, R: resistente.

5.1.5 Antagonismo *in vitro*

L. paracasei BGP1 e *L. rhamnosus* 64 foram capazes de promover efeito antagonista contra os quatro patógenos testados: *Escherichia coli* V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313.

Em todos os testes nos poços que continham células ativas das cepas lactobacilos foi verificado uma zona de inibição de crescimento dos patógenos superior a 3 mm (Tabela 3). Por outro lado, quando avaliada a atividade antagonista dos sobrenadantes neutralizados livre de células não foram obtidos resultados positivos, indicando que a inibição constatada por células ativas não foi decorrente da produção de bacteriocinas termorresistentes, mas possivelmente pela produção de ácidos orgânicos. Relatos semelhantes já foram apresentados (MARAGKOUDAKIS et al., 2006; POPPI et al., 2015; VIZOSO PINTO et al., 2006). Esses autores atribuíram a capacidade de inibição, devido a produção de ácido orgânicos. Este resultado, no entanto, não é unânime na literatura, de modo que não pode ser extrapolado a todas as cepas de lactobacilos. Santos et al. (2016), por exemplo, relataram que os sobrenadantes neutralizados de cepas de lactobacilos isoladas a partir da fermentação do cacau foram capazes de inibir o crescimento de *E. Coli* ATCC 25922,

destacando que os sobrenadantes de *L. plantarum* inibiram adicionalmente *S. enterica* var. *Typhimurium* ATCC 14028 e *Shigella flexi* ATCC11060.

Tabela. 3

Efeito antagonista de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 contra patógenos

Cepas	Patógenos			
	<i>EC</i>	<i>SE</i>	<i>AS</i>	<i>LM</i>
<i>L. rhamnosus</i> 64	+	+	+	+
<i>L. paracasei</i> BGP1	+	+	+	+
<i>L. rhamnosus</i> 64 (SNLC)	-	-	-	-
<i>L. paracasei</i> BGP1 (SNLC)	-	-	-	-

Microrganismos: *Escherichia coli* V517 (*EC*); *Salmonella enteritidis* OMS-Ca (*SE*); *Staphylococcus aureus* 76 (*AS*); *Listeria monocytogenes* ATCC 15313 (*MO*). Presença de halo de inibição (+). Ausência de halo de inibição (-). SNLC: Sobrenadante neutralizado livre de células.

5.1.6 Utilização de prebióticos

Considerando que os prebióticos são ingredientes alimentares não digeríveis capazes de estimular seletivamente o crescimento de probióticos (GIBSON; ROBERFROID, 1995), a avaliação da capacidade de utilização destes por microrganismos com potencial probiótico é indispensável, especialmente quando se vislumbra sua aplicação em produtos simbióticos.

Ponderando que pesquisas recentes têm demonstrado que a capacidade de utilização de prebióticos é uma característica cepa-dependente (MANDADZHIEVA et al., 2011; ZAGO et al., 2011), as duas cepas de lactobacilos do presente estudo foram avaliadas quanto a capacidade de utilização de quatro prebióticos: inulina, polidextrose, raftilose 95 (FOS) e lactulose.

Como ilustrado na Figura 3, *L. paracasei* BGP1 apresentou alto crescimento na presença de inulina e raftilose 95 (FOS), com taxas de crescimento celular de 75% e 86%, respectivamente, em relação ao controle. Entretanto, apresentou taxas de crescimento inferiores a 35% na presença de polidextrose ou lactulose. *L. rhamnosus* 64, por sua vez, apresentou alto crescimento apenas na presença de lactulose, 91% em relação ao controle, e taxa de crescimento celular inferior a 40% na presença dos demais prebióticos testados.

Quando avaliado o desempenho de crescimento das duas cepas na presença de cada prebiótico foi possível observar comportamentos inversos ($p < 0,05$), com exceção para polidextrose que não proporcionou diferença de crescimento entre as duas cepas ($p > 0,05$).

Figura 3. Utilização de inulina, lactulose, raftilose 95 (FOS) e polidextrose por *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) durante o crescimento.

* Os valores da Capacidade de Utilização de Prebiótico (CUP) foram expressos como porcentagem de crescimento celular em relação à glicose (100% de utilização), usada como controle após 24 horas de incubação.

A lactulose que neste estudo promoveu taxa de crescimento alta para *L. rhamnosus* 64 e baixa para *L. paracasei* BGP1 também foi alvo de estudo de Zago et al. (2011) frente à capacidade de sua utilização por 27 cepas de *L. plantarum* isoladas de queijo. Esses autores relataram que entre sete prebióticos avaliados, a lactulose foi o que proporcionou a maior taxa crescimento celular de todas as cepas investigadas, obtendo valores próximos de 100% em relação ao controle.

Kunová, Rada, Lisova, Ročková, & Vlková (2011) também relataram resultados exitosos na utilização de lactulose por diversas espécies de lactobacilos, embora a inulina tenha sido o prebiótico que promoveu as maiores taxas de crescimento no estudo. Watson et al., (2013) também constataram resultados superiores na taxa de crescimento de cepas de 21 espécies lactobacilos quando utilizado lactulose, pontuando que essas mesmas cepas não foram capazes de utilizar inulina e polidextrose.

Os estudos disponíveis na literatura apresentam resultados variados, reforçam a afirmação de que a capacidade de utilização de prebióticos por probióticos é uma característica cepa-dependente (TROPICHEVA et al., 2013), e impedem qualquer tipo de generalização. Todavia, um comportamento frequentemente relatado é a baixa capacidade ou incapacidade de utilização da polidextrose por lactobacilos (MÄKELÄINEN et al., 2010; WATSON et al., 2013; ZAGO et al., 2011), fato corroborado por nossos achados com *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1. A polidextrose apresenta uma estrutura complexa, com difícil e lenta degradação, exigindo a atuação de diversos microrganismos da microbiota intestinal para promoção da degradação parcial da molécula (RÖYTIÖ; OUWEHAND, 2014). Embora os resultados provenientes de testes *in vitro* com microrganismos probióticos isolados não sejam exitosos quanto à capacidade de utilização da polidextrose, cabe a ressalva de que alguns estudos clínicos têm confirmado a capacidade deste prebiótico em modular a microbiota intestinal benéficamente (COSTABILE et al., 2012; HOODA et al., 2012; JIE et al., 2000; LAMICHHANE et al., 2014).

Inulina e frutooligossacarídeos estão entre os ingredientes prebióticos mais utilizados para o desenvolvimento de alimentos simbióticos (BURITI et al., 2007; FORNELLI et al., 2014; MOAYEDNIA, 2014; OKURO et al., 2013; PAZ et al., 2014), sendo que nem sempre a capacidade de utilização desses prebióticos pelos microrganismos probióticos incorporados é testada previamente. Com reconhecido efeito bifidogênico (BÚRIGO et al., 2007; SHOAIB et al., 2016), inulina e frutooligossacarídeos também têm demonstrado efeitos positivos sob lactobacilos. Souza Oliveira, Perego, de Oliveira e Converti (2012) relataram resultados satisfatórios quanto ao efeito da inulina no crescimento e metabolismo de *L. rhamnosus* em co-cultura com *Streptococcus thermophilus*. Makras, Van Acker e De Vuyst (2005) constataram *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 isolado de leite materno foi capaz de utilizar inulina e frutooligossacarídeos. Em contrapartida, nos estudos de Adebola, Corcoran e Morgan (2014), *L. acidophilus* NCTC 1723, *L. delbrueckii* ssp. *bulgaricus* NCTC 12712 e *L. brevis* NCIMB 11973 não foram capazes de utilizar a inulina como fonte de carbono.

5.2 Microencapsulação de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de polímeros

5.2.1 Determinação do pH ideal para produção das cápsulas

Durante o processo de coacervação complexa o pH representa um fator crucial para obtenção bem-sucedida das cápsulas, influenciando, inclusive, no rendimento do processo (DANIELS; MITTERMAIER, 1995; SHINDE; NAGARSENKER, 2009). Tal importância deve-se ao fato que o pH afeta a formação do complexo proteína-carboidrato pela capacidade de influenciar o grau de ionização do grupo funcional da proteína (grupo amino) e do carboidrato (grupo carboxila) (SIOW; ONG, 2013).

Embora as variações nos valores de pH possam ser muito sutis, os relatos presentes na literatura reforçam a ideia de que seu ajuste acurado influencia diretamente na otimização do processo (LECLERCQ; HARLANDER; REINECCIUS, 2009; NAKAGAWA et al., 2004; SIOW;

ONG, 2013). Portanto, a determinação do pH ideal para produção das cápsulas foi realizada neste estudo.

Na Figura 4 é possível observar imagens capturadas por microscopia ótica do material obtido por coacervação complexa em que se avaliou diferentes valores de pH para determinação do valor ideal para o processo de encapsulação por coacervação complexa. Nota-se, que com exceção dos tratamentos em que o pH foi ajustado para 3,0 e 5,0, foram obtidas cápsulas com características típicas para técnica de coacervação complexa, ou seja, cápsulas esféricas com borda bem delimitada e núcleo aparente (NORI et al., 2011; PRATA et al., 2008; ROCHA-SELMÍ et al., 2013). Nas micrografias referentes ao material produzido em pH 3,0, observa-se apenas glóbulos de gordura, enquanto que nas micrografias referentes ao material produzido em pH 5,0 já é possível observar formação do complexo de proteína-polissacarídeo e alguns glóbulos de gordura internalizados no complexo, porém, sem nenhuma forma definida, evidenciando que o processo de encapsulação não ocorreu. Entre os valores de pH testados o material que apresentou características morfológicas dentro do esperado foi o coacervado produzido em pH 4,5.

Já na Figura 5 é apresentado o resultado da avaliação da eficiência de decantação do coacervado 24 horas após a produção das cápsulas. Apenas quando o coacervado foi preparado utilizando o pH 3,0 não foi possível identificar separação de fases. Nos demais valores de pH (3,5, 4,0, 4,5, 5,0) a separação de fase é nítida, atentando-se ao fato de que o tubo em que continha o coacervado preparado em pH 4,5 foi o que apresentou a fase aquosa mais límpida visualmente. Em função dos resultados obtidos, considerando morfologia e eficiência de decantação, o pH 4,5 foi escolhido para o processo de produção das cápsulas por coacervação complexa neste trabalho. Este valor de pH está próximo ou coincide com os valores relatados por autores que também trabalharam com gelatina suína e goma arábica como polímeros para encapsulação de diferentes ingredientes por coacervação complexa, entre estes, Jouzel et al. (2003), Nakagawa et al. (2004), Xing et al. (2004) e Comunian et al. (2013b) que determinaram os valores 3,9, 4,0, 4,2 e 4,4, respectivamente, como pH ótimo para os sistemas que trabalharam.

Figura 4. Micrografias obtidas por microscopia ótica de coacervados produzidos com diferentes valores de pH: 3,0, 3,5, 4,0, 4,5 e 5,0.

Figura 5. Avaliação rendimento do processo por meio da eficiência de decantação de coacervados produzidos com diferentes valores de pH (3,0, 3,5, 4,0, 4,5, 5,0).

5.2.2 Análise morfológica e de tamanho das cápsulas

As cápsulas produzidas apresentaram morfologia típica para técnica de coacervação complexa, formato esférico, bordas bem delimitas e núcleo aparente, conforme é possível observar nas micrografias obtidas por microscopia ótica na Figura 6-A.

Ainda é possível verificar que as características dos núcleos apresentaram diferenças em função do microrganismo encapsulado. Cápsulas carregadas com *L. paracasei* BGP1

apresentam-se em sua maioria mononucleadas, enquanto que as cápsulas carregadas com *L. rhamnosus* 64 apresentam-se multinucleadas. Ambas as características são relatadas na literatura (AZIZ et al., 2014; XIAO et al., 2014; GOMEZ-ESTACA et al., 2016). Uma possível explicação para tal diferença pode estar relacionada com o perfil de hidrofobicidade da parede celular dos microrganismos. Conforme já apresentado em tópico anterior, a parede celular de *L. rhamnosus* 64 é mais hidrofóbica que a parede celular de *L. paracasei* BGP1, o que pode interferir na interação com a gordura durante a produção das cápsulas.

Por meio de microscopia confocal foi possível confirmar que as partículas lipídicas sólidas estavam totalmente internalizadas nas cápsulas, independentemente da quantidade de núcleos (mono ou multinucleadas), sendo que praticamente todas as cápsulas observadas apresentavam recheio, ainda que por núcleos pequenos (Figura 6-B). Tais comportamentos também foram reportados por Lamprecht, Schäfer e Lehr, (2001), Schmitt et al. (2001) e Santos et al. (2015), ainda que esses autores tenham trabalhado com núcleos bastante distintos do usado no presente trabalho.

Já nas micrografias obtidas por microscopia eletrônica de varredura (Figura 6-C) foi observado um comportamento típico já descrito por Saravanan e Panduranga Rao (2010) e Comunian et al. (2013) para cápsulas produzidas por coacervação complexa e submetidas à desidratação por liofilização, cápsulas aglomeradas unidas por pontes sólidas. Após o processo de reidratação das cápsulas a morfologia esférica, borda bem delimitada e núcleo aparente foi novamente observada por meio de microscopia ótica. Para microscopia eletrônica de varredura não foram verificadas diferenças morfológicas em função do microrganismo encapsulado.

Quanto ao tamanho de partícula foram encontrados tamanhos médios de $83,92 \pm 1,70 \mu\text{m}$ para cápsulas carregadas com *L. rhamnosus* 64 e de $80,12 \pm 1,89 \mu\text{m}$ para cápsulas carregadas com *L. paracasei* BGP1, sem diferença estatística ($p > 0.05$). Em ambos os casos a distribuição de tamanho foi unimodal. Essa faixa de tamanho está dentro do citado por Fávaro-Trindade, Pinto e Rocha (2008) e Xiao et al. (2014) como tamanho esperado para

cápsulas obtidas por coacervação complexa. Já a distribuição de tamanho corrobora os achados de vários autores que trabalharam com a mesma técnica, entre eles Alvim e Grosso (2010), Saravanan e Panduranga Rao (2010), Conto et al. (2013) e Agüero et al. (2013).

Figura 6. Micrografias obtidas por microscopia ótica (A) – LR: *L. rhamnosus* 64 e LP: *L. paracasei* BGP1, microscopia confocal (B) e microscopia eletrônica de varredura (C) de cápsulas carregadas com lactobacilos produzidas por coacervação complexa.

