

Fabiane Picinin de Castro Cislaghi

**SORO DE LEITE COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE  
*Bifidobacterium* BB-12 POR SPRAY DRYING**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Ciência dos Alimentos do Centro de Ciências Agrárias da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do Grau de Doutor em Ciência dos Alimentos.  
Orientador: Prof. Dr. Ernani S. Sant'Anna

Florianópolis  
2012

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,  
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária  
da UFSC.

Castro-Cislaghi, Fabiane Picinin de  
Soro de leite como agente encapsulante de  
Bifidobacterium BB-12 por spray drying [tese] / Fabiane  
Picinin de Castro-Cislaghi ; orientador, Ernani Sebastião  
Sant'Anna - Florianópolis, SC, 2012.  
129 p. ; 21cm

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa  
Catarina, Centro de Ciências Agrárias. Programa de Pós-  
Graduação em Ciência dos Alimentos.

Inclui referências

1. Ciência dos Alimentos. 2. soro de leite. 3.  
microencapsulação. 4. probióticos. 5. spray drying. I.  
Sant'Anna, Ernani Sebastião. II. Universidade Federal de  
Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Ciência dos  
Alimentos. III. Título.

Fabiane Picinin de Castro Cislighi

**SORO DE LEITE COMO AGENTE ENCAPSULANTE DE  
*Bifidobacterium* BB-12 POR *SPRAY DRYING***

Esta Tese foi julgada adequada para obtenção do Título de “Doutor”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos.

Florianópolis, 31 de julho de 2012.

---

Prof<sup>a</sup>. Roseane Fett, Dr<sup>a</sup>.  
Coordenadora do curso

**Banca Examinadora:**

---

Prof. Ernani S. Sant’Anna, Dr.  
Orientador

---

Prof<sup>a</sup>. Neila Silvia Pereira dos Santos Richards, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Maria

---

Prof<sup>a</sup>. Leonor Almeida de Souza Soares, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Pelotas

---

Prof<sup>a</sup>. Ana Carolina de Oliveira Costa, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof. Pedro Luiz Manique Barreto, Dr.  
Universidade Federal de Santa Catarina

---

Prof<sup>a</sup>. Edna Regina Amante, Dr<sup>a</sup>.  
Universidade Federal de Santa Catarina



## AGRADECIMENTOS

A Deus, por sempre iluminar meu caminho.

Ao meu amor Mauro César, pelo companheirismo, paciência e compreensão.

A minha família, principalmente aos meus pais, pelo apoio, incentivo e por sempre acreditarem em mim.

Ao Prof. Ernani, pela oportunidade, pela confiança e liberdade conferida a mim e por ter sido um orientador compreensivo.

A Carlise Beddin Fritzen-Freire pela amizade, auxílio nas análises e ajuda primordial na finalização deste trabalho.

A minha grande amiga Juliana Lorenz, que iniciou o trabalho de microencapsulação de probióticos no CAL, pelas dicas, por ter impresso e entregue todos os documentos e matrículas, diminuindo a distância entre Francisco Beltrão-Florianópolis, e pela amizade.

A minha grande amiga Camila Tavares, por ter compartilhado parte dessa trajetória e pelo apoio nos momentos difíceis.

A Carina dos Reis e Silva, pelo auxílio nas análises.

Aos colegas do CAL Valéria Limberger, Carla Mello, Deise Kolling e Eunice Ilha pelos momentos de descontração e incentivo.

Aos colegas da UTFPR-FB, especialmente à Cleusa Weber, por compartilhar o mesmo anseio de finalizar o doutorado e pelo incentivo.

À Universidade Tecnológica Federal do Paraná (UTFPR), em especial ao câmpus Francisco Beltrão e à COALM (Coordenação do curso superior de Tecnologia em Alimentos) pela flexibilização e apoio.

Aos professores e funcionários do Depto. de Ciência e Tecnologia dos Alimentos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Aos professores membros da banca, pela contribuição ao trabalho.

À CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior), ao CNPq (Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento) e à FINEP (Financiadora de Estudos e Projetos) pelo apoio financeiro.

A todos aqueles que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!



*“Nada é mais difícil de realizar, mais perigoso de conduzir, ou mais incerto quanto ao êxito, do que uma nova ordem das coisas, pois a inovação tem como inimigos todos os que prosperaram sob as condições antigas e, como tímidos aliados, os que podem se dar bem nas novas condições.”*

(Maquiavel)





## RESUMO

CASTRO CISLAGHI, Fabiane Picinin de. **Soro de leite como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying***. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

O soro de leite é o principal subproduto da indústria láctea. Apesar do seu elevado valor nutricional, o aproveitamento do soro de leite ainda é pequeno. Novas alternativas para utilização do soro são necessárias a fim de reduzir seu desperdício e a poluição ambiental causada quando não descartado adequadamente. O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*, comparando-o com a goma arábica, a qual é tradicionalmente utilizada na tecnologia de microencapsulação. O rendimento da microencapsulação e a viabilidade das microcápsulas durante o armazenamento foram determinados. Quando o soro de leite foi utilizado como agente encapsulante, o rendimento da microencapsulação foi maior e a viabilidade das células manteve-se elevada e constante durante doze semanas. A caracterização das microcápsulas foi realizada através da determinação da microestrutura, umidade, atividade de água, tempo para dissolução em água e em óleo e a cor. As microcápsulas obtidas com ambos agentes encapsulantes apresentaram diâmetros em torno de 11  $\mu\text{m}$  e formato esférico, com a presença de concavidades, típicas de produtos atomizados. O conteúdo de água residual e a  $A_w$  obtidos estão dentro dos limites para produtos atomizados e também dentro do recomendado para garantir a estabilidade microbiológica. O tempo para dissolução em óleo foi menor do que em água tanto para as microcápsulas produzidas com goma arábica quanto para as produzidas com soro. As microcápsulas elaboradas com soro de leite apresentaram dissolução mais rápida tanto em água quanto em óleo quando comparadas às microcápsulas com goma arábica. Ambas as microcápsulas apresentaram coloração clara, sendo observada tonalidade mais vermelha e amarela nas elaboradas com soro do que nas obtidas com goma arábica. Em um segundo momento, foi avaliada a sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas, a tolerância ao NaCl e a viabilidade durante o armazenamento das microcápsulas obtidas com soro de leite. Foi observada uma pequena redução na viabilidade de *Bifidobacterium* microencapsulada em pH baixo. Quanto à exposição à

bile, a microencapsulação com soro de leite não protegeu as células probióticas, no entanto, a viabilidade das microcápsulas permaneceu  $> 6$  log UFC/g mesmo após 24 horas de incubação na maior concentração de bile estudada. A microencapsulação não teve influência na suscetibilidade da cultura ao sal. Quando as microcápsulas foram adicionadas em sobremesa láctea, a população do probiótico manteve-se acima de 7 log UFC/g por 6 semanas. O soro de leite apresentou-se como um eficiente agente encapsulante de *Bifidobacterium* por *spray drying*.

**Palavras-chave:** Soro de leite. Microencapsulação. *Bifidobacterium*. Probióticos. *Spray drying*. Goma arábica.

## ABSTRACT

CASTRO CISLAGHI, Fabiane Picinin de. **Whey as the encapsulating agent of *Bifidobacterium* BB-12 by spray drying**. 2012. Tese (Doutorado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis – SC.

The whey is the main by-product of the dairy industry. Despite its high nutritional value, the use of the whey is still small. New alternatives of usage are required to reduce its waste and environmental pollution, which are caused if it is not disposed properly. The objective of this study was to evaluate the potential of liquid whey as the encapsulating agent *Bifidobacterium* BB-12 by spray drying, compared with arabic gum, which is typically used in microencapsulation technology. The microencapsulation yield and viability during storage were determined. When the whey was used as the encapsulating agent, the microencapsulation yield was higher, and cell viability remained high and steady for twelve weeks. The characterization of the microcapsules was performed by determining the microstructure, moisture, water activity, time for dissolution in water and in oil and by the color. The microcapsules obtained with both encapsulating agents had diameters of about 11  $\mu\text{m}$  and spherical shape, with the presence of dimples, which are typical in atomized product. The residual water content and  $A_w$  obtained are within the range for atomized products and also within the recommended range to ensure microbiological stability. The time for dissolution in oil was lower than in water, for the microcapsules made with gum arabic as much as for the ones which were produced with whey. Microcapsules prepared with whey had much more rapid dissolution in water and in oil, when compared to microcapsules with gum arabic. Both microcapsules showed clear color. It was observed more red and yellow shades in microcapsules made with whey than in those obtained with gum arabic. In a second step, it was evaluated the survival of microcapsules obtained with whey under simulated gastrointestinal conditions, their tolerance to NaCl and their viability during storage. The results showed a small decrease in the viability of microencapsulated *Bifidobacterium* at low pH. In relation to the exposure of *Bifidobacterium* to bile, microencapsulation with whey did not protect the probiotic cells; however, the viability of the microcapsules remained  $>6 \log \text{cfu/g}$ , even after 24 h of incubation at

the highest bile concentration analyzed. No growth was noted with either the free cells or the microencapsulated cells on MRS-LP with NaCl. The viability of the microcapsules stored at 4 °C remained high and constant for 12 weeks. When the microcapsules were added to a dairy dessert, the probiotic count remained above 7 log cfu/g for 6 weeks. The whey was shown to be an effective encapsulating agent of *Bifidobacterium* by spray drying.

**Keywords:** Whey. Microencapsulation. *Bifidobacterium*. Probiotics. Spray drying. Gum arabic.

## LISTA DE FIGURAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Figura 1. Etapas fundamentais no processo de microencapsulação. ....	35
Figura 2. Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas.....	36
Figura 3. Principal unidade repetitiva da Goma Arábica. ....	38
Figura 4. Principais etapas envolvidas no <i>spray drying</i> . ....	42
Figura 5. Padrões típicos de fluxo ar-produto em <i>spray dryers</i> .. ....	43

### ARTIGO I

Figura 1. Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada com goma arábica durante o armazenamento a 4°C (■) e a -18 °C (□). ....	53
Figura 2. Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada com soro de leite (○) e goma arábica (□) durante o armazenamento a 4 °C..	54

### ARTIGO II

Figura 1. Micrografias das microcápsulas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 obtidas pelo método de <i>spray drying</i> . ....	65
--	----

### ARTIGO III

Figura 1. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (○) livre e (●) microencapsulada por <i>spray drying</i> com soro de leite em (a) pH 6,0 (b) pH 4,0 (c) pH 3,0 e (d) pH 2,0.. ....	83
Figura 2. Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 (□) livre e (■) microencapsulada por <i>spray drying</i> com soro de leite em bile (a) 0% (b) 0,5% (c) 1%.....	85
Figura 3. Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada com soro de leite durante o armazenamento a 4 °C. ....	88
Figura 4. Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada com soro de leite em sobremesa láctea durante o armazenamento a 4 °C. ...	89



## LISTA DE TABELAS

### REVISÃO DE LITERATURA

Tabela 1. Principais proteínas do soro de leite. ....	24
Tabela 2. Valores de qualidade nutricional de algumas proteínas.....	24
Tabela 3. Variação percentual da composição dos soros doce e ácido.	27

### ARTIGO I

Tabela 1. Contagem de células viáveis de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 na solução de alimentação e pó obtido após <i>spray drying</i> , redução da viabilidade e rendimento da microencapsulação (EY). ....	51
--	----

### ARTIGO II

Tabela 1. Características das microcápsulas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 obtidas por <i>spray drying</i> com goma arábica e com soro de leite. ....	66
Tabela 2. Atributos de cor das microcápsulas de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 obtidas por <i>spray drying</i> com goma arábica e com soro de leite. ....	68





## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	23
<b>2.1 SORO DE LEITE</b> .....	23
2.1.1 Tipos de soro de leite .....	26
2.1.2 Poder poluente do soro .....	27
<b>2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS</b> .....	28
2.2.1 <i>Bifidobacterium</i> .....	29
2.2.2 Benefícios à saúde .....	30
2.2.3 Viabilidade.....	33
<b>2.3 MICROENCAPSULAÇÃO</b> .....	33
2.3.1 Agentes encapsulantes .....	36
2.3.1.1 Microencapsulação em goma arábica .....	37
2.3.1.2 Microencapsulação em soro de leite.....	39
2.3.2 Métodos de microencapsulação .....	40
2.3.2.1 <i>Spray drying</i> .....	41
<b>3 ARTIGO I</b> .....	47
<b>RESUMO</b> .....	47
<b>ABSTRACT</b> .....	48
<b>3.1 INTRODUÇÃO</b> .....	48
<b>3.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	49
<b>3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	50
<b>3.4 CONCLUSÃO</b> .....	54
<b>3.5 REFERÊNCIAS</b> .....	55
<b>4 ARTIGO II</b> .....	59
<b>RESUMO</b> .....	59
<b>ABSTRACT</b> .....	60
<b>4.1 INTRODUÇÃO</b> .....	60
<b>4.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	62
4.2.1 Cultura e preparação das células para microencapsulação	62
4.2.2 Elaboração do soro de leite .....	62
4.2.3 Produção das microcápsulas por <i>spray drying</i> .....	62
4.2.4 Caracterização das microcápsulas .....	63
4.2.4.1 <i>Análise de microestrutura</i> .....	63
4.2.4.2 <i>Umidade</i> .....	63
4.2.4.3 <i>Atividade de água</i> .....	63
4.2.4.4 <i>Dissolução</i> .....	63
4.2.4.5 <i>Cor</i> .....	63
4.2.5 <i>Análise estatística</i> .....	64

<b>4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>64</b>
<b>4.3.1 Caracterização das microcápsulas</b> .....	<b>64</b>
4.3.1.1 <i>Microestrutura</i> .....	64
4.3.1.2 <i>Umidade e Atividade de água</i> .....	66
4.3.1.3 <i>Dissolução</i> .....	67
4.3.1.4 <i>Cor</i> .....	68
<b>4.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>68</b>
<b>4.5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>69</b>
<b>5 ARTIGO III</b> .....	<b>75</b>
<b>RESUMO</b> .....	<b>75</b>
<b>ABSTRACT</b> .....	<b>76</b>
<b>5.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>76</b>
<b>5.2 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>78</b>
5.2.1 <b>Cultura e preparação das células para microencapsulação</b> .....	<b>78</b>
5.2.2 <b>Elaboração do soro de leite</b> .....	<b>79</b>
5.2.3 <b>Produção das microcápsulas por <i>spray drying</i></b> .....	<b>79</b>
5.2.4 <b>Enumeração de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 livre e encapsulada</b> .....	<b>79</b>
5.2.5 <b>Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em condições gastrointestinais simuladas</b> .....	<b>80</b>
5.2.5.1 <i>Condições ácidas</i> .....	80
5.2.5.2 <i>Bile</i> .....	80
5.2.6 <b>Tolerância ao sal</b> .....	<b>80</b>
5.2.7 <b>Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 durante o armazenamento</b> .....	<b>81</b>
5.2.8 <b>Viabilidade das microcápsulas em sobremesa láctea</b> .....	<b>81</b>
5.2.9 <b>Análise estatística</b> .....	<b>81</b>
<b>5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO</b> .....	<b>81</b>
5.3.1 <b>Sobrevivência de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 em condições gastrointestinais simuladas</b> .....	<b>81</b>
5.3.1.1 <i>Condições ácidas</i> .....	81
5.3.1.2 <i>Bile</i> .....	84
5.3.2 <b>Tolerância ao sal</b> .....	<b>85</b>
5.3.3 <b>Viabilidade de <i>Bifidobacterium</i> BB-12 microencapsulada durante o armazenamento</b> .....	<b>86</b>
5.3.4 <b>Viabilidade das microcápsulas em sobremesa láctea</b> .....	<b>88</b>
<b>5.4 CONCLUSÃO</b> .....	<b>90</b>
<b>5.5 REFERÊNCIAS</b> .....	<b>90</b>
<b>6 CONSIDERAÇÕES FINAIS</b> .....	<b>101</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Devido aos seus reconhecidos benefícios à saúde, os probióticos têm sido incorporados em uma variedade de alimentos como cereais (PITKÄLÄ et al., 2007), derivados da soja (WANG; YU; CHOU, 2004; EL-GAWAD et al., 2005), iogurtes e outros leites fermentados, queijos, sorvetes e sobremesas (ALAMPRESE et al., 2002; BOYLSTON et al., 2004; ANAL; SINGH, 2007; CRUZ et al., 2009a; LORENZ, 2009; FRITZEN-FREIRE et al., 2010).

