

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ GASPAR ZINCO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Saccharomyces
boulardii* VISANDO O INCREMENTO DA ATIVIDADE PROBIÓTICA

CURITIBA

2020

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

ANDRÉ GASPAR ZINCO

DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Saccharomyces
boulardii* VISANDO O INCREMENTO DA ATIVIDADE PROBIÓTICA

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Paraná, Setor de Ciências da Saúde, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientador: Prof.^o Dr. Fábio Seigi Murakami
Coorientadoras: Prof.^a Dr.^a Debora Brand e
Prof.^a Dr.^a Tania Maria Bordin
Bonfim

CURITIBA

2020

Zinco, André Gaspar

Desenvolvimento tecnológico de microcápsulas contendo *Saccharomyces boulardii* visando o incremento da atividade probiótica [recurso eletrônico] / André Gaspar Zinco – Curitiba, 2020.

Dissertação (mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas. Setor de Ciências da Saúde, Universidade Federal do Paraná, 2020.

Orientador: Prof. Dr. Fábio Seigi Murakami

Coorientadora: Profa. Dra. Debora Brand

Coorientadora: Profa. Dra. Tania Maria Bordin Bonfim

1. Microcápsulas. 2. *Spray drying*. 3. *Saccharomyces boulardii*. 4. Probióticos. 5. Prebióticos. I. Murakami, Fábio Seigi. II. Brand, Debora. III. Bonfim, Tania Maria Bordin. IV. Universidade Federal do Paraná. V. Título.

CDD 615.1

Maria da Conceição Kury da Silva CRB 9/1275



MINISTÉRIO DA
EDUCAÇÃO SETOR DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS - 40001016042P8

TERMO DE APROVAÇÃO

Os membros da Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS da Universidade Federal do Paraná foram convocados para realizar a arguição da Dissertação de Mestrado de **ANDRE GASPAR ZINCO** intitulada: **DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO *Saccharomyces boulardii* VISANDO O INCREMENTO DA ATIVIDADE PROBIÓTICA**, sob orientação do Prof. Dr. FÁBIO SEIGI MURAKAMI, que após terem inquirido o aluno e realizada a avaliação do trabalho, são de parecer pela sua APROVAÇÃO no rito de defesa.

A outorga do título de mestre está sujeita à homologação pelo colegiado, ao atendimento de todas as indicações e correções solicitadas pela banca e ao pleno atendimento das demandas regimentais do Programa de Pós-Graduação.

CURITIBA, 20 de Agosto de 2020.

Assinatura Eletrônica

24/08/2020 14:38:26.0

FÁBIO SEIGI MURAKAMI

Presidente da Banca Examinadora (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/08/2020 15:03:06.0

THAIS MARTINS GUIMARÃES DE FRANCISCO

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Assinatura Eletrônica

24/08/2020 14:47:08.0

ROSSANA CALEGARI DOS SANTOS

Avaliador Externo (UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ)

Avenida Prefeito Lothário Meissner, 632 - CURITIBA - Paraná - Brasil
CEP 80210-170 - Tel: (41) 3360-4098 - E-mail: cfufpr@gmail.com

Documento assinado eletronicamente de acordo com o disposto na legislação federal Decreto 8539 de 08 de outubro de 2015.

Gerado e autenticado pelo SIGA-UFPR, com a seguinte identificação única: 50600

Para autenticar este documento/assinatura, acesse <https://www.prppg.ufpr.br/siga/visitante/autenticacaoassinaturas.jsp>
e insira o código 50600

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal do Paraná e à Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, pela oportunidade de formação.

À Fundação de Coordenação e Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo auxílio financeiro concedido.

Ao meu orientador Prof.^o Dr. Fábio Murakami, pela excelente orientação na condução do trabalho, pelos ensinamentos compartilhados e pela amizade consolidada.

Às minhas coorientadoras Prof.^a Dr.^a Debora Brand e Prof.^a Dr.^a Tania Maria Bordin Bonfim, pelo acompanhamento e orientação nas diversas atividades desenvolvidas durante a graduação e o mestrado.

À minha família, por todo apoio e compreensão durante minha trajetória acadêmica.

Aos colegas e amigos que de alguma forma auxiliaram nesta trajetória tão importante.

*“The future belongs to those
who believe in the beauty
of their dreams.”*

- Eleanor Roosevelt

RESUMO

O presente trabalho teve como principal objetivo o desenvolvimento e caracterização de microcápsulas contendo a levedura probiótica *Saccharomyces boulardii* obtidas pela técnica de *spray drying*, utilizando como agentes encapsulantes maltodextrina e inulina. Para obtenção das células do microrganismo, foi realizado um processo controlado em biorreator utilizando caldo de cana-de-açúcar não-suplementado como substrato, com pH controlado de 5,6 e temperatura controlada de 37 °C. Utilizando o probiótico como princípio ativo, foram desenvolvidas 4 formulações distintas em associação com prebióticos: M1 – utilizando maltodextrina como agente encapsulante, M2 – utilizando inulina como agente encapsulante, M3 – associando maltodextrina e inulina como agentes encapsulantes, e FC - formulação-controle sem material encapsulante. Todas as formulações de microcápsulas, bem como o controle, receberam a adição de caldo de cana-de-açúcar *in natura* para potencialização de viabilidade. Após a produção das micropartículas por *spray drying*, a caracterização das microcápsulas produzidas foi realizada através das seguintes análises: viabilidade, morfologia, tamanho de partícula, difração de raio-X de pó, propriedades térmicas e eficiência de encapsulação. A partir dos resultados obtidos, comparou-se a sobrevivência do probiótico quando revestido com materiais de parede, tanto durante o processo de secagem como durante o período de armazenamento. Após caracterização, constatou-se que as formulações envolvendo inulina (M2 e M3) apresentaram maior eficiência de encapsulação, estabilidade de armazenamento e resistência ao tratamento térmico quando comparadas às formulações controle (FC) e com maltodextrina (M1). Dentre as formulações apresentadas, a associação entre maltodextrina e inulina (M3) apresentou melhores resultados em todas as análises de caracterização. Desta maneira, os resultados obtidos neste trabalho mostram que a microencapsulação por *spray drying* pode ser utilizada como um método eficaz para manter a viabilidade do microrganismo *Saccharomyces boulardii*, e que a combinação dos agentes carreadores maltodextrina e inulina - bem como o caldo de cana-de-açúcar *in natura* - mostra-se promissora para potencializar os efeitos probióticos da levedura.

Palavras-chave: microencapsulação, *spray drying*, *Saccharomyces boulardii*, probióticos, prebióticos.

ABSTRACT

The present study had as main objective the development and characterization of microcapsules containing the probiotic yeast *Saccharomyces boulardii* obtained by the spray drying technique, using maltodextrin and inulin as encapsulating agents. To obtain the cells of the microorganism, a controlled process was carried out in a bioreactor using unsupplemented sugarcane juice as a substrate, with a controlled pH of 5.6 and a controlled temperature of 37 °C. Using probiotic as an active ingredient, 4 different formulations were developed in association with prebiotics: M1 - using maltodextrin as an encapsulating agent, M2 - using inulin as an encapsulating agent, M3 - associating maltodextrin and inulin as encapsulating agents, and FC - control formulation without encapsulating material. All microcapsule formulations, as well as the control, received the addition of raw sugarcane juice to enhance viability. After the production of the microparticles by spray drying, the characterization of the microcapsules produced was carried out through the following analysis: viability, morphology, particle size, powder X-ray diffraction, thermal properties, and encapsulation efficiency. Based on the results obtained, the survival of the probiotic was compared when coated with wall materials, both during the drying process and during the storage period. After characterization, it was found that formulations involving inulin (M2 and M3) showed greater encapsulation efficiency, storage stability and resistance to heat treatment when compared to control (FC) and maltodextrin (M1) formulations. Among the formulations presented, the association between maltodextrin and inulin (M3) showed better results in all characterization analysis. Thus, the results obtained in this work showed that spray drying microencapsulation can be used as an effective method to maintain the viability of the microorganism *Saccharomyces boulardii*, and that the combination of the maltodextrin and inulin carrier agents - as well as the raw sugarcane juice - is promising to enhance the probiotic effects of yeast.

Keywords: microencapsulation, spray drying, *Saccharomyces boulardii*, probiotics, prebiotics.

LISTA DE QUADROS

REVISÃO DE LITERATURA

QUADRO 1 – COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E PROCESSADO.	18
QUADRO 2 – DEZ MAIORES PRODUTORES E CONSUMIDORES MUNDIAIS DE AÇÚCAR EM 2017-2018 EM MILHÕES DE TONELADAS (MT).....	18

LISTA DE TABELAS

CAPÍTULO 1

TABLE 1 – GROWTH KINETIC PARAMETERS FOR BATCH CULTIVATION OF <i>Saccharomyces boulardii</i> WITH DIFFERENT STARTERS AND TOTAL SUGARS INITIAL CONCENTRATION - (A) 47 g.L ⁻¹ TS AND 1 g.L ⁻¹ CDW, (B) 40 g.L ⁻¹ TS AND 0,7 g.L ⁻¹ CDW AND (C) 50 g.L ⁻¹ TS AND 0,3 g.L ⁻¹ CDW	42
---	----

CAPÍTULO 2

TABLE 1 – FORMULATIONS OF MICROCAPSULES CONTAINING <i>Saccharomyces boulardii</i> AS BIOPHARMACEUTICAL ACTIVE INGREDIENT.....	51
TABLE 2 – ENCAPSULATION EFFICIENCY OF <i>Saccharomyces boulardii</i> USING DIFFERENT ENCAPSULATION AGENTS.....	54
TABLE 3 – DSC OF MICROCAPSULES AND FREE CELLS SHOWING T _{PEAK} , T _{ONSET} , T _{ENDSET} AND ENTHALPY (ΔH) MEASUREMENTS.....	60
TABLE 4 – TGA OF MICROCAPSULES AND FREE CELLS SHOWING WATER WEIGHT LOSS, Δm AND DTG _{PEAK} MEASUREMENTS.....	61

LISTA DE FIGURAS

REVISÃO DE LITERATURA

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO POR <i>SPRAY DRYING</i>	21
FIGURA 2 - ESTRUTURA QUÍMICA DA MALTODEXTRINA.....	22
FIGURA 3 - ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE.....	22
FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DE OLIGOFRUTOSSACARÍDEOS DO PREBIÓTICO INULINA.....	23

CAPÍTULO 1

FIGURE 1 - COMPARISON BETWEEN BATCH CULTIVATION OF <i>Saccharomyces boulardii</i> WITH DIFFERENT STARTERS AND TOTAL SUGARS INITIAL CONCENTRATION - (A) 47 g.L ⁻¹ TS AND 1.0 g.L ⁻¹ CDW, (B) 40 g.L ⁻¹ TS AND 0.7 g.L ⁻¹ CDW AND (C) 50 g.L ⁻¹ TS AND 0.3 g.L ⁻¹ CDW.....	41
--	----

CAPÍTULO 2

FIGURE 1 - MICROGRAPHS OF <i>Saccharomyces boulardii</i> MICROCAPSULES:(A) FREE CELLS (FC), (B) MALTODEXTRIN (M1), (C) INULIN (M2) AND (D) MALTODEXTRIN AND INULIN (M4).....	55
FIGURE 2 – X-RAY DIFFRACTOGRAMS OF MICROCAPSULES PRODUCED WITH: (A) MALTODEXTRIN (M1), (B) INULIN (M2) AND (C) MALTODEXTRIN AND INULIN (M3).....	58
FIGURE 3 - DSC (_____) (SOLID LINE) AND TGA (- - - -) (THICK DASHED LINE) / DRTGA (.....) (THIN DASHED LINE) CURVES OF <i>Saccharomyces boulardii</i> MICROCAPSULES PRODUCED WITH: (A) FREE CELLS, (B) MALTODEXTRIN (M1), (C) INULIN (M2) AND (D) MALTODEXTRIN AND.....	59

FIGURE 4 – COMPARATIVE DSC BETWEEN FREE CELLS (FC), MALTODEXTRIN (M1), INULIN (M2) AND MALTODEXTRIN AND INULIN (M3). 61

FIGURE 5 – COMPARATIVE TGA BETWEEN FREE CELLS (FC), MALTODEXTRIN (M1), INULIN (M2) AND MALTODEXTRIN AND INULIN (M3) 63

FIGURE 6 – EFFECTS OF DIFFERENT ENCAPSULATING MATERIALS ON THE VIABILITY OF *Saccharomyces boulardii* MICROCAPSULES DURING 30-DAYS STORAGE TIME, AT 4 °C (A) AND AT 25 °C (B).....64

LISTA DE SIGLAS

- CDW – Cell Dry Weight
- CFU – Colony-Forming Unit
- DNS – Ácido di-nitrossalicílico
- DrTG – Derivada da TG
- DRX – Difração de raios-X
- DSC – Differential Scanning Calorimetry
- EE – Encapsulation Efficiency
- EY – Encapsulation Yield
- FAO – Food and Agriculture Organization of the United Nations
- FC – Free cells
- FOS – Fruto-oligossacarídeos
- FTIR – Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier
- GIT – Gastrointestinal Tract
- GOS – Galacto-oligossacarídeos
- MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura
- SEM – Scanning Electron Microscope
- TGA – Thermogravimetric Analysis
- TS – Total Sugar
- UFC – Unidades Formadoras de Colônias
- USDA – United States Department of Agriculture
- WHO – World Health Organization
- WPC – Whey Protein Concentrate
- XOS – Xilo-oligossacarídeos
- YPD – Yeast-peptone-dextrose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	13
1.1	OBJETIVOS.....	14
1.1.1	OBJETIVO GERAL.....	14
1.1.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	PROBIÓTICOS.....	16
2.2	PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA.....	17
2.3	<i>Saccharomyces boulardii</i>	19
2.4	MICROENCAPSULAÇÃO.....	19
2.5	AGENTES ENCAPSULANTES.....	21
2.6	PREBIÓTICOS.....	22
2.7	CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS.....	23
2.7.1	DIFRAÇÃO DE RAIO-X.....	24
2.7.2	ANÁLISE TÉRMICA.....	25
2.7.3	ESTUDO DE VIABILIDADE.....	26
	REFERÊNCIAS	28
	CAPÍTULO 1 - OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA LEVEDURA PROBIÓTICA <i>Saccharomyces boulardii</i> EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO- SUPLEMENTADO	34
	RESUMO	35
	ABSTRACT	36
1	INTRODUCTION	37
2	MATERIAL AND METHODS	38
2.1	ISOLATION AND CONSERVATION.....	38
2.2	FLASK CULTIVATION.....	38

2.3	BIOREACTOR CULTIVATION	38
2.4	DETERMINATION OF TOTAL SUGARS	39
2.4	CELL MASS DETERMINATION.....	39
2.5	CELL VIABILITY	39
2.6	GROWTH KINETICS PARAMETERS	39
2.4.1	BIOMASS PRODUCTIVITY	39
2.4.2	SUBSTRATE TO BIOMASS CONVERSION FACTOR	40
3	RESULTS AND DISCUSSION	40
3.1	GROWTH KINETIC PARAMETERS.....	42
4	CONCLUSIONS	43
	REFERENCES	44
	CAPÍTULO 2 - DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO <i>Saccharomyces boulardii</i> E ESTUDO DE VIABILIDADE	46
	RESUMO	47
	ABSTRACT	48
1	INTRODUCTION	49
2	MATERIALS AND METHODS	50
2.1	PREPARATION OF DRYING SUSPENSIONS	50
2.2	SPRAY DRYING PROCESS	51
2.3	STABILITY OF <i>Saccharomyces boulardii</i> AFTER MICROENCAPSULATION	53
2.4	ENCAPSULATION EFFICIENCY.....	51
2.4	CHARACTERIZATION OF SPRAY DRIED YEAST FORMULATIONS	52
2.4.1	MORPHOLOGY ANALYSIS	52
2.4.2	DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY ANALYSIS (DSC).....	52
2.4.3	THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS (TGA/DRTGA).....	52
2.4.4	POWDER X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS (XRD)	53

3	RESULTS AND DISCUSSION	53
3.1	ENCAPSULATION EFFICIENCY.....	53
3.2	VIABILITY OF MICROENCAPSULATED <i>Saccharomyces boulardii</i> AFTER SPRAY DRYING AND DURING STORAGE TIME	63
3.3	SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)	55
3.4	POWDER X-RAY DIFFRACTION.....	57
3.5	THERMAL ANALYSIS (DSC AND TGA).....	59
4	CONCLUSIONS	63
	REFERENCES	66

1 INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos geralmente empregados para fortalecer os sistemas do hospedeiro e auxiliar no tratamento de certas doenças. Estas células se encontram disponíveis em diversas formas, como cápsulas de culturas liofilizadas ou sobrenadantes de cultura secos e misturados em alimentos lácteos. Dentre inúmeras linhagens de leveduras estudadas como probiótico, a *Saccharomyces boulardii* é a que mais se destaca por sua comprovada eficácia e segurança (MCFARLAND et al., 2017).