5.2.3. Efeito do pH e da temperatura na estabilidade da cápsula

Se a escolha do valor de pH ideal é um fator crucial e limitante para produção de cápsulas pela técnica de coacervação complexa, a avaliação do efeito do pH na estabilidade da cápsula também é muito importante (XIAO et al., 2016). Como bem colocado por Comunian et al. (2016), o processo de coacervação complexa envolve interações que dependem de valores de pH específicos, entretanto, essas forças de atração, chamadas ligações eletrostáticas, são muito fracas e podem ser alteradas ou eliminadas por mudanças no pH. Dessa forma, os valores de pH podem influenciar no processo de liberação do recheio contido na cápsula de forma desejável ou indesejável (KANG; DAI; KIM, 2012), como pode interferir na proteção desejada aos probióticos contra as condições adversas do trato gastrointestinal que incluem ambientes com valores de pH muito baixos, como no ambiente gástrico onde as secreções podem atingir valores de pH 1,0 (GBASSI; VANDAMME, 2012).

Na Figura 7 são apresentadas imagens obtidas por microscopia ótica das cápsulas carregadas com lactobacilos após exposição a soluções com diferentes valores de pH. É possível observar que a integridade das cápsulas foi mantida após exposição em diferentes condições de pH considerando as características morfológicas típicas. Todavia, verifica-se que as delimitações das cápsulas se mostram consideravelmente enfraquecidas à medida que os valores de pH se tornaram extremos, distanciado do pH 4,5, valor este, utilizado para produção das cápsulas.

Embora em teoria se reconheça o pH como um fator importante para a estabilidade das cápsulas produzidas por coacervação complexa (MIQUELIM; LANNES; MEZZENGA, 2010; TURGEON; SCHMITT; SANCHEZ, 2007), não há na literatura muitos relatos de trabalhos que tenham avaliado o efeito do pH na estabilidade das cápsulas.

Comunian et al. (2016), encapsularam óleo de echium por coacervação complexa utilizando goma de caju como alternativa à goma arábica e avaliaram o efeito do pH na estabilidade das cápsulas. Os achados destes autores assemelham-se aos aqui relatados na encapsulação

de probióticos. Foram observadas alterações da integridade das cápsulas em valores de pH extremos 2,0 e 8,0, sendo o pH 4,0, valor utilizado para o processo de coacervação complexa.

Figura 7. Micrografias obtidas por microscopia ótica de cápsulas produzidas por coacervação complexa com diferentes valores de pH de ajuste (1,5, 3,0, 4,5, 7,5 e 9,0) para determinação do valor de pH ideal para o processo.

Diante dos resultados encontrados, considerável atenção deve ser dada à análise de tolerância aos fluidos gastrointestinais, discutida em tópico subsequente. Os resultados demonstraram que a integridade da cápsula poderá ser comprometida em pH estomacal com enfraquecimento do complexo formado pelos polímeros, evidenciado nas imagens como enfraquecimento das bordas delimitadoras. Entretanto, deve-se atentar ao fato de que não há comprometimento visual das partículas de gordura, o que em teoria sugere que as células bacterianas estavam protegidas. Por outro lado, o enfraquecimento da cápsula também sugere o início do processo de liberação do recheio, considerando que o local de liberação desejável é o trato intestinal, o gatilho do processo de liberação iniciado no estômago, desde que as células sejam mantidas sob proteção, é altamente desejável.

Já na Figura 8, são apresentadas as micrografias obtidas por microscopia ótica e confocal das cápsulas após serem submetidas à exposição em três valores de temperatura, 40, 45 e 50 °C por 2 minutos. Verifica-se que as cápsulas não sofreram alterações morfológicas após exposição às temperaturas de 40 e 45 °C, é possível observar claramente bordas bem delimitadas e núcleos aparentes. No entanto, quando as cápsulas são aquecidas à temperatura de 50 °C constata-se sua total descaracterização, apenas pequenos glóbulos de gordura podem ser visualizados, evidenciando seu rompimento. Resultados próximos foram relatados por Comunian et al. (2016) na encapsulação de óleo de echium por coacervação complexa utilizando goma de caju. Os autores relaram que a 40 °C foi constatada a destruição da cápsula. Conforme esses mesmo autores, o aquecimento provoca agitação entre as moléculas, o que resultaria na desestabilização do complexo proteína-polissacarídeo.

Figura 8. Micrografias de cápsulas carregadas com probióticos submetidas a diferentes temperaturas (40, 45 e 50 °C) capturadas por microscopia ótica (A) e microscopia confocal (B) para avaliar o efeito da temperatura na estabilidade das cápsulas.

A partir dos resultados obtidos do efeito da temperatura na estabilidade da cápsula foi definido o binômio tempo/temperatura, 50°C/2 minutos, para liberação do recheio e contagem de microrganismo. Em análises prévias foi constatado que tais condições não provocam subtração da concentração de microrganismos, ressaltando assim, da possibilidade de incorrer em subestimação da concentração real de células viáveis.

5.2.4. Umidade e atividade de água das cápsulas

Não foi constatada diferença estatística ($p < 0,05$) entre os valores encontrados para umidade e atividade de água em função do microrganismo encapsulado, como esperado.

As cápsulas desidratadas carregadas com *L. paracasei* BGP1 apresentaram valores de umidade de $7,35 \pm 0,04$ % e atividade de água de $0,249 \pm 0,057$ %, enquanto que as cápsulas desidratadas carregadas com *L. rhamnosus* 64 apresentaram umidade de $8,88 \pm 0,88$ % e atividade de água de $0.412 \pm 0,064$.

As cápsulas úmidas também não apresentaram diferença estatística ($p < 0,05$) em função do microrganismo encapsulado. Cápsulas úmidas carregadas com *L. paracasei* BGP1 apresentaram umidade de $90,02 \pm 0,75$ % e atividade de água $0,984 \pm 0,05$, enquanto as cápsulas úmidas carregadas com *L. rhamnosus* 64 apresentaram umidade de $92,99 \pm 0,24$ % e atividade de água $0,990 \pm 0,03$.

Sabe-se que os valores de atividade de água podem alterar a velocidade das reações químicas, retardando ou acelerando alterações químicas de determinados ingredientes (DAMODARAN; PARKIN; FENNEMA, 2008), dessa forma a análise desses valores independentemente do método de encapsulação utilizado merece cuidadosa atenção quando o objetivo do processo é prolongar a estabilidade do material encapsulado. A literatura aponta que altos valores de umidade e atividade de água são deletérios aos

microrganismos microencapsulados durante a estocagem pela aceleração dos processos oxidativos (OKURO et al., 2013).

De acordo com Teixeira; Castro e Kirby (1995), valores de umidade relativa de até 11% favorecem a sobrevivência de microrganismos liofilizados. Dessa forma os valores encontrados para umidade neste trabalho não superaram o preconizado.

5.2.5. Resistência dos microrganismos ao processo de encapsulação

Os resultados de resistência dos microrganismos ao processo de encapsulação por coacervação complexa podem ser visualizados na Figura 9. *L. rhamnosus* 64 não sofreu subtração em sua população durante o processo, a contagem de 10^9 UFC/g constatado no inóculo inicial foi mantida após a encapsulação. Para *L. paracasei* BGP1, entretanto, foi verificada redução na ordem de 1 ciclo logarítmico indo de 10^9 UFC/g a 10^8 UFC/g após a produção das cápsulas (-1,12 log UFC/g). Em busca de uma possível explicação foi realizada a contagem de microrganismos presente na água após a decantação e coleta das cápsulas, verificando que enquanto a contagem de *L. rhamnosus* 64 não atingiu 2,00 log UFC/mL, a contagem de *L. paracasei* BGP1 foi de 3,24 log UFC/mL, sugerindo que as diferenças nas concentrações após a produção da cápsula resultam da permanência de bactérias no meio aquoso onde as cápsulas foram formadas. Dessa forma, esses resultados indicam que a redução na concentração *L. paracasei* BGP1 durante o processo não se deve à morte celular, sustentando a afirmação de que ambos microrganismos foram resistentes ao processo, todavia, quando utilizado *L. rhamnosus* 64 obteve-se uma melhor eficiência de encapsulação.

Aqui, mais uma vez se faz oportuno explorar o perfil de hidrofobicidade da superfície celular dos dois microrganismos, onde se verificou que *L. rhamnosus* 64 apresenta superfície mais hidrofóbica que *L. paracasei* BGP1, o que poderia justificar maior retenção na partícula lipídica, portanto menor tendência de passagem para o ambiente aquoso durante o processo de formação das cápsulas. Uma importante ressalva se faz válida, em função destes

resultados, todas as análises subsequentes apresentam uma contagem inicial com a diferença de 1 ciclo logarítmico entre os dois microrganismos.

Os resultados aqui expostos podem ser considerados satisfatórios ao se estabelecer um comparativo com os relatos constantes na literatura de autores que encapsularam microrganismos probióticos por diferentes técnicas. Okuro et al. (2013) e Pedroso et al, (2012) encapsularam cepas de lactobacilos e bifidobactérias pela técnica de *spray chilling* e também constataram alta resistência dos microrganismos ao processo, com reduções inferiores a 1 ciclo logarítmico nas contagens antes e após a encapsulação.

Spray chilling, assim como coacervação complexa, é uma técnica que não envolve o emprego de altas temperaturas ou solventes orgânicos durante o processo (OKURO; DE MATOS; FAVARO-TRINDADE, 2013), favorecendo a manutenção da integridade celular em comparação com técnicas que empregam altas temperaturas como *spray drying*, por exemplo.

Abd-Talib et al. (2013) que encapsularam duas cepas de *Lactobacillus plantarum* (B13 e B18) relataram reduções superiores a 3,0 log UFC/g durante o processo de secagem por *spray drying* que envolveu o uso de temperatura de 110 °C. Resultados semelhantes já haviam sido relatados por Corcoran et al. (2004), que demonstraram, inclusive, que para as cepas de lactobacilos estudadas, a presença de prebióticos (inulina e polidextrose) não promovia a manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o processo.

Por outra lado, Oliveira et al. (2007) constaram perdas inferiores a 0,60 log UFC/g ao submeter *B. lactis* (BI 01) e *L. acidophilus* (LAC 4) à secagem por *spray drying* após esses microrganismos terem sido encapsulados por coacervação complexa, o que pode ter conferido proteção às células bacterianas. Pelo reconhecido efeito deletério do calor aos microrganismos, muitos autores tentam otimizar a técnica de *spray drying* para minimizar a perda a morte das células durante o processo (BEHBOUDI-JOBBEHDAR et al., 2013).

É oportuno salientar que o impacto do processo de encapsulação na viabilidade dos microrganismos nem sempre é investigado. Em 2016, Dianawati, Mishra e Shah, prestaram uma importante colaboração à literatura científica ao apresentar uma revisão sobre a sobrevivência de probióticos após o processo de encapsulação. Comparando resultados relatados de manutenção da viabilidade de probióticos durante o processo de encapsulação pelas técnicas de *spray drying* (DESMOND et al., 2002; KEARNEY et al., 2009) e *freeze drying* (BERNER; VIERNSTEIN, 2006; HEIDEBACH; FOERST; KULOZIK, 2010). Neste contexto, os resultados obtidos neste trabalho para encapsulação de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 por coacervação complexa podem ser considerados satisfatórios.

5.2.6. Resistência dos microrganismos ao processo de homogeneização em Ultra-Turrax

A utilização do Ultra-Turrax para homogeneização durante o processo de microencapsulação representa um importante fator de risco, uma vez que a homogeneização se dá por meio de cisalhamento, havendo possibilidade de dano físico às células bacterianas. Tal preocupação não é comumente estudada, mas já foi levantada por outros autores (CAPELA; HAY; SHAH, 2007; DING; SHAH, 2009).

Tanto Capela, Hay e Shah, (2007) como Ding e Shah (2009) avaliaram o efeito da homogeneização através de Ultra-Turrax na viabilidade de cepas probióticas encapsuladas em alginato de cálcio ao estudarem o efeito da homogeneização na redução do tamanho das cápsulas. Capela, Hay e Shah, (2007) relataram que as cepas de *L. acidophilus* 33200, *L. casei* 279, *B. longum* 536 e *L. rhamnosus* GG sofreram reduções significativas, entre 35 e 100%, na contagem de células viáveis após homogeneização com Ultra-Turrax a 8000 ou 13500 rpm por 2 ou 4 minutos. Já Ding e Shah (2009), reduziram a velocidade de rotação do Ultra-Turrax e aumentaram o tempo de homogeneização 5 ou 10 minutos, entretanto os resultados encontrados também demonstraram redução significativa na contagem de células viáveis após homogeneização, que variaram entre 10 e 69%,

Considerando os resultados de Capela, Hay e Shah, (2007) e Ding e Shah (2009), o presente estudo propôs avaliar velocidades de rotação menores (5500, 7000 e 8500 rpm) e tempo de homogeneização menor (90 segundos). Foi verificado que não houve redução significativa ($p < 0,05$) na contagem de células viáveis de *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 quando submetidos a processo de homogeneização com Ultra-Turrax a 5500 e 7000 rpm por 90 segundos. Quando a velocidade avaliada foi de 8500 rpm por 90 segundos foi verificada redução na ordem de 1 ciclo logarítmico, de 10^9 UFC/g para 10^8 UFC/g, independentemente da cepa avaliada ($p < 0,05$). Esses resultados corroboraram os resultados de Capela, Hay e Shah, (2007) e Ding e Shah (2009) ao demonstrarem que o aumento da velocidade de homogeneização tem efeito deletério às bactérias, e sustentaram a escolha do binômio velocidade de rotação/tempo em 7000 rpm por 90 segundos para o processo de obtenção das cápsulas considerando a preservação da integridade dos microrganismos.

Figura 9. Resistência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) ao processo de homogeneização com Ultra-Turrax em diferentes velocidades (5500, 7000 e 8500 rpm).

5.2.7. Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados à temperatura e salinidade

Além da possibilidade de aumentar a viabilidade dos microrganismos probióticos durante o período de estocagem e promover proteção contra os efeitos adversos encontrados no trato gastrointestinal (DE VOS et al., 2010), a microencapsulação pode ser útil na proteção das células probióticas durante o processamento dos alimentos, especialmente contra os efeitos deletérios do tratamento térmico que pode provocar lesão celular reduzindo a viabilidade, e consequentemente, a concentração desses microrganismos no produto final (DING; SHAH, 2007). Por esse motivo, muitos autores têm objetivado desenvolver cápsulas que apresentem estabilidade térmica como uma tentativa de ampliar as possibilidades no desenvolvimento de alimentos funcionais contendo probióticos (ANN et al., 2007; KIM et al., 2008b; MANDAL; PUNIYA; SINGH, 2006; SANTOS et al., 2016).