No entanto, para exercer os efeitos benéficos à saúde, os probióticos devem permanecer viáveis no alimento até o momento do consumo em grandes quantidades, e ser capazes de sobreviver à passagem pelo trato gastrointestinal (GILLILAND, 1989; KAILASAPATHY; CHIN, 2000; DEL PIANO et al., 2006; SHAH, 2007). Segundo Del Piano et al. (2006) e Anal e Singh (2007) a baixa viabilidade desses microrganismos é o maior problema enfrentado pela indústria de alimentos.

A microencapsulação pode ser empregada para melhorar a viabilidade dos probióticos durante o processamento e armazenamento dos produtos (KHALIL; MANSOUR, 1998; TRUELSTRUP HANSEN et al., 2002; KIM et al., 2008). Segundo Mattila-Sandholm et al. (2002), a microencapsulação é a tecnologia que possibilita uma maior utilização dos probióticos em novos alimentos.

Mesmo que promissoras em escala laboratorial, as tecnologias desenvolvidas ainda apresentam sérias dificuldades para produção de microrganismos microencapsulados em grande escala (PICOT; LACROIX, 2004; LACROIX et al., 2005; ANAL; SINGH, 2007). Além disso, até o momento, as pesquisas têm focado principalmente na sobrevivência dos microrganismos em baixo pH e alta concentração de bile (ANAL; SINGH, 2007; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008; GBASSI et al., 2009). Segundo Doleyres e Lacroix (2005) e Gharsallaoui et al. (2007), muitas pesquisas ainda devem ser feitas em relação à escolha do material encapsulante de acordo com as propriedades físico-químicas do ingrediente a encapsular e as propriedades desejadas das microcápsulas.

Dos vários materiais que têm sido utilizados como agentes encapsulantes por *spray drying*, a goma arábica se destaca. Entretanto, cápsulas de goma arábica apresentam uma limitada barreira à oxidação, pois atuam como uma membrana semipermeável e sua permeabilidade ao oxigênio é um fator preponderante na vida útil do material encapsulado (GHARSALLAOUI et al., 2007). Nesse sentido, o

emprego de outros agentes encapsulantes se faz necessário para melhorar o processo de microencapsulação de probióticos.

Além do tradicional emprego do soro de leite na elaboração de bebidas lácteas (ALMEIDA; BONASSI; ROÇA, 2001; SIVIERI; OLIVEIRA, 2002; PENNA; OLIVEIRA; TAMIME, 2003; MAGENIS et al., 2006; CUNHA et al., 2008; CASTRO et al., 2009a; CASTRO et al., 2009b; CUNHA et al., 2009), novas e interessantes aplicações para o soro têm sido desenvolvidas. Um exemplo é o uso de proteínas do soro como encapsulantes ou coadjuvantes de encapsulação de componentes bioativos e funcionais como óleos essenciais, ômega-3 e microrganismos probióticos (SMITHERS, 2008).

Proteínas do soro de leite, na forma de concentrado ou isolado, têm sido utilizadas na microencapsulação de probióticos (GUERIN; VUILLEMARD; SUBIRADE, 2003; PICOT; LACROIX, 2004; REID et al., 2005; REID et al., 2007; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; GBASSI et al., 2009). Alguns trabalhos também empregaram soro doce concentrado e permeado de soro (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; RIVEROS et al., 2009). No entanto, até o momento, não existem estudos sobre o uso de soro de leite líquido, sem qualquer tratamento prévio, como agente encapsulante de probióticos pelo método de *spray drying*.

A proposta deste trabalho está focada nessa necessidade de seleção de novos materiais encapsulantes de bifidobactérias, a fim de aumentar a viabilidade desses microrganismos. Pesquisas para otimização da tecnologia de microencapsulação são extremamente importantes, pois podem permitir o desenvolvimento de novos produtos probióticos. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*.

Na estrutura desta tese, além do embasamento teórico constante na revisão de literatura, serão apresentados os três artigos resultantes dos experimentos, os quais são intitulados:

– Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica (publicado na Ciência Rural)

– Caracterização de microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com soro de leite líquido e goma arábica

– *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying* com soro de leite: sobrevivência em condições gastrointestinais

simuladas, tolerância ao NaCl e viabilidade durante o armazenamento (publicado no *Journal of Food Engineering*)



## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SORO DE LEITE

O soro de leite, principal produto secundário da indústria láctea (SMITHERS, 2008; DRAGONE et al., 2009), é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005). De acordo com a Empresa Brasileira de Pesquisa Agropecuária (EMBRAPA) o Brasil é o 5º maior produtor de leite no mundo, com uma produção de aproximadamente 30 bilhões de litros em 2010. Cerca de 34% do leite sob inspeção federal (SIF) é destinado à fabricação de queijos. A produção brasileira de queijo estimada para 2008 foi de 640.000 toneladas (BRASIL, 2012b); considerando que a partir de 10 litros de leite produz-se em média um quilo de queijo e 9 litros de soro (GONZÁLEZ SISO, 1996), foram gerados cerca de 5,76 bilhões de litros de soro nesse mesmo ano.

O descarte do soro constitui uma perda significativa de alimento potencial e energia, pois o soro retém aproximadamente 55% do total de nutrientes do leite. Os mais abundantes desses nutrientes são lactose (45-50 g/L), proteínas solúveis (6-8 g/L), lipídios (4-5 g/L) e sais minerais (8-10% do extrato seco). Os sais minerais consistem em NaCl e KCl (mais que 50%), sais de cálcio (principalmente fosfato) e outros. O soro também contém quantidades apreciáveis de ácido láctico (0,5 g/L) e ácido cítrico, compostos nitrogenados não-protéicos (uréia e ácido úrico) e vitaminas do complexo B (GONZÁLEZ SISO, 1996; PANESAR et al., 2007). A composição do soro depende da composição química do leite, dos processos tecnológicos empregados e do tipo de queijo fabricado (ANTUNES, 2003).

O soro representa uma excelente fonte de proteínas funcionais (SMITHERS, 2008). As proteínas do soro correspondem a 20% das proteínas do leite e as principais são a  $\beta$ -lactoglobulina (56-60%),  $\alpha$ -lactoalbumina (18-24%), soroalbumina bovina (6-12%) e imunoglobulinas (6-12%) (MORR; HÁ, 1993) (Tabela 1). Do ponto de vista aminoacídico (aminoácidos essenciais), as proteínas de soro apresentam quase todos os aminoácidos essenciais em excesso às recomendações, exceto pelos aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina) que não aparecem em excesso, mas atendem às recomendações para todas as idades. Além disso, apresentam elevadas concentrações dos aminoácidos triptofano, cisteína, leucina, isoleucina e lisina (SGARBIERI, 2004).

Tabela 1. Principais proteínas do soro de leite.

	Proteínas			
	$\beta$ - Lg*	$\alpha$ - La*	Soroalbumina	Imunoglobulinas
Concentração (g/L)	2,0-4,0	0,6-1,7	0,4	0,4-1,0
Ponto isoelétrico	5,2	4,2-4,5	4,7-4,9	5,5-8,3
Peso molecular (Da)	18.300	14.200	66.300	80.000-90.000

\*  $\beta$ - Lg =  $\beta$ -lactoglobulina;  $\alpha$ - La =  $\alpha$ -lactoalbumina.

Fonte: Morr e Há (1993); Ordóñez et al. (2005)

A qualidade nutricional de uma proteína é comumente expressa pelos seguintes parâmetros: índice de aminoácidos corrigidos para digestibilidade protéica (*Protein Digestibility Corrected Amino Acid Score*, PDCAAS); relação de eficiência protéica (*Protein Efficiency Ratio*, PER); e valor biológico (*Biological Value*, BV). As proteínas do soro apresentam dois desses índices (PER e BV) mais elevados do que as caseínas e comparáveis à proteína do ovo (Tabela 2) e, portanto, são consideradas altamente digeríveis e absorvidas pelo organismo humano (SGARBIERI, 2004). Devido ao seu elevado valor biológico são necessários apenas 14,5 gramas de proteínas do soro por dia para satisfazer as necessidades diárias protéicas, em comparação com 17,4 gramas de proteína do ovo (LAGRANGE; DALLAS, 1997).

Tabela 2. Valores de qualidade nutricional de algumas proteínas.

Proteína	PDCAAS <sup>1</sup>	PER <sup>2</sup>	BV <sup>3</sup>
Proteínas do soro	1,00	3,2	100
Ovo inteiro	1,00	3,8	88-100
Caseínas	1,00	2,5	80
Concentrado de proteína de soja	0,99	2,2	70
Proteína da carne	0,92	2,9	80

1. Obtido pela comparação da composição de aminoácidos essenciais da proteína sendo avaliada com um padrão de referência estabelecido pela FAO/WHO, considerada a digestibilidade protéica.

2. Relação entre ganho de peso e proteína consumida por animais em crescimento, sob condições padrão.



3. Representa aquela fração de proteína que, absorvida pelo organismo, é retida para manutenção e crescimento.

Fonte: Antunes (2003)

Além das propriedades nutricionais, as proteínas do soro apresentam propriedades funcionais tecnológicas de grande interesse para a indústria de alimentos, como a solubilidade em ampla faixa de pH, a alta capacidade de retenção de água e as propriedades emulsificantes (CHATTERTON et al., 2006). Atribuem-se também às proteínas do soro de leite propriedades funcionais fisiológicas, como atividades anti-câncer, hipocolesterolêmica, anti-inflamatória, de proteção e reparo das células entéricas, ação imunomoduladora, antiulcerogênica, anti-hipertensiva e benefício à atividade esportiva (McINTOSH, 1998; MORENO, 2002; ROSANELI, 2002; COSTA, 2004; SGARBIERI, 2004).

Com o uso da tecnologia de membranas (microfiltração, ultrafiltração, nanofiltração e osmose reversa) associada a técnicas como *spray drying* e cristalização, pode-se obter soro em pó, lactose e proteínas do soro (PAPACHRISTOU; LAFAZANIS, 1997; BICKERS; BHAMIDIMARRI, 1998). A secagem e a remoção de componentes não-protéicos, com o aumento da concentração em proteínas, levam a produtos comerciais, denominados concentrados (WPC – *whey protein concentrate*, com 25 a 80% de proteínas) ou isolados (WPI – *whey protein isolate*, 90% de proteínas) de proteínas do soro do leite (ANDRADE; NASSER, 2005).

O soro pode ser ainda utilizado como substrato em processos de bioconversão com microrganismos (como *Candida krusei*, *Kluyveromyces fragilis*, *Kluyveromyces lactis* e *Torulopsis cremoris*) para produzir biomassa microbiana (*single cell protein*) e metabólitos como álcool, aldeídos e ésteres (GONZÁLEZ SISO, 1996; CRISTIANI-URBINA et al., 2000).

Soro e produtos de soro têm sido empregados com sucesso na indústria de alimentos, sendo que o valor nutricional e o custo razoável são fatores chave que estimulam essa utilização (LIU et al., 2005). Pode ser utilizado na elaboração de produtos dietéticos, nos quais age como substituto de gordura, em produtos de panificação, confeitaria, cárneos, sopas, molhos para salada, alimentos infantis, bebidas para atletas, dietas enterais e em produtos lácteos (ANTUNES; CAZETTO; BOLINI, 2004; BRANS, 2004; MENEZES, 2011).

Apesar da elevada produção de soro, o Brasil importa grande quantidade de soro de leite em pó. O consumo total nacional de soro de leite em pó é de 62 mil toneladas por ano. A produção nacional anual é de aproximadamente 22 mil toneladas, sendo necessário, portanto, a importação de cerca de 40 mil toneladas de soro em pó por ano (SOORO, 2007 apud TULLIO, 2007). De acordo com a Embrapa, o Brasil importou cerca de 32 mil toneladas de soro em 2005 (BRASIL, 2012b).

Desta forma, mesmo com as evoluções tecnológicas para a transformação do soro em outros produtos, sua utilização ou descarte ainda é um problema na indústria de laticínios (FERCHICHI et al., 2005; PANESAR et al., 2007). Países como Estados Unidos, Austrália, Canadá e Nova Zelândia e nações da União Européia processam este subproduto reconhecendo-o como ingrediente funcional e agregando valor à linha de produção da indústria láctea (SILVA; BOLINI, 2006). Infelizmente essa ainda não é a realidade do Brasil, onde grande parte do soro de leite é destinada à alimentação animal ou descartada diretamente em rios e solos, sem qualquer tratamento prévio.

### **2.1.1 Tipos de soro de leite**

Dependendo do método de obtenção, o soro pode ser classificado em soro doce e soro ácido; o soro doce (pH aproximado de 6,4) é obtido a partir da ação de uma enzima proteolítica no leite, enquanto o soro ácido (pH aproximado de 4,5) é resultante da coagulação do leite por ação de um ácido e aquecimento (85° - 90° C) (ORDÓÑEZ et al., 2005). As principais diferenças entre os dois tipos de soro são a acidez e o conteúdo mineral (ANTUNES, 2003; KOSSEVA et al., 2009). Além disso, o soro doce contém maior quantidade de peptídeos e aminoácidos livres, por ser resultado da ação da enzima sobre a caseína (TULLIO, 2007). A concentração de lactose no soro ácido é menor do que no soro doce devido ao processo de fermentação, pois uma fração da lactose é transformada em ácido láctico durante a formação da coalhada (coagulação). No soro ácido há um maior teor de ácido láctico e minerais como o cálcio e fósforo, devido à solubilização do complexo cálcio-fósforo, existente nas micelas de caseína, em pH ácido (MIZUBUTI, 1994; WONG et al., 1999; FERREIRA, 2003 apud VIEIRA, 2006). A Tabela 3 apresenta a variação percentual da composição dos soros doce e ácido.

Tabela 3. Variação percentual da composição dos soros doce e ácido.

Componente (% , m/m)	Soro doce	Soro ácido
Umidade	93,0-94,0	94,0-95,0
Lipídios	0,3-0,5	0,3-0,6
Proteínas	0,8-1,0	0,8-1,0
Lactose	4,5-5,0	3,8-4,2
Minerais	0,5-0,7	0,7-0,8
Ácido láctico e outros	0,1	0,1-0,8

Fonte: Madrid, Cenzano e Vicente (1996)

O soro doce tem ampla gama de aplicação na área de alimentos, enquanto que o soro ácido é pouco empregado, sendo utilizado como coagulante na fabricação do “*queso blanco*” e para suplementar sucos de frutas ácidas, mas pode deixar um gosto residual salgado (MIZUBUTI, 1994), e pelo seu forte sabor ácido, é menos aceito pelos consumidores (FERREIRA, 2003 apud VIEIRA, 2006).

### 2.1.2 Poder poluente do soro

A indústria leiteira gera efluentes líquidos significativos, cuja disposição exige uma grande quantidade de investimentos. Aproximadamente 85% do total de leite utilizado para a fabricação de queijo é descartado como soro de leite (PANESAR et al., 2007). A maioria das indústrias não tem sistemas de tratamento próprios para seu descarte (DRAGONE et al., 2009) e como consequência, aproximadamente 50% de todo o soro líquido produzido não é aproveitado, sendo este número ainda maior se forem consideradas as micro e pequenas empresas (LIRA et al., 2009).