A cana-de-açúcar (*Saccharum officinarum*) desempenha um importante papel na indústria farmacêutica e de biotecnologia, uma vez que é utilizada na obtenção de biocombustíveis e para cultivo de diversos microrganismos. Estudos recentes mostram que não somente o caldo de cana-de-açúcar, mas também o melaço, folhas e bagaço da cana podem ser utilizados em associação com leveduras do gênero *Saccharomyces* como substrato em processos fermentativos, tanto para produção de metabólitos primários e secundários quanto para obtenção de biomassa microbiana (MURUAGA et al., 2016; JUTAKANOKI et al., 2012; SANTOSH et al., 2017). Tendo em vista a disponibilidade e a grande importância da indústria de cana-de-açúcar no Brasil, uma vez que este se destaca como o maior produtor mundial (SAHU, 2018), este insumo foi escolhido para a produção de biomassa microbiana utilizada neste estudo.

O probiótico deve sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal superior para que possa desempenhar sua função no intestino. Dentre as técnicas desenvolvidas para proteção destes microrganismos probióticos, a microencapsulação é comumente utilizada devido a seu baixo custo, reprodutibilidade, facilidade de escalonamento e produção de partículas de alta qualidade (ESTEVINHO et al., 2015).

Microencapsulação é uma técnica de revestimento onde substâncias ativas são revestidas com partículas poliméricas formando cápsulas microscópicas. (DA SILVA et al., 2014). Este encapsulamento providencia uma barreira física contra estresses ambientais e, portanto, reduz a perda de viabilidade das células probióticas durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal.

Atualmente, pesquisas envolvendo microencapsulação na indústria farmacêutica retratam: desenvolvimento de novos sistemas de administração de medicamentos, obtenção de novos produtos para o mercado, redução de reações adversas e efeitos colaterais, melhoria no modo de administração de medicamentos, possibilidade de ligações sítio-específicas pelo composto, aumento no tempo de vida útil em prateleira, melhoria da adesão pelo paciente e possível liberação controlada e sustentada de diversos princípios ativos (PAULO; SANTOS, 2017; LI et al, 2019). Dentre os materiais de parede utilizados como agentes encapsulantes, encontram-se a maltodextrina e diversos prebióticos, os quais fornecem a proteção necessária para estas substâncias ativas (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

O presente trabalho visa a produção de células de probiótico *Saccharomyces boulardii* utilizando cana-de-açúcar, uma matéria-prima de baixo custo amplamente disponível no Brasil, bem como a posterior microencapsulação das células utilizando diferentes agentes encapsulantes e caracterização físico-química do produto final.

1.1 OBJETIVOS

1.1.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver e caracterizar microcápsulas contendo células de probiótico *Saccharomyces boulardii* através do processo de *spray drying* utilizando diferentes agentes encapsulantes, bem como avaliar a viabilidade e estabilidade visando o incremento da atividade probiótica.

1.1.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Obter biomassa microbiana de *Saccharomyces boulardii* por meio de biorreator para utilização em desenvolvimento tecnológico de microcápsulas.
- Avaliar o crescimento celular de *Saccharomyces boulardii* utilizando caldo de cana-de-açúcar não suplementado como substrato.
- Desenvolver microcápsulas contendo *Saccharomyces boulardii* em associação com maltodextrina, inulina e caldo de cana-de-açúcar para potencialização de atividade probiótica.

- Avaliar a eficiência de encapsulação do probiótico utilizando a técnica de *Spray drying*.
- Caracterizar microcápsulas contendo *Saccharomyces boulardii* através de técnicas instrumentais analíticas como: DSC (calorimetria diferencial exploratória), TGA (análise termogravimétrica), DRX (difração de raios-x) e SEM (microscopia eletrônica de varredura).
- Realizar estudo de estabilidade do probiótico sob condições de armazenamento.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROBIÓTICOS

A utilização de leveduras para produção de alimentos na humanidade vem de longa data, desde a fermentação de pães e bebidas até a descoberta da produção de etanol e gás carbônico por espécies como *Saccharomyces cerevisiae* (GOMEZ-PASTOR et al., 2011). A levedura *Saccharomyces boulardii* tem sido prescrita nos últimos 30 anos para profilaxia e tratamento de diarreias de origem bacteriana, sendo um dos microrganismos mais seguros e eficientes da atualidade para uso como probiótico (KELESIDIS et al., 2011).

Segundo a Organização de Agricultura e Alimentos das Nações Unidas (FAO/WHO), probióticos são “organismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefício à saúde do hospedeiro”. Ainda segundo a FAO, para que o microrganismo seja considerado um probiótico, este deve ser tolerante ao ácido, pepsina e bile estomacais, além de mostrar atividade antibacteriana contra bactérias patogênicas e apresentar boa aderência ao muco intestinal (ARGYRI; PANAGO; TASSOU, 2016).

O mecanismo de ação pelos quais estes organismos atuam varia de acordo com a linhagem e a formulação na qual eles são incorporados, fazendo com que o estudo farmacológico de probióticos seja mais complexo quando comparado à fármacos inertes (REID et al., 2016). Os três principais mecanismos pelos quais estes agentes atuam são a modulação do sistema imune do hospedeiro, interação direta com outros microrganismos ou ação em compostos microbianos e alimentícios em determinado organismo (OELSCHLAEGGER et al., 2010).

Além dos benefícios propriamente ditos, os probióticos podem ser facilmente encontrados em alimentos, preparações farmacêuticas e suplementos alimentares, o que aumenta sua disponibilidade comercial e permite o acompanhamento terapêutico de diferentes linhagens de microrganismos (REID et al., 2016). A maioria dos probióticos disponibilizados comercialmente têm origem bacteriana, uma vez que estes microrganismos resistem melhor às adversidades do trato gastrointestinal quando comparados às células de levedura. Com os avanços na área de saúde e bem-estar, a introdução de novos probióticos industrialmente viáveis se torna cada

vez mais válida, uma vez que estudos recentes mostram diversas linhagens de leveduras com possível potencial probiótico que necessitam ser exploradas (RODRIGUEZ et al., 2018).

2.2 PRODUÇÃO DE BIOMASSA MICROBIANA

O processo industrial de obtenção de biomassa microbiana se dá pelo cultivo de grandes quantidades de fungos ou bactérias utilizando culturas puras, propagadas em meio de cultura apropriado, as quais são incorporadas em biorreatores, onde aumentam de volume gradativamente em cada estágio até o volume final designado. Um processo eficiente se dá pela máxima transformação de açúcar (substrato) em biomassa microbiana, bem como pela minimização da formação de subprodutos tóxicos, como etanol e acetaldeído (VIEIRA et al., 2013).

A maioria dos processos utilizados para produção de microrganismos probióticos se dá quase que exclusivamente por processo descontínuo ou produção em batelada, como também é chamado, um método tradicional de produção industrial de células microbianas. Pequenas alterações nestes métodos de produção podem acarretar benefícios no cultivo industrial destas células, como a adoção do método de produção contínua (LACROIX et al., 2007).

A produção industrial e comercialização de leveduras teve início no final do século XIX, e atualmente já é possível a produção de linhagens com características específicas, as quais atendam à demanda da indústria alimentícia, como a de pães e de bebidas fermentadas. Como substrato para o crescimento celular destes microrganismos, costuma-se usar subprodutos alimentares e de resíduos agroindustriais. Como materiais convencionais, podemos citar o amido, melaço de soja e soro de leite, além dos não-convencionais, como derivados do petróleo e etanol (BEKATOROU et al., 2006; PEREIRA et al, 2010; IZMIRLIOGLU, DEMIRCI, 2016).

A cana-de-açúcar vem sendo utilizada como substrato para produção de etanol no Brasil, sendo uma fonte de combustível alternativa, menos poluente e de fonte sustentável (WENDHAUSEN et al., 2001). A composição média do caldo de cana-de-açúcar encontra-se no QUADRO 1 e os maiores produtores mundiais de açúcar nos anos de 2017 e 2018 podem ser observados no QUADRO 2.

QUADRO 1: COMPOSIÇÃO CENTESIMAL DO CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR IN NATURA E PROCESSADO.

Determinações	Controle	Pasteurizado	Irradiado	Pasteurizado e irradiado
Umidade (%)	81,14 ± 1,14 ^a	80,39 ± 1,32 ^a	80,75 ± 1,21 ^a	80,42 ± 0,50 ^a
Valor calórico (kcal)	73,80 ± 4,53 ^a	76,82 ± 5,30 ^a	75,41 ± 4,84 ^a	76,70 ± 2,03 ^a
Carboidratos (%)	18,20 ± 1,10 ^a	18,96 ± 1,25 ^a	18,61 ± 1,23 ^a	18,98 ± 0,40 ^a
Açúcares totais (%)	17,68 ± 0,08 ^a	17,73 ± 0,06 ^a	17,90 ± 0,19 ^a	17,64 ± 0,20 ^a
Açúcares redutores (%)	0,49 ± 0,01 ^a	0,49 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,02 ^a	0,50 ± 0,01 ^a
Extrato etéreo (%)	0,014 ± 0,01 ^a	0,017 ± 0,00 ^a	0,017 ± 0,01 ^a	0,015 ± 0,01 ^a
Proteínas (%)	0,21 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,20 ± 0,01 ^a	0,19 ± 0,01 ^a
Ácido ascórbico (mg.100 mL ⁻¹)	2,98 ± 0,12 ^b	2,70 ± 0,20 ^{ab}	2,58 ± 0,10 ^a	2,53 ± 0,10 ^a
Cinza (%)	0,41 ± 0,01 ^a	0,41 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,01 ^a	0,42 ± 0,00 ^a
Fósforo (g.kg ⁻¹)	0,10 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^a
Potássio (g.kg ⁻¹)	0,77 ± 0,10 ^a	0,76 ± 0,20 ^a	0,75 ± 0,01 ^a	0,82 ± 0,15 ^a
Cálcio (g.kg ⁻¹)	0,31 ± 0,02 ^a	0,28 ± 0,03 ^a	0,31 ± 0,01 ^a	0,30 ± 0,01 ^a
Magnésio (g.kg ⁻¹)	0,10 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,00 ^a	0,10 ± 0,01 ^a	0,10 ± 0,00 ^a
Enxofre(g.kg ⁻¹)	0,25 ± 0,01 ^a	0,25 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^a	0,24 ± 0,01 ^a
Sódio (g.kg ⁻¹)	0,68 ± 0,15 ^a	0,74 ± 0,04 ^a	0,65 ± 0,03 ^a	0,76 ± 0,02 ^a
Ferro (mg.kg ⁻¹)	14,33 ± 1,95 ^a	15,06 ± 3,87 ^a	14,71 ± 2,78 ^a	15,70 ± 4,18 ^a
Manganês (mg.kg ⁻¹)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Cobre (mg.kg ⁻¹)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ
Zinco (mg.kg ⁻¹)	<LQ	<LQ	<LQ	<LQ

Médias seguidas de mesma letra, nas linhas, não diferem entre si (Tukey, p < 0,05); *médias de 3 repetições e respectivos desvios padrão; e <LQ: menor que o limite de quantificação do método: manganês e cobre menor que 0,005 mg.mL⁻¹ e zinco menor que 0,002 mg.mL⁻¹.

Fonte: Oliveira (2007).

QUADRO 2: DEZ MAIORES PRODUTORES E CONSUMIDORES MUNDIAIS DE AÇÚCAR EM 2017-2018 EM MILHÕES DE TONELADAS (MT)

Nº	País	Produção (milhões de toneladas)	Consumo (milhões de toneladas)	Contribuição na produção de açúcar (%)
1	Brasil	38.87	10.60	20.28
2	Índia	32.44	26.50	16.93
3	União Europeia	21.15	18.80	11.03
4	China	10.25	15.70	5.34
5	Tailândia	13.73	2.63	7.16
6	EUA	8.39	11.18	4.37
7	México	6.32	4.59	3.29
8	Paquistão	7.42	5.40	3.87
9	Rússia	6.50	6.16	3.39
10	Austrália	4.70	10.1	2.45
11	Outros	41.82	62.14	21.82

Traduzido de: Sugar, World Markets and Trade, USDA-Foreign Agricultural Service, Office of Global Analysis (2018).

2.3 *Saccharomyces boulardii*

O cientista francês Henri Boulard observou que durante um surto de cólera na China em 1920, pessoas que mastigavam casca de lichia ou de mangostão não desenvolviam os sintomas da doença. Isto levou ao isolamento da linhagem de levedura *Saccharomyces boulardii* de cascas de frutas, a qual é hoje o probiótico mais comercializado do mundo em formulações farmacêuticas. A levedura *Saccharomyces boulardii* foi registrada como um fármaco pela primeira vez em 1953, sendo o único microrganismo eucarioto probiótico registrado. Esta levedura pertence ao mesmo gênero do microrganismo *Saccharomyces cerevisiae*, a levedura mais comumente utilizada em microbiologia industrial de produtos de gênero alimentício. Como diferença entre estas, podemos citar a rápida velocidade de crescimento de *S. boulardii* em temperaturas de 37 °C, o que torna a temperatura corpórea favorável ao seu desenvolvimento. Outra característica interessante desta levedura é a sobrevivência em baixo pH, como observado no ambiente estomacal (LUKASZEWICKZ et al., 2012)

Na década de 1980, realizou-se um estudo para avaliar os benefícios da levedura *S. boulardii* no organismo hospedeiro e para determinar seu mecanismo de ação. Investigou-se o efeito da levedura em infecções bacterianas, seus efeitos sobre a mucosa e, mais recentemente, propriedades imunomoduladoras. Medicamentos à base de *S. boulardii* podem ser administrados junto com antibióticos, uma vez que estes não interferem nas propriedades probióticas da levedura. Esta característica é muito importante no tratamento de diarreias infecciosas, uma vez que bactérias probióticas teriam sua eficácia alterada pelo tratamento com antimicrobianos decorrentes dessas doenças. Para comercialização, as células são preparadas, armazenadas e administradas na forma liofilizada (CZERUCKA et al., 2007)

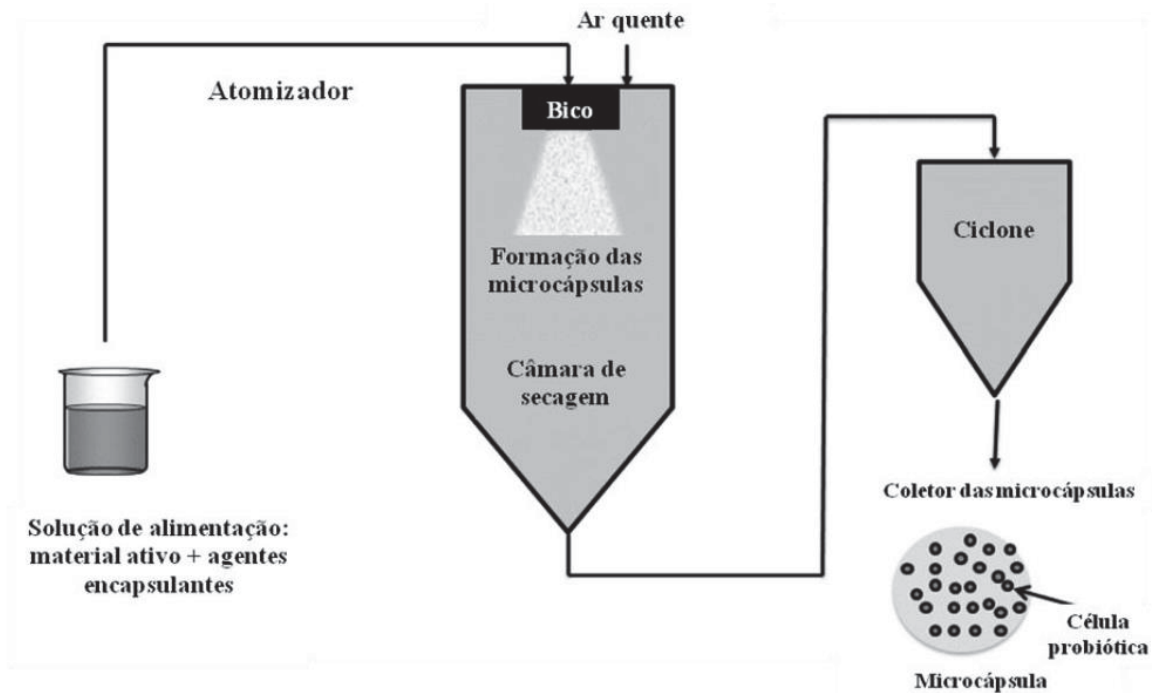
2.4 MICROENCAPSULAÇÃO

A microencapsulação é um processo pelo qual materiais bioativos são revestidos com outros materiais com função protetora. Essa técnica protege o material interno de estresses ambientais e condições adversas, como oxidação e acidez elevada. Nos últimos anos, a microencapsulação tem sido estudada como

forma de aumentar a viabilidade de microrganismos probióticos durante o processamento e o armazenamento de alimentos. Como materiais para este processo, são comumente utilizados polissacarídeos, proteínas e açúcares (ARSLAN et al., 2015). Até o momento, microcápsulas têm mostrado enorme potencial para liberação controlada em formulações farmacêuticas devido a serem micropartículas de alto volume interno e grande área de superfície (FANG et al., 2019). Além disso, o encapsulamento de princípios bioativos na indústria farmacêutica traz como benefício o aumento de viabilidade tanto durante o armazenamento quanto durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Isto faz com que as células probióticas retenham suas propriedades benéficas ao hospedeiro (PAULO, SANTOS, 2017). É comum que células sofram danos durante o processo de secagem, ocasionando em perda de viabilidade posterior a este processo. Portanto, a adição de agentes encapsulantes como protetores faz com que este dano seja diminuído e mantenha o princípio ativo intacto durante todo o processo de secagem, conforme descrito por Bernucci (2017). Além disso, Vanden Braber (2019) relata que a microencapsulação de leveduras *Kluyveromyces* utilizando matrizes relacionadas ao seu isolamento e crescimento impacta positivamente no aumento de viabilidade e estabilidade do probiótico durante o processamento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal.