Neste estudo o efeito da temperatura na sobrevivência das duas cepas de lactobacilos livres e encapsuladas foi avaliado ao expor as bactérias a três condições de temperatura (40, 50 e 60 °C) por 5 minutos. Os resultados encontrados estão apresentados na Figura 10. Nota-se que a encapsulação só foi eficaz na proteção de *L. rhamnosus* 64 (LR) quando exposto à temperatura de 60 °C, quando evitou a redução de 1,33 log UFC/mL considerando o resultado obtido para células livres ($p < 0,05$). Em todas as outras condições comparando os resultados entre células livres e encapsuladas não foram constatadas diferenças estatísticas ($p > 0,05$).

Quando avaliado o efeito da temperatura na sobrevivência dos microrganismos, observa-se que o aumento da temperatura impactou de forma significativa somente quando a temperatura de exposição foi de 60 °C. As reduções foram de 6,00 e 6,12 log UFC/mL para *L. paracasei* BGP1 encapsulado e livre, respectivamente, e 7,41 e 6,27 log UFC/mL para *L. rhamnosus* 64, encapsulado e livre, respectivamente.

A preocupação com o efeito deletério do calor às cepas de lactobacilos é amplamente documentado na literatura, seja em estudos antigos (SPECK; MYERS, 1946), como em estudos recentes (CHEN; TANG; CHIANG, 2017; SPUS et al., 2017; YAO et al., 2017). Teles

Santos et al. (2016), recentemente avaliaram o efeito do calor na sobrevivência de cepas de lactobacilos isoladas do processo de fermentação do cacau, relatando reduções mais amenas na contagem de células de microrganismos expostos a 60 °C por 5 minutos. De acordo com os autores, as reduções variaram entre $1,94 \pm 0,32$ e $3,39 \pm 0,49$ log UFC/mL. Ferrando et al. (2015) relataram redução na ordem de 3 ciclos logarítmicos ao avaliar a tolerância térmica de *L. plantarum* a temperatura de 58 °C por 15 minutos. Liao et al. (2010) foram além e demonstram que o pH do meio também pode influenciar na tolerância térmica de cepas de lactobacilos. A disparidade entre os resultados de tolerância térmica conduz à ideia de que tal característica também é singular à cada cepa.

Figura 10 – Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição a diferentes temperaturas (40, 50 e 60 °C) por 5 minutos.

De acordo com resultados obtidos no presente estudo, a encapsulação em partículas lipídicas recobertas por gelatina e goma arábica não promoveu melhoria na tolerância térmica das duas cepas de lactobacilos avaliadas. Esses resultados poderiam ter sido diferentes caso o tempo de exposição tivesse sido prolongado. Tal suposição foi feita com

base nos estudos disponíveis na literatura que avaliaram o efeito da temperatura na sobrevivência de lactobacilos livres ou encapsulados. Ann et al. (2007), por exemplo, também não encontram diferenças significativas na viabilidade entre *L. acidophilus* ATCC 43121 livre ou encapsulado, após 60 minutos de exposição à temperatura de 55 °C. No entanto, quando o tempo de exposição foi prolongado a 180 e 240 minutos, a encapsulação foi capaz de melhorar a viabilidade frente ao calor. Já Ding e Shah, (2007), relataram que a encapsulação de cepas de lactobacilos e bifidobactérias em matriz de alginato foi capaz de melhorar a resistência térmica dos microrganismos. Ao expor as cepas livres ou encapsuladas a 65 °C por 30 minutos, os autores encontraram redução de 4,17 log UFC/mL para microrganismos encapsulados e 6,74 log UFC/mL para os microrganismos livres, resultado considerado como exitoso pelos pesquisadores. A capacidade de tolerância ao calor é uma característica tão importante que já é possível encontrar na literatura estudos que por meio da microencapsulação objetivam prioritariamente melhorar a resistência térmica de probióticos (PITIGRAISORN et al., 2017).

O conteúdo de NaCl presente nos alimentos é outro fator que pode comprometer a viabilidade dos microrganismos probióticos e reduz as possibilidades de desenvolvimento de alimentos probióticos, uma vez que o sal é muito utilizado na indústria de alimentos como agente do gosto salgado (BOSNEA; MOSCHAKIS; BILIADERIS, 2014).

Neste estudo, o efeito de três concentrações de NaCl na sobrevivência das cepas de lactobacilos é apresentado na Figura 11. É possível observar que só foram verificadas diferenças significativas ($p < 0,05$) nos resultados obtidos na concentração de 5% de NaCl em relação às demais. Nessa concentração, foi possível verificar, inclusive, diferença entre os valores de viabilidade de bactérias livres e encapsuladas ($p < 0,05$), com redução de 2,23 log UFC/mL e 0,41 log UFC/mL para células livres e encapsuladas, respectivamente, de *L. paracasei* BGP1, e 2,95 log UFC/mL e 1,2 log UFC/mL para células livres e encapsuladas, respectivamente, de *L. rhamnosus* 64.

Os resultados reportados neste trabalho para tolerância à salinidade das bactérias livres corroboram com diversos relatos, entre eles os de Rahman, Hossain e Rahman (2016) que verificaram que cepas de lactobacilos isolados de iogurtes comercializados em Bangladesh apresentaram boa tolerância a soluções de NaCl em concentrações de até 7%. Em concentrações de 8 a 9% os autores verificaram tolerância moderada, sendo que a 10% os microrganismos foram classificados como intolerantes.

A tolerância a diferentes concentrações de NaCl (1–5 %) de cepas de lactobacilos isoladas de produtos lácteos tradicionais iranianos também foi investigada por Sharafi et al. (2015). Os resultados apresentaram forte variação em função da cepa. *L. rhamnosus*, por exemplo, apresentou reduções significativas nas taxas de crescimento em todas as concentrações de NaCl testadas, sendo que a menor redução de crescimento (40%) ocorreu com quando os microrganismos cresceram expostos a 1% de NaCl. Já *L. crustorum*, *Lactobacillus casei* e *L. brevis* apresentaram taxa de crescimento superior a 70% quando expostos a 3% de NaCl. Embora os autores não tenham demonstrado os valores, afirmaram que o crescimento desses microrganismos foi satisfatório mesmo na presença de solução salina a 5%.

Figura 11. Sobrevivência *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição a diferentes concentrações de NaCl (1, 2,5 e 5%) por 120 minutos.

Os estudos que avaliaram o efeito protetor da encapsulação a microrganismos probióticos expostos à altas concentrações de sal apresentam resultados diversos. Ann et al. (2007) encapsularam *L. acidophilus* ATCC 43121 com substratos prebióticos usando um sistema de hibridação não encontraram diferença na tolerância ao sal a 15% entre bactérias livres ou encapsuladas. Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014) encapsularam *L. paraplantarum* B1 e *L. paracasei* E6 por coacervação complexa e constaram efeito protetor da encapsulação frente à exposição dos microrganismos a 3, 6 e 9% de NaCl. Como bem destacado por esses autores, a alta concentração salina pode comprometer a estabilidade do coacervado por influência da força iônica. Ao romper as cápsulas a proteção dos probióticos contra a alta concentração de NaCl fica prejudicada. Dessa forma, para alimentos que apresentam alta concentração salina a aplicação da técnica de encapsulação por coacervação complexa pode não ser a mais indicada. Todavia, cabe acrescentar que neste trabalho, mesmo após o rompimento da membrana formada pelo complexo gelatina-goma arábica, teoricamente, os probióticos ainda estariam protegidos das condições adversas do meio, pois estariam imobilizados nas partículas lipídicas.

Por fim, muita cautela se faz necessária para avaliação do efeito da salinidade em bactérias probióticas encapsuladas. Algumas técnicas de encapsulação que oferecem condições desfavoráveis ao microrganismo durante o processo, como é o caso do calor na técnica de *spray drying*, podem promover a sensibilidade ao sal pelo dano causado à membrana citoplasmática dessas bactérias. Gardiner et al. (2000) relataram que *L. paracasei* subsp. *paracasei* teve sua sensibilidade ao sal consideravelmente aumentada após encapsulação com *spray drying*, os microrganismos que antes de serem submetidos à técnica apresentam 4% de sensibilidade, passaram a apresentar 70% de sensibilidade a 5% de NaCl após a secagem.

5.2.8. Tolerância dos microrganismos livres ou encapsulados aos fluidos gastrointestinais simulados

A capacidade de resistir às condições adversas do trato gastrointestinal é um requisito indispensável para que um microrganismo seja classificado como probiótico de ação

intestinal (COOK et al., 2012). Quando se verifica que a sensibilidade dos microrganismos ao ácido e à bile pode comprometer o número de células que chegarão vivas ao intestino, recorre-se à tecnologia de microencapsulação (DE VOS et al., 2010). Na literatura é possível encontrar uma infinidade de trabalhos que avaliaram a microencapsulação por diversas técnicas como estratégia de melhorar resistência de lactobacilos às condições do TGI (TRINDADE; GROSSO, 2000; DING; SHAH, 2007; OLIVEIRA et al., 2007b; GBASSI et al., 2009; PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; OKURO et al., 2013;). Graças aos resultados exitosos obtidos por esses trabalhos o interesse pela microencapsulação de microrganismos tem crescido muito, especialmente pela indústria de alimentos funcionais (DIAS; FERREIRA; BARREIRO, 2015).

Figura 12. Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR), livres ou encapsulados por coacervação complexa, após exposição por 300 minutos aos fluidos gastrointestinais simulados, sendo 120 minutos de exposição em fluidos gástricos simulados e 180 minutos de exposição em fluidos intestinais simulados.

Como já apresentado em tópico anterior, a sensibilidade das cepas de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 os fluidos gástricos simulados foi significativamente alta, em especial no fluido

gástrico. Como reapresentado na Figura 12, *L. rhamnosus* 64 livre sofreu redução de 1,31 log UFC/g, enquanto *L. paracasei* BGP1 livre sofreu redução de 3,37 log UFC/g.

Já o efeito dos fluidos intestinais simulados foi pequeno para ambos os microrganismos. Após 180 minutos de exposição aos FIS *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 foi de 1,64 e 1,71 log UFC/g, respectivamente. Com a microencapsulação a sensibilidade reduziu consideravelmente. *L. paracasei* BGP1 que livre apresentou redução de 1,31 log UFC/g nos FGS, quando encapsulado reduziu 0,66 log UFC/g ($p > 0,05$). Já *L. rhamnosus* 64 que livre apresentou redução de 3,37 log UFC/g, quando encapsulado apresentou redução de 1,13 log UFC/g ($p < 0,05$). Nos FIS os resultados também foram exitosos, *L. paracasei* BGP1 apresentou redução de 0,75 log UFC/g e *L. rhamnosus* 64 de 0,63 log UFC/g; resultados com diferença estatística ($p < 0,05$) comparando-se os microrganismos livres e encapsulados. A perda acumulada (FGS + FIS) para *L. paracasei* BGP1 livre foi de 5,08 log UFC/g, enquanto a forma encapsulada apresentou perda de 1,41 log UFC/g ($p < 0,05$). Já a perda acumulada de *L. rhamnosus* 64 livre foi de 2,95 log UFC/g, enquanto a forma encapsulada apresentou perda 1,76 log UFC/g ($p < 0,05$).

A microencapsulação promoveu resultados satisfatórios para os dois microrganismos avaliados ao promover a manutenção da viabilidade acima de 6,00 log UFC/g. Bosnea, Moschakis e Biliaderis (2014), que também utilizaram a coacervação complexa para encapsulação de *L. paraplantarum* B1 e *L. paracasei* E6 apresentaram resultados igualmente exitosos. A encapsulação foi feita com proteína isolada do leite e goma arábica. Os resultados apresentados foram surpreendentes e superaram os aqui apresentados, *L. paracasei* E6 nos testes de resistência aos fluidos gastrointestinais observaram redução na ordem de 1 ciclo logarítmico mantendo a contagem dos microrganismos em 10^9 UFC/g.

Os resultados do presente estudo, no entanto, superaram os encontrados por Okuro et al. (2013) que encapsularam *L. acidophilus* em gordura por *spray chilling*, o que era esperado, visto que, com a coacervação, os probióticos tinham uma barreira adicional de proteção,

além da matriz lipídica. Todavia, se aproximaram dos resultados de Ding e Shah (2007), que encapsularam várias cepas de lactobacilos em matriz de alginato.

Promover proteção aos probióticos contra as condições do TGI é muito exitoso, visto o efeito deletério dos fluidos produzidos. Os ácidos biliares, por exemplo, apresentam efeito antimicrobiano por possuírem propriedade detergente capaz de dissolver as membranas dos microrganismos levando à morte celular (MADUREIRA et al., 2013). Em 2012, Cook et al. em uma importante contribuição à literatura científica reuniram detalhadamente em uma revisão as principais características do TGI que influenciam a sobrevivência dos probióticos. Os autores também abordaram a tecnologia de microencapsulação como estratégia para entrega de microrganismos no TGI.

É certo que a preocupação com a sensibilidade dos probióticos às condições do trato gastrointestinal é importante. No entanto, é preciso considerar que os probióticos têm sido utilizados para aplicações em outros sítios de atuação como cavidade bucal (BIZZINI et al., 2012), pele (JEONG; LEE; CHUNG, 2016) e vagina (REID, 2016), dessa forma, probióticos que apresentem boa funcionalidade, ainda que tenham alta sensibilidade às condições do TGI podem ser utilizados para outras finalidades.

5.2.9. Avaliação da estabilidade dos microrganismos microencapsulados durante período de estocagem

Conforme os resultados ilustrados na Figura 13 é possível verificar que *L. rhamnosus* 64 e *L. paracasei* BGP1 microencapsulados apresentaram perfis de sobrevivência semelhantes, independentemente da temperatura de estocagem. Após 120 dias de estocagem a 7 °C verificou-se redução na concentração de células viáveis dentro da faixa de 1 ciclo logarítmico para ambos microrganismos. Ou seja, enquanto *L. rhamnosus* sofreu redução de 0,93 log UFC/g, *L. paracasei* BGP1 apresentou redução de 0,69 log UFC/g ($p < 0,05$). Já na estocagem a 25 °C constatou-se que após os 120 dias *L. rhamnosus* sofreu redução de 1,58 log UFC/g e

Figura 13. Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) encapsulados por coacervação complexa durante estocagem 7 °C por 120 dias.