O soro possui uma Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) de 30.000-50.000 mg de O<sub>2</sub>/L, sendo este valor cerca de 100 vezes maior que a carga orgânica presente no esgoto doméstico (GIROTO; PAWLOWSKI, 2001; MACHADO et al., 2001; RICHARDS, 2002). A DBO mede a quantidade de oxigênio necessária para estabilizar biologicamente a matéria orgânica presente em uma amostra, após um determinado tempo (5 dias) e a uma dada temperatura (20°C) (PESSOA; JORDÃO, 1982). A DBO é diretamente proporcional ao potencial poluidor de um resíduo ou substância (OLIVEIRA, 2006). A lactose é a principal responsável pela elevada DBO do soro (GIROTO; PAWLOWSKI, 2001).

Por apresentar alta concentração de matéria orgânica e deficiência em nitrogênio, a estabilização por métodos convencionais para

tratamento biológico do soro é dificultada (GIROTO; PAWLOWSKI, 2001) e apresenta elevado custo (OZMIHCI; KARGI, 2007). Considerando uma produção média de 10.000 litros de soro por dia, esta teria o poder poluente equivalente ao de uma população de 5.000 habitantes (LIRA et al., 2009). Quando descartado no solo, ele afeta a estrutura física e química deste, diminuindo os rendimentos agrícolas; quando lançado em corpos d'água, reduz a vida aquática, pois esgota o oxigênio dissolvido (PANESAR et al., 2007). Portanto, alternativas tecnológicas para o adequado aproveitamento do soro são fundamentais.

## 2.2 MICRORGANISMOS PROBIÓTICOS

A palavra “probiótico” deriva do grego e significa “para a vida”. Os probióticos foram classicamente definidos como suplementos alimentares à base de microrganismos vivos que afetam benéficamente o hospedeiro, promovendo o balanço de sua microbiota intestinal (FULLER, 1989). Entretanto, de acordo com a definição atual aceita internacionalmente, probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002).

Bactérias probióticas são habitantes normais do trato gastrointestinal humano (GOMES; MALCATA, 1999; SHAH, 2007) e sua população é influenciada pela idade, dieta, antibióticos, estresse entre outros fatores (ARUNACHALAM, 1999). Há evidências crescentes de que a microbiota intestinal é importante para manter a homeostase do indivíduo (CURTIS; SPERANDIO, 2011). Assim, a idéia de manter um equilíbrio microbiano saudável, ou de restaurar a homeostase da microbiota através do consumo de probióticos está ganhando popularidade (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001; GAREAU; SHERMAN; WALKER, 2010).

O número de produtos disponíveis e a familiaridade do consumidor com o conceito de probiótico têm aumentado e, conseqüentemente, a pesquisa com este tipo de produto também tem crescido (CRUZ et al., 2009b). De acordo com Semyonov et al. (2010), os alimentos probióticos dominam o *marketing* industrial de alimentos funcionais, representando cerca de 65% do mercado mundial (AGRAWAL, 2005). Segundo Jankovic et al. (2010) e Nazzaro et al. (2011) este mercado continua expandindo. Os exemplos mais conhecidos são leites fermentados e iogurtes (NAGPAL et al., 2007), no entanto, outros derivados lácteos como queijos, sorvetes e sobremesas

também têm sido utilizados como veículos de probióticos (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010).

As principais espécies probióticas pertencem aos gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (SHAH, 2007). No Brasil são aprovadas para uso como probióticos as espécies: *Lactobacillus acidophilus*, *L. casei* shirota, *L. casei* var. *rhamnosus*, *L. casei* var. *defensis*, *L. paracasei*, *Lactococcus lactis*, *Bifidobacterium bifidum*, *B. animallis* (incluindo a subespécie *B. lactis*), *B. longum* e *Enterococcus faecium* (BRASIL, 2012a).

Um grande número de cepas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* é reconhecido como GRAS (*generally recognized as safe* – geralmente reconhecido como seguro) e muitas delas tem uma longa história de uso seguro em alimentos (DEL PIANO et al., 2006). Idealmente, as bactérias probióticas devem apresentar tolerância a substâncias antimicrobianas utilizadas na prática clínica, mas não devem transmitir tal resistência a outras bactérias (DEL PIANO et al., 2006; FORSSTEN; SINDELAR; OUWEHAND, 2011). Segundo Aureli et al. (2011), alimentos que contêm probióticos têm se mostrado seguros tanto para a população saudável quanto para pessoas com alguma patologia.

### 2.2.1 *Bifidobacterium*

As Bifidobactérias foram isoladas pela primeira vez de fezes de recém-nascidos no final do século XIX, no Instituto Pasteur, por Tissier, que as descreveu e denominou *Bacillus bifidus* (VASILJEVIC; SHAH, 2008). No início do século XX, bifidobactérias foram classificadas como espécies de *Lactobacillus*, entretanto, atualmente esses microrganismos são classificados como um gênero separado (BOYLSTON et al., 2004). O gênero *Bifidobacterium* pertence ao grupo de bactérias corineformes, no filo *Actinobacteria*, a qual compreende bactérias gram-positivas com alto conteúdo de guanina+citosina (G+C) (> 50%) (STACKEBRANDT et al., 1997). No filo *Actinobacteria*, a ordem *Bifidobacteriales* consiste de duas famílias, *Bifidobacteriaceae* e *Incertae*. A família *Bifidobacteriaceae* pode ser dividida em cinco gêneros: *Bifidobacterium*, *Aeriscardovia*, *Gardnerella*, *Parascardovia* e *Scardovia* (GARRITY et al., 2007). As bifidobactérias catabolizam hexoses através de uma via metabólica peculiar, envolvendo a enzima-chave frutose-6-fosfocetolase (EC 4.1.2.2), conhecida como via da frutose-6-fosfato ou a chamada “via bífida” (BIAVATI; MATTARELLI, 2001). Esta enzima é considerada um marcador taxonômico para a família *Bifidobacteriaceae* (RUSSEL et al., 2011).

São microrganismos não formadores de esporos, desprovidos de flagelos, catalase-negativos e na sua maioria anaeróbicos, entretanto algumas cepas são tolerantes ao O<sub>2</sub>. Possuem morfologia variada, incluindo bacilos curtos, curvados e bifurcados em forma de Y (ANAL; SINGH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008). A aparência dos bastonetes pode ser influenciada por condições nutricionais (TAMIME, 2002). O crescimento ótimo se dá a temperaturas de 35 a 40 °C e valores de pH de 6,0 a 7,0. As bifidobactérias são heterofermentativas, fermentam carboidratos produzindo principalmente ácidos acético e lático em uma proporção de 3:2 (v/v). Devido a sua natureza fastidiosa, estas bactérias são de difícil isolamento e crescimento em laboratório (ANAL; SINGH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

De acordo com Russel et al. (2011), bifidobactérias habitam sete diferentes nichos ecológicos: o intestino humano, a vagina humana, a cavidade oral, o trato gastrointestinal animal, águas residuais, o intestino de abelhas e alimentos. Espécies de *Bifidobacterium* foram isoladas de leites fermentados, leite cru e queijos fabricados com leite cru (MEILE et al.; 1997; DELCENSERIE et al., 2007; WATANABE et al., 2008). Esses microrganismos predominam em recém-nascidos, constituindo aproximadamente 95% da microbiota intestinal em crianças amamentadas (YOSHIOKA et al., 1991) e 75% da microbiota em bebês alimentados com fórmulas infantis (HADADJI et al., 2005). No adulto, as bifidobactérias formam apenas 3% da microbiota (VAUGHAN et al., 2005).

As espécies freqüentemente empregadas como probióticos são *Bifidobacterium adolescentis*, *B. animalis*, *B. bifidum*, *B. breve*, *B. infantis*, *B. lactis* e *B. longum* (ANAL; SINGH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008). *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis*, uma cultura probiótica industrial, possui propriedades tecnológicas desejáveis, como tolerância ao oxigênio, resistência ao ácido e habilidade para crescer em meios à base de leite (BOZANIC; TRATNIK, 2001; JANER et al., 2005).

### **2.2.2 Benefícios à saúde**

Vários benefícios à saúde têm sido atribuídos aos probióticos, alguns deles comprovados cientificamente, enquanto outros requerem mais estudos em humanos (VASILJEVIC; SHAH, 2008; CRUZ et al., 2009a). Os principais efeitos benéficos relatados são: alívio da intolerância à lactose, prevenção e redução dos sintomas da diarreia por rotavírus e associada a antibiótico, tratamento e prevenção de alergias,

efeito antimutagênico e anticarcinogênico, efeito hipocolesterolêmico, inibição de *Helicobacter pylori* e patógenos intestinais, estímulo do sistema imunológico e melhora da doença inflamatória do intestino (NOMOTO, 2005; SHAH, 2007; VASILJEVIC; SHAH, 2008).

Os ácidos graxos de cadeia curta produzidos pelos probióticos, como ácido propiônico e butírico, contribuem para a acidificação do ambiente intestinal e ativação das funções das células epiteliais intestinais (OHASHI; USHIDA, 2009; GUILLOTEAU et al., 2010). Esses ácidos também ativam o movimento intestinal e, conseqüentemente, previnem ou aliviam a constipação (GRIDER; PILAND, 2007). Estudos têm demonstrado que a ingestão de *Bifidobacterium* atua na melhora da constipação (YAESHIMA ET AL., 1997; MATSUMOTO ET AL., 2001; ISHIZUKA et al., 2012).

Tem sido relatado que microrganismos probióticos produzem peptídeos bioativos (LEBLANC et al., 2002; PRIOULT et al., 2004; KORHONEN, 2009). Peptídeos biologicamente ativos (PBAs) são definidos como fragmentos específicos de proteínas que têm um impacto positivo nas funções do organismo, influenciando beneficemente a saúde (KITTS; WEILER, 2003). Possuem atividade similar a uma droga ou hormônio, que eventualmente modulam a função fisiológica, ao se ligarem a receptores específicos da célula-alvo, levando à indução de respostas fisiológicas (PIHALANTO; KORHONEN, 2003). Hayes et al. (2006) observaram produção de peptídeos antimicrobianos por *L. acidophilus*. Alguns estudos têm reportado a produção de peptídeos inibidores da ECA (enzima conversora da angiotensina-I) por espécies probióticas de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (DONKOR et al., 2007; ONG et al., 2007; RAMCHANDRAN; SHAH, 2008; GONZALEZ-GONZALEZ et al., 2011). A inibição da ECA pode influenciar diferentes sistemas de regulação do organismo envolvidos na modulação da pressão arterial, defesa imune e atividade do sistema nervoso (MEISEL, 1998).

Estudos têm demonstrado que microrganismos probióticos podem sintetizar e também responder a neuroquímicos, como GABA (ácido gama-aminobutírico) e acetilcolina, os quais foram isolados de espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium*. Estes compostos podem induzir efeitos neurológicos e imunológicos no hospedeiro (SIRAGUSA et al., 2007; REID, 2011; LYTE, 2011). Algumas cepas de probióticos produzem Ácido Linoleico Conjugado (CLA - *conjugated linoleic acid*), um ácido graxo que tem sido associado com uma variedade de efeitos promotores da saúde, como atividade anti-aterogênica, anti-adipogênica, anti-diabetes e anti-inflamatória (COAKLEY et al., 2003; OH et al.,

2003; BARRETT et al., 2007; VAN NIEUWENHOVE et al., 2007; O'SHEA et al., 2012).

É importante enfatizar que os benefícios à saúde são cepa-específicos (LUYER et al., 2005; CANANI et al., 2007; KEKKONEN et al., 2007) e não podem ser preditos para uma determinada espécie de microrganismo, assim como não há uma única cepa capaz de proporcionar simultaneamente todos os benefícios mencionados (SHAH, 2007).

De acordo com Saier e Mansour (2005) e Oelschlaeger (2010), os probióticos possuem três mecanismos de promoção da saúde humana: (i) fornecendo produtos finais da fermentação anaeróbica de carboidratos, como ácidos orgânicos, que podem ser absorvidos pelo hospedeiro, sendo que estes produtos finais são capazes de influenciar o humor, o nível de energia e habilidades cognitivas. Tais ações podem resultar em inativação de toxinas e detoxificação no intestino do hospedeiro. (ii) competindo diretamente com outros microrganismos, comensais e/ou patogênicos. Este princípio é importante para a prevenção e terapia de infecções e restauração do equilíbrio da microbiota. (iii) estimulando a resposta imune do hospedeiro pela produção de polissacarídeos específicos, incluindo o sistema imune inato, bem como o adquirido. Este modo de ação é importante para a prevenção e terapia de doenças infecciosas, mas também para o tratamento de inflamação crônica do trato digestivo. Além disso, esta ação pode ser importante para a erradicação das células hospedeiras neoplásicas. No entanto, até o momento, os modos de ação das bactérias probióticas ainda não são totalmente conhecidos (OELSCHLAEGER, 2010).

Recentemente foi constatado que os efeitos probióticos são dependentes da presença de ligantes funcionais ou “moléculas efetoras” na célula probiótica (VAN BAARLEN et al., 2009). Estas moléculas bioativas características são (glico) proteínas, as quais são afetadas adversamente pela ação enzimática da pepsina, baixo pH do estômago e atividade antimicrobiana de sais biliares (KONSTANTINOV et al., 2008). Portanto, a funcionalidade da molécula efetora requer requisitos de conservação específicos durante o trânsito gastrointestinal e a fabricação do produto. Neste contexto, a microencapsulação pode proteger as células probióticas (DOHERTY et al., 2012).



### 2.2.3 Viabilidade

Os efeitos benéficos produzidos pelas bactérias probióticas estão fortemente ligados a sua capacidade de sobreviver à passagem no trato gastrointestinal. A bactéria deve ser metabolicamente estável e ativa no produto até o final de sua vida útil, alcançar o intestino em número elevado e, então, apresentar os benefícios à saúde do hospedeiro (GILLILAND, 1989; SHAH, 2007). Além disso, para garantir um efeito no organismo humano, os probióticos devem ser consumidos regularmente (KOMATSU; BURITI; SAAD, 2008; SAULNIER et al., 2009). Ensaios de alimentação com diferentes cepas têm demonstrado que os probióticos geralmente desaparecem do trato gastrointestinal dentro de uma ou duas semanas após a descontinuidade da ingestão (FORSSSTEN; SINDELAR; OUWEHAND, 2011). O padrão para que um alimento seja considerado probiótico é de no mínimo  $10^6 - 10^7$  UFC/g do produto (FAO/WHO, 2002; SHAH, 2007). No Brasil, a legislação recomenda  $10^8 - 10^9$  UFC/porção diária do produto pronto para consumo (BRASIL, 2012a).

A viabilidade da bactéria probiótica é um parâmetro chave no desenvolvimento de alimentos probióticos. Vários fatores afetam a viabilidade, como acidez titulável, pH, peróxido de hidrogênio, conteúdo de oxigênio dissolvido, temperatura de estocagem, concentração de ácidos láctico e acético, entre outros (DAVE; SHAH, 1997; SHAH, 2000; MARTÍNEZ-VILLALUENGA et al., 2006). Entretanto, várias pesquisas têm mostrado grandes variações e baixa viabilidade de bactérias probióticas em alimentos (SCHILLINGER, 1999; WEESE et al., 2002; MASCO et al., 2005; LIN et al., 2006; LACROIX; YILDIRIM, 2007; MORTAZAVIAN et al., 2007; AL-OTAIBI, 2009; DE VOS et al., 2010). Uma alternativa que tem sido proposta para solucionar este problema é a microencapsulação (KHALIL; MANSOUR, 1998; SULTANA et al., 2000; ANAL; SINGH, 2007; CAPELA; HAY; SHAH, 2007).