O método de *Spray drying* para microencapsulação consiste na transformação de um estado fluido para o formato de partículas secas através da pulverização de líquido em um meio de secagem quente (CAL et al., 2009) A técnica de *Spray drying* é muito utilizada para microencapsulação na indústria de alimentos, uma vez que apresenta inúmeras vantagens ao se trabalhar com microrganismos, como baixo custo de operação e processo único de secagem (ARSLAN et al., 2015). A FIGURA 1 apresenta um esquema do processo de *spray drying*.

FIGURA 1 - REPRESENTAÇÃO ESQUEMÁTICA DO PROCESSO DE MICROENCAPSULAÇÃO POR SPRAY DRYING.



Traduzido de: Burgain et al. (2011)

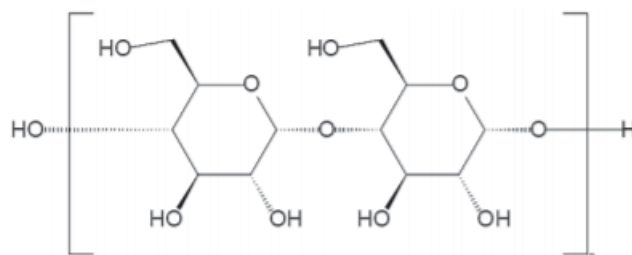
2.5 AGENTES ENCAPSULANTES

A atual abundância de polímeros naturais faz com que uma extensa gama de materiais de parede esteja disponível para microencapsulação. Estes materiais variam de lipídios, proteínas e carboidratos até as várias misturas que podem ser obtidas com estes compostos. Esta diversidade de materiais encapsulantes faz com que se obtenham as mais diversas características entre as microcápsulas, como tempo total de armazenamento, métodos pelos quais podem se obter as micropartículas e velocidade de liberação (LOZINSKA et al., 2020).

Um dos agentes proteicos mais utilizados para microencapsulação é a proteína do soro de leite (WPC). Suas características funcionais envolvem a resistência à oxidação, aumento de propriedades emulsificantes e melhora do valor nutricional dos compostos aos quais está associada (LOYEAU et al., 2018). Proteínas vegetais também desempenham atividades emulsificantes quando incorporadas em microcápsulas (PRIOL et al., 2019). Além destas, Carboidratos são amplamente utilizados como agentes encapsulantes. Dentre estes, são citados amidos (sorgo e

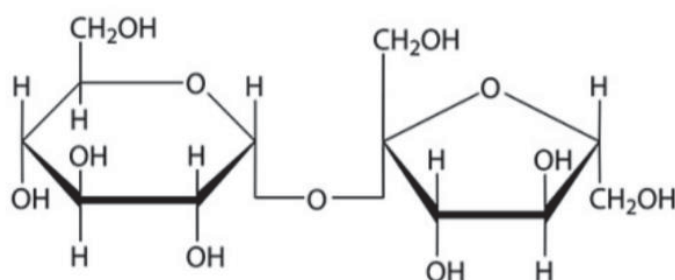
milho), gomas (arábica e xantana) e polímeros de diferentes açúcares, como a maltodextrina e a sacarose (ARSHAD; ALI; HASNAIN, 2018; MANSOUR; SALAH; XU, 2019; BRAGA et al., 2019). A estrutura polimérica da maltodextrina, bem como a estrutura da sacarose, as quais justificam suas potenciais propriedades encapsulantes, podem ser vistas nas FIGURAS 2 e 3.

FIGURA 2: ESTRUTURA QUÍMICA DA MALTODEXTRINA.



Fonte: CARARETO et al. (2010)

FIGURA 3: ESTRUTURA QUÍMICA DA SACAROSE.



Fonte: AMCHARA et al. (2018)

2.6 PREBIÓTICOS

Segundo Roberfroid, 2010, um prebiótico é definido como um ingrediente alimentar não-digerível que concede benefícios ao hospedeiro, estimulando seletivamente o crescimento e também a atividade de uma ou um número limitado de bactérias no trato gastrointestinal, melhorando assim a saúde do indivíduo. Estruturalmente, prebióticos podem ter sua natureza baseada em carboidratos, como inulina, fruto-oligossacarídeos (FOS), galacto-oligossacarídeos (GOS) e xilo-oligossacarídeos (XOS), e não-carboidratos, como polifenóis, minerais e ácidos

graxos poli-insaturados (NUMA; PASTORE, 2019). Estruturas poliméricas do prebiótico inulina podem ser observadas na FIGURA 4.

Prebióticos são amplamente utilizados em saúde animal, uma vez que podem substituir alguns antibióticos em certos tratamentos, tendo em vista que o excesso destes pode acarretar no depósito de resíduos nos tecidos destes animais (XIA et al., 2019; RICKE et al., 2020). Novos estudos sugerem que os benefícios do uso de prebióticos incluem atividades antitumorais, onde tumores implantados pela via subcutânea interagiram com os prebióticos inulina e mucina, os quais induzem imunidade antitumoral e controlam concomitantemente o crescimento do tumor em modelos de camundongos singênicos (LI et al., 2020)

FIGURA 4 - ESTRUTURA QUÍMICA DO PREBIÓTICO INULINA.



Fonte: ROBERFROID, VAN LOO, GIBSON (1998).

2.7 CARACTERIZAÇÃO DE MICROCÁPSULAS

Durante a produção de micropartículas, o uso de diferentes agentes carreadores resulta em diferentes propriedades físico-químicas para cada formulação utilizada. Desta maneira, a comparação entre propriedades dos componentes utilizados é essencial para otimização deste processo nas indústrias alimentícia e

farmacêutica. Estas propriedades podem influenciar na estabilidade, velocidade de processamento e facilidade de manuseio do produto final. (TONON, 2009). Tendo em vista que microcápsulas também são consideradas um excelente meio de liberação controlada de fármacos, a caracterização destas partículas quanto à morfologia, viscosidade e fluidez é de fundamental importância para garantir a qualidade do produto desejado (FANG, 2019). Uma vez preparadas, as microcápsulas precisam ser analisadas quanto a sua estrutura química, conteúdo, morfologia, superfície e propriedades de resistência. Para isso, diversas técnicas são utilizadas, dentre elas: Espectroscopia no infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difração de raio-X de pó (DRX), análise termogravimétrica (TGA), calorimetria diferencial exploratória (DSC), microscopia eletrônica de varredura (MEV), dentre outras (ZHANG et al., 2018). Para análise de probióticos associados a prebióticos, estudos recentes realizaram a análise de microestrutura das partículas através de MEV, propriedades térmicas através de DSC e TGA e estudo de viabilidade em condições gástricas simuladas, uma vez que estas análises contribuem para otimização de formulações no processo de microencapsulação. (FRITZEN-FREIRE, 2013; PINTO et al, 2015; VERRUCK et al, 2018).

2.7.1 DIFRAÇÃO DE RAIO-X

Tendo em vista o grande número de técnicas empregadas para formação de pós a partir de uma substância sólida, a Difração de Raio-X (DRX) é uma importante ferramenta para caracterização destes compostos (RAMESH et al., 2020). A DRX de pó é uma técnica excepcional para análise de microestruturas, uma vez que permite a análise não-destrutiva do analito, permitindo a sua recuperação, bem como a determinação quantitativa de estruturas cristalinas presentes na amostra. É uma técnica muito utilizada nas áreas de metalurgia, materiais e ciências farmacêuticas (TEDESCO, BRUNELLI, 2017; ZHANG et al., 2017). A maioria dos princípios ativos existe no estado sólido, quando em condições ambientais. O conhecimento detalhado de sua estrutura cristalina é importante para entender as propriedades físico-químicas que podem afetar a atividade farmacológica. Cristais que compartilham da mesma composição química, mas possuem diferentes estruturas internas - incluindo diferentes dimensões das células unitárias e diferentes agrupamentos de cristais -

são chamados polimorfos. Embora apenas uma forma de cristal tenha sido caracterizada para alguns compostos, outras podem existir como formas polimórficas. Para se distinguir formas estruturais de diferentes compostos, duas técnicas principais de DRX são utilizadas: Uma onde o feixe de raios-X é direcionado para um único cristal, ou também podendo ser direcionado para o pó espalhado em um suporte de amostras (THAKRAL, 2018). O funcionamento do difratômetro se dá por um feixe de raios-X que sai de um gerador e é refletido pela amostra, onde então é absorvido por um detector. O detector e a amostra costumam ter um movimento rotacional, onde toda a superfície da amostra poderá ser escaneada pelo feixe de raios, determinando a estrutura cristalina do composto. Amostras muito grosseiras ou transparentes podem levar à falsas leituras (TEDESCO, BRUNELLI, 2017). Estudos mostram a importância da análise DRX no processo de microencapsulação, uma vez que permite a identificação de propriedades vantajosas ou prejudiciais presentes no produto final, como o grau de cristalização das micropartículas de drogas pouco solúveis (TAN et al, 2009) ou o depósito de cristais em microcápsulas para liberação controlada de perfumes (PEÑA et al, 2012). Além disso, a DRX de pó serve como confirmação de que a microcápsula de diversos materiais atingiu a cristalização desejada para desempenhar a função estabelecida (CHEN et al, 2013).

2.7.2 ANÁLISE TÉRMICA

Análise térmica, constituída principalmente por DSC (calorimetria diferencial exploratória) e TGA (análise termogravimétrica), baseia-se em ferramentas utilizadas para descrever o comportamento de uma substância em função da temperatura. Estas análises são capazes de mostrar temperaturas de transição de fase, processos de degradação e condução de estudos de estabilidade (EL-SAYED et al., 2011). Técnicas como esta são de fundamental importância para caracterização de substâncias, uma vez que as propriedades físicas e químicas de compostos são normalmente afetados por condições externas e internas, tais como umidade, temperatura, pressão, energia interna, dentre outros (REVANTH et al., 2019).

A DSC, técnica que é utilizada em aproximadamente 70% das análises térmicas realizadas atualmente, mede o fluxo de calor durante períodos de transição ou mudanças térmicas em reações de oxidação que ocorrem em uma determinada

amostra por meio de uma função tempo-temperatura. Em contrapartida, a TGA mede a variação de peso de uma amostra quando submetida ao aquecimento. Essa variação de peso pode ser usada para determinar processos de oxidação durante a decomposição da amostra (ROZAINA; BIRCH, 2018).

Quando utilizadas concomitantemente, essas técnicas expressam resultados significativos envolvendo materiais utilizados na indústria farmacêutica e de alimentos, como por exemplo: a temperatura onde ocorre quebra de glicosídeos, a volatilidade de certos compostos e até mesmo auxiliar na identificação de substâncias que apresentam características específicas em um determinado comportamento térmico (XIE et al., 2007; LIN et al., 2010). Uma vez que as microcápsulas são submetidas à análise térmica, estas podem ser caracterizadas em diversos parâmetros, já que as informações de mudança de energia obtidas na análise DSC permitem o estudo de propriedades importantes desses compostos, tais como: Mudança de fase (ponto de fusão, ponto de transição vítrea), estabilidade (decomposição dos componentes da fórmula), identificação de polimorfos presentes no composto, interação (excipientes da formulação), dentre outros (HUANG, DALI, 2013). He (2020) relatou que microcápsulas do açúcar manitol, quando comparadas ao açúcar sem agente encapsulante e submetidas à caracterização por DSC, apresentaram melhorias em diversos pontos, como estabilidade química e aumento na capacidade de armazenamento de energia, evitando a degradação. Desta maneira, estudos realizando análises de propriedades térmicas de diferentes materiais mostraram a importância da caracterização de micropartículas, onde foram obtidas informações relacionadas à variação de massa, estabilidade térmica, água livre, pureza, ponto de fusão, ponto de ebulição, calores de transição, entre outras características. (FRITZEN-FREIRE, 2013; PINTO et al, 2015; VERRUCK et al, 2018).

2.7.3 ESTUDO DE VIABILIDADE

A diminuição da viabilidade de microrganismos desempenha uma função crítica quando se estudam culturas microbianas. A avaliação de viabilidade de biomassa após certos processos e durante o armazenamento é de suma importância para o gerenciamento de processos microbiológicos (ZUTHI et al., 2015). A viabilidade de probióticos em diversas matrizes é afetada por fatores como pH,

acidificação durante o armazenamento de produtos fermentados, produção de peróxido de hidrogênio, toxicidade do oxigênio, temperaturas de processamento e armazenamento, taxa e proporção de inoculação, microencapsulação e estabilidade durante o período de armazenamento. Desta maneira, a preservação da viabilidade pela utilização de agentes protetores se faz necessária para preservar as características benéficas de microrganismos probióticos (MOUMITA et al., 2016; POLETTO et al., 2019). Uma vez que a dosagem recomendada de administração de probióticos é de 10^6 - 10^7 UFC por grama de produto, este princípio ativo deve se manter estável após o processamento, bem como durante todo o período de armazenamento (BURGAIN et al, 2011). Para verificar a estabilidade microbiológica destes compostos, são utilizadas técnicas de análise térmica (DSC e TGA), verificação de pH e contagem de células em um determinado período, sob condições ambientais e sob refrigeração (COSTA NETO et al, 2019). Analisando resultados mostrados por Fritzen-Freire (2012) e Suryabhan (2019) utilizando microrganismos probióticos como Bifidobactérias e *S. boulardii*, é possível ver que a microencapsulação potencializa a viabilidade de microrganismos probióticos quando armazenados, bem como sob as condições extremas do trato gastrointestinal.

REFERÊNCIAS

AMCHRA, F. Z.; FAIZ, C. A.; CHAOUKI, S.; et al. Effect of Stevia rebaudiana, sucrose and aspartame on human health: A comprehensive review. **Journal of Medicinal Plants Studies**. v. 6. p. 102-108. 2018.

ARGYRI, A.A.; PANAGOUE E. Z.; TASSOU, C.C.; Probiotics from the Olive Microbiota. **Probiotics, Prebiotics, and Synbiotics, Bioactive Foods in Health Promotion**. p. 371-389. Academic Press. 2016.

ARSHAD, H.; ALI, T. M.; HASNAIN, A. Native and modified Sorghum starches as wall materials in microencapsulation of nutmeg oleoresin. **Biological Macromolecules**. V. 114. P. 700-709. 2018.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I. Microencapsulation of Probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with Different Wall Materials by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63. p. 685-690. 2015.

BEKATOROU, A.; PSARIANOS, C.; KOUTINAS, A.A.; Production of Food Grade Yeasts. **Food Technology and Biotechnology**. v. 44. p. 407-415. 2006.

BRAGA, A. B. A. C.; COSTA, C. J. M.; POMELLA, A. W. V.; et al. Evaluation of lethality temperature and use of different wall materials in the microencapsulation process of *Trichoderma asperellum conidias* by spray drying. **Powder Technology**. v. 347. p. 199-206. 2019.

BURGAIN, J.; GAIANI, C.; LINDER, M.; et al. Encapsulation of probiotic living cells: From laboratory scale to industrial Applications. **Journal of Food Engineering**, v. 104, p. 467-483, 2011.

CARARETO, N. D. D.; MONTEIRO FILHO, E. S.; PESSOA FILHO, P. A.; et al. Water Activity of Aqueous Solutions of Ethylene Oxide-propylene Oxide Block Copolymers and Maltodextrins. **Brazilian Journal of Chemical Engineering**. v. 27. p. 173-181. 2010.

CHEN, Z.; CAO, L.; FANG, G.; et al. Synthesis and characterization of microencapsulated paraffin microcapsules as shape-Stabilized thermal energy storage materials. **Nanoscale and Microscale Thermophysical Engineering**. v. 17. 112-123. 2013.

COSTA NETO, J. J. G., GOMES, T. L. M., JUSTO, T. F.; et al. Microencapsulation of tiger nut milk by lyophilization: Morphological characteristics, shelf life and microbiological stability. **Food Chemistry**. v. 284. p. 133-139. 2019.

CZERUCKA, D.; PICHE, T.; RAMPAL, P. Review article: Yeast as Probiotics – *Saccharomyces boulardii*. **Alimentary Pharmacology & Therapeutics**. v. 26. p. 767-778. 2007.

EL-SAYED, S.; MAHMOUD, K. H.; FATAH, A. A.; et al. DSC, TGA and dielectric properties of carboxymethyl cellulose/polyvinyl alcohol blends. **Physica B**. v. 406. p. 4068-4076. 2011.

ESTEVINHO, B. N.; CARLAN, I.; BLAGA, A.; et al. Soluble vitamins (vitamin B12 and vitamin C) microencapsulated with different biopolymers by a spray drying process. **Powder Technology**. v. 289. p. 71-78. 2016.

FANG, Z.; CAO, X.; YU, Y.; et al. Fabrication and characterization of microcapsule encapsulating EOR surfactants by microfluidic technique. **Colloids and Surfaces A**. v. 570. p. 282-292. 2019.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**. v.45. p.306-312. 2012.