Figura 14. Sobrevivência de *L. paracasei* BGP1 (LP) e *L. rhamnosus* 64 (LR) encapsulados por coacervação complexa durante estocagem a 25 °C por 120 dias.

L. paracasei BGP1 sofreu redução de 1,50 log UFC/g ($p < 0,05$). Quando estabelecida comparação entre a estabilidade dos microrganismos nas duas condições de estocagem verifica-se que a temperatura não impactou os resultados ao ponto de constatar diferenças estatísticas. Em outras palavras, a técnica de encapsulação foi efetiva na proteção dos microrganismos independente da temperatura de estocagem avaliada, 7 ou 25 °C.

Na literatura é possível encontrar estudos envolvendo a encapsulação de probióticos por diferentes técnicas que relatam êxito na manutenção da viabilidade dos microrganismos durante o período de estocagem, demonstrando, inclusive, impacto da temperatura de estocagem na estabilidade dos microrganismos, indicando que quanto maior a temperatura na qual as cápsulas foram estocadas, menor é a taxa de sobrevivência dos probióticos (ALBERTINI et al., 2010; ANN et al., 2007).

Oliveira et al. (2007) encapsularam *Bifidobacterium lactis* (BI01) e *Lactobacillus acidophilus* (LAC04) por meio de coacervação complexa seguida por secagem em spray drying e constataram que após 120 dias de estocagem das cápsulas a concentração de *B. lactis* (BI 01) sofreu redução de 4,34 e 6,06 ciclos logarítmicos a 7 e 37 °C, respectivamente.

Okuro et al. (2013) que utilizaram a técnica de *spray chilling* e gordura interesterificada de palma e palmiste para encapsular *L. acidophilus* com inulina ou polidextrose verificaram que a temperatura de estocagem, -18, 7 ou 20 °C, exerceu forte influência na estabilidade dos microrganismos ao longo de 120 dias, sob condição de atmosfera controlada.

Por outro lado, alguns estudos relataram resultados semelhantes aos encontrados neste trabalho, ao demonstrarem que a temperatura de estocagem não influenciou na estabilidade dos microrganismos. Pedroso et al. (2012) encapsularam *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus acidophilus* por *spray chilling* utilizando gordura interesterificada de palma e palmiste e após 90 dias de estocagem das cápsulas à temperatura de 7 e 37 °C verificaram que a concentração de *L. acidophilus* não apresentou diferença significativa em função da

temperatura. *B. lactis*, no entanto, apresentou melhores resultados de sobrevivência quando as cápsulas foram estocadas a 7 °C. Em outro trabalho Pedroso et al. (2013) utilizaram a mesma técnica de encapsulação, *spray chilling*, para encapsular *B. lactis* e *L. acidophilus*, utilizando manteiga de cacau como matriz lipídica. Mesmo utilizando temperatura de estocagem inferior, 7 e 20 °C, novamente esses autores constataram que após 90 dias de estocagem a temperatura não influenciou na estabilidade do microrganismo. Durante o armazenamento em duas condições distintas de temperatura, 7 e 25 °C, a técnica de encapsulação aplicada também foi responsável por resultados satisfatórios.

5.3 Avaliação da manutenção da capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 livres ou microencapsulados por coacervação complexa

A administração oral de bactérias lácticas pode induzir a promoção de parâmetros imunológicos a nível intestinal, como IgA secretória e citocinas, os quais estão relacionados com um estado de maior defesa da mucosa intestinal, mas estes são dependentes da cepa e do tempo de administração da mesma (FRECE et al., 2005; VINDEROLA et al., 2005a, 2005b). Em modelos animais, observou-se que a administração de bactérias ácido-lácticas pode prevenir a infecção por agentes patogênicos entéricos tais como *Salmonella* (ZACARÍAS et al., 2014).

Neste estudo, os animais receberam *L. paracasei* BGP1 ou *L. rhamnosus* 64 durante 10 dias como culturas livres ou encapsuladas. Se estabeleceu também um grupo controle de biotério e outro grupo controle que recebeu somente cápsulas vazias. Não se observou diferenças significativas nos níveis de IgA secretora e citocinas no conteúdo intestinal nos grupos tratados em relação aos controles. Como pode ser visto nas Figuras 15 e 16, não se observou diferenças nem mesmo entre os resultados obtidos de animais que receberam microrganismos livres ou encapsulados. Também não se observou diferenças nestes mesmos parâmetros (Figuras 17 e 18) quando os animais receberam as cepas por 10 dias e foram desafiados com *Salmonella* e eutanasiados e dias após o desafio.

Figura 15. Níveis de sIgA total no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 10 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias.

Grupo 1: *L. paracasei* BGP1 livre; Grupo 2: *L. rhamnosus* 64 livre; Grupo 3: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. paracasei* BGP1; Grupo 4: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. rhamnosus* 64; Grupo 5: Cápsulas vazias obtidas por coacervação complexa; Grupo 6: Solução salina estéril (grupo controle de biotério).

Numerosos estudos indicam que existem dois limiares de microrganismos necessários para obter uma ativação da resposta imune da mucosa, tanto em animais (GILL; RUTHERFURD, 2001; YA et al., 2008) como em humanos (OUWEHAND, 2017). As cápsulas produzidas continham aproximadamente 1×10^8 UFC/g de cada cepa, no entanto, devido a viscosidade das mesmas quando em suspensão para administração aos animais, resultando em

dificuldade na passagem da agulha de gavagem, foi necessário realizar uma diluição na proporção 1:10, culminando em uma administração real de aproximadamente 1×10^7 UFC/animal. Essa dosagem pode ser considerada baixa para ser detectada pelas células imunológicas da mucosa intestinal do modelo animal utilizado.

Figura 16. Níveis de citocina presente no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 10 dias consecutivos. Os resultados estão expressos como média das concentrações da respectiva citocina (pg/mL de conteúdo intestinal).

Grupo 1: *L. paracasei* BGP1 livre; Grupo 2: *L. rhamnosus* 64 livre; Grupo 3: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. paracasei* BGP1; Grupo 4: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. rhamnosus* 64; Grupo 5: Cápsulas vazias obtidas por coacervação complexa; Grupo 6: Solução salina estéril (grupo controle de biotério).

Figura 17. Níveis de sIgA total produzidas no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 7 dias e foram desafiados com *Salmonella* e eutanasiados 7 dias depois do desafio. Os resultados estão expressos como média das concentrações de sIgA ($\mu\text{g/g}$ conteúdo intestinal). As barras verticais representam os desvios-padrão das médias.

Grupo 1: *L. paracasei* BGP1 livre; Grupo 2: *L. rhamnosus* 64 livre; Grupo 3: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. paracasei* BGP1; Grupo 4: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. rhamnosus* 64; Grupo 5: Cápsulas vazias obtidas por coacervação complexa; Grupo 6: Solução salina estéril (grupo controle de biotério).

Algo importante deve ser observado, as cápsulas sejam elas vazias ou carregadas com microrganismos foram bem toleradas, visto que não desencadeou uma resposta inflamatória, a qual poderia ser evidenciada pelo aumento das citocinas IL-2, TNF e IL-6. Este resultado é positivo, pois é possível que o material de parede utilizado para encapsulação de microrganismos promova efeito indesejável em relação ao sistema imunológico. Através dos resultados obtidos, verifica-se a necessidade de otimizar o processo de encapsulação, de modo a produzir cápsulas com conteúdo maior de microrganismos, no entanto, em termos de tolerância imunológica o material de utilizado foi adequado.

Figura 18. Níveis de citocinas produzidas no conteúdo intestinal de camundongos BALB/c que receberam os produtos durante 10 dias e foram desafiados com *Salmonella* e eutanasiados 7 dias depois do desafio. Os resultados estão expressos como média das concentrações da respectiva citocinas (pg/mL de conteúdo intestinal).

Figura 4 Grupo 1: *L. paracasei* BGP1 livre; Grupo 2: *L. rhamnosus* 64 livre; Grupo 3: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. paracasei* BGP1; Grupo 4: Cápsulas obtidas por coacervação complexa carregadas de *L. rhamnosus* 64; Grupo 5: Cápsulas vazias obtidas por coacervação complexa; Grupo 6: Solução salina estéril (grupo controle de biotério).

Quanto aos testes realizados para determinar a segurança oral das duas cepas não foi constatado crescimento bacteriano em nenhum dos dois órgãos avaliados, fígado e baço, seja no experimento que envolveu desafio com patógeno ou não. Resultados semelhantes têm sido relatados. Vinderola et al. (2005a) e (Zacarías et al., (2014) também avaliaram a segurança oral de cepas de microrganismos candidatos a probióticos e verificaram que estes não foram capazes de se translocar da microbiota entérica para órgãos como fígado e baço quando administrados em doses usuais.

6. CONCLUSÃO

- As duas avaliadas, *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64, apresentaram características desejáveis para microrganismos candidatos ao uso como probióticos, embora ambas tenham demonstrado considerável sensibilidade aos fluidos gastrointestinais simulados. Por meio de testes *in vitro* as duas cepas foram capazes de antagonizar quatro patógenos importantes (*Escherichia coli* V517, *Salmonella enteritidis* OMS-Ca, *Staphylococcus aureus* 76 e *Listeria monocytogenes* ATCC 15313). Pela avaliação do perfil de susceptibilidade a antibióticos os dois microrganismos não demonstraram comportamentos distintos aos já relatados na literatura através de estudos com cepas das mesmas espécies. Ainda que os testes *in vitro* tenham revelado que as paredes celulares das cepas apresentam baixa hidrofobicidade (8,47 e 19,9%), os valores encontram-se nos intervalos descritos por outros autores. Os testes de capacidade de utilização de prebióticos confirmaram que esta característica, assim como as demais estudadas neste trabalho, é cepa-dependente. Os resultados aqui relatados podem subsidiar a escolha da combinação de prebiótico e probióticos para o desenvolvimento de alimentos simbióticos. Por fim, ainda sobre a primeira etapa do estudo, é possível concluir que os resultados de resistência à lisozima colocam ambas as cepas como importantes candidatos à aplicação em filmes de desintegração oral, visto que ambas apresentaram perfil de sobrevivência superior a 80% após exposição por 30 minutos à lisozima.

- A encapsulação de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64 foi bem-sucedida. Nos testes preliminares para determinação do pH ideal para produção das cápsulas definiu-se pelo valor de 4,5, que está próximo ou coincide com valores usados por outros autores que utilizaram gelatina suína e goma arábica para encapsular diferentes ingredientes alimentícios. As cápsulas obtidas apresentaram morfologias e tamanhos típicos à técnica. Valor de pH extremos, 1,0 e 9,0, foram capazes de reduzir a estabilidade das cápsulas, verificada através do comprometimento das características morfológicas. Condições de temperatura superior a 50 °C também comprometeu a integralidade das cápsulas. Os microrganismos apresentaram boa resistência às condições do processo de encapsulação,

incluindo a homogeneização em Ultra-Turrax. A tolerância dos microrganismos à diferentes condições de salinidade e temperatura melhorou significativamente com o processo de encapsulação. Bem como a resistência aos fluidos gastrointestinais, principal característica que justificou o emprego da encapsulação as duas cepas estudadas. Durante o armazenamento em duas condições distintas de temperatura, 7 e 25 °C, a técnica de encapsulação aplicada também foi responsável por resultados satisfatórios.

- Nos testes *in vivo* constatou-se que a microencapsulação em partículas lipídicas recobertas por interação eletrostática de gelatina suína e goma arábica não provoca alteração na capacidade imunomoduladora de *L. paracasei* BGP1 e *L. rhamnosus* 64. Não foi constatada diferença na produção de imunoglobulina A (IgA) ou citocinas quando comparada a resposta imunológica de camundongos frente à ingestão dos microrganismos encapsulados. Os mesmos resultados foram obtidos quando os microrganismos foram tratamento com lactobacilos e em seguida desafiados com *Salmonella*. Embora os resultados dos testes *in vivo* tenham sido satisfatórios, ficou evidenciada a necessidade de otimizar a técnica de encapsulação proposta para aumentar o carregamento de microrganismos por grama de cápsula.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AAZAMI, N. et al. Characterization of some potentially probiotic *Lactobacillus* strains isolated from Iranian native chickens. **The Journal of General and Applied Microbiology**, v. 60, n. 6, p. 215–221, 2014.
- ABD-TALIB, N. et al. Survival of encapsulated probiotics through spray drying and non-refrigerated storage for animal feeds application. **Agricultural Sciences**, v. 4, n. 5, p. 78–83, 2013.
- ABDALLAH ISMAIL, N. et al. Frequency of Firmicutes and Bacteroidetes in gut microbiota in obese and normal weight Egyptian children and adults. **Archives of Medical Science : AMS**, v. 7, n. 3, p. 501–507, 11 jun. 2011.
- ADEBOLA, O. O.; CORCORAN, O.; MORGAN, W. A. Synbiotics: the impact of potential prebiotics inulin, lactulose and lactobionic acid on the survival and growth of lactobacilli probiotics. **Journal of Functional Foods**, v. 10, p. 75–84, set. 2014.
- AGRAWAL, R. **Probiotics: An emerging food supplement with health benefits** Food Biotechnology, 2005.
- AGÜERO, L. et al. Synthesis and characterization of polyelectrolyte complex microparticles for drug release. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 128, n. 6, p. 3548–3554, 2013.
- ALBERTINI, B. et al. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, n. 4, p. 359–366, 2010.
- ALVIM, I. D.; GROSSO, C. R. F. Microparticles obtained by complex coacervation: influence of the type of reticulation and the drying process on the release of the core material. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 30, p. 1069–1076, 2010.
- AMMOR, M. S.; BELÉN FLÓREZ, A.; MAYO, B. Antibiotic resistance in non-enterococcal lactic acid bacteria and bifidobacteria. **Food Microbiology**, v. 24, n. 6, p. 559–570, set. 2007.
- ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, n. 5, p. 240–

251, maio 2007.

ANN, E. Y. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121 with prebiotic substrates using a hybridisation system. **International Journal of Food Science & Technology**, v. 42, n. 4, p. 411–419, 2007.

ANUKAM, K. C.; REID, G. Probiotics: 100 years (1907-2007) after Elie Metchnikoff's observation. **Communicating Current Research and Educational Topics and Trends in Applied Microbiology**, p. 466–474, 2007.