## 2.3 MICROENCAPSULAÇÃO

Os primeiros registros de tentativas de aplicação da técnica de microencapsulação datam dos anos 1930, mas o primeiro produto com material microencapsulado só surgiu em 1954, um papel de cópia sem carbono. Esse papel recebeu uma fina camada de microcápsulas de tinta, contendo solução de 2 a 6% de um pigmento adequado disperso em

partículas com diâmetro de 1 até 10 µm. A pressão da ponta do lápis na superfície do papel rompia as microcápsulas, liberando o pigmento, que, por contato direto com o revestimento ácido aplicado na superfície frontal da segunda via, mudava de cor em função do pH, propiciando a obtenção da cópia (RÉ, 2000).

A tecnologia de microencapsulação foi definida por Todd (1970) como o empacotamento com finas coberturas poliméricas de sólidos, líquidos ou material gasoso, dando origem a microcápsulas que podem liberar seus conteúdos a taxas controladas sob influência de condições específicas (ANAL; STEVENS, 2005; KAILASAPATHY; MASONDOLE, 2005; ANAL; STEVENS; REMUÑÁN-LÓPEZ, 2006). Arshady (1993) descreveu as microcápsulas como embalagens extremamente pequenas, compostas por um polímero como material de parede e um material ativo chamado de núcleo. O diâmetro e a forma podem variar de acordo com o agente encapsulante e método utilizados (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2003; ANAL; SINGH, 2007).

Entre os propósitos gerais da microencapsulação estão: fazer um líquido comportar-se como sólido; separar materiais reativos; reduzir a toxicidade do componente ativo; controlar a liberação do componente; reduzir volatilidade ou inflamabilidade de líquidos; mascarar o gosto e odor de componentes; aumentar a vida útil; ou proteger o ativo contra luz, umidade e calor (JACKSON; LEE, 1991). Em função da variedade de propósitos, as microcápsulas vêm sendo aplicadas em importantes ramos tecnológicos (SHAHIDI; HAN, 1993; RENARD et al., 2002). Na indústria agropecuária, a microencapsulação tem sido usada para envolver pesticidas químicos e biológicos, fertilizantes e rações animais. Na indústria farmacêutica, a principal aplicação é em fórmulas de liberação gradual e direcionada a órgãos alvos, mas também para mascarar odor e sabor de medicamentos e aumentar a resistência de materiais frágeis às condições de processamento (PRATA, 2006). Na área de cosméticos, a microencapsulação tem sido usada para fragrâncias e extratos vegetais (SHALAKA et al., 2009). Na indústria de alimentos, têm-se encapsulado aromas, acidulantes, lipídios, corantes, antioxidantes, enzimas, aminoácidos, óleos essenciais, vitaminas, minerais e microrganismos (DESAI; PARK, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008), dentre os quais estão os probióticos.

Para cada método de microencapsulação, as etapas fundamentais são: incorporação dos compostos bioativos; formação das gotículas; remoção do solvente; coleta das microcápsulas; e secagem (Figura 1) (FREITAS et al., 2005; DALMORO et al., 2012).

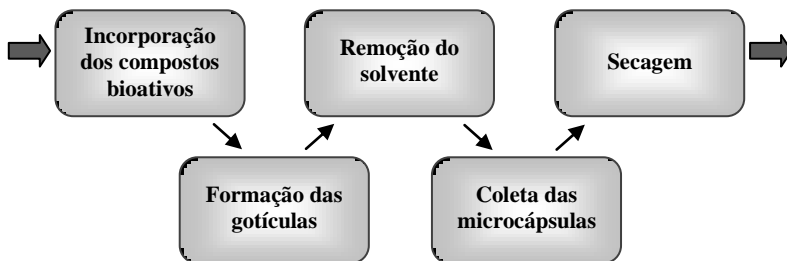


Figura 1. Etapas fundamentais no processo de microencapsulação.  
Fonte: Dalmoro et al. (2012)

Dependendo das propriedades físico-químicas do núcleo, da composição do material de parede (agente encapsulante) e da técnica de microencapsulação utilizada, diferentes tipos de partículas podem ser obtidos: esfera simples circundada por uma camada de espessura uniforme; partícula contendo um núcleo de formato irregular; várias partículas de núcleos em uma matriz contínua de material de parede; vários núcleos distintos dentro da mesma cápsula; e microcápsulas multi-parede (GHARSALLAOUI et al., 2007) (Figura 2). Dentre essas partículas, a esfera simples é a mais comum de ser fabricada e utilizada (ZHAO; ZHANG, 2011).

A liberação do agente ativo pode ocorrer através da ruptura mecânica, mediante ação da temperatura e do pH, por meio da biodegradação, pela solubilidade no meio e também por difusão (MARTIN, 1993 apud SUAVE et al., 2006). Na prática é comum que a liberação do composto bioativo da microcápsula resulte da combinação de dois ou mais mecanismos que atuam simultaneamente, pois na maior parte dos casos não existe um mecanismo dominante responsável pela liberação do agente encapsulado (COIMBRA, 2010).

A principal razão para encapsular probióticos é a melhora da sua sobrevivência durante o processamento e armazenamento do alimento e para protegê-los das condições físicas e químicas rigorosas do trato gastrointestinal, ou seja, do baixo pH e da alta concentração de bile (KHALIL; MANSOUR, 1998; TRUELSTRUP HANSEN et al., 2002; ALLAN-WOJTAS; TRUELSTRUP HANSEN; PAULSON, 2008; KIM et al., 2008). Segundo Talwalkar e Kailasapathy (2003), a microencapsulação também proporciona regiões anóxicas no interior das cápsulas, proporcionando assim uma proteção adicional para cepas

sensíveis ao oxigênio. Além disso, microcápsulas de bactérias probióticas podem ser elaboradas para a ruptura em áreas específicas do organismo, como por exemplo, o intestino. Para tanto, um revestimento capaz de resistir às condições ácidas pode ser utilizado, permitindo que os ingredientes ativos consigam passar pelo estômago (ANAL et al., 2003; ANAL; STEVENS, 2005).

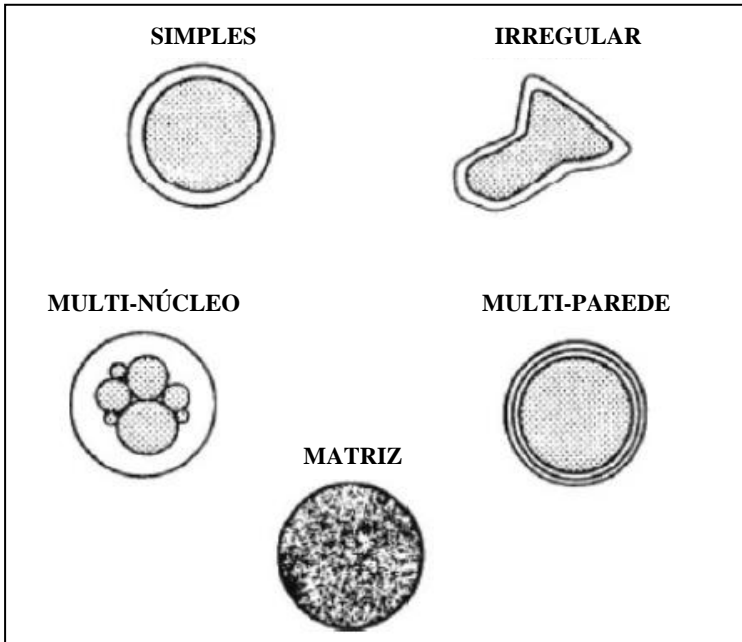


Figura 2. Morfologia de diferentes tipos de microcápsulas.

Fonte: Gibbs et al. (1999)

### 2.3.1 Agentes encapsulantes

Vários materiais têm sido usados para encapsular probióticos, como o alginato, goma arábica, carragena, quitosana, carboximetilcelulose (CMC), gelatina, pectina, amido e proteínas (JACKSON; LEE, 1991; ANAL; SINGH, 2007). A composição do agente encapsulante é o principal determinante das propriedades funcionais da microcápsula e de como ela pode ser usada para melhorar

o desempenho de um ingrediente em particular (DESAI, PARK, 2005; GHARSALLAOUI et al., 2007).

Um material encapsulante deve apresentar algumas características como: boas propriedades reológicas a altas concentrações e facilidade de manuseio durante o processo; habilidade para dispersar ou emulsificar o material ativo e estabilizar a emulsão produzida; não reatividade com o material a ser encapsulado tanto durante o processo como durante o armazenamento prolongado; envolver e reter o material ativo dentro de sua estrutura durante o processo e armazenamento; liberar completamente o solvente ou outros materiais usados durante a encapsulação através da secagem ou de outras operações de remoção do solvente; promover máxima proteção do material ativo contra condições ambientais (oxigênio, calor, luz, umidade); solubilidade em solventes aceitáveis na indústria de alimentos (como água e etanol); baixo custo e uso permitido em alimentos (*food-grade status*) (DESAI; PARK, 2005).

### 2.3.1.1 Microencapsulação em goma arábica

Entre todas as gomas usadas na microencapsulação, a goma acácia, geralmente chamada goma arábica, destaca-se devido às suas excelentes propriedades de emulsificação e, portanto, tem sido amplamente utilizada (DICKINSON, 2003). A goma arábica é um hidrocolóide natural exsudada a partir de árvores das espécies *Acacia senegal* e *Acacia seyal*, obtida como resposta à ferida da planta. Principalmente produzida na África, esta goma é muito utilizada como agente espessante, emulsificante e estabilizante em alimentos (THEVENET, 1988).

A coleta da goma é manual e realizada duas vezes durante a estação seca. A quantidade produzida por cada árvore não excede 300 gramas (NUSSINOVITH, 1997). O Sudão domina o comércio e a produção (80-90%) de goma no mercado mundial, com uma produção anual de 40.000-50.000 toneladas. Entretanto, sua produção sofre constantes flutuações devido aos eventos climáticos e políticos da região, o que ocasiona alterações no seu preço no mercado (VERBEKEN; DIERCKX; DEWETTINCK, 2003).

Quimicamente, a goma arábica é um sal neutro ou levemente ácido de um polissacarídeo complexo que contém íons cálcio, magnésio e potássio em sua molécula (PRAKASH; MANGINO, 1990). Esta goma é um heteropolissacarídeo do tipo arabinogalactana, constituído por um polímero de ácido D-glucorônico, L-ramnose, D-galactose e L-arabinose e uma fração protéica de aproximadamente 2%, à qual são atribuídas as

propriedades de emulsificação dessa goma (RANDALL; PHILLIPS; WILLIAMS, 1989; DICKINSON, 2003). Em pH acima de 2,2 a goma é negativamente carregada, e a baixos pHs (< 2,2) a dissociação dos grupos carboxilas é suprimida (SANCHEZ et al., 2002). A goma arábica não apresenta unidade repetitiva de maneira regular (DEFAYE; WONG, 1986), porém, o hexassacarídeo ramificado, conforme esquematizado na Figura 3, pode representar a principal subunidade para esta macromolécula altamente ramificada (FÁVARO et al., 2006).

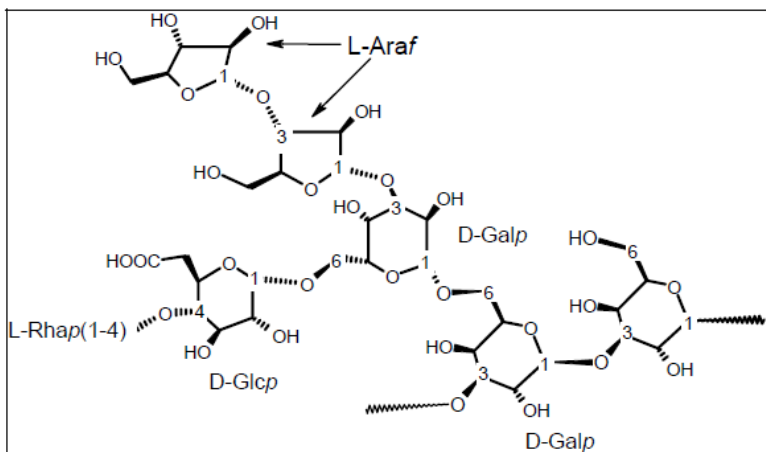


Figura 3. Principal unidade repetitiva da Goma Arábica.  
Fonte: Fávoro et al. (2006)

Tradicionalmente a goma arábica tem sido utilizada em microencapsulação porque apresenta boa capacidade emulsificante, baixa viscosidade (1,8 mPa.s solução a 1%) quando comparada a outros polissacarídeos de massa molar similar (400 kDa) (SANCHEZ et al., 2002), alta solubilidade em água (SU; LIN; CHEN, 2007), boa retenção de compostos voláteis (ROSENBERG et al., 1990; REINECCIUS, 1991; BHANDARI et al., 1992).

Para uso na indústria de alimentos probióticos, a goma arábica tem as vantagens adicionais de promover benefícios à saúde associados com fibra dietética, além de causar uma rápida mudança na microbiota intestinal quando presente na dieta humana, caracterizando assim um efeito prebiótico (DESMOND et al., 2002; PHILLIPS; OGASAWARA; USHIDA, 2008). A goma arábica tem sido utilizada para

microencapsular bactérias probióticas por *spray drying* (DESMOND et al., 2002; LIAN; HSIAO; CHOU, 2002; LIAN; HSIAO; CHOU, 2003; HSIAO; LIAN; CHOU, 2004; SIMPSON et al., 2005; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; SU; LIN; CHEN, 2007). No entanto, o elevado custo, o suprimento limitado e variações na qualidade têm restrito o uso desta goma como material de parede na microencapsulação e incentivado a busca por materiais encapsulantes alternativos (GHARSALLAOUI et al., 2007).

### 2.3.1.2 Microencapsulação em soro de leite

Além das conhecidas propriedades de emulsificação, geleificação e formação de filme das proteínas do soro, suas propriedades microencapsulantes têm sido investigadas e reportadas, focalizando principalmente no método de *spray drying* para obtenção de microcápsulas (LEE; ROSENBERG, 2000; GHARSALLAOUI et al., 2007). Entre os biopolímeros utilizados como agentes de cobertura, as proteínas do soro surgem como candidatos potenciais, pois são completamente biodegradáveis e amplamente utilizadas em muitos tipos de alimentos (GBASSI et al., 2009).

A desnaturação térmica das proteínas do soro tem influência nas características de emulsificação e, portanto, nas suas propriedades microencapsulantes (ROSENBERG; SHEU, 1996). O tratamento térmico, como o que ocorre durante o *spray drying*, induz a desnaturação e agregação das proteínas do soro (MILLQVIST-FUREBY; ELOFSSON; BERGENSTAHL, 2001; VASBINDER et al., 2003), melhorando sua adsorção à interface e resultando na formação de uma camada fina semelhante a um gel (KIOKIAS; DIMAKOU; OREOPOULOU, 2007). Esta desnaturação protéica também modifica as propriedades funcionais do pó obtido (MILLQVIST-FUREBY, ELOFSSON; BERGENSTAHL, 2001).

Proteínas do soro, na forma de WPC ou WPI, têm sido usadas com sucesso como agentes encapsulantes ou coadjuvantes na microencapsulação de probióticos (GUERIN; VUILLEMARD; SUBIRADE, 2003; PICOT; LACROIX, 2004; REID et al., 2005; REID et al., 2007; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; GBASSI et al., 2009; WEINBRECK; BODNÁR; MARCO, 2010; RODRIGUES et al., 2011a; RODRIGUES et al., 2011b). Com relação ao emprego de soro líquido, Pimentel-gonzález et al. (2009) microencapsularam *L. rhamnosus* pelo método de emulsificação utilizando soro doce concentrado. O soro mostrou-se como um agente emulsificante eficiente, sendo que os

probióticos microencapsulados apresentaram maior resistência às condições gastrointestinais simuladas, possivelmente devido ao fato do soro atuar como um agente tamponante.