GÓMEZ-PASTOR, R.; PÉREZ-TORRADO, R.; GARRE, E. et al. Recent Advances in Yeast Biomass Production. **Biomass - Detection, Production and Usage**. p. 201-222. InTech. 2011.

HE, L.; MO, S.; LIN, P.; et al. Synthesis and properties of nanoencapsulated D-mannitol for medium temperature thermal energy storage. **Solar Energy Materials and Solar Cells**. v. 209. 2020.

HUANG, J.; DALI, M. Evaluation of integrated Raman-DSC technology in early pharmaceutical development: Characterization of polymorphic systems. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis**. v. 86. p. 92-99. 2013.

IZMIRLIOGLU, G.; DEMIRCI, A. Improved simultaneous saccharification and fermentation of bioethanol from industrial potato waste with co-cultures of *Aspergillus niger* and *Saccharomyces cerevisiae* by medium optimization. **Fuel**. v. 185. p. 684-691. 2016.

JUTAKANOKKE, R.; LEEPIPATPIBOON, N.; TOLIENG, V.; et al. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**. v. 39. p. 283-289. 2012.

KELESIDIS, T.; POTHOUKAKIS, C. Efficacy and Safety of the Probiotic *Saccharomyces boulardii* for the Prevention and Therapy of Gastrointestinal Disorders. **Therapeutic Advances in Gastroenterology**. v. 5. p. 111-125. 2011.

LACROIX, C.; YILDIRIM, S. Fermentation technologies for the production of probiotics with high viability and functionality. **Current Opinion in Biotechnology**. v. 18. p. 176-183. 2007.

LI, K.; WANG, B.; WANG, W.; et al. Microencapsulation of *Lactobacillus casei* BNCC 134415 under lyophilization enhances cell viability during cold storage and pasteurization, and in simulated gastrointestinal fluids. **LWT - Food Science and Technology**. v. 116. 2019.

LI, Y.; ELMEN, L.; SEGOTA, I.; et al. Prebiotic-Induced Anti-tumor Immunity Attenuates Tumor Growth. **Cell Reports**. v. 30. p. 1753-1766. 2020.

LIN, C.; CHANG, Y.; GUPTA, J. P.; et al. Comparisons of TGA and DSC approaches to evaluate nitrocellulose thermal degradation energy and stabilizer efficiencies. **Process Safety and Environmental Protection**. v. 88. p. 413-419. 2010.

LOZINSKA, N.; ROZYNSKA, A. G.; ARTICHOWICZ, W.; et al. Microencapsulation of fish oil – determination of optimal wall material and encapsulation methodology. **Journal of Food Engineering**. v. 268. p. 2020.

LOYEAU, P. A.; SPOTTI, M. J.; BRABER, N. L. V.; et al. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. lactis INL1 using whey proteins and dextrans conjugates as wall materials. **Food Hydrocolloids**. v. 85. p. 129-135. 2018.

LUKASZEWICKZ, M. *Saccharomyces cerevisiae* var. *bouardii* – Probiotic Yeast. **Probiotics**. p. 385-398. 2012.

MANSOUR, M.; SALAH, M.; XU, X. Effect of microencapsulation using soy protein isolate and gum arabic as wall material on red raspberry anthocyanin stability, characterization, and simulated gastrointestinal conditions. **Ultrasonics Sonochemistry**. v. 63. 2020.

MCFARLAND, L.V. Common Organisms and Probiotics: *Saccharomyces bouardii*. **The Microbiota in Gastrointestinal Pathophysiology**. p. 145-164. Academic Press. 2017.

MOUMITA, S.; GODERSKA, K.; JOHNSON, E. M.; et al. Evaluation of the viability of free and encapsulated lactic acid bacteria using in vitro gastro intestinal model and post storage survivability studies of symbiotic microcapsules in dry food matrix. **LWT - Food Science and Technology**. v. 77. p. 460-467. 2017.

MURUAGA, M. L.; CARVALHO, K.G.; DOMÍNGUEZ, J.M.; et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. **Renewable Energy**. v. 85. p. 649-656. 2016.

NERI-NUMA, I. A.; PASTORE, G. M. Novel insights into prebiotic properties on human health: a review. **Food Research International**. v. 131. 2020.

OESCHLAEGER, T.A.; Mechanisms of probiotic actions – A review. **International Journal of Medical Microbiology**. v. 300. p. 57-62. 2010.

OLIVEIRA, A. C. G.; SPOTO, M. H. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; et al. Effects of heat treatment and gamma radiation on the characteristics of pure sugarcane juice and mixed with fruit juices. **Food Science and Technology**. v. 27. p. 863-873. 2007.

PAULO, F.; SANTOS, L. Design of experiments for microencapsulation applications: A review. **Materials Science and Engineering: C**. v. 77. p. 1327-1340. 2017.

PEÑA, B.; PANISELLO, C.; ARESTE, G.; et al. Preparation and characterization of polysulfone microcapsules for perfume release. **Chemical Engineering Journal**. v. 179. p. 394-403. 2012.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BENEDETTI, S.; et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**. v. 67. 2015.

POLETTI, G.; RADDATZ, G. C.; CICHOSKI, A. J.; et al. Study of viability and storage stability of *Lactobacillus acidophilus* when encapsulated with the prebiotics rice bran, inulin and Hi-maize. **Food Hydrocolloids**. v. 95. p. 238-244. 2019.

PRIOL, L. L.; DAGMEY, A.; MORANDAT, S.; et al. Comparative study of plant protein extracts as wall materials for the improvement of the oxidative stability of sunflower oil by microencapsulation. **Food Hydrocolloids**. v. 95. p. 105-115. 2019.

RAMESH, S.; VETRIVEL, S.; SURESH, P.; et al. Characterization techniques for nano particles: A practical top down approach to synthesize copper nano particles from copper chips and determination of its effect on planes. **Materials Today: Proceedings**. 2020.

REID, G.; Probiotics: definition, scope and mechanisms of action. **Best Practice & Research Clinical Gastroenterology**. v. 30. p. 17-25. 2016.

REVANTH, J. S.; MADHAV, V. S.; SAI, Y. K.; et al. TGA and DSC analysis of vinyl ester reinforced by Vetiveria zizanioides, jute and glass fiber. **Materials Today: Proceedings**. 2019.

RICKE, S. C.; LEE, S. I.; KIM, S. A.; et al. Prebiotics and the poultry gastrointestinal tract microbiome. **Poultry Science**. v. 99. p. 670-677. 2020.

ROBERFROID, M. B.; VAN LOO, J.; GIBSON, G. R. The Bifidogenic nature of chicory inulin and its hydrolysis products. **The Journal of Nutrition**, v.128 p. 11-19, 1998.

ROBERFROID, M.; GIBSON, G. R.; HOYLES, L. et al. Prebiotic effects: Metabolic and health benefits. **British Journal of Nutrition**. v. 104. p. S1-S63. 2010.

RODRIGUEZ, P.F.; ARÉVALO-VILLENA, M.; ROSA, I.Z. et al. Selection of Potential non-Saccharomyces Probiotic Yeasts from Food Origin by a Step-by-step Approach. **Food Research International**. v. 112. p. 143-151. 2018.

ROZAINA, T. M. T.; BIRCH, E. J. Thermal Analysis for Lipid Decomposition by DSC and TGA. **Encyclopedia of Food Chemistry**. p. 345-352. 2019.

SANTOSH, I.; ASHTAVINAYAK, P.; AMOL, D.; et al. Enhanced bioethanol production from different sugarcane bagasse cultivars using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 5. p. 2861–2868. 2017.

SILVA, P. T.; FRIES, L. L. M.; MENEZES, C. R.; et al. Microencapsulation: concepts, mechanisms, methods and some applications in food technology. **Ciência Rural**. v. 44. 2013.

SURYABHAN, P.; LOHITH, K.; ANU-APPAIAH, K.A. Sucrose and Sorbitol Supplementation on Maltodextrin Encapsulation Enhance the Potential Probiotic Yeast Survival by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 107. p. 243-248. 2019.

TAN, A.; SIMOVIC, S.; DAVEY, A. K.; et al. Silica-lipid hybrid (SLH) microcapsules: A novel oral delivery system for poorly soluble drugs. **Journal of Controlled Release**. v. 134. 62-70. 2009.

TEDESCO, C.; BRUNELLI, M. X-ray Powder Diffraction. **Comprehensive Supramolecular Chemistry**. v. 2. p. 45-73. 2017.

TONON, R. V.; BRABET, C.; PALLET, D.; BRAT, P.; HUBINGER, M. D. Physicochemical and morphological characterisation of açai (*Euterpe oleraceae* Mart.) powder produced with different carrier agents. **International Journal of Food Science and Technology**. v.44. p.1950-1958. 2009.

VANDEN BRABER, N. L.; DÍAS VERGARA, L. I.; ROSSI, C. A.; et al. Effect of microencapsulation in whey protein and water-soluble chitosan derivative on the viability of the probiotic *Kluyveromyces marxianus* VM004 during storage and in simulated gastrointestinal conditions. **LWT - Food Science and Technology**. v. 118. 2019.

VERRUCK, S.; LIZ, G. R.; DIAS, C.; et al. Effect of full-fat goat's milk and prebiotics use on Bifidobacterium BB-12 survival and on the physical properties of spray-dried powders under storage conditions. **Food Research International**. v. 119. 2018.

VIEIRA, E.D.; ANDRIETTA, M.G.S.; ANDRIETTA, S.R. Yeast Biomass Production: A New Approach in Glucose-limited Feeding Strategy. **Brazilian Journal of Microbiology**. v. 44. p. 551-558. 2013.

XIA, Y.; KONG, J.; ZHANG, G.; et al. Effects of dietary inulin supplementation on the composition and dynamics of cecal microbiota and growth-related parameters in broiler chickens. **Poultry Science**. v. 98. p. 6942-6953. 2019.

XIE, W.; TANG, J.; GU, X.; et al. Thermal decomposition study of menthyl-glycoside by TGA/SDTA, DSC and simultaneous Py-GC-MS analysis. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 78. p. 180-184. 2007.

WENDHAUSEN, R.; FREGONESI, A.; MORAN, P.J.S. et al. Continuous Fermentation of Sugar Cane Syrup Using Immobilized Yeast Cells. **Journal of Bioscience and Bioengineering**. v. 91. p. 48-52. 2001.

ZHANG, Y.; SUN, Q.; GENG, J. Microstructural characterization of limestone exposed to heat with XRD, SEM and TG-DSC. **Materials Characterization**. v. 134. p. 285-295. 2017.

ZUTHI, M. F. R.; NGO, H. H.; GUO, W. S.; et al. Biomass viability: An experimental study and the development of an empirical mathematical model for submerged membrane bioreactor. **Bioresource Technology**. v. 190. p. 352-358. 2015.

CAPÍTULO 1
OBTENÇÃO DE CÉLULAS DA LEVEDURA PROBIÓTICA *Saccharomyces*
***boulardii* EM CALDO DE CANA-DE-AÇÚCAR NÃO-SUPLEMENTADO**

Obtenção de Células da Levedura Probiótica *Saccharomyces boulardii* em Caldo de Cana-de-açúcar Não-suplementado

Obtention of Probiotic Cells of *Saccharomyces boulardii* in Unsupplemented Sugarcane Juice

RESUMO

Este trabalho teve por objetivo a obtenção de células do probiótico *Saccharomyces boulardii* em biorreator utilizando como substrato o caldo de cana-de-açúcar não-suplementado. Para crescimento do microrganismo, foi utilizado o caldo de cana-de-açúcar como principal constituinte dos meios de cultura, uma vez que o Brasil é o maior produtor de cana-de-açúcar atualmente, sendo esta uma matéria-prima de ampla disponibilidade e baixo custo. Para obtenção de biomassa microbiana, três processos foram conduzidos em biorreator de 10 litros utilizando concentrações distintas de inóculo ($0,3 \text{ g.L}^{-1}$, $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ e $1,0 \text{ g.L}^{-1}$). O meio dos processos consistiu em diferentes concentrações de caldo de cana-de-açúcar diluído em água purificada (Processo A - 47 g.L^{-1} , processo B - 50 g.L^{-1} e processo C - 40 g.L^{-1}). Após 24 horas de processo, estes foram avaliados quanto à massa celular seca obtida e consumo de açúcares totais. Dos três processos conduzidos, o processo B (40 g.L^{-1} de açúcares iniciais e $0,7 \text{ g.L}^{-1}$ de concentração celular inicial) foi o que obteve maior produção de biomassa microbiana, embora o consumo de substrato tenha sido o maior dentre os processos realizados. A comparação dos cultivos realizados sugere que o caldo de cana-de-açúcar não-suplementado pode ser utilizado como fonte principal de carbono para células probióticas, o qual pode ser suplementado para otimizar o processo de produção destes microrganismos.

Palavras-chave: Cana-de-açúcar, *Saccharomyces boulardii*, probiótico

ABSTRACT

The objective of this work was the obtention of cells of the probiotic *Saccharomyces boulardii* in a bioreactor using non-supplemented sugarcane juice as a substrate. For the growth of the microorganism, sugarcane juice was used as the main constituent of the culture media, since Brazil is the largest producer of sugarcane today, which is a raw material of wide availability and low cost. To obtain microbial biomass, three processes were carried out in a 10-liter bioreactor using different concentrations of inoculum (0.3 g.L^{-1} , 0.7 g.L^{-1} and 1.0 g.L^{-1}). The process medium consisted of different concentrations of sugarcane juice diluted in purified water (Process A - 47 g.L^{-1} , process B - 50 g.L^{-1} and process C - 40 g.L^{-1}). After 24 hours of process, they were evaluated for dry cell mass obtained and consumption of total sugars. Of the three processes conducted, process B (40 g.L^{-1} of initial sugars and 0.7 g.L^{-1} of initial cell concentration) was the one that obtained the highest production of microbial biomass, although the substrate consumption was the highest among the processes performed. The comparison of the cultivations carried out suggests that the unsupplemented sugarcane juice can be used as the main source of carbon for probiotic cells, which can be supplemented to optimize the production process of these microorganisms.

Keywords: Sugarcane, *Saccharomyces boulardii*, probiotic

1 INTRODUCTION

Probiotics are defined as living microorganisms which, when administered in adequate amounts, confer health benefits to the host (GOLDSTEIN et al., 2016). These organisms are often consumed through fermented foods such as milk, cheese, yogurt and cereal drinks. Probiotic characteristics include resistance to stomach fluids and the ability to fight and prevent infections of the gastrointestinal tract (RAHMANI; MORADZADEH; FARAHMAND, 2019; EL-ENSHASY et al., 2008).

Saccharomyces boulardii is a probiotic commonly used in humans and animals and is a viable and safe alternative to various antibiotics (VILLOT et al., 2019). In view of the extensive cell production of this microorganism, it is necessary that the growth process of this probiotic is cheap, sustainable and efficient. Several inexpensive substrate alternatives, such as agro-industrial waste, are being studied for use in culture media of these microorganisms (GABOARDI et al., 2018).

Sugarcane (*Saccharum officinarum*) is a plant of great economic importance in several countries, especially in the areas of energy, fuels and chemical synthesis (SAHU, 2018). Among the microorganisms employed in the industry, the yeast *Saccharomyces* is the main one, considering its easy handling, low cost, low nutritional need, tolerance to high sugar concentrations, among other advantages. Sugarcane juice and molasses are among the main products obtained from sugarcane manufacture, although leaves and bagasse can also be used to conduct fermentation processes (SANTOSH et al., 2017; JUTAKANOKI et al., 2012). The components of these substrates vary according to the climatic and vegetative conditions of each region (MURUAGA et al., 2016).

This research aims to evaluate the adoption of unsupplemented sugarcane juice as substrate for cultivation of *Saccharomyces boulardii*, as this contributes economically to the community that produces this component.

2 MATERIAL AND METHODS

2.1 ISOLATION AND CONSERVATION

To isolate a single colony of *Saccharomyces boulardii*, a commercial product (Repoflor®, Legrand, Brazil) was used, where an aliquot was transferred to a flask containing YPD medium (pH 5.6) and grown under stirring at 150 rpm and 28 °C for 24 hours. After growth, the culture was diluted and cultivated in petri dishes with YPD medium at 28 °C for 48 h. After growth, two isolated colonies were inoculated into two flasks containing YPD broth (pH 5.6), which were conditioned under agitation at 150 rpm at 28 °C for 24 h. For preservation, the contents of the vials were divided into polypropylene tubes and glycerol added as cryoprotectant, which were stored in freezer.

2.2 FLASK CULTIVATION

A stored culture was first transferred to 250 mL Erlenmeyer flask containing 75 mL of YPD broth and cultivated under stirring at 150 rpm and 37 °C for 24 hours in order to simulate human body temperature. After that, the content of the flask was then transferred to a 1000 mL Erlenmeyer flask containing 225 mL of YPD medium and cultivated under the same conditions.

2.3 BIOREACTOR CULTIVATION

The biotechnological processes were performed in a 10 L Biostat B (B. Braun Biotech International, Germany) bioreactor, which started at pH 5.6 controlled with 1M NaOH and 1M H₂SO₄, agitation 200 rpm, 3 vvm air injection and temperature controlled at 37 °C. The processes media consisted of different concentrations of fresh sugarcane juice diluted with water (total sugar concentrations were of 47 g.L⁻¹, 40 g.L⁻¹ and 50 g.L⁻¹). Process samples were taken at intervals of 2 hours to 12 hours, and a new sample was taken within 24 hours of the process.