ARMOUGOM, F. et al. Monitoring Bacterial Community of Human Gut Microbiota Reveals an Increase in *Lactobacillus* in Obese Patients and Methanogens in Anorexic Patients. **PLoS ONE**, v. 4, n. 9, p. e7125, 23 set. 2009.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v. 10, n. 4, p. 413–435, 1 jan. 1993.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune System Stimulation by Probiotic Microorganisms. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–956, 2014a.

ASHRAF, R.; SHAH, N. P. Immune system stimulation by probiotic microorganisms. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 7, p. 938–56, jan. 2014b.

AZIZ, S. et al. Microencapsulation of krill oil using complex coacervation. **Journal of Microencapsulation**, v. 31, n. 8, p. 774–784, 1 dez. 2014.

BÄCKHED, F. et al. *Helicobacter pylori* Infection Induces Interleukin-8 Receptor Expression in the Human Gastric Epithelium. **Infection and Immunity**, v. 71, n. 6, p. 3357–3360, 23 jun. 2003.

BÄCKHED, F. et al. The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 44, p. 15718–15723, 2 nov. 2004.

BÄCKHED, F. et al. Mechanisms underlying the resistance to diet-induced obesity in germ-free mice. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 104, n. 3, p. 979–984, 16 jan. 2007.

BARBOSA, F. H. F. et al. Perfil de hidrofobicidade da superfície celular de *Bifidobacterium*

lactis Bb12 e Bifidobacterium longum Bb46 em função do meio de cultura. **Revista de Biologia e Ciências da Terra**, v. 5, n. 2, p. 1–5, 2005.

BAUMLER, A. J.; SPERANDIO, V. Interactions between the microbiota and pathogenic bacteria in the gut. **Nature**, v. 535, n. 7610, p. 85–93, 7 jul. 2016.

BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S. et al. Optimization of Spray-Drying Process Conditions for the Production of Maximally Viable Microencapsulated *L. acidophilus* NCIMB 701748. **Drying Technology**, v. 31, n. 11, p. 1274–1283, 18 ago. 2013.

BEKKALI, N.-L.-H. et al. The role of a probiotics mixture in the treatment of childhood constipation: a pilot study. **Nutrition Journal**, v. 6, p. 17, 4 ago. 2007.

BELICOVÁ, A.; MIKULÁŠOVÁ, M.; DUŠINSKÝ, R. Probiotic Potential and Safety Properties of *Lactobacillus plantarum* from Slovak Bryndza Cheese. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 760298, 4 set. 2013.

BERNARDEAU, M. et al. Safety assessment of dairy microorganisms: The *Lactobacillus* genus. **International Journal of Food Microbiology**, v. 126, n. 3, p. 278–285, 2008.

BERNER, D.; VIERNSTEIN, H. Effect of protective agents on the viability of *Lactococcus lactis* subjected to freeze-thawing and freeze-drying. **Scientia Pharmaceutica**, v. 74, n. 3, p. 137–149, 2006.

BERVOETS, L. et al. Differences in gut microbiota composition between obese and lean children: a cross-sectional study. **Gut Pathogens**, v. 5, p. 10, 30 abr. 2013.

BETORET, E. et al. Functional foods development: Trends and technologies. **Trends in Food Science and Technology**, v. 22, n. 9, p. 498–508, 2011.

BIZZINI, B. et al. **Probiotics and Oral Health** *Current Pharmaceutical Design*, 2012. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/node/103430/article>>

BOSNEA, L. A.; MOSCHAKIS, T.; BILIADERIS, C. G. Complex Coacervation as a Novel Microencapsulation Technique to Improve Viability of Probiotics Under Different Stresses. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 10, p. 2767–2781, 24 abr. 2014.

BRANDT, K.; SAMPAIO, M.; MIUKI, C. Importância da microflora intestinal. **Pediatria**, v. 28, n. 2, p. 117–127, 2006.

BRON, P. A.; VAN BAARLEN, P.; KLEEREBEZEM, M. Emerging molecular insights into the interaction between probiotics and the host intestinal mucosa. **Nature Reviews Microbiology**, 2011.

BROWN, L. M. Helicobacter pylori: epidemiology and routes of transmission. **Epidemiologic Reviews**, v. 22, n. 2, p. 283–297, 2000.

BUNDESINSTITUT FÜR GESUNDHEITLICHEN VERBRAUCHERSCHUTZ UND VETERINÄRMEDIZIN. **Final report of the BgVV Working Group “Probiotic Microorganism Cultures in Food”**. Berlin: [s.n.].

BURGAIN, J. et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, n. 4, p. 467–483, jun. 2011.

BÚRIGO, T. et al. **Efeito bifidogênico do frutooligossacarídeo na microbiota intestinal de pacientes com neoplasia hematológica** Revista de Nutrição scielo , , 2007.

BURITI, F. C. A. et al. Synbiotic potential of fresh cream cheese supplemented with inulin and Lactobacillus paracasei in co-culture with Streptococcus thermophilus. **Food Chemistry**, v. 104, n. 4, p. 1605–1610, 2007.

BYRD, J. C.; BRESALIER, R. S. **Alterations in gastric mucin synthesis by Helicobacter pylori** World Journal of Gastroenterology, 2000.

CAPELA, P.; HAY, T. K. C.; SHAH, N. P. Effect of homogenisation on bead size and survival of encapsulated probiotic bacteria. **Food Research International**, v. 40, n. 10, p. 1261–1269, dez. 2007.

CARDING, S. et al. Dysbiosis of the gut microbiota in disease. **Microbial Ecology in Health and Disease**, v. 26, p. 10.3402/mehd.v26.26191, 2 fev. 2015.

CHAMPAGNE, C. P.; FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current opinion in biotechnology**, v. 18, n. 2, p. 184–90, maio 2007.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J.; ROY, D. Challenges in the addition of probiotic cultures to foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 45, n. 1, p. 61–84, jan. 2005.

CHEN, M.-J.; TANG, H.-Y.; CHIANG, M.-L. Effects of heat, cold, acid and bile salt adaptations on the stress tolerance and protein expression of kefir-isolated probiotic Lactobacillus

kefiranofaciens M1. **Food Microbiology**, v. 66, p. 20–27, set. 2017.

CHMIELEWSKA, A.; SZAJEWSKA, H. Systematic review of randomised controlled trials: Probiotics for functional constipation. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 16, n. 1, p. 69–75, 7 jan. 2010.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing; Twenty-Second Informational Supplement, M100-S22**. [s.l.: s.n.]. v. 32

COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013a.

COMUNIAN, T. A. et al. Microencapsulation of ascorbic acid by complex coacervation: Protection and controlled release. **Food Research International**, v. 52, n. 1, p. 373–379, 2013b.

COMUNIAN, T. A. et al. Effect of different polysaccharides and crosslinkers on echium oil microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 150, p. 319–329, 5 out. 2016.

COMUNIAN, T. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. **Microencapsulation using biopolymers as an alternative to produce food enhanced with phytosterols and omega-3 fatty acids: A review****Food Hydrocolloids**, 2016.

COOK, M. T. et al. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of controlled release : official journal of the Controlled Release Society**, v. 162, n. 1, p. 56–67, 20 ago. 2012.

CORCORAN, B. M. et al. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, n. 5, p. 1024–1039, 2004.

CORONA-HERNANDEZ, R. I. et al. Structural Stability and Viability of Microencapsulated Probiotic Bacteria: A Review. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 12, n. 6, p. 614–628, 2013.

COSTABILE, A. et al. Impact of polydextrose on the faecal microbiota: a double-blind, crossover, placebo-controlled feeding study in healthy human subjects. **British Journal of**

Nutrition, v. 108, n. 3, p. 471–481, 2012.

D'ANGELO, C.; REALE, M.; COSTANTINI, E. Microbiota and Probiotics in Health and HIV Infection. **Nutrients**, v. 9, n. 6, p. 615, 16 jun. 2017.

DAHIYA, D. K. et al. Gut Microbiota Modulation and Its Relationship with Obesity Using Prebiotic Fibers and Probiotics: A Review. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, p. 563, 2017.

DAMODARAN, S.; PARKIN, K. L.; FENNEMA, O. R. **Fennema's food chemistry**. Boca Raton: CRC Press/Taylor & Francis, 2008.

DANG, Y. et al. The Effect of Probiotics Supplementation on Helicobacter pylori Eradication Rates and Side Effects during Eradication Therapy: A Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e111030, 3 nov. 2014.

DANIELS, R.; MITTERMAIER, E. M. Influence of pH adjustment on microcapsules obtained from complex coacervation of gelatin and acacia. **Journal of Microencapsulation**, v. 12, n. 6, p. 591–599, 1 jan. 1995.

DARDMEH, F. et al. Potential nociceptive regulatory effect of probiotic lactobacillus rhamnosus PB01 (DSM 14870) on mechanical sensitivity in diet-induced obesity model. **Pain Research and Management**, v. 2016, 2016.

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

DE MATOS-JR, F. E. et al. Effect of feed preparation on the properties and stability of ascorbic acid microparticles produced by spray chilling. **LWT - Food Science and Technology**, v. 75, p. 251–260, jan. 2017.

DE SOUZA OLIVEIRA, R. P. et al. Effect of inulin on the growth and metabolism of a probiotic strain of Lactobacillus rhamnosus in co-culture with Streptococcus thermophilus. **LWT - Food Science and Technology**, v. 47, n. 2, p. 358–363, jul. 2012.

DE VOS, P. et al. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, n. 4, p. 292–302, abr. 2010.

DE VRESE, M.; OFFICK, B. Probiotics and Prebiotics: Effects on Diarrhea. In: **Bioactive Foods**

in **Promoting Health**. [s.l: s.n.]. p. 205–227.

DE VRESE, M.; SCHREZENMEIR, J. Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics. In: STAHL, U.; DONALIES, U. E. B.; NEVOIGT, E. (Eds.). . **Food Biotechnology**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2008. p. 1–66.

DELIA, P. et al. Use of probiotics for prevention of radiation-induced diarrhea. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 13, n. 6, p. 912–915, 14 fev. 2007.

DESAI, K. G. H.; JIN PARK, H. Recent Developments in Microencapsulation of Food Ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361–1394, jul. 2005.

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Encapsulation of vitamin C in tripolyphosphate cross-linked chitosan microspheres by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 22, p. 179–192, 2005.

DESMOND, C. et al. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum acacia. **JOURNAL OF APPLIED MICROBIOLOGY**, v. 93, n. 6, p. 1003–1011, 2002.

DHEWA, T. et al. Selection of *Lactobacillus* strains as potential probiotics on basis of in vitro attributes. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 5, n. 1, p. 45–51, 2010.

DIANAWATI, D.; MISHRA, V.; SHAH, N. P. Survival of Microencapsulated Probiotic Bacteria after Processing and during Storage: A Review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 10, p. 1685–1716, 2016.

DIAS, M. I.; FERREIRA, I. C. F. R.; BARREIRO, M. F. Microencapsulation of bioactives for food applications. **Food Funct.**, v. 6, n. 4, p. 1035–1052, 2015.

DIDARI, T. et al. A systematic review of the safety of probiotics. **Expert Opinion on Drug Safety**, v. 13, n. 2, p. 227–239, 1 fev. 2014.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Acid, Bile, and Heat Tolerance of Free and Microencapsulated Probiotic Bacteria. **Journal of Food Science**, v. 72, n. 9, p. M446--M450, 2007.

DING, W. K.; SHAH, N. P. Effect of Homogenization Techniques on Reducing the Size of Microcapsules and the Survival of Probiotic Bacteria Therein. **Journal of Food Science**, v. 74, n. 6, p. M231–M236, 1 ago. 2009.

DORON, S.; SNYDMAN, D. R. Risk and Safety of Probiotics. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 60, n. Suppl 2, p. S129–S134, 15 maio 2015.

DUARY, R. K. et al. Assessing the adhesion of putative indigenous probiotic lactobacilli to human colonic epithelial cells. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 134, n. 5, p. 664–671, 15 nov. 2011.

ERATTE, D. et al. Complex coacervation with whey protein isolate and gum arabic for the microencapsulation of omega-3 rich tuna oil. **Food Funct.**, v. 5, n. 11, p. 2743–2750, 2014.

FAVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S. C. DE. Revisão : Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103–112, 2008.

FELLEY, C.; MICHETTI, P. **Probiotics and Helicobacter pylori** Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology, 2003.

FENG, J.-R. et al. Efficacy and safety of probiotic-supplemented triple therapy for eradication of Helicobacter pylori in children: a systematic review and network meta-analysis. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 73, n. 10, p. 1199–1208, 2017.

FERRANDO, V. et al. Resistance of functional Lactobacillus plantarum strains against food stress conditions. **Food Microbiology**, v. 48, p. 63–71, 2015.

FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS / WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food** Joint FAO/WHO Working Group Report. Ontario: [s.n.].

FORNELLI, A. R. et al. Effect of inulin and oligofructose on the physicochemical, microbiological and sensory characteristics of symbiotic dairy beverages. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 35, n. 6, p. 3099–3111, 2014.

FRECE, J. et al. In vivo Testing of Functional Properties of Three Selected Probiotic Strains. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 21, n. 8, p. 1401, 2005.

FULLER, R. Probiotics in man and animals. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 66, n. 5, p. 365–378, 1989.

FURRIE, E. Probiotics and allergy. **Proceedings of the Nutrition Society**, v. 64, n. 4, p. 465–

469, 2005.

GAD, G. F. M.; ABDEL-HAMID, A. M.; FARAG, Z. S. H. Antibiotic resistance in lactic acid bacteria isolated from some pharmaceutical and dairy products. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 45, n. 1, p. 25–33, 19 maio 2014.

GARCÍA-CAYUELA, T. et al. Adhesion abilities of dairy *Lactobacillus plantarum* strains showing an aggregation phenotype. **Food Research International**, v. 57, p. 44–50, 2014.

GARDINER, G. E. et al. Comparative Survival Rates of Human-Derived Probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* Strains during Heat Treatment and Spray Drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, n. 6, p. 2605–2612, jun. 2000.

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

GBASSI, G. K.; VANDAMME, T. Probiotic Encapsulation Technology: From Microencapsulation to Release into the Gut. **Pharmaceutics**, v. 4, n. 1, p. 149–163, 6 mar. 2012.

GERRITSEN, J. et al. Intestinal microbiota in human health and disease: the impact of probiotics. **Genes & Nutrition**, v. 6, n. 3, p. 209–240, 2011.

GIBBS, B. F. et al. Encapsulation in the food industry: a review. **International journal of food sciences and nutrition**, v. 50, n. 3, p. 213–224, 1999.