### **2.3.2 Métodos de microencapsulação**

Existem inúmeras técnicas de encapsulação, porém nem todas se adequam à encapsulação de probióticos, pois algumas fazem uso de solventes orgânicos, que podem ser tóxicos para estes microrganismos; outras utilizam agentes encapsulantes não GRAS ou que afetam as características sensoriais dos alimentos (AZEREDO, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008). Segundo De Vos et al. (2010), ao escolher um sistema de encapsulação é essencial optar por um sistema que possa ser incorporado facilmente em alimentos sem interferir na sua textura e sabor. O tamanho das células (1 a 5  $\mu\text{m}$ ) impede a obtenção de cápsulas na escala nano, o que também é um fator limitante para algumas técnicas. Além disso, para a indústria de alimentos, o custo representa um obstáculo para utilização do ingrediente encapsulado (AZEREDO, 2005; FAVARO-TRINDADE; PINHO; ROCHA, 2008).

A extrusão é a técnica de microencapsulação de microrganismos mais popular, pois é simples, de baixo custo e não há necessidade de emprego de temperaturas elevadas (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003; FAVARO-TRINDADE, 2011). Baseia-se na geleificação de um polissacarídeo aniônico, quando em contato com o cálcio ou qualquer outro íon multivalente (CUI et al., 2000). Este método envolve a preparação de uma solução de hidrocolóide, adição dos microrganismos e extrusão desta suspensão com uma seringa, na forma de gotas, em uma solução de endurecimento (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003). Uma desvantagem da extrusão é a baixa produtividade, o que dificulta a produção de microcápsulas em larga escala (PICOT; LACROIX, 2003).

Na técnica de emulsão, um pequeno volume da suspensão contendo as células microbianas e o polímero (fase descontínua) é adicionado em um grande volume de óleo vegetal (fase contínua). Esta mistura é homogeneizada, na presença de um emulsificante, para formar uma emulsão do tipo água em óleo (A/O) (FAVARO-TRINDADE, 2011). Após a formação da emulsão, o polímero, solúvel em água, deve ser insolubilizado através de ligações cruzadas a fim de formar uma partícula geleificada no interior da fase óleo, que em seguida é separada por filtração. Devido ao uso de grandes volumes de óleo vegetal, tem



um custo mais elevado que a extrusão (KRASAEKOOPT; BHANDARI; DEETH, 2003), além de gerar grande quantidade de resíduos.

A coacervação consiste na separação de fase de um ou mais hidrocolóides, e subsequente deposição destes hidrocolóides sobre o ingrediente ativo suspenso ou emulsionado no meio, dando origem à fase coacervada (GOUIN, 2004). Na coacervação simples emprega-se apenas uma substância como agente encapsulante enquanto que, na coacervação complexa, dois polímeros de cargas opostas formam um complexo solúvel e as microcápsulas são formadas pela interação interiônica entre os polímeros (BENITA, 2005). A ampliação de escala é difícil e o coacervado é obtido em solução aquosa, portanto, para ampliar sua vida útil é preciso aplicar um processo adicional de secagem (FAVARO-TRINDADE, 2011).

Na microencapsulação por leite fluidizado (*spray coating*), enquanto as partículas do núcleo são suspensas, o material da parede é atomizado para dentro da câmara, depositando-se sobre as partículas do núcleo. Quando as partículas atingem o topo da coluna ascendente, são lançadas em uma coluna descendente de ar, que as lança novamente no leite fluidizado, onde são novamente revestidas, secas e endurecidas (AZEREDO, 2005).

Um processo de encapsulação pode ser realizado por meio de liofilização (*Freeze-drying*) de uma emulsão do material do núcleo com um encapsulante. No entanto, seu alto custo e longo tempo de processo prejudicam sua aplicabilidade comercial (AZEREDO, 2005).

### 2.3.2.1 *Spray drying*

Embora muitas técnicas tenham sido desenvolvidas para microencapsular ingredientes alimentícios, a atomização ou *spray drying* é a tecnologia mais empregada na indústria de alimentos (GHARSALLAOUI et al., 2007; BRASILEIRO, 2011; FAVARO-TRINDADE, 2011), devido ao baixo custo e disponibilidade de equipamentos comumente utilizados (GOUIN, 2004). Comparado à liofilização, o custo do método de *spray-drying* é de 30 a 50 vezes mais baixo (DESOBRY; NETTO; LABUZA, 1997). Este processo é um dos mais antigos métodos de encapsulação, usado desde a década de 1930 na obtenção dos primeiros aromas encapsulados usando goma arábica como material de parede (SHAHIDI; HAN, 1993) e tem sido usado com sucesso na indústria de alimentos por várias décadas (GOUIN, 2004). O processo é flexível, no qual se pode variar substancialmente a matriz de

microencapsulação; de fácil ampliação para escala industrial; e produz partículas de boa qualidade (DZIEZAK, 1988; RÉ, 1998; DESAI; PARK, 2005).

O *spray drying* pode ser utilizado como um método de secagem das microcápsulas anteriormente preparadas por outra técnica, ou como um processo de obtenção de microcápsulas (BROADHEAD; ROUAN; RHODES, 1992). A microencapsulação por *spray drying* é definida como a transformação de um produto fluido (suspensão, solução ou pasta) em partículas secas. O processo envolve a formação de uma emulsão ou suspensão contendo o material ativo e o agente encapsulante, em diferentes proporções, e a atomização desta em uma câmara de secagem com circulação de ar quente. A água contida nas gotículas evapora em contato com o ar quente e os sólidos remanescentes do agente encapsulante envolvem o material ativo. As microcápsulas são então coletadas da base do ciclone do secador (BALASSA; FANGER, 1971; DESAI; PARK, 2005). A Figura 4 esquematiza as etapas envolvidas na técnica de microencapsulação por *spray drying*.

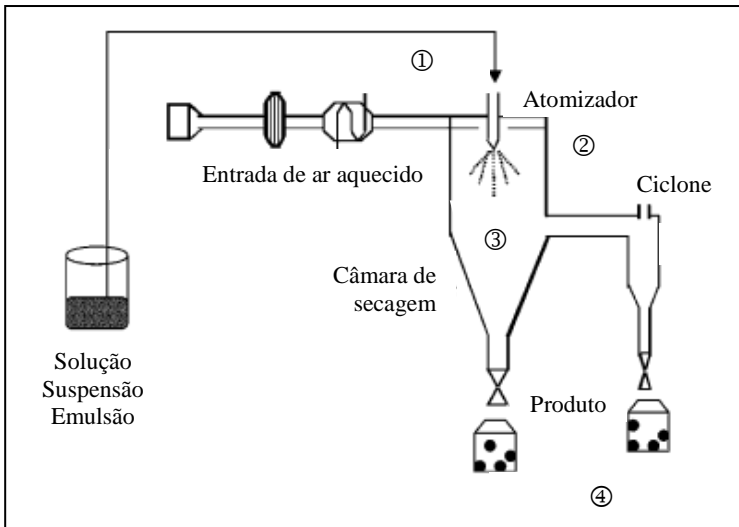


Figura 4. Principais etapas envolvidas no *spray drying*. Etapa ①: atomização; etapa ②: contato *spray*-ar; etapa ③: evaporação do solvente; etapa ④: separação do produto. Fonte: RÉ (2006) com modificações.

Existem três tipos de padrão de fluxo ar-produto em *spray dryers*: co-corrente, contra-corrente e fluxo misto. No processo co-corrente, as gotículas e o ar passam através do secador na mesma direção. As gotículas encontram o ar em altas temperaturas, causando uma rápida evaporação, enquanto elas ainda estão úmidas, proporcionando condições de segurança para materiais termolábeis. Na configuração contra-corrente, as gotículas tem direção oposta ao fluxo de ar, o que expõe o produto seco a altas temperaturas. Este tipo de equipamento pode ser usado somente para materiais não sensíveis ao calor e é menos utilizado que o tipo co-corrente (OAKLEY, 1997). Fluxo misto é uma combinação de fluxos co-corrente e contra-corrente. O bico atomizador é posicionado na base da câmara, forçando as gotículas a subirem até serem superadas pela gravidade e pelo fluxo descendente do meio de secagem. Este é um método para gotículas relativamente comuns, em uma pequena câmara a taxas de produção pequenas (BARBOSA-CÁNOVAS et al., 2005). A Figura 5 apresenta os três padrões de fluxo ar-produto em *spray dryers*.

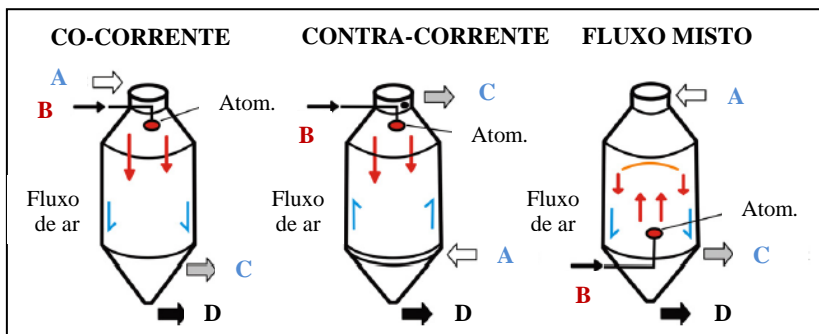


Figura 5. Padrões típicos de fluxo ar-produto em *spray dryers*. **A**: entrada de ar; **B**: alimentação; **C**: saída do ar; **D**: saída do produto; Atom.: atomizador. Fonte: Peighambardoust et al. (2011)

As microcápsulas produzidas por atomização são geralmente do tipo matriz, onde o princípio ativo, no caso os probióticos, distribui-se na matriz seca do agente encapsulante (RÉ, 1998; RÉ, 2006; FAVARO-TRINDADE, 2011). Uma das principais vantagens do *spray drying* é a possibilidade de trabalhar com materiais lábeis, devido ao curto tempo de contato no secador (RODRIGUES et al., 2011b). Além disso, a

microencapsulação por *spray drying* pré-condiciona as células de forma que elas se adaptam melhor ao estresse das condições ambientais adversas, como altas temperaturas, ambiente ácido ou presença de sais biliares (NAZZARO et al., 2011). No entanto, uma limitação da tecnologia de *spray drying* é o número restrito de materiais de parede disponíveis, visto que estes devem ser solúveis em água em um nível aceitável (GOUIN, 2004). Além dessa elevada solubilidade, um material de parede para microencapsulação por *spray drying* deve formar soluções de baixa viscosidade mesmo em altas concentrações (REINECCIUS, 1988 apud GHARSALLAOUI et al., 2007). Materiais de parede típicos incluem goma arábica, maltodextrinas, amido modificado, e misturas destes. Outros polissacarídeos e proteínas podem ser usados, mas seu uso torna-se muito trabalhoso e dispendioso devido a sua baixa solubilidade em água: a quantidade de água na alimentação a ser evaporada é muito maior devido ao menor conteúdo de matéria seca e conseqüentemente a quantidade de ingrediente ativo na alimentação também deve ser reduzida (DESAI; PARK, 2005).

Em relação ao processo, a temperatura do ar de entrada é determinante na qualidade do produto obtido. O aumento desta temperatura facilita o processo de secagem, pois normalmente reduz a tensão superficial e a viscosidade, facilitando a formação de gotículas (SOARES, 2002). A temperatura de entrada deve estar acima do ponto de ebulição do solvente utilizado. Mesmo que essa temperatura seja consideravelmente elevada, os sólidos em cada partícula nunca são aquecidos acima da temperatura de saída. A umidade do produto final de secagem é determinada pela temperatura de saída, que por sua vez é dependente da temperatura de entrada. A temperatura do produto aspergido estará aproximadamente 20°C abaixo da temperatura de saída (DE CAMPOS, 1996; AULTON, 2002), a qual é determinante para a sobrevivência dos probióticos à microencapsulação por *spray drying* (FAVARO-TRINDADE; GROSSO, 2002; SUN et al., 2006).

A concentração do meio carreador também pode afetar a sobrevivência da bactéria após *spray drying*, pois um elevado conteúdo de sólidos totais pode resultar em partículas grandes que requerem maiores tempos de secagem. Assim, os microrganismos encapsulados podem ser submetidos a um maior dano térmico, levando à perda de viabilidade (SANTIVARANGKNA et al., 2007). Em estudo de Lian, Hsiao e Chou (2002) a maior sobrevivência de Bifidobacteria após *spray drying* foi obtida quando se utilizou a concentração de 10% (m/m) para os agentes encapsulantes.

Devido à complexidade das várias etapas do *spray drying*, este processo tem se baseado na experiência, tentativa e erro, e trabalho em escala piloto, inclusive quanto à seleção do material encapsulante, o qual será determinante para a eficiência da microencapsulação e a estabilidade das microcápsulas durante a estocagem (GHARSALLAOUI et al., 2007). De acordo com Desai e Park (2005), novos materiais de parede para uso na microencapsulação por *spray drying* não têm sido realmente explorados nos últimos anos. Desta forma, uma área de pesquisa de interesse crescente é o desenvolvimento de polímeros alternativos e de baixo custo, que sejam naturais e que encapsulem com a mesma eficiência que a goma arábica, a qual é tradicionalmente usada.



### 3 ARTIGO I

*Artigo publicado na Ciência Rural (ISSN 0103-8478)*

#### **Potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*: comparação com goma arábica**

*Potential of liquid whey as the encapsulating agent of Bifidobacterium BB-12 by spray drying: comparison with gum arabic*

**Fabiane Picinin de Castro-Cislaghi<sup>1,2\*</sup>, Carlise Beddin Fritzen-Freire<sup>2</sup>, Ernani Sebastião Sant'Anna<sup>2</sup>**

*1 Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Linha Santa Bárbara, s/n, 85601-970, Caixa-Postal 135, Francisco Beltrão, PR, Brasil*

*2 Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil*

#### **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi avaliar o potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*, comparando-o com a goma arábica, a qual é tradicionalmente utilizada na tecnologia de microencapsulação. Foram determinados o rendimento da microencapsulação e a viabilidade das microcápsulas durante o armazenamento. Quando o soro de leite foi utilizado como agente encapsulante, o rendimento da microencapsulação foi maior e a viabilidade das células manteve-se elevada e constante durante doze semanas. O soro de leite apresentou-se como um eficiente agente encapsulante de *Bifidobacterium* por *spray drying*.

**Palavras-chave:** Microencapsulação. *Bifidobacterium*. Probiótico. Soro de leite. Atomização. Secagem. Goma acácia.

## ABSTRACT

The objective of this study was to evaluate the potential of liquid whey as the encapsulating agent *Bifidobacterium* BB-12 by spray drying, compared with arabic gum, which is typically used in microencapsulation technology. The microencapsulation yield and viability during storage were determined. When the whey was used as the encapsulating agent, the microencapsulation yield was higher, and cell viability remained high and steady for twelve weeks. The whey was shown to be an effective encapsulating agent of *Bifidobacterium* by spray drying.

**Keywords:** Microencapsulation. *Bifidobacterium*. Probiotic. Whey. Spray drying. Drying. Acacia gum.

## 3.1 INTRODUÇÃO

A microencapsulação é um processo no qual as células são retidas dentro de uma matriz ou membrana encapsulante (ANAL; SINGH, 2007). Entre as várias aplicações desta tecnologia, na indústria de alimentos, a principal aplicação envolve a proteção de compostos biologicamente ativos ou células, como as bactérias probióticas, de ambientes nocivos para eficiente liberação nos locais alvo (DOHERTY et al., 2011). Probióticos são microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002). Para que um alimento seja considerado probiótico recomenda-se que contenha no mínimo  $10^6 - 10^7$  UFC/g do produto (FAO/WHO, 2002; SHAH, 2007).