2.4 DETERMINATION OF TOTAL SUGARS

The analysis of determination of total sugars of samples was performed by the method of dinitrosalicylic acid (DNS) according to Miller (1959). The samples were hydrolyzed by the addition of HCl and heating at 75 °C for 15 minutes. After hydrolysis, 3,5-dinitrosalicylic acid was added to the samples, which were heated in a water bath at 100 °C for 15 minutes. The colorimetric reaction was quantified using spectrophotometer (Shimadzu) at a wavelength of 560 nm. All readings were performed in triplicate.

2.4 CELL MASS DETERMINATION

Biomass quantification was determined by gravimetry after oven drying at 65 °C to constant weight and expressed in g.L⁻¹, as demonstrated by Bosso (2019).

2.5 CELL VIABILITY

Samples were mixed with methylene blue 5% and stirred for 5 minutes at room temperature. Viability was examined in quintuplicates under microscope according to Kwolek-Mirek (2014) and Zhang (2019). Viable cells were not stained with the methylene blue, and dead cells were blue-stained.

2.6 GROWTH KINETICS PARAMETERS

Growth Kinetics Parameters were obtained according to Melo et al (2016).

2.6.1 BIOMASS PRODUCTIVITY (P_x)

This parameter (P_x) expresses the average speed of the yeast growth, where the amount of biomass produced over the cultivation time is verified (being X the final concentration of cells and X₀ the initial concentration).

$$P_x = (X - X_0) / (\text{cultivation time})$$

2.6.2 SUBSTRATE TO BIOMASS CONVERSION FACTOR ($Y_{x/s}$)

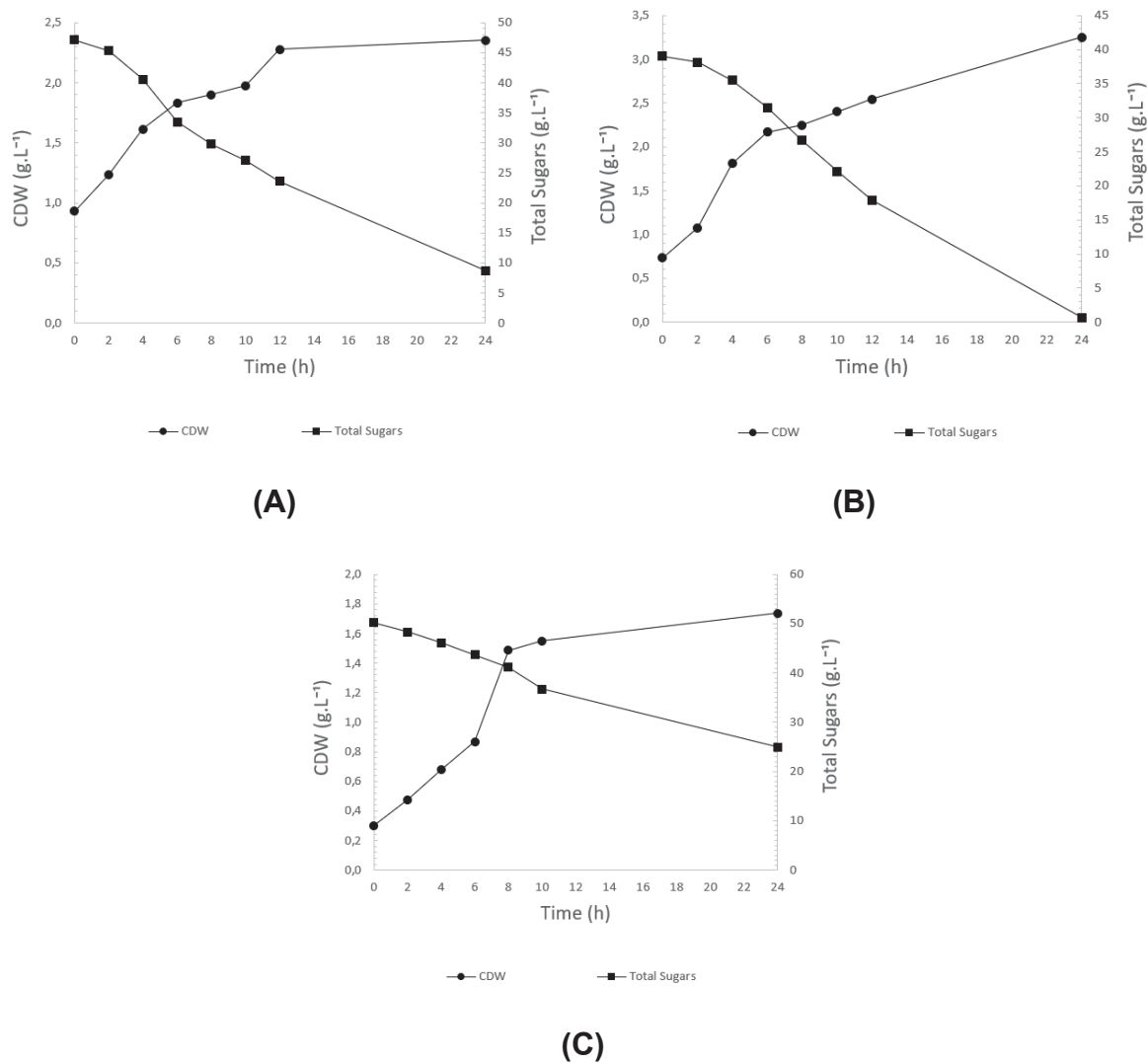
This is the relation between the amount of biomass produced and the amount of consumed substrate. It is given by the following expression, where S_0 is the initial substrate concentration and S the final one.

$$Y_{x/s} = (X - X_0) / (S_0 - S)$$

3 RESULTS AND DISCUSSION

The cultivation of *Saccharomyces boulardii* cell mass took place in three separate processes. In all of them pH values and air injection were controlled, therefore the only significant changes between the three of them were the initial cell yield and initial sugar concentration. Bioreactor cultivation results expressed in CDW (cell dry weight) and TS (total sugars) can be seen on figure 1.

FIGURE 1 - COMPARISON BETWEEN BATCH CULTIVATION OF *Saccharomyces boulardii* WITH DIFFERENT STARTERS AND TOTAL SUGARS INITIAL CONCENTRATION - (A) 47 g.L⁻¹ TS AND 1.0 g.L⁻¹ CDW, (B) 40 g.L⁻¹ TS AND 0.7 g.L⁻¹ CDW AND (C) 50 g.L⁻¹ TS AND 0.3 g.L⁻¹ CDW.



As a result of the three processes, every cell yield obtained were 100% viable during every stage of the growth. These are significant results, as probiotic cells must be viable during every stage of processing and manufacturing of new food and pharmaceutical products. According to Kwolek-Mirek (2014), this viability indicates very low or non-existing impact of environment stressors and toxicity, justifying the use for the sugarcane juice as a carbon source. As for the DCW yield, Guerra (2007) states that supplementation of probiotic media using yeast extract impacts positively on cell growth and its desired metabolites. Also, as a means of reducing toxicity and increasing the fermentation rate of the substrate by *Saccharomyces boulardii*, Agu

(2018) stated that the supplementation of Allopurinol can be beneficial to the yeast cells as an enhancement of several parameters, such as cell lifespan and product formation. On the reports of Bertrand (2018), a yeast culture media with the minimum growth requirements could be formulated with: Glucose: 50 g.L⁻¹; KH₂PO₄: 3 g.L⁻¹, (NH₄)₂SO₄: 2 g.L⁻¹; vitamins, salts and minerals, and even without an accordingly formulated medium, the fresh sugarcane juice seems to have provided enough of these components to the yeast cells. Following steps of this study would include supplementation of the fresh sugarcane juice in order to increase total DCW production for it to be used in the industry, since there are several ways to increase probiotic activity of these microorganisms when being applied in technological processes.

3.1 GROWTH KINETIC PARAMETERS

Growth kinetic parameters obtained for all three processes can be observed on table 1:

TABLE 1 – GROWTH KINETIC PARAMETERS FOR BATCH CULTIVATION OF *Saccharomyces boulardii* WITH DIFFERENT STARTERS AND TOTAL SUGARS INITIAL CONCENTRATION - (A) 47 g.L⁻¹ TS AND 1 g.L⁻¹ CDW, (B) 40 g.L⁻¹ TS AND 0.7 g.L⁻¹ CDW AND (C) 50 g.L⁻¹ TS AND 0.3 g.L⁻¹ CDW

	Biomass productivity (P_x) (g.L⁻¹.h⁻¹)	Substrate to biomass conversion factor (Y_{x/s}) (g_{cells}.g_{substrate}⁻¹)
Process A	0.0591	0.0370
Process B	0.1049	0.0656
Process C	0.0590	0.0564

By analyzing all three processes, process B yielded the most cell mass when compared to the other ones. Taking in consideration that the composition of all processes' media is the same, this can be due to the substrate/inoculum ratio being the most adequate for this growth process. Also, according to Melo (2016), the use of alternative sources of carbon, such as fresh juices, are viable methods in order to increase the cell mass yield, since the results are similar to those found in works using conventional carbon sources. Also, productivity over time is strictly related to nitrogen content in the medium, as stated by Valera (2019). Since the media used in the

processes were not supplemented, the delay in the fermenting process and inability to consume all the substrate might be justified by such conditions. Regarding the substrate to biomass conversion factor, process A had the least substrate consumption in order to generate a determinate amount of cells. However, this process occurred very slowly and it was not able to consume all the provided substrate. Also, Mendes (2013) reported that supplementation of sugar cane juice with yeast extract can positively impact the cell mass yield, as well as maintaining cell viability during the process.

4 CONCLUSIONS

As a means of obtaining viable probiotic yeast cells to be used in the pharmaceutical and food industry, the cultivation process using only unsupplemented fresh sugarcane juice showed great potential to be studied in future works. The cultivation of *Saccharomyces boulardii* using unsupplemented sugarcane juice presented different cell yields when changing the initial sugar and starter culture concentrations. When using higher starter culture concentrations, the total sugar consumption of the process had a steady and fast rate when compared with the low starter concentrations. Taking these results into consideration, the unsupplemented sugarcane juice can be used as a potential carbon source for probiotic yeast cell cultivation. Supplementation of this natural carbon source with other components might be used as a strategy to develop efficient and cheap yeast cell culture media.

REFERENCES

- AGU, C.V.; UJOR, V.; EZEJI, T.C. Allopurinol supplementation of the growth medium enhances the fermentation of lignocellulosic hydrolysates to ethanol by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. v. 14. p. 151-159. 2018.
- BERTRAND, E.; PASQUIER, C.; DUCHEZ, D.; et al. High-frequency, high-intensity electromagnetic field effects on *Saccharomyces cerevisiae* conversion yields and growth rates in a reverberant environment. **Bioresource Technology**. v. 260. p. 264-272. 2018.
- BOSSO, A.; SETTI, A. C. I., TOMAL, A. D.; et al. Substrate consumption and beta-galactosidase production by *Saccharomyces fragilis* IZ 275 grown in cheese whey as a function of cell growth rate. **Biocatalysis and Agricultural Biotechnology**. V. 21. 2019.
- EL ENSHASY, H.; Optimization of high cell density cultivation of (Probiotic/Biotherapeutic) yeast *Saccharomyces boulardii* adapted to dryness stress. **Deutsche Lebensmittel-Rundschau: Zeitschrift für Lebensmittelkunde und Lebensmittelrecht**. v. 104. p. 389-394. 2019.
- GABOARDI, G.; SANTOS, D.G.; MENDES, L.; et al. Bioremediation and biomass production from the cultivation of probiotic *Saccharomyces boulardii* in parboiled rice effluent. **Journal of Environmental Management**. v. 226. p. 180-186. 2018.
- GOLDSTEIN, E. J. C.; JOHNSON, S.J.; MAZIADÉ, P.J.; et al. Probiotics and prevention of *Clostridium difficile* infection. **Anaerobe**. v. 45. p. 114-119. 2016.
- GUERRA, N. P.; BERNARDEZ, P. F.; CASTRO, L. P. Fed-batch pediocin production on whey using different feeding media. **Enzyme and Microbial Technology**. v. 41. p. 397-406. 2007.
- JUTAKANOKÉ, R.; LEEPIPATPIBOON, N.; TOLIENG, V.; et al. Sugarcane leaves: Pretreatment and ethanol fermentation by *Saccharomyces cerevisiae*. **Biomass and Bioenergy**. v. 39. p. 283-289. 2012.
- KWOLEK-MIREK, M.; ZADRAG-TECZA, R. Comparison of methods used for assessing the viability and vitality of yeast cells. **FEMS Yeast Research**. v. 14. p. 1068-1079. 2014.
- MELO, A. L. M.; COSTA, W. A.; SILVA, R. K. P.; et al. Avaliação da cinética de crescimento e produção de biossurfactantes por *Candida guilliermondii* utilizando suco de caju como fonte de carbono. **Congresso Nacional de Pesquisa e Ensino em Ciências - CONAPESC, 2016, Campina Grande**. v. 1. 2016.

MENDES, T. A. O.; PINTO, L. M.; MENDES, D. S. O.; et al. Increase in yeast biomass production in batch and semi-continuous aerated propagators in the production of sugarcane spirit. **Brazilian Journal of Food Technology**. v. 16. p. 81-89. 2013.

MILLER, G.L.; Use of Dinitrosalicylic Acid Reagent for Determination of Reducing Sugar. **Analytical Chemistry**. v. 31. p. 426-428. 1959.

MURUAGA, M. L.; CARVALHO, K.G.; DOMÍNGUEZ, J.M.; et al. Isolation and characterization of *Saccharomyces* species for bioethanol production from sugarcane molasses: Studies of scale up in bioreactor. **Renewable Energy**. v. 85. p. 649-656. 2016.

OLIVEIRA, A. C. G.; SPOTO, M. H. F.; CANNIATTI-BRAZACA, S.G.; et al. Effects of heat treatment and gamma radiation on the characteristics of pure sugarcane juice and mixed with fruit juices. **Food Science and Technology**. v. 27. p. 863-873. 2007.

RAHMANI, P.; MORADZADEH, A.; FARAHMAND, F.; Giving probiotics to your children for gastrointestinal problems: In the light of scientific findings. **PharmaNutrition**. v. 10. 2019.

SAHU, O.; Assessment of sugarcane industry: Suitability for production, consumption and utilization. **Annals of Agrarian Science**. v. 16. p. 389-395. 2018.

SANTOSH, I.; ASHTAVINAYAK, P.; AMOL, D.; et al. Enhanced bioethanol production from different sugarcane bagasse cultivars using co-culture of *Saccharomyces cerevisiae* and *Scheffersomyces (Pichia) stipitis*. **Journal of Environmental Chemical Engineering**. v. 5. p. 2861–2868. 2017.

VALERA, M. J.; MORCILLO-PARA, M. A.; ZAGORSKA, I.; et al. Effects of melatonin and tryptophol addition on fermentations carried out by *Saccharomyces cerevisiae* and non-*Saccharomyces* yeast species under different nitrogen conditions. **International Journal of Food Microbiology**. v. 289. p. 174-181. 2019.

VILLOT, C.; MA, T.; RENAUD, D. L.; et al. *Saccharomyces cerevisiae boulardii* CNCM I-1079 affects health, growth, and fecal microbiota in milk-fed veal calves. **American Dairy Science Association – Journal of Dairy Science**. v. 102. p. 7011-7025. 2019.

ZHANG, Z.; XIONG, F.; WANG, Y. et al. Fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* in a one liter flask coupled with an external circulation ultrasonic irradiation slot: Influence of ultrasonic mode and frequency on the bacterial growth and metabolism yield. **Ultrasonics – Sonochemistry**. V. 54. P. 39-47. 2019.

CAPÍTULO 2
DESENVOLVIMENTO TECNOLÓGICO DE MICROCÁPSULAS CONTENDO
***Saccharomyces boulardii* E ESTUDO DE VIABILIDADE**

Desenvolvimento Tecnológico de Microcápsulas Contendo *Saccharomyces Boulardii* e Estudo de Viabilidade

Technological Development of Microcapsules Containing *Saccharomyces Boulardii* and Viability Study

RESUMO

O presente trabalho visou o desenvolvimento de microcápsulas contendo o microrganismo probiótico *Saccharomyces boulardii* através da técnica de *Spray drying*. Foram desenvolvidas 4 formulações distintas em associação com prebióticos: M1 – utilizando maltodextrina como agente encapsulante, M2 – utilizando inulina como agente encapsulante, M3 – associando maltodextrina e inulina como agentes encapsulantes, e FC - células sem material encapsulante para fins de controle, todas adicionadas de caldo de cana-de-açúcar *in-natura* para aumento de viabilidade. As formulações de microcápsulas foram caracterizadas quanto às suas propriedades físicas e submetidas à avaliação de viabilidade do probiótico, bem como a estabilidade da formulação. Para análise de estabilidade microbiológica, foram feitas contagens das células viáveis das microcápsulas durante um período de armazenamento de 30 dias a 4 °C e a 25 °C. A avaliação física das microcápsulas incluiu análises de morfologia, difração de raios-X e propriedades térmicas. Quando comparadas às células de probiótico sem material encapsulante, todas as três formulações de microcápsulas demonstraram um aumento considerável de viabilidade celular e estabilidade de formulação. As microcápsulas produzidas com inulina (M2) e maltodextrina enriquecida com inulina (M3) mostraram contagens celulares superiores às demais fórmulas durante todo o tempo de armazenamento, bem como uma maior eficiência durante o processo de encapsulação. Quando submetidas à difração de raios-X, nenhuma formulação apresentou a presença de cristais, sendo assim caracterizadas como amorfas. As análises térmicas realizadas demonstraram um aumento de estabilidade térmica nas formulações contendo inulina (M2 e M3). Embora a formulação contendo somente inulina (M2) teve a maior resistência ao tratamento térmico, a associação entre maltodextrina e inulina (M3) apresentou maior estabilidade de armazenamento e eficiência de encapsulação, bem como resultados de análise térmica muito próximos à M2. Estes resultados sugerem que o enriquecimento destas formulações biofarmacêuticas com prebióticos é uma alternativa válida para a produção de microcápsulas de alta estabilidade microbiológica.