GIBSON, G. R.; ROBERFROID, M. B. Dietary Modulation of the Human Colonic Microbiota: Introducing the Concept of Prebiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 125, n. 6, p. 1401–1412, 1 jun. 1995.

GILL, H. S.; RUTHERFURD, K. J. Viability and dose–response studies on the effects of the immunoenhancing lactic acid bacterium *Lactobacillus rhamnosus* in mice. **British Journal of Nutrition**, v. 86, n. 2, p. 285–289, 2001.

GINEIKIENE, J.; KIUDYTE, J.; DEGUTIS, M. Functional, organic or conventional? Food choices of health conscious and skeptical consumers. **Baltic Journal of Management**, v. 12, n. 2, p. 139–152, 2017.

GOBBETTI, M.; CAGNO, R. DI; DE ANGELIS, M. Functional microorganisms for functional food

quality. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 50, n. 8, p. 716–27, set. 2010.

GOMEZ-ESTACA, J. et al. Encapsulation of an astaxanthin-containing lipid extract from shrimp waste by complex coacervation using a novel gelatin–cashew gum complex. **Food Hydrocolloids**, v. 61, p. 155–162, dez. 2016.

GOUIN, S. **Microencapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends**. Trends in Food Science and Technology. **Anais...**2004

GRANATO, D. et al. Functional foods and nondairy probiotic food development: Trends, concepts, and products. **Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety**, v. 9, n. 3, p. 292–302, 2010.

GUEIMONDE, M. et al. Antibiotic resistance in probiotic bacteria. **Frontiers in Microbiology**, v. 4, p. 202, 18 jul. 2013.

GUINANE, C. M.; COTTER, P. D. Role of the gut microbiota in health and chronic gastrointestinal disease: understanding a hidden metabolic organ. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**, v. 6, n. 4, p. 295–308, jul. 2013.

GUPTA, V.; GARG, R. Probiotics. **Indian Journal of Medical Microbiology**, v. 27, n. 3, p. 202–209, 1 jul. 2009.

HAGHSHENAS, B. et al. Bioactivity characterization of Lactobacillus strains isolated from dairy products. **MicrobiologyOpen**, v. 4, n. 5, p. 803–813, 27 out. 2015.

HAMILTON-MILLER; SHAH. Vancomycin susceptibility as an aid to the identification of lactobacilli. **Letters in Applied Microbiology**, v. 26, n. 2, p. 153–154, 1998.

HASSAN, S. T. S.; ŠUDOMOVÁ, M. Probiotics as Dietary Supplements for Eradication of Helicobacter pylori Infection in Children: A Role Beyond Infection. **Children**, v. 3, n. 4, p. 27, 10 dez. 2016.

HAUKIOJA, A. Probiotics and Oral Health. **European Journal of Dentistry**, v. 4, n. 3, p. 348–355, jul. 2010.

HAVENAAR, R.; BRINK, B. TEN; HUIS IN 'T VELD, J. H. J. Selection of strains for probiotic use. In: **Probiotics: The scientific basis**. Dordrecht: Springer Netherlands, 1992. p. 209–224.

HAVENAAR, R.; HUIS IN'T VELD, J. H. J. Probiotics: A General View BT - The Lactic Acid Bacteria Volume 1: The Lactic Acid Bacteria in Health and Disease. In: WOOD, B. J. B. (Ed.). . Boston, MA: Springer US, 1992. p. 151–170.

HEIDEBACH, T.; FOERST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **JOURNAL OF FOOD ENGINEERING**, v. 98, n. 3, p. 309–316, jun. 2010.

HEINEMANN, R. J. B.; CARVALHO, R. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Orally disintegrating film (ODF) for delivery of probiotics in the oral cavity — Development of a novel product for oral health. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 19, p. 227–232, jul. 2013.

HERNÁNDEZ-RODRÍGUEZ, L. et al. Lactobacillus plantarum protection by entrapment in whey protein isolate: κ -carrageenan complex coacervates. **Food Hydrocolloids**, v. 36, n. Supplement C, p. 181–188, 2014.

HICKSON, M. et al. Use of probiotic Lactobacillus preparation to prevent diarrhoea associated with antibiotics: randomised double blind placebo controlled trial. **BMJ**, v. 335, n. 7610, p. 80–80, 2007.

HOMAN, M.; OREL, R. Are probiotics useful in Helicobacter pylori eradication? **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 37, p. 10644–10653, 7 out. 2015.

HOODA, S. et al. 454 Pyrosequencing Reveals a Shift in Fecal Microbiota of Healthy Adult Men Consuming Polydextrose or Soluble Corn Fiber. **The Journal of Nutrition**, 1 jul. 2012.

IGNACIO, A. et al. Correlation between body mass index and faecal microbiota from children. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 22, n. 3, p. 258.e1-258.e8, 17 jun. 2017.

ILHA, E. C. et al. Lactobacillus paracasei isolated from grape sourdough: acid, bile, salt, and heat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research and Technology**, v. 240, n. 5, p. 977–984, 2015.

ISLAM, M. A. Microencapsulation of Live Probiotic Bacteria. **Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 20, n. 10, p. 1367–1377, 28 out. 2010.

JANDHYALA, S. M. et al. Role of the normal gut microbiota. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 29, p. 8787–8803, 7 ago. 2015.

JEONG, J. H.; LEE, C. Y.; CHUNG, D. K. Probiotic Lactic Acid Bacteria and Skin Health. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 56, n. 14, p. 2331–2337, out. 2016.

JIE, Z. et al. Studies on the effects of polydextrose intake on physiologic functions in Chinese people. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v. 72, n. 6, p. 1503–1509, 1 dez. 2000.

JIMÉNEZ, E. et al. Is meconium from healthy newborns actually sterile? **Research in Microbiology**, v. 159, n. 3, p. 187–193, 2008.

JOSHI, N.; RAWAT, K.; BOHIDAR, H. B. pH and ionic strength induced complex coacervation of Pectin and Gelatin A. **Food Hydrocolloids**, v. 74, n. Supplement C, p. 132–138, 2018.

JOUZEL, B. et al. Encapsulation of a lipid precursor, the eicosapentaenoic acid, to study the development of the crassostrea gigas oyster flavours. **Journal of Microencapsulation**, v. 20, n. 1, p. 35–46, 1 jan. 2003.

JUNYAPRASERT, V. B. et al. Effect of Process Variables on the Microencapsulation of Vitamin A Palmitate by Gelatin-Acacia Coacervation. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 27, n. 6, p. 561–566, 2001.

KABIR, A. M. et al. Prevention of Helicobacter pylori infection by lactobacilli in a gnotobiotic murine model. **Gut**, v. 41, n. 1, p. 49–55, 1997.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current issues in intestinal microbiology**, v. 3, n. 2, p. 39–48, 2002.

KANG, M. K.; DAI, J.; KIM, J.-C. Ethylcellulose microparticles containing chitosan and gelatin: pH-dependent release caused by complex coacervation. **Journal of Industrial and Engineering Chemistry**, v. 18, n. 1, p. 355–359, 25 jan. 2012.

KANMANI, P. et al. Probiotics and its functionally valuable products-a review. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 53, n. 6, p. 641–58, jan. 2013.

KASAI, C. et al. Comparison of the gut microbiota composition between obese and non-obese individuals in a Japanese population, as analyzed by terminal restriction fragment length polymorphism and next-generation sequencing. **BMC Gastroenterology**, v. 15, p. 100, 11 ago. 2015.

KAUR, N.; GUPTA, A. K. Applications of inulin and oligofructose in health and nutrition.

Journal of Biosciences, v. 27, n. 7, p. 703–714, 2002.

KAYITMAZER, A. B.; KOKSAL, A. F.; KILIC IYILIK, E. Complex coacervation of hyaluronic acid and chitosan: effects of pH, ionic strength, charge density, chain length and the charge ratio. **Soft Matter**, v. 11, n. 44, p. 8605–8612, 2015.

KEARNEY, N. et al. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **INTERNATIONAL DAIRY JOURNAL**, v. 19, n. 11, p. 684–689, nov. 2009.

KIM, J. M. et al. Conjugated linoleic acids produced by *Lactobacillus dissociates* IKK-gamma and Hsp90 complex in *Helicobacter pylori*-infected gastric epithelial cells. **Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology**, v. 88, n. 5, p. 541–552, 2008a.

KIM, S.-J. et al. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 3, p. 493–500, 2008b.

KLEEREBEZEM, M.; VAUGHAN, E. E. Probiotic and Gut Lactobacilli and Bifidobacteria: Molecular Approaches to Study Diversity and Activity. **Annual Review of Microbiology**, v. 63, n. 1, p. 269–290, 8 set. 2009.

KLEMMER, K. J. et al. Complex coacervation of pea protein isolate and alginate polysaccharides. **Food Chemistry**, v. 130, n. 3, p. 710–715, 2012.

KOBYLIAK, N. et al. Probiotics in prevention and treatment of obesity: a critical view. **Nutrition {&} Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 14, 2016.

KODAIRA, M. S.; ESCOBAR, A. M. DE U.; GRISI, S. Aspectos epidemiológicos do *Helicobacter pylori* na infância e adolescência. **Revista de Saúde Pública**, v. 36, p. 356–369, 2002.

KOLIADA, A. et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. **BMC Microbiology**, v. 17, p. 120, 22 maio 2017.

KÖLL, P. et al. Characterization of oral lactobacilli as potential probiotics for oral health. **Oral Microbiology and Immunology**, v. 23, n. 2, p. 139–147, 1 abr. 2008.

KONSTANTINOV, S. R. et al. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, n. 49, p. 19474–19479, 9 dez. 2008.

KOS, B. et al. Adhesion and aggregation ability of probiotic strain *Lactobacillus acidophilus* M92. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, n. 6, p. 981–987, 1 jun. 2003.

KUANG, S. S.; OLIVEIRA, J. C.; CREAN, A. M. Microencapsulation as a Tool for Incorporating Bioactive Ingredients into Food. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 50, n. 10, p. 951–968, 22 nov. 2010.

KUMAR, M. et al. Cancer-preventing attributes of probiotics: an update. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 61, n. 5, p. 473–496, 1 ago. 2010.

KUNOVÁ, G. et al. In vitro fermentability of prebiotic oligosaccharides by lactobacilli. **Czech Journal of Food Science**, v. 29, n. Special Issue, p. S49–S54, 2011.

LABIP, S. G. **Significance of probiotics in human diets**SOMED 21st International congress on microbial ecology and disease. Paris: [s.n.].

LÄHTEENMÄKI, L. Claiming health in food products. **Food Quality and Preference**, v. 27, n. 2, p. 196–201, 2013.

LAMICHHANE, S. et al. Impact of Dietary Polydextrose Fiber on the Human Gut Metabolome. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 62, n. 40, p. 9944–9951, 8 out. 2014.

LAMPRECHT, A.; SCHÄFER, U.; LEHR, C.-M. Size-Dependent Bioadhesion of Micro- and Nanoparticulate Carriers to the Inflamed Colonic Mucosa. **Pharmaceutical Research**, v. 18, n. 6, p. 788–793, 2001.

LANDMAN, C.; QUÉVRAIN, E. Le microbiote intestinal : description, rôle et implication physiopathologique. **La Revue de Médecine Interne**, v. 37, n. 6, p. 418–423, 2016.

LECLERCQ, S.; HARLANDER, K. R.; REINECCIUS, G. A. Formation and characterization of microcapsules by complex coacervation with liquid or solid aroma cores. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 24, n. 1, p. 17–24, 2009.

LEE, K. E. et al. *Helicobacter pylori* and interleukin-8 in gastric cancer. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 45, p. 8192–8202, 7 dez. 2013.

LESBROS-PANTOFlickOVA, D.; CORTHÉSY-THEULAZ, I.; BLUM, A. L. *Helicobacter pylori* and Probiotics. **The Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 812S–818S, 2007.

LEVRI, K. M. et al. Do probiotics reduce adult lactose intolerance? A systematic review. **The Journal of family practice**, v. 54, n. 7, p. 613–620, 2005.

LEY, R. E. et al. Obesity alters gut microbial ecology. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 102, n. 31, p. 11070–11075, 2 ago. 2005.

LIAO, Q. et al. The influence of pH on heat stress response by probiotic *Lactobacillus plantarum* LP-Only. **Annals of Microbiology**, v. 60, n. 2, p. 341–348, jun. 2010.

LILLY, D. M.; STILLWELL, R. H. Probiotics: Growth-Promoting Factors Produced by Microorganisms. **Science**, v. 147, n. 3659, p. 747 LP-748, 12 fev. 1965.

LÓPEZ-CEPERO, A. A.; PALACIOS, C. Association of the Intestinal Microbiota and Obesity. **Puerto Rico health sciences journal**, v. 34, n. 2, p. 60–4, 2015.

LOUIS, S. et al. Characterization of the Gut Microbial Community of Obese Patients Following a Weight-Loss Intervention Using Whole Metagenome Shotgun Sequencing. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. e0149564, 26 fev. 2016.

LÜ, M. et al. Efficacy of Probiotic Supplementation Therapy for *Helicobacter pylori* Eradication: A Meta-Analysis of Randomized Controlled Trials. **PLoS ONE**, v. 11, n. 10, p. e0163743, 10 out. 2016.

MACQUEEN, G.; SURETTE, M.; MOAYYEDI, P. The gut microbiota and psychiatric illness. **Journal of Psychiatry & Neuroscience : JPN**, v. 42, n. 2, p. 75–77, mar. 2017.

MADUREIRA, A. R. et al. Bioactivity of probiotic whey cheese: characterization of the content of peptides and organic acids. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 93, n. 6, p. 1458–1465, 2013.

MÄKELÄINEN, H. et al. Xylo-oligosaccharides and lactitol promote the growth of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus* species in pure cultures. **Beneficial Microbes**, v. 1, n. 2, p. 139–148, 19 mar. 2010.

MAKRAS, L.; VAN ACKER, G.; DE VUYST, L. *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei* 8700:2 Degrades Inulin-Type Fructans Exhibiting Different Degrees of Polymerization. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 71, n. 11, p. 6531–6537, 9 nov. 2005.

MANDADZHIEVA, T. et al. Utilization of Different Prebiotics by *Lactobacillus* Spp. and

Lactococcus Spp. **Biotechnology & Biotechnological Equipment**, v. 25, n. sup1, p. 117–120, 1 jan. 2011.