Entre todas as gomas usadas na microencapsulação, a goma arábica destaca-se devido às suas excelentes propriedades de emulsificação e, portanto, tem sido amplamente utilizada (DICKINSON, 2003). No entanto, o elevado custo, o suprimento limitado e variações na qualidade têm restringido o uso desta goma como material de parede na microencapsulação e incentivado a busca por materiais encapsulantes alternativos (GHARSALLAOUI et al., 2007).

O soro de leite é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005). É um subproduto de relevante importância na indústria de laticínios, tendo em vista o volume produzido e sua composição



(HUFFMAN, 1996). No entanto, apesar do seu valor nutricional, grande parte do soro de leite produzido ainda é descartada indevidamente no solo e em rios, causando sérios problemas de poluição ambiental, devido a sua alta Demanda Bioquímica de Oxigênio (DBO) (SILVA; BOLINI, 2006). Portanto, alternativas tecnológicas para o seu adequado aproveitamento são fundamentais. As proteínas do soro na forma de concentrado protéico de soro (CPS) ou ainda isolado protéico de soro (IPS) têm sido usadas na microencapsulação de probióticos (PICOT; LACROIX, 2004; REID et al., 2007; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; DOHERTY et al., 2011; GBASSI et al., 2011). No entanto, o uso de soro de leite na forma líquida foi estudado somente por Pimentel-González et al. (2009) que empregaram o soro doce concentrado como emulsificante na microencapsulação de *L. rhamnosus* por emulsificação. Até o momento, não existem publicações sobre o uso de soro de leite líquido como agente encapsulante de probióticos por *spray drying*. Visando a ampliação da utilização deste subproduto na indústria de alimentos, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying*, comparando-o com a goma arábica, a qual é tradicionalmente utilizada na tecnologia de microencapsulação.

### 3.2 MATERIAL E MÉTODOS

Para armazenamento em longo prazo, culturas liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12<sup>®</sup>, Chr. Hansen) foram mantidas na proporção de 2,5 g/100 mL de uma solução estéril de leite desnatado reconstituído 12% a -18 °C (cultura estoque). Antes da microencapsulação, a cultura foi ativada em estufa a 37 °C por 2 h. O soro de leite foi obtido a partir da coagulação enzimática de leite pasteurizado padronizado, através da adição de quimosina (0,9 mL/L, Chr. Hansen<sup>®</sup>) e solução de Cloreto de Cálcio 40% (m/v) (0,4 mL/L) e subsequente incubação a 37 °C por 40 minutos. O soro foi coletado após a quebra do coágulo e dessora, de acordo com metodologia de Furtado e Neto (1994).

*Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulada pelo método de *spray drying* empregando dois agentes encapsulantes: goma arábica (10 g/100 mL) e soro de leite líquido. O agente encapsulante foi previamente preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min. Posteriormente, a cultura estoque foi misturada ao agente encapsulante para obter a solução de alimentação do *spray dryer*. As microcápsulas foram obtidas em um *spray dryer* co-corrente, de escala laboratorial (B-

290 mini *spray dryer*, Buchi), à temperatura de entrada constante de 150 °C e temperatura de saída de  $55 \pm 3$  °C. A solução de alimentação contendo *Bifidobacterium* BB-12 foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e alimentada para a câmara de secagem através de uma bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 6 mL/min., fluxo do ar de secagem de 35 m<sup>3</sup>/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. O pó obtido (microcápsulas) foi coletado da base do ciclone e armazenado em frascos estéreis hermeticamente fechados.

Para enumeração de *Bifidobacterium* BB-12 utilizou-se ágar MRS (Difco, Sparks, MD, EUA) modificado com a adição de 0,2% (m/v) de Cloreto de Lítio e 0,3% (m/v) de Propionato de Sódio (MRS-LP) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000), pela técnica de semeadura em profundidade (*Pour plate*). Após incubação a 37 °C por 72 horas em jarras anaeróbicas contendo AnaeroGen<sup>®</sup> (Oxoid) foi realizada a contagem de células viáveis, expressa em log de unidade formadora de colônia por mL ou g (log UFC/mL ou g). Entretanto, os microrganismos encapsulados foram primeiramente liberados das microcápsulas de acordo com metodologia de Kim et al. (2008), com modificações, homogeneizando 0,1 g das microcápsulas em 9,9 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) por 10 minutos usando uma barra magnética.

O rendimento da microencapsulação (*Encapsulation Yield – EY*) foi calculado através da fórmula:  $EY = (N / N_0) \times 100$ , onde  $N_0$  é o número de células viáveis na solução de alimentação do *spray dryer* e  $N$  é o número de células viáveis no pó obtido, ambos expressos em log UFC/g (PICOT; LACROIX, 2004). O rendimento é uma medida combinada da eficiência da tecnologia de microencapsulação e da sobrevivência das células viáveis durante o processo (ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008). Foi avaliada a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada durante o armazenamento.

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o *software* Statística 7.0, seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância de 5%, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na Tabela 1 é possível observar que não houve diferença ( $p > 0,05$ ) entre as contagens de células viáveis nas soluções de alimentação do *spray dryer* preparadas com goma arábica ou com soro de leite, ou

seja, a contagem inicial antes do processo de microencapsulação foi a mesma para ambos agentes encapsulantes. Entretanto, após *spray drying* houve maior redução da viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com goma arábica, resultando em uma menor contagem de células viáveis no pó obtido, quando comparada à bactéria microencapsulada em soro de leite. Portanto, o rendimento da microencapsulação foi maior quando o soro de leite foi utilizado como agente encapsulante.

Tabela 1. Contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 na solução de alimentação e pó obtido após *spray drying*, redução da viabilidade e rendimento da microencapsulação (EY).

	Agente encapsulante	
	Goma arábica	Soro de leite
Solução de alimentação (log UFC/g)	10,13 <sup>a</sup> ± 0,26	10,28 <sup>a</sup> ± 0,10
Pó (log UFC/g)	8,50 <sup>a</sup> ± 0,12	9,34 <sup>b</sup> ± 0,16
Redução da viabilidade* (log UFC/g)	1,62 <sup>a</sup> ± 0,27	0,94 <sup>b</sup> ± 0,20
EY (%)	84,01 <sup>a</sup> ± 2,29	90,85 <sup>b</sup> ± 1,93

\* diferença entre a contagem de células viáveis (log UFC/g) na solução de alimentação e no pó obtido após *spray drying*.

\*\* resultados expressos como média ± desvio padrão (n = 3).

\*\*\* letras diferentes na mesma linha indicam diferença significativa entre as médias pelo teste de Tukey (p < 0,05).

Os rendimentos obtidos neste estudo para a microencapsulação tanto com soro de leite (90,85 ± 1,93%) quanto com goma arábica (84,01 ± 2,29%) foram satisfatórios quando comparados a outros trabalhos. Chávarri et al. (2010) microencapsularam *B. bifidum* e *L. gasserii* com alginato e quitosana por extrusão e observaram rendimentos de 19,5 a 40,2%. Em estudo realizado por Zhao et al. (2008), houve uma redução de 1,2-2,4 log na viabilidade de *L. acidophilus* após a microencapsulação por *spray drying* com β-ciclodextrina e goma acácia. Chan et al. (2011) observaram uma redução de 4 log na viabilidade de microcápsulas liofilizadas de *L. casei* obtidas por extrusão com alginato. Quando foi adicionado amido ao alginato observaram uma redução de 1,5-2 log UFC/g.

Segundo Golowczyc et al. (2010) a habilidade para sobreviver ao *spray drying* varia consideravelmente entre as espécies de

microrganismos. Lian, Hsiao e Chou (2002), ao microencapsular *Bifidobacterium* por *spray drying* à temperatura de saída constante, verificaram que a sobrevivência das células ao processo depende da cepa e do agente encapsulante utilizados. Picot e Lacroix (2004) observaram que o rendimento da microencapsulação, além de ser dependente da cepa e agente encapsulante, também é influenciado pelo método empregado. Quando *Bifidobacterium* foi microencapsulada em uma solução de WPI por *spray drying* o rendimento foi maior do que quando microencapsulada pelo método de emulsificação seguido de *spray drying*, com WPI e gordura do leite.

Segundo Kim e Bhowmik (1990), a temperatura de saída no *spray dryer* é o principal parâmetro que afeta a viabilidade bacteriana. Sunny-Roberts e Knorr (2009) relataram que a sobrevivência de *L. rhamnosus* após *spray drying* foi inversamente proporcional à temperatura de saída. Visto que neste estudo foi utilizada uma única cepa de microrganismo e selecionados os mesmos parâmetros no *spray dryer*, pode-se sugerir que as diferenças observadas, quanto ao rendimento da microencapsulação e viabilidade nas microcápsulas obtidas, são devido aos diferentes agentes encapsulantes empregados. O soro de leite apresentou melhores resultados quando comparado à goma arábica.

A fim de avaliar o efeito da temperatura de armazenamento na viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com goma arábica, os pós obtidos no *spray dryer* foram mantidos a 4 °C e a -18 °C. As microcápsulas mantidas a -18 °C apresentaram contagens satisfatórias (> 6 log UFC/g) durante 40 semanas (Figura 1). Entretanto, a viabilidade das microcápsulas armazenadas a 4 °C manteve-se adequada somente até a 28ª semana de armazenamento.

Resultados similares foram obtidos por Su, Lin e Chen (2007), que observaram manutenção da viabilidade de *L. acidophilus* e *B. longum* microencapsulados por *spray drying*, com maltodextrina e goma arábica, acima de 7 log UFC/g durante 5 semanas de armazenamento a 4 °C. Simpson et al. (2005) avaliaram a viabilidade de 12 espécies de *Bifidobacterium* microencapsuladas por *spray drying*, com leite desnatado reconstituído com e sem adição de goma arábica, e relataram que todas apresentaram contagens de células viáveis > 6 log UFC/g após 90 dias a 4 °C. Em estudo realizado por Lorenz (2009), a viabilidade de *L. acidophilus* La-5 microencapsulado por *spray drying* com alginato de sódio foi > 6 log UFC/g após 12 semanas a -18 °C.

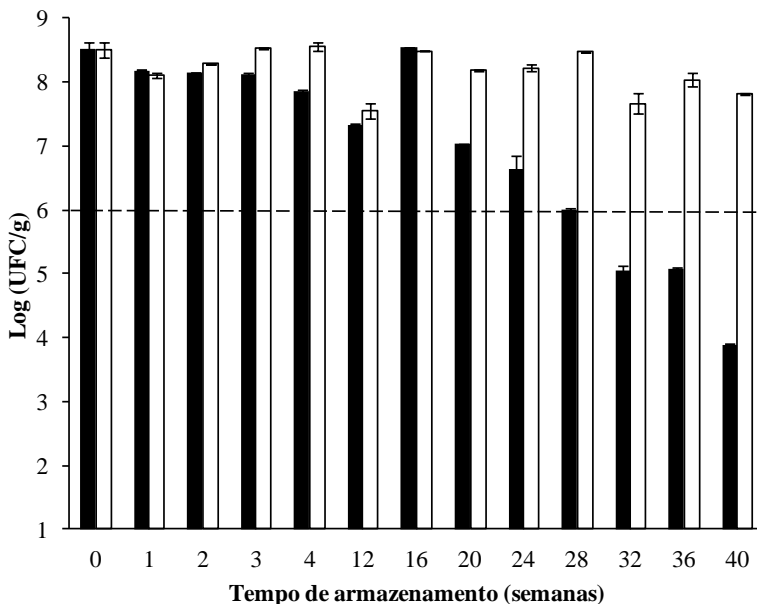


Figura 1. Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com goma arábica durante o armazenamento a 4°C (■) e a -18 °C (□). As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias (n = 3). A semana 0 corresponde à contagem de células viáveis (log UFC/g) realizada no primeiro dia de armazenamento.

Apesar da redução na contagem de células viáveis observada nas microcápsulas com goma arábica mantidas a 4 °C, pode-se inferir que o período pelo qual a viabilidade manteve-se adequada é satisfatório, portanto o pó obtido com soro de leite como agente encapsulante foi armazenado nesta temperatura. As contagens de células viáveis nos pós obtidos após *spray drying* com soro de leite durante o armazenamento a 4 °C mostraram que a viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 manteve-se constante ( $9,27 \pm 0,03$  log UFC/g) ao final da 12ª semana (Figura 2). Quando a goma arábica foi utilizada como agente encapsulante, foi observada uma redução de  $1,18 \pm 0,16$  log UFC/g na viabilidade das microcápsulas armazenadas à mesma temperatura, por igual período. Em estudos realizados por Rodríguez-Huezo et al. (2007) e Zhao et al.

(2008) houve uma redução de 1,32 e 1,0 log UFC/mL, respectivamente, na viabilidade das células microencapsuladas por *spray drying* armazenadas a 4 °C.

A partir dos resultados obtidos, pode-se afirmar que a microencapsulação de *Bifidobacterium* BB-12 por *spray drying* com soro de leite, aplicada neste trabalho, mostrou-se como uma técnica eficaz na manutenção da viabilidade das células durante o armazenamento.

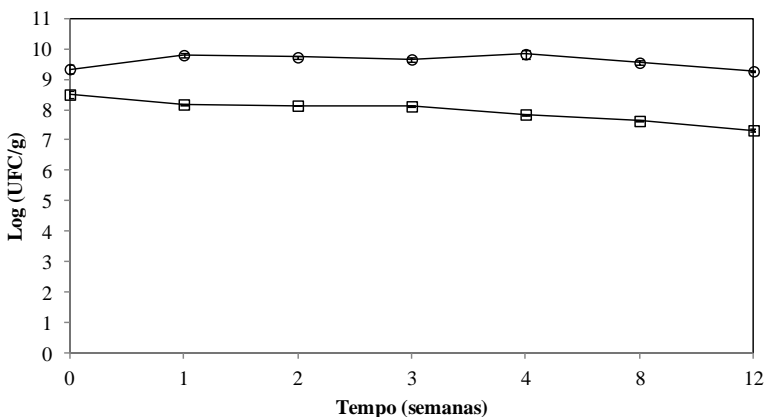


Figura 2. Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite (○) e goma arábica (□) durante o armazenamento a 4 °C. As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias (n = 3). A semana 0 corresponde à contagem de células viáveis (log UFC/g) realizada no primeiro dia de armazenamento.

### 3.4 CONCLUSÃO

O soro de leite mostrou-se eficiente como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 quando comparado à goma arábica. Desta forma, é possível empregar o soro de leite líquido na tecnologia de microencapsulação de probióticos, o que contribui para sua maior utilização, redução do desperdício e da poluição ambiental.

### AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento

Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa.

### 3.5 REFERÊNCIAS

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v.18, p. 240–251, 2007.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 agosto 2005, sec. 1, p. 7.

CHAN, E.S.; WONG, S.L.; LEE, P.P.; LEE, J.S.; TI, T.B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S.H.; YIM, Z.H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.225–232, 2011.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastro-intestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v.142, p.185–189, 2010.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v.17, p.25–39, 2003.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection, **Food Hydrocolloids**, v.25, p.1604-1617, 2011.

FAO/WHO. (2002). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Disponível em: <[http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm)>. Acesso em: 21 julho 2011.

FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos—Manual Técnico para Produção Industrial de Queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; YOLOU, F.S.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v.21, p.97-102, 2011.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v.40, p.1107–1121, 2007.

GOLOWCZYC, M.A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.7–12, 2010.