Palavras-chave: microencapsulação, *spray drying*, *Saccharomyces boulardii*, probióticos, inulina.

ABSTRACT

The present study aimed at the development of microcapsules containing the probiotic microorganism *Saccharomyces boulardii* through the spray drying technique. 4 different formulations were developed in association with prebiotics: M1 - using maltodextrin as an encapsulating agent, M2 - using inulin as an encapsulating agent, M3 - associating maltodextrin and inulin as an encapsulating agent, and FC - cells without encapsulating material for control purposes, all added of raw sugarcane juice to increase viability. The microcapsule formulations were characterized in terms of their physical properties and subjected to the probiotic viability assessment, as well as the stability of the formulation. For microbiological stability analysis, viable cells of microcapsules were counted during a 30-day storage period at 4 °C and 25 °C, and the physical evaluation included analyzes of morphology, X-ray diffraction and thermal properties. When compared to probiotic cells without encapsulating material, all three microcapsule formulations demonstrated a considerable increase in cell viability and formulation stability. The microcapsules produced with inulin (M2) and maltodextrin enriched with inulin (M3) showed cell counts superior to the other formulas during the entire storage time, as well as greater efficiency during the encapsulation process. When submitted to X-ray diffraction, no formulation presented the presence of crystals, thus being characterized as amorphous. The thermal analyzes performed demonstrated an increase in thermal stability in formulations containing inulin (M2 and M3). Although the formulation containing only inulin (M2) had the greatest resistance to heat treatment, the association between maltodextrin and inulin (M3) showed greater storage stability and encapsulation efficiency, as well as results of thermal analysis very close to M2. These results suggest that the enrichment of these biopharmaceutical formulations with prebiotics is a valid alternative to produce microcapsules with high microbiological stability.

Keywords: microencapsulation, spray drying, *Saccharomyces boulardii*, probiotics, inulin.

1 INTRODUCTION

Probiotic microorganisms are defined as live microorganisms, which when consumed in adequate amounts, confer a health effect on the host (FAO/WHO, 2001). These organisms are employed in the prevention and recovery of many gastrointestinal infections as well as in the immune system improvement. Among the many microorganisms administered with this objective, *Saccharomyces boulardii* is one of the most commonly used (ARSLAN et al., 2015).

Due to the extreme conditions found in the gastrointestinal tract, such as very low pH, digestive enzymes and bile salts, probiotic microorganisms can easily lose their viability once they reach this kind of environment. For the probiotic cells to reach the colon – where the beneficial effect will take place – the microorganism must survive these adverse conditions, which is why several protection mechanisms were developed, such as microencapsulation (ARSLAN; ERBAS, 2017).

According to Lozinska (2020), “Microencapsulation is a set of techniques, which allows for small solid particles with a core made of active substances to be created. The wall of the microcapsule provides the physical barrier between core and environment.” *Spray drying* is the most commonly used microencapsulation technique due to its low cost, flexibility, reproducibility and quick particle formation. It is widely used in the food industry to produce powdered-form ingredients. (LUCAS et al., 2019).

One of the most common wall materials used for microencapsulation is maltodextrin, due to its relatively low cost and neutral physical properties, as well as good preservation of the probiotic effect (SURYABHAN; LOHIT; ANU-APPAIAH, 2019). In order to increase the probiotic effect, prebiotics are often used as a supplement for the wall material. Inulin is a prebiotic obtained from many plant species such as artichoke and chicory root, as well as synthesized from sucrose (BENGOECHEA et al., 2019)

As reported by Kyriakoudi (2018), microencapsulation with maltodextrin resulted in increased stability of compounds, as well as increased thermal and gastrointestinal resistance. Bernucci (2017) also described that microencapsulation of probiotic microorganisms has a positive effect on the survival through the GIT, ensuring cell protection and integrity while in extreme conditions. This also allows for the probiotic cell to be added to food and pharmaceutical products without losing its

original properties. In the same context, Suryabhan (2019) showed that sucrose supplementation on maltodextrin microcapsules increased the survival of probiotic yeast cells in these formulations. Taking these results into account, and with Brazil being the world's biggest sugarcane producer, fresh sugarcane juice was implemented in the formulations presented in this work in order to increase the viable cell counts of the probiotic. Following previous studies, such as the association of maltodextrin with oligosaccharides prebiotics in microcapsules, and since the supplementation of maltodextrin with prebiotics and proteins have showed to increase stability and probiotic properties of various active components (ZHANG et al., 2018), these materials were used in the formulations presented in this work. In this context, the aim of this work is to evaluate the increased viability of an active pharmaceutical component through production and characterization of different microcapsule formulations, evaluating the use of maltodextrin supplemented with inulin and fresh sugarcane juice as a potential wall material, in order to provide a low-cost and widely available material to increase *Saccharomyces boulardii* GIT viability and storage stability.

2 MATERIALS AND METHODS

A suspension of probiotic cells of *Saccharomyces boulardii* (10^9 CFU.mL⁻¹) was used as the main component of the spray dried microcapsules. The suspension was the result of a biotechnological process using a 10-liter bioreactor, which was then centrifuged and concentrated into 50 mL of a 10^9 CFU.mL⁻¹ *Saccharomyces boulardii* suspended in sterile water. The wall materials chosen as encapsulating agents were maltodextrin and inulin. Sugar cane juice was added to the formulation to increase the viability of the final product (SURYABHAN; LOHIT; ANU-APPAIAH, 2019).

2.1 PREPARATION OF DRYING SUSPENSIONS

Four suspensions of 50 mL each were prepared: FC (10 mL of yeast suspension, 1 mL of sugar cane juice), M1 (10 mL of yeast suspension, 1 mL of sugar cane juice and 10 g of maltodextrin), M2 (10 mL of yeast suspension, 1 mL of sugarcane juice and 10 g of inulin) and M3 (10 mL of yeast suspension, 1 mL of

sugarcane juice, 5 g of maltodextrin and 5 g of inulin). Every formulation received sterile water in order to obtain 50 mL and the fresh sugarcane juice contained 0.3 g.mL⁻¹ of total solids. Designed formulations can be seen on Table 1:

TABLE 1 – FORMULATIONS OF MICROCAPSULES CONTAINING *Saccharomyces boulardii* AS BIOPHARMACEUTICAL ACTIVE INGREDIENT.

	<i>Saccharomyces boulardii</i> suspension (10 ⁹ CFU.mL ⁻¹) (0.15 g.mL ⁻¹)	Maltodextrin	Inulin	Fresh Sugarcane Juice (0.3 g.mL ⁻¹)
M1	10 mL	10 g	---	1 mL
M2	10 mL	---	10 g	1 mL
M3	10 mL	5 g	5 g	1 mL

2.2 SPRAY DRYING PROCESS

The spray drying process was performed using constant outlet temperature of 45 °C. The yeast suspensions were kept under magnetic agitation and were fed into the machine through a peristaltic pump set at a flow of 0,7 mL per minute, as well as a drying air flow of 0,15 m³ per minute. At the end of each process, the resulting powder was collected at the base of the equipment and recovered from the walls of each compartment, which were mixed thoroughly and stored into sterile polypropylene tubes.

In order to assess the effects of the different wall materials used in the process, a cell viability count was performed right after the spray drying process, as well as after 15 and 30 days of storage in both 4 °C and 25 °C temperatures. The resulting powders were also evaluated on their morphology, particle size, moisture contents, and were submitted to thermal analysis and powder x-ray diffraction.

2.3 ENCAPSULATION EFFICIENCY

The encapsulation efficiency (EE) was calculated as described by Petraityte (2019), as:

$$EE = (N/N_0) \times 100$$

where N is the number of viable cells (log CFU.g⁻¹) of dry matter contained inside the microcapsules, and N₀ is the number of viable cells (log CFU.g⁻¹) of dry matter before drying the suspensions.

2.4 CHARACTERIZATION OF SPRAY DRIED YEAST FORMULATIONS

After the spray drying process, in order to evaluate the physical alterations suffered by the yeast cells, as well as determining differences between the formulations viabilities, the obtained powders were submitted to the following analyses: Morphology, Differential Scanning Calorimetry (DSC), Thermogravimetric Analysis (TGA) and Powder X-ray diffraction (DRX).

2.4.1 MORPHOLOGY ANALYSIS

Morphology was observed using a Scanning electron microscope JEOL JSM 6360-LV (Jeol, Tokyo, Japan). Before visualization, the powder samples were placed on adhesive paper and coated with gold at 30 mA through 1m30s. Magnifications observed were of 3000 and 7000 times, for comparison purposes.

2.4.2 DIFFERENTIAL SCANNING CALORIMETRY ANALYSIS (DSC)

The DSC analysis of the microcapsules were performed using a shimadzu DSC-60 (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 2 mg of powder samples were placed in aluminum pans and analyzed under a dynamic synthetic air atmosphere of 50 mL.min⁻¹ and heated from 30 °C to 400 °C at a heating rate of 10 °C per minute. The equipment was previously calibrated with reference standards of zinc and indium.

2.4.3 THERMOGRAVIMETRIC ANALYSIS (TGA/DRTGA)

Thermogravimetry analysis were performed using a Shimadzu DTG-60 thermobalance (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 2 mg of samples were placed

in platinum pans under a dynamic synthetic air atmosphere of 50 mL.min⁻¹ and heated from 30 °C to 400 °C at a rate of 10 °C per minute. The equipment was calibrated with reference standard of calcium oxalate with declared purity of 99.99%

2.4.4 POWDER X-RAY DIFFRACTION ANALYSIS (XRD)

Powder X-ray diffraction was performed using a Shimadzu XRD-6000 diffractometer (Shimadzu, Kyoto, Japan). Approximately 10 mg of each sample were placed into a holder and inserted on the equipment. The scan range was set between 10 and 80°, scan angle of 2θ, scan speed of 2 degrees per minute and conditions of 40 kV voltage and 20 mA current.

2.5 STABILITY OF *Saccharomyces boulardii* AFTER MICROENCAPSULATION

To determine viable cell count after storage, samples of 0, 15 and 30 days of the microcapsules were resuspended in sterile water (1 g of spray dried formulation powder into 9 mL sterile water), diluted accordingly (1 mL of previous suspension into 9 mL of sterile water, with subsequent dilutions of the same proportion), plated into YPD agar (dextrose, tryptone, yeast extract and bacteriological agar, pH 5.6) and incubated at 37 °C for 48 hours.

3 RESULTS AND DISCUSSION

3.1 ENCAPSULATION EFFICIENCY

Maltodextrin, inulin, fresh sugarcane juice and their combinations were selected as wall materials in order to evaluate the effect of different polymers supplemented with sucrose when producing microcapsules containing *Saccharomyces boulardii* as bioactive ingredient. These associations were then submitted to spray drying process and then had their characteristics assessed by analytical methods. Table 2 shows the viable cell counts for *Saccharomyces boulardii* in the initial suspensions (before spray drying), in the microcapsules (after microencapsulation) produced with different wall materials and the respective encapsulating efficiency.

TABLE 2 – ENCAPSULATION EFFICIENCY OF *Saccharomyces boulardii* USING DIFFERENT ENCAPSULATION AGENTS.

Microcapsules	Log CFU.g⁻¹ Before drying process	Log CFU.g⁻¹ After drying process	Encapsulation Efficiency (EE)%
M1 (Maltodextrin)	9.81	7.47	76.14%
M2 (Inulin)	9.81	7.75	79.00%
M3 (Maltodextrin and Inulin)	9.81	8.44	86.03%

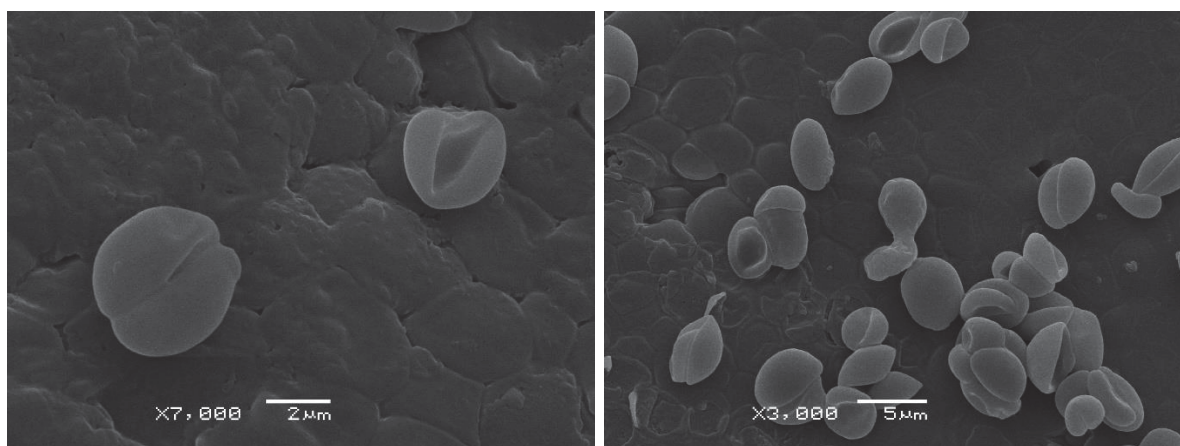
The results showed an increased viable cell count for the microparticles produced with maltodextrin and inulin (M3) when compared to the other formulations – M1 (maltodextrin) and M2 (inulin). In addition, the encapsulation efficiency of M3 was 7 to 10% higher when compared to the other microcapsules produced. When comparing only M1 and M2, the later showed an increased viable cell count and, therefore, in the encapsulation efficiency. This suggests that inulin can act as a thermoprotector agent during the spray drying process, increasing the yeast cells survival during the encapsulation (FRITZEN-FREIRE et al., 2012).

Also, Shao (2018) showed that microencapsulation using maltodextrin and different proteins had a significant positive impact on microencapsulation efficiency. Therefore, the components used in this study were shown to be appropriate wall materials for the encapsulation of *Saccharomyces boulardii*. Regarding the viable cell count, every microcapsule formulation presented a yield higher than the recommended in order to provide health benefits to the host, which is 10^6 CFU.g⁻¹ of the final product (PETRAITYTE; SIPALIENE, 2019). In addition, Garcia-Manrique et al (2019) stated that when testing wall materials with different molecular weights, differences tend to appear in encapsulation efficiency. Furthermore, interfering molecular groups that are contained in these materials, such as the amount of hydroxyl groups, also tend to interfere with the encapsulation efficiency due to interactions with the aqueous matrix used in these formulations.

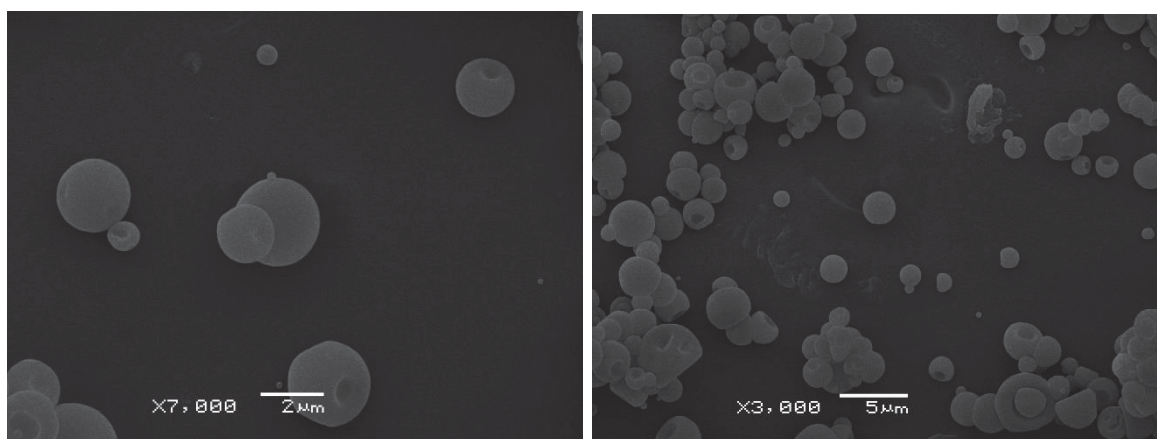
3.2 SCANNING ELECTRON MICROSCOPY (SEM)

The SEM micrographs of the *Saccharomyces boulardii* microparticles in association with different encapsulating agents can be seen on figure 1. The SEM has shown the absence of free yeast cells in the microcapsules powder, confirming the formation of microparticles for all formulations (M1, M2 and M3).