MANDAL, S.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K. Effect of alginate concentrations on survival of microencapsulated Lactobacillus casei NCDC-298. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 10, p. 1190–1195, 2006.

MANGONI, J. et al. **Potencial probiótico de lactobacilos de origem suína** *Acta Scientiarum. Animal Sciences* scielo , , 2011.

MANZONI, M. S. J.; CAVALLINI, D. C. U.; ROSSI, E. A. Efeitos do consumo de probióticos nos lípedes sanguíneos. **Alim. Nutr.**, v. 19, p. 351–360, 2008.

MARAGKOUidakis, P. A. et al. Probiotic potential of Lactobacillus strains isolated from dairy products. **International Dairy Journal**, v. 16, n. 3, p. 189–199, mar. 2006.

MARTEAU, P. R. Probiotics in clinical conditions. **Clinical Reviews in Allergy & Immunology**, v. 22, n. 3, p. 255–273, 2002.

MARTÍN, R. et al. Human milk is a source of lactic acid bacteria for the infant gut. **The Journal of Pediatrics**, v. 143, n. 6, p. 754–758, 2003.

MARTÍNEZ-MARTÍNEZ, M. I.; CALABUIG-TOLSÁ, R.; CAULI, O. The effect of probiotics as a treatment for constipation in elderly people: A systematic review. **Archives of Gerontology and Geriatrics**, v. 71, n. Supplement C, p. 142–149, 2017.

MEKKES, M. C. et al. **The development of probiotic treatment in obesity: A review** *Beneficial Microbes*, 2014.

MENRAD, K. **Market and marketing of functional food in Europe**. Journal of Food Engineering. **Anais...**2003

MILLION, M. et al. Correlation between body mass index and gut concentrations of Lactobacillus reuteri, Bifidobacterium animalis, Methanobrevibacter smithii and Escherichia coli. **International Journal of Obesity (2005)**, v. 37, n. 11, p. 1460–1466, 5 nov. 2013.

MIQUELIM, J. N.; LANNES, S. C. S.; MEZZENGA, R. pH Influence on the stability of foams with protein–polysaccharide complexes at their interfaces. **Food Hydrocolloids**, v. 24, n. 4, p. 398–405, 2010.

MISHRA, S.; MISHRA, H. N. Technological aspects of probiotic functional food development. **Nutrafoods**, v. 11, n. 4, p. 117–130, 2012.

MOAYEDNIA, N. Quality Evaluation of New Developed Symbiotic Yogurt over the Storage at Refrigerator. **Journal of Food Biosciences and Technology**, v. 4, n. JFBT(Vol.4-No.1), p. 57–64, 1 jan. 2014.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A. M. **Review article: Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks** **Food Reviews International**, 2011.

MORAIS, M. B. DE; JACOB, C. M. A. The role of probiotics and prebiotics in pediatric practice. **Jornal de Pediatria**, v. 82, n. 8, p. 189–197, 2006.

MUKAI, T. et al. Inhibition of binding of *Helicobacter pylori* to the glycolipid receptors by probiotic *Lactobacillus reuteri*. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 32, n. 2, p. 105–110, 2002.

MUSSO, G.; GAMBINO, R.; CASSADER, M. Obesity, Diabetes, and Gut Microbiota: The hygiene hypothesis expanded? **Diabetes Care**, v. 33, n. 10, p. 2277–2284, 23 out. 2010.

NAKAGAWA, K. et al. Microchannel emulsification using gelatin and surfactant-free coacervate microencapsulation. **Journal of Colloid and Interface Science**, v. 278, n. 1, p. 198–205, 1 out. 2004.

NATIVIDAD, J. M. M.; VERDU, E. F. Modulation of intestinal barrier by intestinal microbiota: Pathological and therapeutic implications. **Pharmacological Research**, v. 69, n. 1, p. 42–51, 2013.

NAZZARO, F. et al. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current opinion in biotechnology**, v. 23, n. 2, p. 182–6, abr. 2012.

NG, S. C. et al. **Mechanisms of action of probiotics: Recent advances** **Inflammatory Bowel Diseases**, 2009.

NORI, M. P. et al. Microencapsulation of propolis extract by complex coacervation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 44, n. 2, p. 429–435, mar. 2011.

OBERMEYER, A. C. et al. Complex coacervation of supercharged proteins with polyelectrolytes. **Soft Matter**, v. 12, n. 15, p. 3570–3581, 2016.

OELSCHLAEGER, T. A. **Mechanisms of probiotic actions - A review** *International Journal of Medical Microbiology*, 2010.

OKURO, P. K. et al. Co- encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* with inulin or polydextrose in solid lipid microparticles provides protection and improves stability. **Food Research International**, v. 53, p. 96–103, 2013.

OKURO, P. K.; DE MATOS, F. E.; FAVARO-TRINDADE, C. S. Technological Challenges for Spray Chilling Encapsulation of Functional Food Ingredients. **Food Technology and Biotechnology**, v. 51, p. 171–182, 2013.

OLIVEIRA, A. C. et al. Microencapsulation of *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by Complex Coacervation Followed by Spouted-Bed Drying. **Drying Technology**, v. 25, n. 10, p. 1687–1693, out. 2007a.

OLIVEIRA, A. C. et al. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L. acidophilus* (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of microencapsulation**, v. 24, n. 7, p. 673–681, out. 2007b.

OPLUSTIL, C. P.; ZOCOLI, C. M.; TOBOUTI, N. R. **Procedimentos Básicos em Microbiologia Clínica**. 3. ed. São Paulo: Sarvier, 2010.

OUWEHAND, A. C. A review of dose-responses of probiotics in human studies. **Beneficial Microbes**, v. 8, n. 2, p. 143–151, 23 dez. 2017.

ÖZDEMİR, Ö. Various effects of different probiotic strains in allergic disorders: an update from laboratory and clinical data. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 160, n. 3, p. 295–304, 12 jun. 2010.

PACIFICO, L. et al. Probiotics for the treatment of *Helicobacter pylori* infection in children. **World J Gastroenterol January World J Gastroenterol**, v. 21, n. 203, p. 673–683, 2014.

PANPETCH, W. et al. Characterization of *Lactobacillus salivarius* strains B37 and B60 capable of inhibiting IL-8 production in *Helicobacter pylori*-stimulated gastric epithelial cells. **BMC Microbiology**, v. 16, p. 242, 18 out. 2016.

PARKER, R. B. Probiotics: the other half of the antibiotic story. **Animal Nutrition and Health**, v. 29, p. 4–8, 1974.

PARVEZ, S. et al. Probiotics and their fermented food products are beneficial for health. **Journal of Applied Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 1171–1185, 2006.

PATEL, A.; SHAH, N.; PRAJAPATI, J. B. Clinical application of probiotics in the treatment of *Helicobacter pylori* infection; A brief review. **Journal of Microbiology, Immunology and Infection**, v. 47, n. 5, p. 429–437, 7 out. 2017.

PAVLOVIĆ, N.; STANKOV, K.; MIKOV, M. Probiotics - Interactions with Bile Acids and Impact on Cholesterol Metabolism. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 168, n. 7, p. 1880–1895, 2012.

PAZ, N. F. et al. Characterization of goat milk and potentially symbiotic non-fat yogurt. **Food Science and Technology (Campinas)**, v. 34, p. 629–635, 2014.

PEDROSO, D. DE L. et al. Protection of *Bifidobacterium lactis* and *Lactobacillus acidophilus* by microencapsulation using spray-chilling. **International Dairy Journal**, v. 26, p. 127–132, 2012.

PEDROSO, D. L. et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* and *Lactobacillus acidophilus* in cocoa butter using spray chilling technology. **Brazilian Journal of Microbiology**, v. 44, p. 777–783, 2013.

PELLETIER, C. et al. Cell surface characteristics of *Lactobacillus casei* subsp. *casei*, *Lactobacillus paracasei* subsp. *paracasei*, and *Lactobacillus rhamnosus* strains. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 63, n. 5, p. 1725–1731, maio 1997.

PICARD, C. et al. **Review article: Bifidobacteria as probiotic agents - Physiological effects and clinical benefits** *Alimentary Pharmacology and Therapeutics*, 2005.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D. J. et al. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, n. 2, p. 292–297, mar. 2009.

PINEIRO, M.; STANTON, C. Probiotic Bacteria: Legislative Framework-Requirements to Evidence Basis. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 850S–853, 2007.

PITIGRAISORN, P. et al. Encapsulation of *Lactobacillus acidophilus* in moist-heat-resistant multilayered microcapsules. **Journal of Food Engineering**, v. 192, p. 11–18, jan. 2017.

POLAK-BERECKA, M. et al. The effect of cell surface components on adhesion ability of

Lactobacillus rhamnosus. **Antonie Van Leeuwenhoek**, v. 106, p. 751–762, 5 ago. 2014.

POPPI, L. B. et al. Effect of Lactobacillus sp. isolates supernatant on Escherichia coli O157:H7 enhances the role of organic acids production as a factor for pathogen control. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 35, p. 353–359, 2015.

PRADO, F. C. et al. Trends in non-dairy probiotic beverages. **Food Research International**, v. 41, n. 2, p. 111–123, 2008.

PRATA, A. S. et al. Release properties of chemical and enzymatic crosslinked gelatin-gum Arabic microparticles containing a fluorescent probe plus vetiver essential oil. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 67, n. 2, p. 171–178, 1 dez. 2008.

QV, X. Y.; ZENG, Z. P.; JIANG, J. G. Preparation of lutein microencapsulation by complex coacervation method and its physicochemical properties and stability. **Food Hydrocolloids**, v. 25, n. 6, p. 1596–1603, 2011.

RABIA, A.; SHAH, N. P. **Antibiotic resistance of probiotic organisms and safety of probiotic dairy products** *International Food Research Journal*, 2011.

RAHMAN, M. M.; HOSSAIN, K. M.; RAHMAN, S. M. Isolation, characterization, and properties study of probiotic lactic acid bacteria of selected yoghurt from Bangladesh. **African Journal of Microbiology Research**, v. 10, n. 1, p. 23–31, 2016.

REID, G. The potential role for probiotic yogurt for people living with HIV/AIDS. **Gut Microbes**, v. 1, n. 6, p. 411–414, 28 jul. 2010.

REID, G. The development of probiotics for women's health. **Canadian Journal of Microbiology**, v. 63, n. 4, p. 269–277, dez. 2016.

RIBEIRO, C. DE A. S. M. A. R. A. R. L. Probióticos, prebióticos e simbióticos - Artigo de Revisão. **Saúde & Ambiente**, v. 3, n. 1, p. 16–33, 2008.

ROCHA-SELMÍ, G. A. et al. Double emulsion stage prior to complex coacervation process for microencapsulation of sweetener sucralose. **Journal of Food Engineering**, v. 119, n. 1, p. 28–32, nov. 2013.

ROCHA-SELMÍ, G. A.; FAVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Morphology, stability, and application of lycopene microcapsules produced by complex coacervation. **Journal of**

Chemistry, 2013.

RODRIGUES, A. C. P. et al. *Saccharomyces boulardii* stimulates sIgA production and the phagocytic system of gnotobiotic mice. **Journal of Applied Microbiology**, v. 89, n. 3, p. 404–414, 2000.

ROKKA, S.; RANTAMÄKI, P. **Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: Challenges for industrial applications** *European Food Research and Technology*, 2010.

ROSENBERG, M.; GUTNICK, D.; ROSENBERG, E. Adherence of bacteria to hydrocarbons: A simple method for measuring cell-surface hydrophobicity. **FEMS Microbiology Letters**, v. 9, n. 1, p. 29–33, 1 set. 1980.

RÖYTIÖ, H.; OUWEHAND, A. C. The fermentation of polydextrose in the large intestine and its beneficial effects. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 3, p. 305–313, 15 abr. 2014.

RUGGIERO, P. Use of probiotics in the fight against *Helicobacter pylori*. **World Journal of Gastrointestinal Pathophysiology**, v. 5, n. 4, p. 384–391, 15 nov. 2014.

SAAD, S. M. I. Probióticos e prebióticos: o estado da arte. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, p. 1–16, 2006.

SAHA, S. et al. Probiotics as oral health biotherapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 12, n. 9, p. 1207–1220, 1 set. 2012.

SAHA, S. et al. Novel probiotic dissolvable carboxymethyl cellulose films as oral health biotherapeutics: in vitro preparation and characterization. **Expert Opinion on Drug Delivery**, v. 10, n. 11, p. 1471–1482, 1 nov. 2013.

SALMINEN, S.; ISOLAURI, E. Intestinal colonization, microbiota, and probiotics. **The Journal of Pediatrics**, v. 149, n. 5, Supplement, p. S115–S120, 2006.

SÁNCHEZ, B. et al. Probiotics, gut microbiota, and their influence on host health and disease. **Molecular Nutrition & Food Research**, p. n/a–n/a, 2016.

SANDERS, M. E. et al. Safety assessment of probiotics for human use. **Gut Microbes**, v. 1, n. 3, p. 164–185, 4 mar. 2010.

SANTOS, M. G. et al. Coencapsulation of xylitol and menthol by double emulsion followed by

complex coacervation and microcapsule application in chewing gum. **Food Research International**, v. 66, n. 0, p. 454–462, dez. 2014.

SANTOS, M. G. et al. Microencapsulation of xylitol by double emulsion followed by complex coacervation. **Food Chemistry**, v. 171, p. 32–39, 2015.

SANTOS, T. T. et al. Characterization of lactobacilli strains derived from cocoa fermentation in the south of Bahia for the development of probiotic cultures. **LWT - Food Science and Technology**, v. 73, p. 259–266, nov. 2016.

SARAO, L. K.; ARORA, M. Probiotics, prebiotics, and microencapsulation: A review. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 57, n. 2, p. 344–371, 2017.

SARAVANAN, M.; RAO, K. P. Pectin–gelatin and alginate–gelatin complex coacervation for controlled drug delivery: Influence of anionic polysaccharides and drugs being encapsulated on physicochemical properties of microcapsules. **Carbohydrate Polymers**, v. 80, n. 3, p. 808–816, 5 maio 2010.

SARKAR, A.; MANDAL, S. **Bifidobacteria—Insight into clinical outcomes and mechanisms of its probiotic action** *Microbiological Research*, 2016.

SCHILLINGER, U.; LÜCKE, F.-K. Identification of lactobacilli from meat and meat products. **Food Microbiology**, v. 4, n. 3, p. 199–208, 1987.