HUFFMAN, L. M. Processing whey protein for use as a food ingredient. **Food Technology**, Chicago, v. 50, p. 49-52, 1996.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493–500, 2008.

KIM, S. S.; BHOWMIK, S. R. Survival of lactic acid bacteria during spray drying of plain yoghurt. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 1008–1010, 1990.

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



LORENZ, J.G. **Comparação dos métodos de emulsificação e *spray drying* na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete**. 2009. 85f. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v.14, p.505–515, 2004.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J.; CAMPOS-MONTIEL, R.G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v.42, p.292–297, 2009.

REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M31–M37, 2007.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v.40, p.1299–1306, 2007.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v.17, p.1262–1277, 2007.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.26, p.116-122, 2006.

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.

SU, L.C.; LIN, C.W.; CHEN, M. J. Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p.49-54, 2007.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209–214, 2009.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000.

ZHAO, R.; SUN, J.; TORLEY, P.; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1349–1354, 2008.

## 4 ARTIGO II

### **Caracterização de microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com soro de leite líquido e goma arábica**

*Characterization of microcapsules of Bifidobacterium BB-12 obtained by spray drying with liquid whey and gum arabic*

**Fabiane Picinin de Castro Cislighi<sup>1,2\*</sup>, Carlise Beddin Fritzen-Freire<sup>2</sup>, Ernani S. Sant'Anna<sup>2</sup>**

*1 Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Linha Santa Bárbara, s/n, 85601-970, Caixa-Postal 135, Francisco Beltrão, PR, Brasil*

*2 Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil*

## **RESUMO**

O objetivo deste estudo foi caracterizar as microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com soro de leite líquido como agente encapsulante, comparando-as com microcápsulas obtidas com goma arábica, a qual é tradicionalmente utilizada. Foi avaliada a microestrutura, umidade, atividade de água, tempo para dissolução em água e em óleo e a cor. As microcápsulas obtidas com ambos agentes encapsulantes apresentaram diâmetros em torno de 11 µm e formato esférico, com a presença de concavidades, as quais são típicas de produtos atomizados. O conteúdo de água residual e a Aw obtidos estão dentro dos limites para produtos atomizados e também dentro do recomendado para garantir a estabilidade microbiológica. O tempo para dissolução em óleo foi menor do que em água tanto para as microcápsulas produzidas com goma arábica quanto para as produzidas com soro. As microcápsulas elaboradas com soro de leite apresentaram dissolução mais rápida tanto em água quanto em óleo quando comparadas às microcápsulas com goma arábica. Ambas as microcápsulas apresentaram coloração clara, sendo observada tonalidade mais vermelha e amarela nas elaboradas com soro do que as obtidas com goma arábica. As microcápsulas obtidas com soro de leite

como agente encapsulante apresentaram características semelhantes às obtidas com goma arábica.

**Palavras-chave:** Soro de leite. Microencapsulação. *Bifidobacterium*. Probióticos. *Spray drying*. Goma arábica.

## ABSTRACT

The objective of this study was to characterize the microcapsules of *Bifidobacterium* BB-12 obtained by spray drying, with liquid whey as the encapsulating agent, comparing them to microcapsules obtained with gum arabic, which is traditionally used. The microstructure, moisture, water activity, time for dissolution in water and in oil and color were evaluated. The microcapsules obtained with both encapsulating agents had diameters of about 11  $\mu\text{m}$  and spherical shape, with the presence of dimples, which are typical in atomized product. The residual water content and  $A_w$  obtained are within the range for atomized products and also within the recommended range to ensure microbiological stability. The time for dissolution in oil was lower than in water, for the microcapsules made with gum arabic as much as for the ones which were produced with whey. Microcapsules prepared with whey had much more rapid dissolution in water and in oil, when compared to microcapsules with gum arabic. Both microcapsules showed clear color. It was observed more red and yellow shades in microcapsules made with whey than in those obtained with gum arabic. The microcapsules obtained with whey and the encapsulating agent showed similar characteristics to those obtained with gum arabic.

**Keywords:** Whey. Microencapsulation. *Bifidobacterium*. Probiotics. *Spray drying*. Gum arabic.

## 4.1 INTRODUÇÃO

De acordo com Burgain et al. (2011) há um interesse crescente dos consumidores modernos por produtos probióticos. Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). Bifidobactérias têm sido utilizadas na indústria de alimentos probióticos (SHAH, 2007), no entanto, estudos têm indicado baixa viabilidade desses microrganismos em produtos contendo células livres

(DE VOS et al., 2010). Para proteger os probióticos dos danos durante o processamento e armazenamento do alimento, e durante a digestão no trato gastrointestinal, a microencapsulação tem sido amplamente estudada (SABIKHI et al., 2010; CHEN; MUSTAPHA, 2012).

Microencapsulação é a técnica na qual uma membrana engloba pequenas partículas de sólido, líquido ou compostos voláteis com o objetivo de oferecer proteção contra condições adversas (BERTOLINI et al., 2001). A microencapsulação por *spray drying* é o método mais utilizado na indústria de alimentos (JAFARI et al., 2008; ROCHA; FÁVARO-TRINDADE; GROSSO, 2012; MURUGESAN; ORSAT, 2012;). Segundo Peighambardoust, Tafti e Hesari (2011), a tecnologia de *spray drying* é um processo econômico para produção de microrganismos viáveis em escala industrial.

Dos vários materiais que têm sido utilizados como agentes encapsulantes por *spray drying*, a goma arábica se destaca. No entanto, o elevado custo, o suprimento limitado e variações na qualidade têm restrito o uso desta goma como material de parede na microencapsulação e incentivado a busca por materiais encapsulantes alternativos (GHARSALLAOUI et al., 2007; JAFARI et al., 2008). Segundo Desai e Park (2005), é necessário o desenvolvimento de polímeros alternativos e de baixo custo, que sejam naturais e que encapsulem com a mesma eficiência que a goma arábica.

A utilização de soro de leite na tecnologia de microencapsulação de probióticos é promissora devido à grande disponibilidade deste subproduto nos laticínios, o que minimiza os custos do processo. Além de não ter aproveitamento efetivo do soro, grande parte dos laticínios também não tem métodos de descarte adequado e o soro tem sido descartado no ambiente sem qualquer tratamento. Sendo assim, o uso do soro como agente encapsulante também contribui para a minimização dos danos ambientais.

Produtos de soro, como proteínas (WPC e WPI) e permeado de soro têm sido utilizados com sucesso na microencapsulação de probióticos (PICOT; LACROIX, 2004; RIVEROS et al., 2009; WEINBRECK; BODNÁR; MARCO, 2010; RODRIGUES et al., 2011), no entanto o uso de soro de leite líquido sem qualquer tratamento prévio ainda não foi estudado.

O objetivo deste estudo foi caracterizar microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com soro de leite líquido como agente encapsulante, comparando-as com microcápsulas obtidas com goma arábica, a qual é tradicionalmente usada.

## 4.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.2.1 Cultura e preparação das células para microencapsulação

Para armazenamento em longo prazo, culturas liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hónsholm, Dinamarca) foram mantidas na proporção de 2,5 g/100 mL de uma solução estéril de leite desnatado reconstituído 12% à -18 °C (cultura estoque). Antes da microencapsulação, a cultura foi ativada em estufa a 37 °C por 2 h.

### 4.2.2 Elaboração do soro de leite

O soro de leite foi obtido a partir da coagulação enzimática de leite pasteurizado padronizado, através da adição de quimosina (0,9 mL/L, Chr. Hansen<sup>®</sup>, Valinhos, SP, Brasil) e solução de Cloreto de Cálcio 40% (m/v) (0,4 mL/L) e subsequente incubação a 37 °C por 40 minutos. O soro foi coletado após a quebra do coágulo e dessora, de acordo com metodologia de Furtado e Neto (1994).

### 4.2.3 Produção das microcápsulas por *spray drying*

*Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulada pelo método de *spray drying* empregando dois agentes encapsulantes: goma arábica (10 g/100 mL, Vetec, RJ, Brasil) e soro de leite líquido. O agente encapsulante foi previamente preparado e autoclavado a 121 °C por 15 min. Após, a cultura estoque foi misturada ao agente encapsulante para obter a solução de alimentação do *spray dryer*. As microcápsulas foram obtidas em um *spray dryer* co-corrente, de escala laboratorial (B-290 mini *spray dryer*, Buchi, Flawil, Suíça), à temperatura de entrada constante de 150 °C e temperatura de saída de 55 ± 3 °C. A solução de alimentação contendo *Bifidobacterium* BB-12 foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e alimentada para a câmara de secagem através de uma bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 6 mL/min., fluxo do ar de secagem de 35 m<sup>3</sup>/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. O pó obtido (microcápsulas) foi coletado da base do ciclone e armazenado em frascos estéreis hermeticamente fechados.

## 4.2.4 Caracterização das microcápsulas

### 4.2.4.1 Análise de microestrutura

A aparência externa e o tamanho das microcápsulas foram observados em um microscópio eletrônico de varredura Jeol JSM 6390 LV (Jeol, Tokyo, Japão) com voltagem de aceleração de 10 e 15 kV. As amostras foram fixadas com uma fita dupla face em *stubs* de alumínio e recobertas por uma fina camada de ouro, em uma recobridora de ouro (Leica, modelo EM SCD 500, Wetzlar, Alemanha), como descrito por Lian, Hsiao e Chou (2002). Para calcular o diâmetro médio, cerca de 120 partículas de cada tipo de microcápsula (com soro de leite e com goma arábica) foram medidas no microscópio, de acordo com metodologia proposta por Krasaekoopt, Bhandari e Deeth (2004).

### 4.2.4.2 Umidade

A umidade das microcápsulas foi determinada por secagem em estufa a 105 °C, de acordo com metodologia da AOAC (2005).

### 4.2.4.3 Atividade de água

A atividade de água das microcápsulas obtidas por *spray drying* foi determinada pelo medidor Aw43 (Etec, São Paulo, Brasil) a 25°C após estabilização das amostras a esta temperatura por 30 minutos.

### 4.2.4.4 Dissolução

O tempo de dissolução dos pós foi determinado adicionando 2 g do material a 50 mL de água destilada ou óleo de soja a 26 °C (EL-TINAY; ISMAIL, 1985). A mistura foi agitada mecanicamente (DI 03, Dist, Santa Catarina, Brasil) a 892 rpm, usando uma barra magnética de 2 mm x 7 mm. O tempo requerido para completa dissolução (solução límpida) foi determinado (FAVARO-TRINDADE et al., 2010).

### 4.2.4.5 Cor

Os parâmetros de cor L\*, a\* e b\* das microcápsulas foram determinados usando um colorímetro Minolta Chroma Meter CR-400 (Konica Minolta, Osaka, Japão), ajustado para operar com iluminante

D65 e 10° de ângulo de observação. Na escala de cor CIELab, o parâmetro L\* (luminosidade) varia de 0 a 100, indicando a variação de cor do preto ao branco; o eixo a\* mostra a variação do vermelho (+a\*) ao verde (-a\*); enquanto o eixo b\* mostra a variação do amarelo (+b\*) ao azul (-b\*).

#### 4.2.5 Análise estatística

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o *software* Statistica versão 7.0 (2004) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância de 5%, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média ± desvio padrão.

### 4.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO

#### 4.3.1 Caracterização das microcápsulas

##### 4.3.1.1 Microestrutura

As microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas pelo método de *spray drying* com goma arábica e com soro de leite apresentaram formato semelhante: esférico, com a presença de concavidades ou achatamentos (Figura 1). O mesmo foi observado por Fávoro-Trindade e Grosso (2002) em microcápsulas de *L. acidophilus* e *B. lactis* em acetoftalato de celulose; e por Lorenz (2009) em microcápsulas de *L. acidophilus* em gel de alginato, ambas elaboradas por *spray drying*. Desmond et al. (2002) também observaram essas características na superfície de microcápsulas de *L. paracasei* contendo goma arábica, o que não foi evidente nas cápsulas somente com leite em pó desnatado reconstituído.

De acordo com Fávoro-Trindade et al. (2010), as concavidades são típicas de produtos atomizados, no entanto Rodríguez-Huezo et al. (2007) relataram que a formação destas depende da temperatura de secagem, sendo que temperaturas de secagem moderadas (como temperatura de entrada de 140 °C e de saída de 60 °C) ocasionam estas concavidades na superfície, as quais dão aos pós obtidos características como resistência à fratura mecânica e à difusão do soluto. Segundo Lian, Hsiao e Chou (2002), a formação de tais achatamentos pode ser



denominada como “efeito bola murcha” (*flat ball effect*) e a extensão em que esse efeito ocorre depende do material encapsulante utilizado.

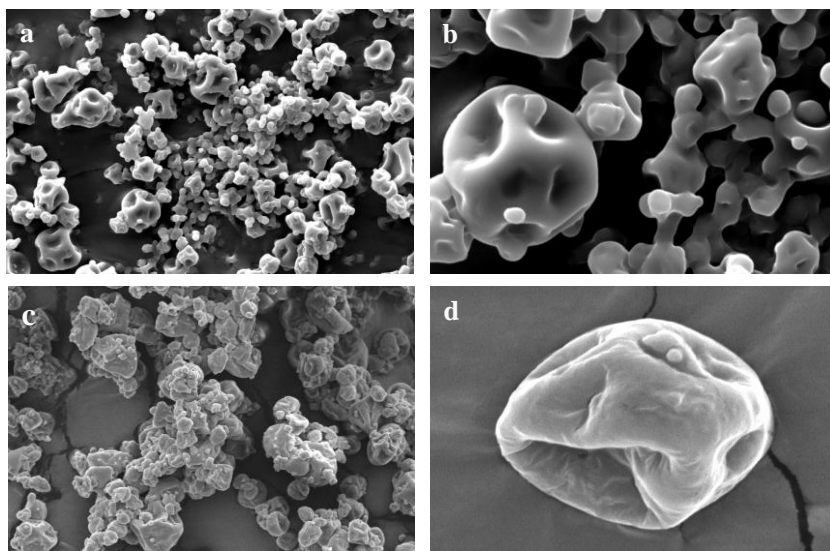


Figura 1. Micrografias das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas pelo método de *spray drying*. (a) goma arábica (500x); (b) goma arábica (2000x); (c) soro de leite (800x); (d) soro de leite (5000x).

As microcápsulas de *Bifidobacterium* apresentaram diâmetros em torno de 11  $\mu\text{m}$ , sendo que não houve diferença entre os tamanhos das microcápsulas obtidas com soro de leite e com goma arábica (Tabela 1). Fang e Bhandari (2010) relatam que o diâmetro de microcápsulas obtidas por *spray drying* pode variar de 10 a 100  $\mu\text{m}$ . Fritzen-Freire et al. (2012) observaram que o tamanho das cápsulas de *Bifidobacterium* em leite desnatado reconstituído com e sem adição de prebióticos variou de 14,45 a 18,78  $\mu\text{m}$ . De acordo com Champagne e Fustier (2007), microcápsulas muito grandes podem afetar a textura do alimento no qual será incorporada. Diâmetros menores que 100  $\mu\text{m}$  são preferidos para a maioria das aplicações (ANNAN et al., 2008).

Tabela 1. Características das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com goma arábica e com soro de leite.

	Agente encapsulante	
	Goma arábica	Soro de leite
Tamanho (µm)	11,06 <sup>a</sup> ± 4,44	11,23 <sup>a</sup> ± 4,21
Umidade (g/100 g)	4,90 <sup>a</sup> ± 0,84	3,05 <sup>a</sup> ± 0,43
Aw	0,26 <sup>a</sup> ± 0,01	0,23 <sup>a</sup> ± 0,01
Tempo para dissolução em água (s)	819,00 <sup>a</sup> ± 7,07	552,50 <sup>b</sup> ± 9,19
Tempo para dissolução em óleo (s)	425,50 <sup>a</sup> ± 6,36	279,00 <sup>b</sup> ± 7,07

\* Resultados expressos como média ± desvio-padrão.