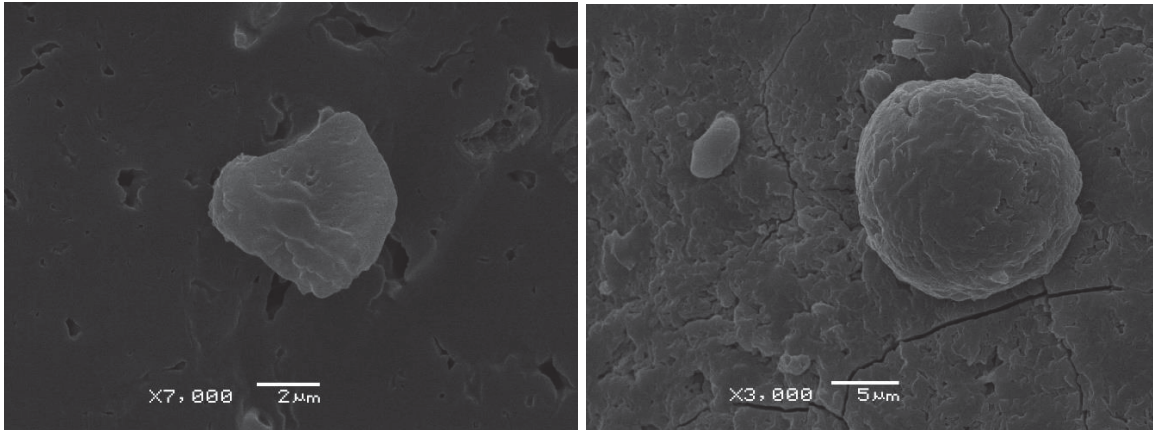
FIGURE 1 - MICROGRAPHS OF *Saccharomyces boulardii* MICROCAPSULES: (A) FREE CELLS (FC), (B) MALTODEXTRIN (M1), (C) INULIN (M2) AND (D) MALTODEXTRIN AND INULIN (M4).



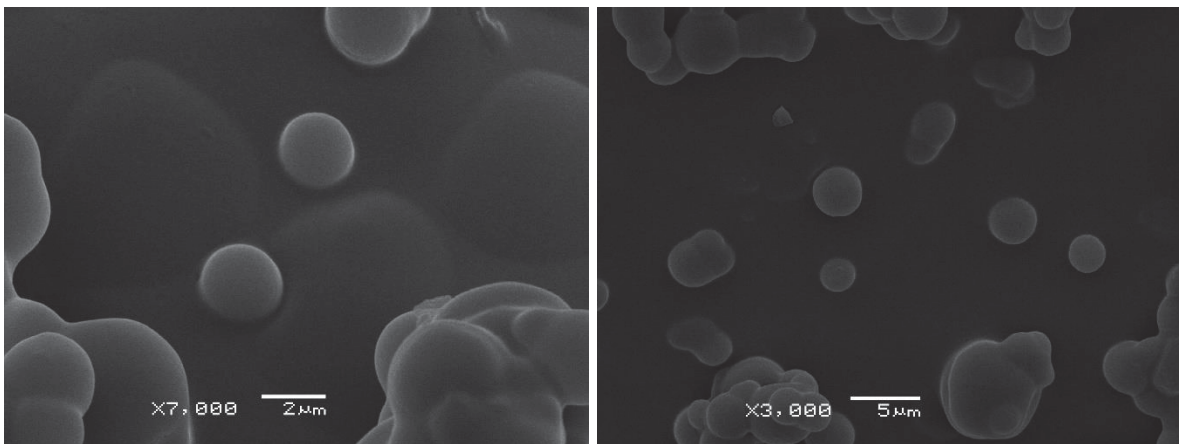
(A)



(B)



(C)



(D)

Analyzing the morphology of free *S. boulardii* cells submitted to spray drying, the damage this process can cause to unprotected microorganisms becomes clear. Also, when comparing the FC formulation to *S. boulardii* cells that were not submitted to the spray drying process - as documented by Krasowska et al (2019) - cell damage, outer membrane rupture and changes to natural cell morphology become very evident. In accordance to results shown by Pinto (2015), particles obtained from the same formulation had different sizes and showed a spherical shape, as well as some concavities, which are well-known characteristics of spray dried products. Microparticles obtained from the M2 formulation had the most surface disruption among all three formulations, suggesting the exit of heat and volatile components when submitting microorganisms to the spray drying process (LIAN, HSIAO, CHOU, 2012).

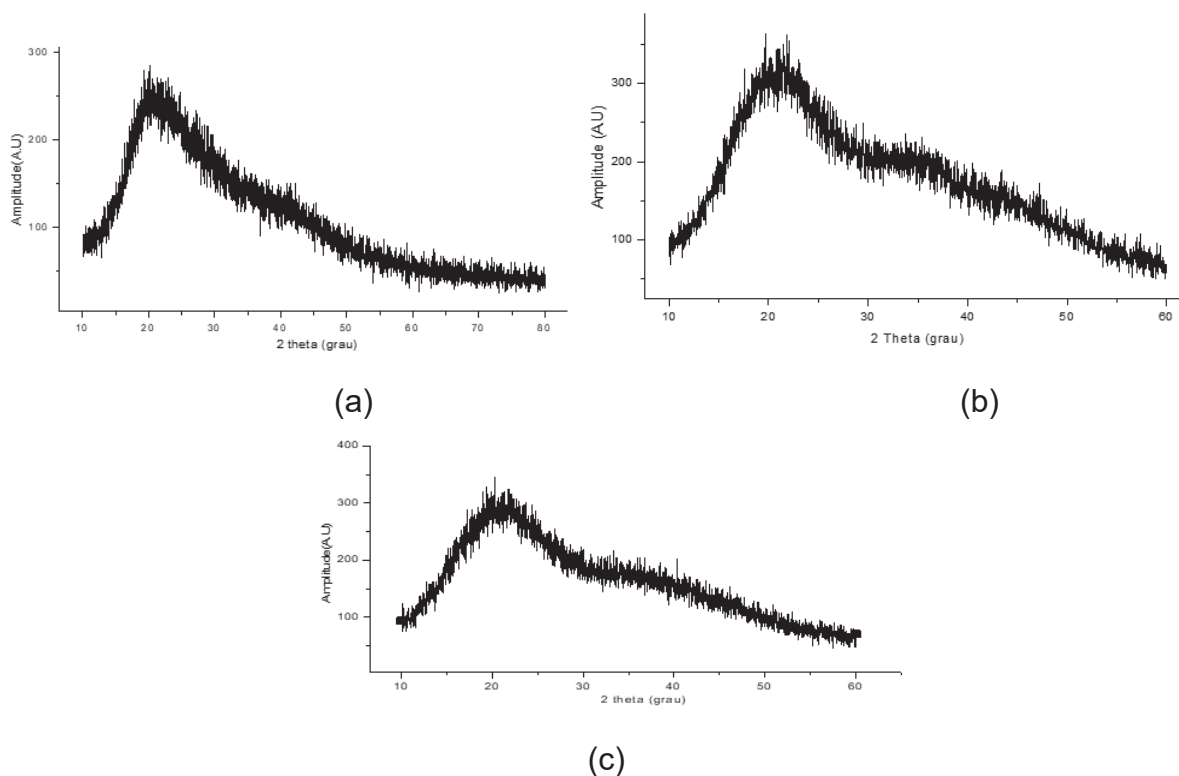
The same phenomenon occurs to form concavities on the surface of the particles, as reported by Saéñz (2009) – Formation of these depressions in the surface of spray dried microcapsules is due to the fact shrinkage of the particles during the drying process, a result of the rapid evaporation of liquid drops present in the formulation. The cells without encapsulating agent (FC) were the most damaged by the spray drying process and were used as control.

M1, M2 and M3 were completely coated by the wall materials and showed surface integrity and constant format. Maltodextrin and inulin microcapsules are in accordance with particles shown by Nawas (2019) and Ding (2020), where the results indicated that when using low molecular weight carbohydrates as carrier agents, more smooth and spherical particles were produced, whereas carbohydrates with high molecular weight could cause more particle shrinkage and end up collapsing due to their film-forming characteristic.

3.3 POWDER X-RAY DIFFRACTION

The X-ray diffractograms of the *Saccharomyces boulardii* microparticles in association with different wall materials can be seen on figure 2.

FIGURE 2 – X-RAY DIFFRACTOGRAMS OF MICROCAPSULES PRODUCED WITH: (A) MALTODEXTRIN (M1), (B) INULIN (M2) AND (C) MALTODEXTRIN AND INULIN (M3).



According to the diffractograms, every formulation resulted in amorphous microparticles. This suggests that neither the fresh sugarcane juice nor the encapsulating agents provided a crystalline structure to the yeast cells. Amorphous structure observed in both microcapsules are in accordance to particles shown by Barroso (2013).

The diffractograms containing amorphous material present large and diffuse peaks due to the fact that molecules in an amorphous state are displayed out of order and, therefore, produce dispersed bands, which contrasts with any crystalline materials that may be in association with the active ingredient, materials which would yield sharp and defined peaks because of the highly ordered state of the molecules. According to further reports by Barroso et al (2013), the amorphous state of particles has higher internal energy and higher solubility, mainly due to the fact of less molecules packing together, unsaturated binding, and lack of arrangement. As stated by previous works, powders containing amorphous structures may yield advantages when used in the pharmaceutical and food industry, since one of their main properties is high dispersibility in water (YU, 2001).

3.4 THERMAL ANALYSIS (DSC AND TGA)

The produced microcapsules (M1, M2 and M3) were evaluated by their thermal behavior and the results can be observed in the DSC and TGA/DrTGA curves showed by figure 3.

FIGURE 3 - DSC (_____) (SOLID LINE) AND TGA (- - -) (THICK DASHED LINE) / DRTGA (.....) (THIN DASHED LINE) CURVES OF *Saccharomyces boulardii* MICROCAPSULES PRODUCED WITH: (A) FREE CELLS, (B) MALTODEXTRIN (M1), (C) INULIN (M2) AND (D) MALTRODEXTRIN WITH INULIN (M3)

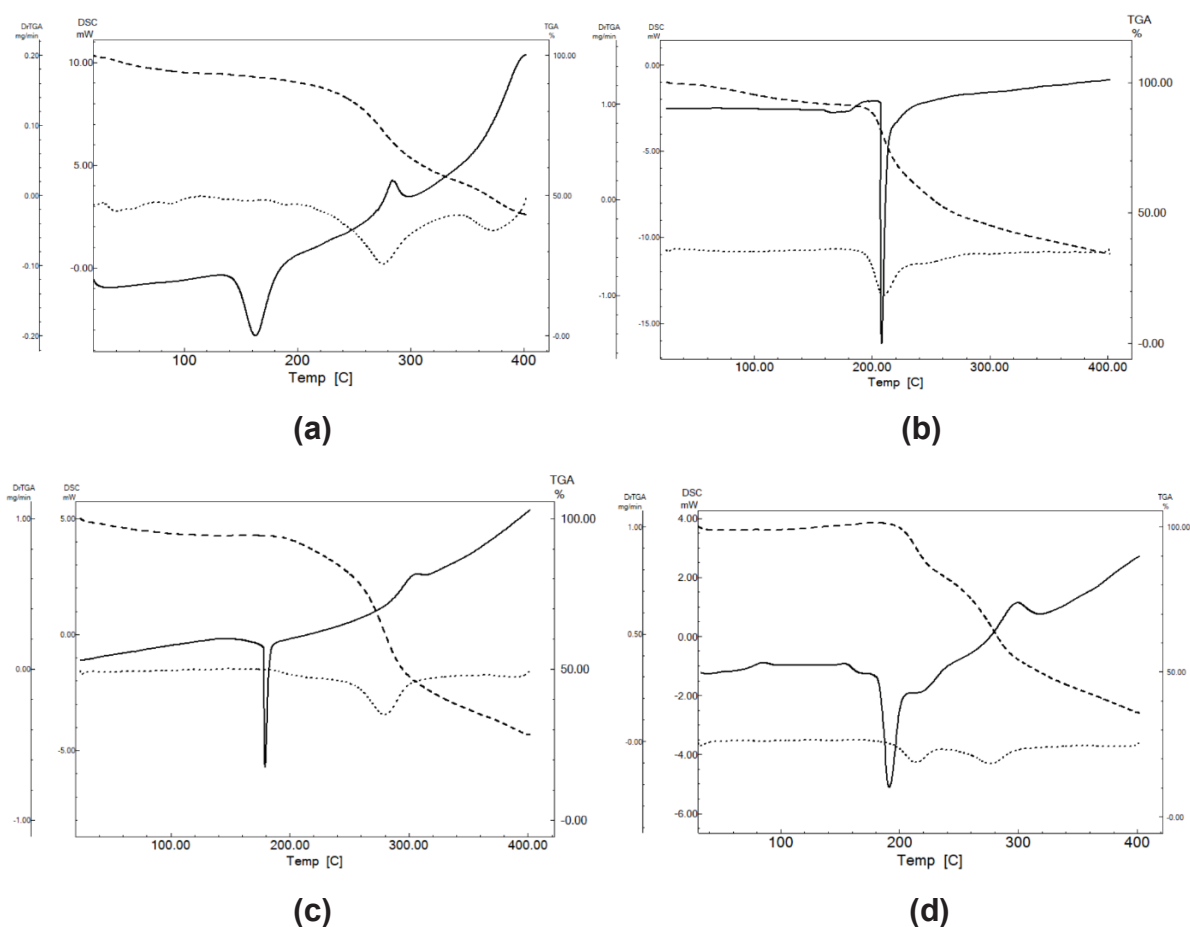


Table 3 displays the values of T_{peak} , T_{onset} and T_{endset} temperatures, as well as the results of enthalpy change when submitting the formulations for DSC. It can be noted that the fusion-like transition temperatures and enthalpies variations have changed for the produced microcapsules when compared to the Free Cells control.

TABLE 3 - DSC OF MICROCAPSULES AND FREE CELLS SHOWING T_{PEAK} , T_{ONSET} , T_{ENDSET} AND ENTHALPY (ΔH) MEASUREMENTS.

Formulations	T_{peak} (°C)	T_{onset} (°C)	T_{endset} (°C)	ΔH (J.g⁻¹)
FC	163.00	147.25	180.12	-123.66
M1	179.16	178.14	182.38	-41.39
M2	208.27	206.95	211.82	-132.66
M3	190.08	188.11	195.69	-86.32

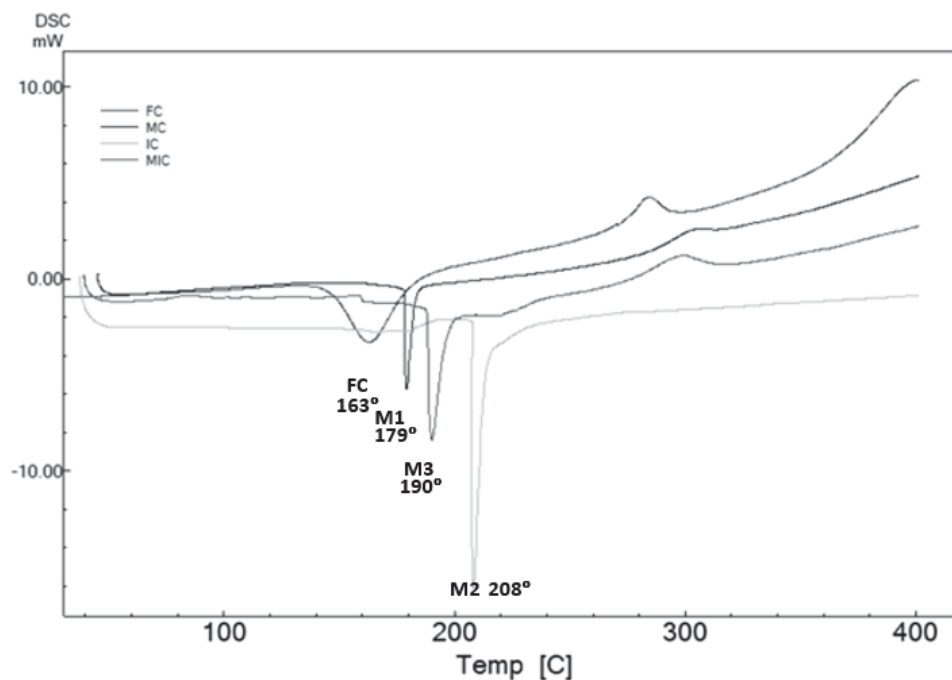
(FC) Free cells, (M1) microcapsules with maltodextrin, (M2) microcapsules with Inulin and (M3) microcapsules with maltodextrin and inulin.

For all four formulations, the first curve (A) shows one well-defined endothermic event, most likely correspondent to a fusion-like state transition of the microcapsules. The wideness of (a) peak corresponds to the fusion-like transition of a complex matrix, due to the fact that the cells are unprotected and therefore a not-uniform melting of the probiotic takes place. Every other formulation showed a narrower peak due to the presence of well-defined encapsulation agents. Every subsequent thermal event corresponds to gradual decomposition of the different matter present in the formulations. When comparing thermal analysis curves of the microcapsules (M1, M2 and M3) and Free Cells in figure 4, the cells which did not receive encapsulating agents had the lowest phase transition temperature, 163 °C.