SCHIPPA, S.; CONTE, M. P. Dysbiotic Events in Gut Microbiota: Impact on Human Health. **Nutrients**, v. 6, n. 12, p. 5786–5805, 2014.

SCHMITT, C. et al. Study of β -lactoglobulin/acacia gum complex coacervation by diffusing-wave spectroscopy and confocal scanning laser microscopy. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 20, n. 3, p. 267–280, 2001.

Scientific Concepts of Functional Foods in Europe Consensus Document. **British Journal of Nutrition**, v. 81, n. 4, p. S1–S27, 1999.

SERVIN, A. L.; COCONNIER, M. H. **Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and interaction with pathogens** *Bailliere's Best Practice and Research in Clinical Gastroenterology*, 2003.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science**

and nutrition, v. 33, n. 6, p. 501–547, 1993.

SHARAFI, H. et al. Lactobacillus crustorum KH: Novel Prospective Probiotic Strain Isolated from Iranian Traditional Dairy Products. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 175, n. 4, p. 2178–2194, 2015.

SHARMA, M.; DEVI, M. Probiotics: a comprehensive approach toward health foods. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 54, n. 4, p. 537–52, jan. 2014.

SHARMA, P. et al. Antibiotic resistance among commercially available probiotics. **Food Research International**, v. 57, p. 176–195, mar. 2014.

SHEIL, B.; SHANAHAN, F.; O'MAHONY, L. Probiotic effects on inflammatory bowel disease. **The Journal of nutrition**, v. 137, n. 3 Suppl 2, p. 819S–24S, 2007.

SHEKHAR, K. et al. **A review on Microencapsulation** **International Journal of Pharmaceutical Sciences Review and Research**, 2010.

SHEN, J.; OBIN, M. S.; ZHAO, L. The gut microbiota, obesity and insulin resistance. **Molecular Aspects of Medicine**, v. 34, n. 1, p. 39–58, 2013.

SHINDE, U. A.; NAGARSENKER, M. S. Characterization of Gelatin-Sodium Alginate Complex Coacervation System. **Indian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 71, n. 3, p. 313–317, 14 abr. 2009.

SHINDE, U.; NAGARSENKER, M. Microencapsulation of eugenol by gelatin-sodium alginate complex coacervation. **Indian journal of pharmaceutical sciences**, v. 73, n. 3, p. 311–5, 2011.

SHOAIB, M. et al. Inulin: Properties, health benefits and food applications. **Carbohydrate Polymers**, v. 147, p. 444–454, 20 ago. 2016.

SHORI, A. B. **Microencapsulation Improved Probiotics Survival During Gastric Transit** **HAYATI Journal of Biosciences**, 2017.

SILVA, D. F. et al. Microencapsulation of lycopene by gelatin-pectin complex coacervation. **Journal of Food Processing and Preservation**, v. 36, n. 2, p. 185–190, 2012.

SILVA, S. T. DA; SANTOS, C. A. DOS; BRESSAN, J. Intestinal microbiota; relevance to obesity and modulation by prebiotics and probiotics. **Nutrición Hospitalaria**, v. 28, n. 4, p. 1039–

1048, 2013.

SINGH, K. et al. Probiotics: A review. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 1, n. 2, p. S287–S290, 2011.

SLOW, L.-F.; ONG, C.-S. Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation. **Journal of Food Processing & Technology**, v. 4, n. 1, p. 1–5, 2013a.

SLOW, L. F.; ONG, C. S. **Effect of pH on Garlic Oil Encapsulation by Complex Coacervation** *Journal of Food Processing & Technology* OMICS International., , 2013b. Disponível em: <<http://www.omicsonline.org/effect-of-ph-on-garlic-oil-encapsulation-by-complex-coacervation-2157-7110.1000199.php?aid=10832>>

SIRÓ, I. et al. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance — A review. **Appetite**, v. 51, n. 3, p. 456–467, nov. 2008.

SKOOG, E. C. et al. Human gastric mucins differently regulate helicobacter pylori proliferation, gene expression and interactions with host cells. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.

SOCCOL, C. R. et al. **The potential of probiotics: A review** *Food Technology and Biotechnology*, 2010.

SOLANKI, H. K. et al. **Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent** *BioMed Research International*, 2013.

SOUZA, T. C. et al. Cell viability and immunostimulating and protective capacities of *Bifidobacterium longum* 51A are differentially affected by technological variables in fermented milks. **Journal of Applied Microbiology**, v. 112, n. 6, p. 1184–1192, 2012.

SOUZA, T. C. et al. In vitro evaluation of *Bifidobacterium* strains of human origin for potential use in probiotic functional foods. **Beneficial Microbes**, v. 4, n. 2, p. 179–186, 26 fev. 2013.

SOUZA, V. B. DE. **Extração e encapsulação por coacervação complexa das proantocianidinas da canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2016.

SPECK, M. L.; MYERS, R. P. The Viability of Dried Skim-Milk Cultures of *Lactobacillus bulgaricus* as Affected by the Temperature of Reconstitution. **Journal of Bacteriology**, v. 52, n. 6, p. 657–663, dez. 1946.

SPUS, M. et al. Isolation and characterization of *Lactobacillus helveticus* DSM 20075 variants with improved autolytic capacity. **International Journal of Food Microbiology**, v. 241, p. 173–180, jan. 2017.

STAUDACHER, H. Probiotics for lactose intolerance and irritable bowel syndrome. **British Journal of Community Nursing**, v. 20, n. Sup6a, p. S12–S14, 1 jun. 2015.

TALEBI BEZMIN ABADI, A. *Helicobacter pylori* treatment: New perspectives using current experience. **Journal of Global Antimicrobial Resistance**, v. 8, p. 123–130, mar. 2017.

TANIDA, M. et al. High-fat diet-induced obesity is attenuated by probiotic strain *Lactobacillus paracasei* ST11 (NCC2461) in rats. **Obesity Research and Clinical Practice**, v. 2, n. 3, p. 159–169, 2008.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; KIRBY, R. Spray drying as a method for preparing concentrated cultures of *Lactobacillus bulgaricus*. **Journal of Applied Bacteriology**, v. 78, n. 4, p. 456–462, 1 abr. 1995.

THIES, C. Microencapsulation of Flavors by Complex Coacervation. In: **Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems**. [s.l: s.n.]. p. 149–170.

THIRAWORAWONG, T. et al. Anti-inflammatory Properties of Gastric-derived *Lactobacillus plantarum* XB7 in the Context of *Helicobacter pylori* Infection. **Helicobacter**, v. 19, n. 2, p. 144–155, 2014.

TIMILSENA, Y. P. et al. Microencapsulation of chia seed oil using chia seed protein isolate-chia seed gum complex coacervates. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 91, p. 347–357, 2016.

TRINDADE, C. S. F.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, p. 496–499, 2000.

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

TROPICHEVA, R. et al. In vitro assessment of prebiotic utilization by dairy lactobacilli. **Bulgarian Journal of Agricultural Science**, v. 19, n. SUPPL. 2, p. 105–107, 2013.

TROVISQUEIRA, M.; MOREIRA, S. Erradicação de *Helicobacter pylori* e probióticos... Mito ou realidade? **Revista Portuguesa de Medicina Geral e Familiar**, v. 30, p. 137–138, 2014.

TURGEON, S. L.; SCHMITT, C.; SANCHEZ, C. Protein–polysaccharide complexes and coacervates. **Current Opinion in Colloid & Interface Science**, v. 12, n. 4, p. 166–178, 2007.

TURNBAUGH, P. J. et al. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. **Nature**, v. 444, n. 7122, p. 1027–1131, 21 dez. 2006.

UPADHYAY, N.; MOUDGAL, V. **Probiotics: A review** *Journal of Clinical Outcomes Management*, 2012.

VALLS, J. et al. Prospects of Functional Foods/Nutraceuticals and Markets. In: RAMAWAT, G. K.; MÉRILLON, J.-M. (Eds.). **Natural Products: Phytochemistry, Botany and Metabolism of Alkaloids, Phenolics and Terpenes**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2013. p. 2491–2525.

VAN COILLIE, E. et al. Identification of lactobacilli isolated from the cloaca and vagina of laying hens and characterization for potential use as probiotics to control *Salmonella* Enteritidis. **Journal of Applied Microbiology**, v. 102, n. 4, p. 1095–1106, 1 abr. 2007.

VARAVALLO, M. A.; THOMÉ, J. N.; TESHIMA, E. Aplicação de bactérias probióticas para profilaxia e tratamento de doenças gastrointestinais Application of probiotic bacteria for prevention and treatment of gastrointestinal diseases. **Semina: Ciências Biológicas e da Saúde**, v. 29, n. 1, p. 83–104, 2008.

VIJAYA KUMAR, B.; VIJAYENDRA, S. V. N.; REDDY, O. V. S. Trends in dairy and non-dairy probiotic products - a review. **Journal of Food Science and Technology**, v. 52, n. 10, p. 6112–6124, 13 out. 2015.

VINDEROLA, C. G. et al. Immunomodulating capacity of kefir. **Journal of Dairy Research**, v. 72, n. 2, p. 195–202, 2005a.

VINDEROLA, C. G. et al. Distal mucosal site stimulation by kefir and duration of the immune response. **European Journal of Inflammation**, v. 3, n. 2, p. 63–73, 2005b.

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Lactic acid starter and probiotic bacteria: A comparative “in vitro” study of probiotic characteristics and biological barrier resistance.

Food Research International, v. 36, n. 9–10, p. 895–904, 2003.

VINDEROLA, G. et al. Usefulness of a set of simple in vitro tests for the screening and identification of probiotic candidate strains for dairy use. **LWT - Food Science and Technology**, v. 41, n. 9, p. 1678–1688, 2008.

VIZOSO PINTO, M. G. et al. Lactobacillus spp. with in vitro probiotic properties from human faeces and traditional fermented products. **International Journal of Food Microbiology**, v. 109, n. 3, p. 205–214, 15 jun. 2006.

WANG, F. et al. Probiotics in Helicobacter pylori eradication therapy: Systematic review and network meta-analysis. **Clinics and Research in Hepatology and Gastroenterology**, v. 41, n. 4, p. 466–475, 2017a.

WANG, Y. et al. Antioxidant Properties of Probiotic Bacteria. **Nutrients**, v. 9, n. 5, p. 521, 19 maio 2017b.

WATSON, D. et al. Selective carbohydrate utilization by lactobacilli and bifidobacteria. **Journal of Applied Microbiology**, v. 114, n. 4, p. 1132–1146, 2013.

WHITE, N. D. Gut Microbiota and Obesity: Potential Therapeutic Targets and Probiotic Treatment. **American Journal of Lifestyle Medicine**, v. 10, n. 2, p. 104–106, 2015.

WHORWELL, P. J. et al. Efficacy of an encapsulated probiotic Bifidobacterium infantis 35624 in women with irritable bowel syndrome. **American Journal of Gastroenterology**, v. 101, n. 7, p. 1581–1590, 2006.

WOJTNYIAK, K.; SZAJEWSKA, H. Systematic review: probiotics for functional constipation in children. **European Journal of Pediatrics**, v. 176, n. 9, p. 1155–1162, 1 ago. 2017.

XIAO, Z. et al. Production and characterization of multinuclear microcapsules encapsulating lavender oil by complex coacervation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 29, n. 3, p. 166–172, 2014.

XIAO, Z. et al. Study of production and the stability of styrallyl acetate nanocapsules using complex coacervation. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 31, n. 4, p. 283–289, 2016.

XING, F. et al. Microencapsulation of capsaicin by the complex coacervation of gelatin, acacia and tannins. **Journal of Applied Polymer Science**, v. 91, n. 4, p. 2669–2675, 2004.

XU, H. et al. Assessment of cell surface properties and adhesion potential of selected probiotic strains. **Letters in Applied Microbiology**, v. 49, n. 4, p. 434–442, 1 out. 2009.

YA, T. et al. Immunological evaluation of *Lactobacillus casei* Zhang: a newly isolated strain from koumiss in Inner Mongolia, China. **BMC Immunology**, v. 9, n. 1, p. 68, nov. 2008.

YAN, F.; POLK, D. B. Probiotics and immune health. **Current opinion in gastroenterology**, v. 27, n. 6, p. 496–501, out. 2011.

YANG, G.; LIU, Z.-Q.; YANG, P.-C. Treatment of Allergic Rhinitis with Probiotics: An Alternative Approach. **North American Journal of Medical Sciences**, v. 5, n. 8, p. 465–468, ago. 2013.

YANG, J.-C.; LU, C.-W.; LIN, C.-J. Treatment of *Helicobacter pylori* infection: Current status and future concepts. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 18, p. 5283–5293, 14 maio 2014.

YAO, M. et al. Microencapsulation of *Lactobacillus salivarius* Li01 for enhanced storage viability and targeted delivery to gut microbiota. **Food Hydrocolloids**, v. 72, p. 228–236, nov. 2017.

ZACARÍAS, M. F. et al. Mortality and translocation assay to study the protective capacity of *Bifidobacterium lactis* INL1 against *Salmonella* Typhimurium infection in mice. **Beneficial Microbes**, v. 5, n. 4, p. 427–436, 2014.

ZACARÍAS, M. F. et al. Influence of Technological Treatments on the Functionality of *Bifidobacterium lactis* INL1, a Breast Milk-Derived Probiotic. **Journal of Food Science**, p. n/a–n/a, 2017.

ZAGO, M. et al. Characterization and probiotic potential of *Lactobacillus plantarum* strains isolated from cheeses. **Food Microbiology**, v. 28, n. 5, p. 1033–1040, ago. 2011.

ZHANG, H. et al. Human gut microbiota in obesity and after gastric bypass. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 7, p. 2365–70, 2009a.

ZHANG, M. et al. Probiotics in *Helicobacter pylori* eradication therapy: a systematic review and meta-analysis. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 21, n. 14, p. 4345–57, 2015.

ZHANG, W. et al. Whey protein and gum arabic encapsulated Omega-3 lipids the effect of material properties on coacervation. **Agro Food Industry Hi-Tech**, v. 20, n. 4 SUPPL, p. 18–21, 2009b.

ZHOU, C. et al. Lactobacilli inhibit interleukin-8 production induced by Helicobacter pylori lipopolysaccharide-activated Toll-like receptor 4. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 14, n. 32, p. 5090–5095, 28 ago. 2008.

ZHU, R. et al. Meta-analysis of the efficacy of probiotics in Helicobacter pylori eradication therapy. **World Journal of Gastroenterology : WJG**, v. 20, n. 47, p. 18013–18021, 21 dez. 2014.