When coated with wall materials, the microcapsules increased their phase transition temperature to 179 °C (M1), 190 °C (M3) and 208 °C (M2), as stated by their higher T_{peaks} . DSC of free probiotic cells match the probiotic fingerprinting reported by Razafindralambo (2019).

Also, since sucrose was added on every formulation through fresh sugarcane juice, thermal decomposition of the microcapsules might have been reduced after the spray drying process, as reported by Morrow (2019).

FIGURE 4 – COMPARATIVE DSC BETWEEN FREE CELLS (FC), MALTODEXTRIN (M1), INULIN (M2) AND MALTODEXTRIN AND INULIN (M3).



The weight loss in the decomposition steps with its respective temperature range and DTG_{peak} temperature are shown in Table 4.

TABLE 4 - TGA OF MICROCAPSULES AND FREE CELLS SHOWING WATER WEIGHT LOSS, Δm AND DTG_{PEAK} MEASUREMENTS.

Formulations	Water weight loss		
	(%)	Δm (%)	DTG _{peak} (°C)
FC	5.065	33.26	274.92
M1	3.936	43.39	279.67
M2	5.062	33.50	209.77
M3	0.065	48.86	213.84

(FC) Free cells, (M1) microcapsules with maltodextrin, (M2) microcapsules with Inulin and (M3) microcapsules with maltodextrin and inulin.

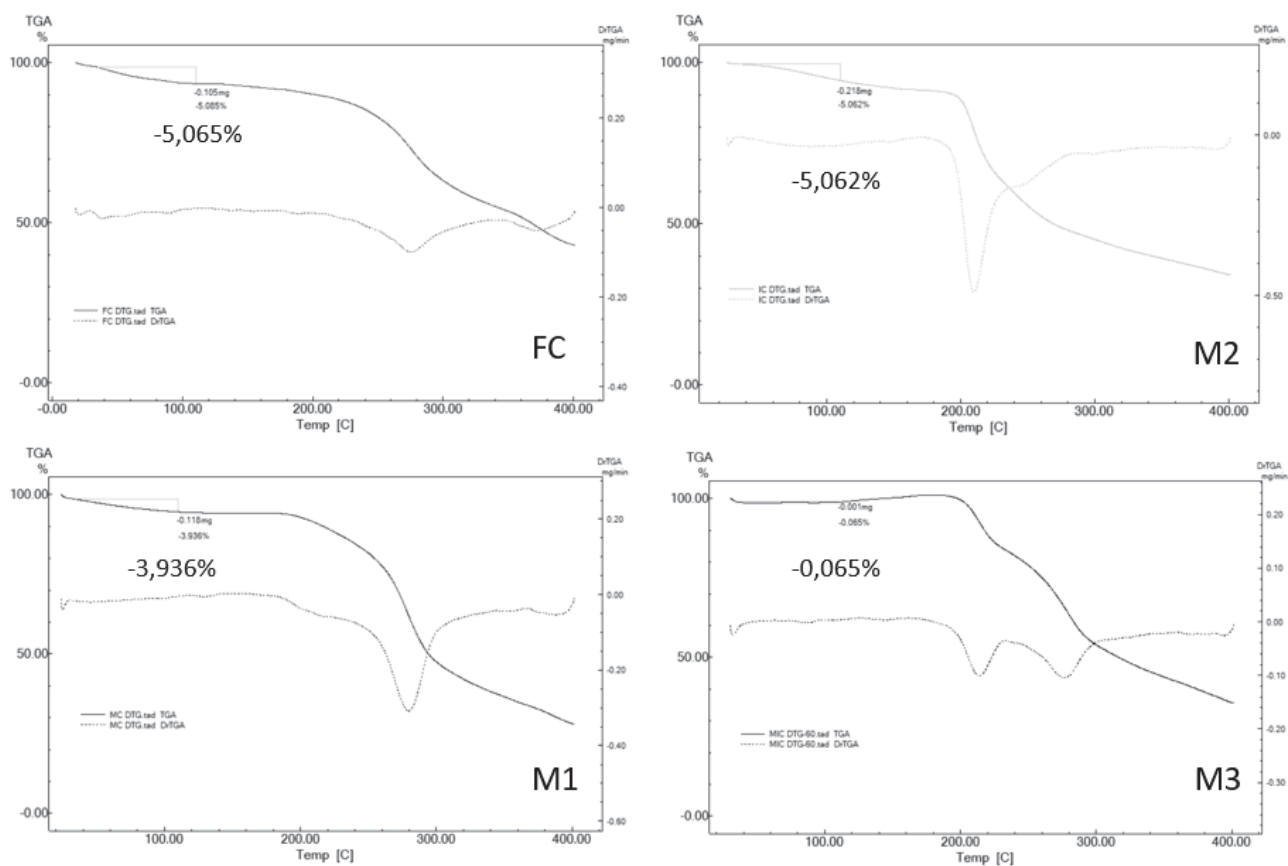
The TGA/DrTGA curves showed two different stages, which can be seen on figure 5. The first one being the loss of water weight, occurring between 30 and 105 °C, and the second being the decomposition process of the matter, which occurs in

either one or two steps, depending on the analyzed sample. Both FC and M2 had a humidity loss of 5% in the first stage, while M1 had a 3.9% loss and M3 had a <1% loss. Also, the decomposition stages of the analysis remained constant for all microcapsules and free cells, which correspond to the degradation of material constituent such as proteins and carbohydrates (PINTO et al, 2015).

The thermal behavior of inulin was also shown by Leone (2014), in which it degrades in three different steps, two of which were reproduced in this work. Bohm (2004) also stated that the degradation of the fructose chains presents in inulin occurs near the temperature of 213 °C, close to the phase transition temperature of the inulin-only based microcapsules.

As for maltodextrin behavior, Laczkowski (2013) described the increase in stability of certain agents when used as wall material, similar to the results found in this work. Also, M3 showed 2 very distinct decomposition stages which peaked at 214 °C and 276 °C, respectively. This indicates decomposition of the two distinct materials used to formulate this microcapsule, being an intermediate between M1 and M2 decomposition stages.

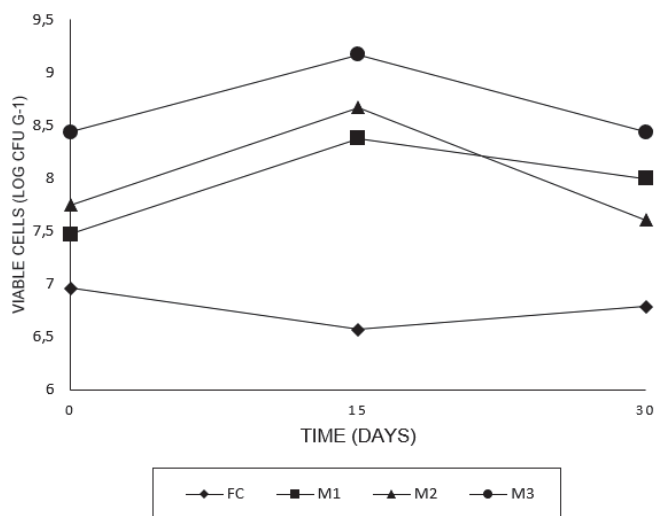
FIGURE 5 – COMPARATIVE TGA BETWEEN FREE CELLS (FC), MALTODEXTRIN (M1), INULIN (M2) AND MALTRODEXTRIN AND INULIN (M3)



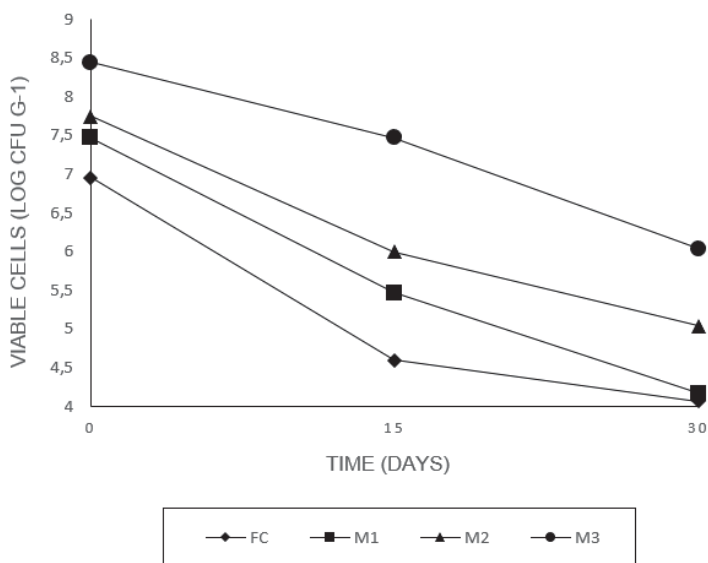
3.5 VIABILITY OF MICROENCAPSULATED *Saccharomyces boulardii* AFTER SPRAY DRYING AND DURING STORAGE TIME

The effects of different encapsulating materials on the viability of *Saccharomyces boulardii* microcapsules during storage at 4 °C and at 25 °C is shown in figure 6 (a) and (b), respectively.

FIGURE 6 - EFFECTS OF DIFFERENT ENCAPSULATING MATERIALS ON THE VIABILITY OF *Saccharomyces boulardii* MICROCAPSULES DURING 30-DAYS STORAGE TIME, AT 4 °C (A) AND AT 25 °C (B).



a) viability at 4 °C



b) viability at 25 °C

(FC) Free cells (M1): microcapsules with maltodextrin, (M2): microcapsules with Inulin (M3): microcapsules with maltodextrin and inulin.

When comparing microcapsules stored in both temperatures, the particles viability was maintained above the recommended 10^6 CFU.g⁻¹ when stored under 4

°C during the period of 30 days. However, when stored under 25 °C, both FC (free cells) and M1 (maltodextrin) showed a decrease in viability below the recommended value after 15 days. In both temperatures M3 maintained the highest viability value throughout the 30-day period, suggesting that the association of maltodextrin with inulin as protecting agent helps the yeast cells to survive longer during storage, which is in accordance to microencapsulation studies reported by Sarkar (2017). During 4 °C storage, M1, M2 and M3 showed an increase in viability during the first 15 days, which is a result of cell recovery after the damage induced by the spray drying process, since the technique used to produce the powder have an influence on the cell viability (SIMPSON et al., 2005).

4 CONCLUSIONS

The coating of *Saccharomyces boulardii* with both maltodextrin and inulin increased the encapsulation efficiency and initial viability of the yeast, as well as during the 30-day storage period. The microparticles maintained the yeast's amorphous structure after the encapsulation process. Regarding thermal treatment, the entrapment of the cells within wall materials provided a higher resistance when exposed to high temperatures when compared to the free cells. The microcapsules formulated with maltodextrin and inulin showed the highest decrease in water weight loss during thermogravimetric analysis, as well as good improvement during the DSC phase transition stage, along with M2 (inulin only). Considering these results, the microcapsules designed with inulin-enriched maltodextrin showed great potential in improving the probiotic capabilities of *Saccharomyces boulardii* yeast cells when used as an active ingredient in pharmaceutical preparations.

REFERENCES

- ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; et al. Microencapsulation of probiotic *Saccharomyces cerevisiae* var. *boulardii* with different wall materials by spray drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 63. p. 685-690. 2015.
- ARSLAN-TONTUL, S.; ERBAS, M.; Single and Double Layered Microencapsulation of Probiotics by Spray Drying and Spray Chilling. **LWT - Food Science and Technology**. v. 81. p. 160-169. 2017.
- BARROSO, A. K. M.; PIERUCCI, A. P. T. R.; FREITAS, S. P.; et al. Oxidative stability and sensory evaluation of microencapsulated flaxseed oil. **Journal of Microencapsulation**. v. 31. p. 193-201. 2013.
- BENGOECHEA, C.; LOPEZ-CASTEJON, M. L.; MARQUEZ, S.; et al. Gelation Properties of Calcium-inulin Gels. **Food Hydrocolloids**. v. 97. 2019.
- BOHM, A.; KAISER, I.; TREBSTEIN, A.; HENLE, T. Heat-induced degradation of inulin. **European Food Research and Technology**, v.220, p.466–471, 2005.
- DING, Z.; TAO, T.; YIN, X.; et al. Improved encapsulation efficiency and storage stability of spray dried microencapsulated lutein with carbohydrates combinations as encapsulating material. **LWT - Food Science and Technology**. v. 124. 2020
- FAO/WHO. Probiotics in Food - Health and Nutritional Properties and Guidelines for Evaluation. **FAO – Food and Nutrition Paper**. V. 85. 2001.
- FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C.; et al. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**. v.45. p.306-312. 2012.
- GARCÍA-MANRIQUE, P.; MACHADO, N. D.; FERNÁNDEZ, M. A.; et al. Effect of drug molecular weight on niosomes size and encapsulation efficiency. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**. v. 186. 2019.
- KRASOWSKA, A.; MURZYN, A.; DYJANKIEWICZ, A.; et al. The antagonistic effect of *Saccharomyces boulardii* on *Candida albicans* filamentation, adhesion and biofilm formation. **FEMS yeast research**. v. 9. p. 1312-1321. 2009.
- KYRIAKOUDI, A.; TSIMIDOU, M. Z.; Properties of encapsulated saffron extracts in maltodextrin using the Büchi B-90 nano spray-dryer. **Food Chemistry**. v. 266. p. 458-465. 2018.
- LEONE, R. S.; COLMAN, T. A. D.; SCHNITZLER, E.; et al. Evolved gas analysis (coupled TG–DSC–FTIR) applied to the thermal behaviour of inulin. **Journal of Analytical and Applied Pyrolysis**. v. 71. p. 215-224. 2014.

LIAN, W.; HSIAH, H.; CHOU, C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**. v. 74. p. 79-86. 2002.

LOZINSKA, N.; GLOWACZ-ROSYNSKA, A.; ARTICHOWICZ, W.; et al. Microencapsulation of Fish Oil – Determination of Optimal Wall Material and Encapsulation Methodology. **Journal of Food Engineering**. v. 268. 2020.

LUCAS, J.; RALAIVAO, M.; ESTEVINHO, B.N.; et al. A New Approach for the Microencapsulation of Curcumin by a Spray Drying Method, in Order to Value Food Products. **Powder Technology**. v. 362. p. 428-435. 2020.

MORROW, E. A.; TERBAN, M. W.; LEE, J. W.; et al. Investigation of thermal decomposition as a critical factor inhibiting cold crystallization in amorphous sucrose prepared by melt-quenching. **Journal of Food Engineering**. v. 261. p. 87-99. 2019.

NAWAS, T.; AZAM, M. D.; RAMADHAN, A. H.; et al. Impact of Wall Material on the Physicochemical Properties and Oxidative Stability of Microencapsulated Spray Dried Silver Carp Oil. **Journal of Aquatic Food Product Technology**. v. 28 p. 49-63. 2019.

PETRAITYTE, S.; SIPALIENE.; A. Enhancing Encapsulation Efficiency of Alginate Capsules Containing Lactic Acid Bacteria by Using Different Divalent Cross-linkers Sources. **LWT - Food Science and Technology**. v. 110. p. 307-315. 2019.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BENEDETTI, S.; et al. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect Bifidobacterium-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**. v. 67. p. 400-408. 2015.

RAZAFINDRALAMBO, H.; RAZAFINDRALAMBO, A.; BLECKER, C. Thermophysical Fingerprinting of Probiotic-Based Products. **Scientific Reports**. v. 9. 2019.

SAÉNZ, C.; TAPIA, S.; CHÁVEZ, J.; ROBERT, P. Microencapsulation by spray drying of bioactive compounds from cactus pear (*Opuntia ficus-indica*). **Food Chemistry**. v.114, p. 616-622. 2009.

SARKAR, S.; KIM, B.; Analysis of graphene-encapsulated polymer microcapsules with superior thermal and storage stability behavior. **Polymer Degradation and Stability**. v. 138. p. 72-81. 2017.

SHAO, P.; XUAN, S.; WU, W.; et al. Encapsulation efficiency and controlled release of *Ganoderma lucidum* polysaccharide microcapsules by spray drying using different combinations of wall materials. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 125. p. 962-969. 2018.

SIMPSON, P. J.; STANTON, C.; FITZGERALD, G. F.; ROSS, R. P. Intrinsic tolerance of *Bifidobacterium* species to heat and oxygen and survival following spray drying and storage. **Journal of Applied Microbiology**, v.99, p.493-501, 2005.

SURYABHAN, P.; LOHITH, K.; ANU-APPAIAH, K.A. Sucrose and Sorbitol Supplementation on Maltodextrin Encapsulation Enhance the Potential Probiotic Yeast Survival by Spray Drying. **LWT - Food Science and Technology**. v. 107. p. 243-248. 2019.

YU, L. Amorphous pharmaceutical solids: preparation, characterization and stabilization. **Advanced Drug Delivery Reviews**. v. 48. p. 27-42. 2001.

ZHANG, L., ZHENG, X., FU, N.; et al. Maltodextrin: A consummate carrier for spray-drying of xylooligosaccharides. **Food Research International**. v. 106. p. 383-393. 2018.