\*\* letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % (p < 0,05).

#### 4.3.1.2 Umidade e Atividade de água

Os valores de umidade foram similares para as microcápsulas obtidas com ambos agentes encapsulantes (Tabela 1). O mesmo foi observado para os valores de atividade de água (Aw), sendo que estes estão dentro dos limites para produtos atomizados e também dentro do recomendado para garantir a estabilidade microbiológica (<0,6) (FÁVARO-TRINDADE et al., 2010). O conteúdo de água de pós probióticos é um fator crítico que influencia a estabilidade da bactéria durante o armazenamento (WANG; YU; CHOU, 2004; SANTIVARANGKNA et al., 2007; MENG et al., 2008; CHAN et al., 2011). Em geral, os microrganismos sobrevivem melhor com atividade de água baixa. Entretanto, a secagem em excesso pode diminuir a viabilidade e estabilidade dos microrganismos (LI et al., 2011).

Segundo Gardiner et al. (2000) e Meng et al. (2008), é necessária uma umidade residual de 4% ou menos para o armazenamento prolongado de pós contendo probióticos. Zayed e Roos (2004) observaram que o conteúdo ótimo de água para armazenamento de *L. salivarius* subsp. *salivarius* variou de 2,8 a 5,6%, enquanto que valores maiores de água residual imediatamente após a secagem levam a perdas mais elevadas de células probióticas durante o armazenamento na forma de pó. De acordo com esses autores, certa quantidade de água deve permanecer no produto para que se obtenha uma taxa de sobrevivência satisfatória. Sunny-Roberts e Knorr (2009) observaram valores de umidade de 3,79 a 4,1% após *spray drying* de *L. rhamnosus* GG e *L. rhamnosus* E-97800 (E800). Heidebach, Först e Kulozik (2010) obtiveram valores entre 3 e 4% para o conteúdo médio de água residual

de microcápsulas de *Lactobacillus* F19 e *Bifidobacterium* BB-12 após a secagem, não sendo observada diferença significativa devido à espécie ou ao tipo de matriz protéica utilizada. Em estudo realizado por Li et al. (2011), a umidade das microcápsulas de *L. casei* variou de 8,3 a 10,6%.

As microcápsulas apresentaram atividade de água menor que 0,3 (Tabela 1), o que de acordo com Tonon et al. (2009), é muito positivo para a estabilidade dos pós, visto que há menos água livre disponível para reações bioquímicas, prolongando a vida de prateleira. Resultados similares foram obtidos por Fritzen-Freire et al. (2012). Golowczyc et al. (2010) microencapsularam *L. plantarum* 83114 com leite em pó desnatado reconstituído por *spray drying* e obtiveram valores de  $A_w$  que variaram de 0,24 a 0,44. Semyonov et al. (2010) observaram valores de  $A_w$  de 0,33 a 0,8 para microcápsulas de *Lactobacillus paracasei*.

De acordo Masters (1985) e Kearney et al. (2009) a atividade de água e a umidade devem estar abaixo de 0,25 e 5%, respectivamente. O conteúdo de água residual bem como a  $A_w$  obtidos nesse estudo para as microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 com goma arábica e com soro de leite parecem ser adequados para armazenamento a longo prazo.

#### 4.3.1.3 Dissolução

O tempo para dissolução em óleo foi menor ( $p < 0,05$ ) do que em água tanto para as microcápsulas produzidas com goma arábica quanto para as produzidas com soro (Tabela 1). Resultados similares foram obtidos por Fávaro-Trindade et al. (2010) para microcápsulas de hidrolisado de caseína obtidas por *spray drying* com proteína de soja e gelatina como encapsulantes. Segundo Favaro-Trindade et al. (2010), estes resultados podem ser explicados pela exposição dos sítios hidrofóbicos, os quais são capazes de promover interações proteína-óleo, facilitando a dissolução neste solvente/meio.

Fritzen-Freire et al. (2012) observaram tempos de dissolução em água de 190,77 a 332,37 segundos, para microcápsulas de *Bifidobacterium* com leite desnatado reconstituído obtidas por *spray drying*. Essa maior solubilidade observada, quando comparada a este trabalho, pode ser explicada pelo fato de que quando o leite é submetido ao *spray dryer*, os grupos hidrofílicos (uma mistura de lactose e proteínas do leite) são mais expostos, desta forma aumentando a solubilidade (GHARSALLAOUI et al., 2007).

As microcápsulas elaboradas com soro de leite apresentaram dissolução mais rápida tanto em água quanto em óleo quando comparadas às microcápsulas com goma arábica. Os pós obtidos com

ambos agentes encapsulantes foram capazes de se dissolver em água e em óleo (Tabela 1), o que permite sua aplicação em uma ampla variedade de produtos.

#### 4.3.1.4 Cor

Os atributos de cor das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 estão apresentados na Tabela 2. As microcápsulas obtidas com os diferentes agentes encapsulantes não apresentaram diferença entre si ( $p > 0,05$ ) quanto à luminosidade ( $L^*$ ). O parâmetro  $L^*$  foi elevado, indicando que ambas as microcápsulas apresentaram coloração clara. Entretanto, as microcápsulas com soro de leite apresentaram maiores valores de  $a^*$  e  $b^*$ , indicando tonalidade mais vermelha e amarela que as obtidas com goma arábica, respectivamente. Esta diferença pode ser devido à reação de Maillard entre açúcares redutores e proteínas que pode ter ocorrido durante a microencapsulação por *spray drying* com soro de leite. Além disso, de acordo com Aryana e McGrew (2007), um fator que influencia a cor do produto é a cor dos ingredientes utilizados. Isto explica a maior tendência ao amarelo das microcápsulas com soro de leite, visto que o soro naturalmente apresenta coloração amarelo-clara.

Tabela 2. Atributos de cor das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com goma arábica e com soro de leite.

	Goma arábica	Soro de leite
$L^*$	87,63 <sup>a</sup> ± 1,79	85,96 <sup>a</sup> ± 1,81
$a^*$	0,60 <sup>a</sup> ± 0,02	0,95 <sup>b</sup> ± 0,05
$b^*$	6,10 <sup>a</sup> ± 0,15	11,42 <sup>b</sup> ± 0,44

\* Resultados expressos como média ± desvio-padrão.

\*\* letras diferentes na mesma linha diferem significativamente entre si, pelo teste de Tukey, ao nível de significância de 5 % ( $p < 0,05$ ).

## 4.4 CONCLUSÃO

As microcápsulas obtidas com soro de leite como agente encapsulante apresentaram características semelhantes às obtidas com goma arábica, a qual é amplamente utilizada. Desta forma, o soro de leite pode ser utilizado na microencapsulação de probióticos por *spray drying*, o que contribui para seu maior aproveitamento e redução do desperdício.

## 4.5 REFERÊNCIAS

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.

ARYANA, K.J.; MCGREW, P. Quality attributes of yogurt with *Lactobacillus casei* and various prebiotics. **LWT - Food Science and Technology**, v. 40, p. 1808-14, 2007.

BERTOLINI, A.C., SIANI, A.C. and GROSSO, C.R.F. 2001. Stability of monoterpenes encapsulated in gum Arabic by spray-drying. *J. Agric. Food Chem.* 49, 780–785.

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

CHAMPAGNE, C. P., & FUSTIER, P. Microencapsulation for the improved delivery of bioactive compounds into foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v.18, p.184–190, 2007.

CHAN, E.S.; WONG, S.L.; LEE, P.P.; LEE, J.S.; TI, T.B.; ZHANG, Z.; PONCELET, D.; RAVINDRA, P.; PHAN, S.H.; YIM, Z.H. Effects of starch filler on the physical properties of lyophilized calcium–alginate beads and the viability of encapsulated cells. **Carbohydrate Polymers**, v.83, p.225–232, 2011.

CHEN, M.; MUSTAPHA, A. Survival of freeze-dried microcapsules of  $\alpha$ -galactosidase producing probiotics in a soy bar matrix. **Food Microbiology**, v. 30, 68-73, 2012.

DE VOS, P.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.

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

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

EL-TINAY, A. H., & ISMAIL, I. A. Effect of some additives and processes on the characteristics of agglomerated and granulated spray-dried Roselle powder. **Acta Alimentaria Hungaricae**, v.14, p. 283–295, 1985.

FANG, Z. X., & BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols – A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, p. 510–523, 2010.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Canadá, 2002. Disponível em: [http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm). Acesso em: 26 março 2009.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 485-494, 2002.

FAVARO-TRINDADE, C.S.; SANTANA, A.S.; MONTERREY-QUINTERO, E.S.; TRINDADE, M.A.; NETTO, F.M. The use of spray drying technology to reduce bitter taste of casein hydrolysate. **Food Hydrocolloids**, v. 24, p. 336–340, 2010.

FRITZEN-FREIRE, C.B., PRUDÊNCIO, E.S., AMBONI, R.D.M.C., PINTO, S.S.; NEGRÃO-MURAKAMI, A.N., MURAKAMI, F.S. Microencapsulation of bifidobacteria by spray drying in the presence of prebiotics. **Food Research International**, v. 45, p. 306–312, 2012.

FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos—Manual Técnico para Produção Industrial de Queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GARDINER, G.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A.E.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2605–2612, 2000.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GOLOWCZYC, M.A.; SILVA, J.; ABRAHAM, A.G.; DE ANTONI, G.L.; TEIXEIRA, P. Preservation of probiotic strains isolated from kefir by spray drying. **Letters in Applied Microbiology**, v.50, p.7–12, 2010.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Influence of casein-based microencapsulation on freeze-drying and storage of probiotic cells. **Journal of Food Engineering**, v. 98, p. 309–316, 2010.

JAFARI, S.M., ASSADPOOR, E., HE, Y., BHANDARI, B. Encapsulation efficiency of food flavors and oils during spray drying. **Drying Technology**, v. 26, p. 816–835, 2008.

KEARNEY, N., MENG, X. C., STANTON, C., KELLY, J., FITZGERALD, G. F., & ROSS, R. P. Development of a spray dried probiotic yoghurt containing *Lactobacillus paracasei* NFBC 338. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 684-689, 2009.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737–743, 2004.

LI, X.Y.; CHENB,X.G.; SUNA, Z.H.; PARKC, H.J.; CHAC, D.S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex

microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479–1485, 2011.

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

LORENZ, J.G. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

MASTERS, K. **Spray drying handbook**. (4th ed.). London: Halsted Press, 1985.

MENG, X.C.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; DALY, C.; ROSS, R.P. Anhydrobiotics: The challenges of drying probiotic cultures. **Food Chemistry**, v.106, p.1406–1416, 2008.

MURUGESAN, R.; ORSAT, V. Spray drying for the production of nutraceutical ingredients – a review. **Food and Bioprocess Technology**, v. 5, p. 3–14, 2012.

PEIGHAMBARDOUST, S.H.; TAFTI, A.G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 215-224, 2011.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505–515, 2004.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, p. 123-132, 2009.

ROCHA, G.A.; FÁVARO-TRINDADE, C.S.; GROSSO, C.R.F. Microencapsulation of lycopene by spray drying: Characterization, stability and application of microcapsules. **Food and Bioprocess Processing**, v. 90, p. 37–42, 2012.



RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

SABIKHI, L., BABU, R., THOMPSON, D.K., KAPILA, S. Resistance of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* LA1 to processing treatments and simulated gut conditions. **Food and Bioprocess Technology**, v. 3, p. 586-593, 2010.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v.23, p. 302-315, 2007.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, p. 193-202, 2010.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262–1277, 2007.

SUNNY-ROBERTS, E. O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v.19, p.209–214, 2009.

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.

WANG, Y.; YU, R.; CHOU, C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 209–217, 2004.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 364–367, 2010.

ZAYED, G.; ROOS, Y.H. Influence of trehalose and moisture content on survival of *Lactobacillus salivarius* subjected to freeze-drying and storage. **Process Biochemistry**, v. 39, p. 1081–1086, 2004.

## 5 ARTIGO III

Artigo publicado no *Journal of Food Engineering* (ISSN: 0260-8774), v.113, p.186-193, 2012, DOI: 10.1016/j.jfoodeng.2012.06.006

### ***Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada por *spray drying* com soro de leite: sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas, tolerância ao NaCl e viabilidade durante o armazenamento**

*Bifidobacterium BB-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage*

**Fabiane Picinin de Castro-Cislaghi<sup>1,2\*</sup>, Carina dos Reis e Silva<sup>2</sup>, Carlise Beddin Fritzen-Freire<sup>2</sup>, Juliana Goulart Lorenz<sup>2</sup>; Ernani S. Sant'Anna<sup>2</sup>**

*1 Universidade Tecnológica Federal do Paraná, Linha Santa Bárbara, s/n, 85601-970, Caixa-Postal 135, Francisco Beltrão, PR, Brasil*

*2 Departamento de Ciência e Tecnologia de Alimentos, Centro de Ciências Agrárias, Universidade Federal de Santa Catarina, Rod. Admar Gonzaga, 1346, Itacorubi, 88034-001, Florianópolis, SC, Brasil*

## RESUMO

*Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulada por *spray drying* com soro de leite. Este trabalho investigou a sobrevivência destas microcápsulas em condições gastrointestinais simuladas, a tolerância ao NaCl e a viabilidade durante o armazenamento. Os resultados mostraram uma pequena redução na viabilidade de *Bifidobacterium* microencapsulada em pH baixo. Em relação à exposição de *Bifidobacterium* à bile, a microencapsulação com soro de leite não protegeu as células probióticas, no entanto a viabilidade das microcápsulas permaneceu > 6 log UFC/g mesmo após 24 horas de incubação na maior concentração de bile estudada. Não foi observado crescimento tanto para as células livres quanto para as microencapsuladas em MRS-LP com NaCl. A viabilidade das microcápsulas armazenadas a 4 °C manteve-se elevada e constante por 12 semanas. Quando as microcápsulas foram adicionadas em sobremesa láctea, a população do probiótico manteve-se acima de 7

log UFC/g por 6 semanas. O soro de leite mostrou-se promissor como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12.

**Palavras-chave:** Probiótico. Microencapsulação. Soro. *Spray drying*. *Bifidobacterium*.

## ABSTRACT

*Bifidobacterium* BB-12 was microencapsulated by spray drying with whey. This present work investigated the survival of these microcapsules under simulated gastrointestinal conditions, as well as their tolerance to NaCl and their viability during storage. The results showed a small decrease in the viability of microencapsulated *Bifidobacterium* at low pH. In relation to the exposure of *Bifidobacterium* to bile, microencapsulation with whey did not protect the probiotic cells; however, the viability of the microcapsules remained  $>6 \log \text{ cfu/g}$ , even after 24 h of incubation at the highest bile concentration analyzed. No growth was noted with either the free cells or the microencapsulated cells on MRS-LP with NaCl. The viability of the microcapsules stored at 4 °C remained high and constant for 12 weeks. When the microcapsules were added to a dairy dessert, the probiotic count remained above 7 log cfu/g for 6 weeks. Therefore, whey is a promising encapsulating agent for *Bifidobacterium* BB-12.

**Keywords:** Probiotic. Microencapsulation. Whey. *Spray drying*. *Bifidobacterium*.

## 5.1 INTRODUÇÃO

Probióticos são microrganismos vivos que quando administrados em quantidades adequadas conferem benefícios à saúde do indivíduo (FAO/WHO, 2002). Espécies de Lactobacilli e bifidobacteria têm demonstrado efeitos benéficos na imunomodulação e na redução ou prevenção de diversas doenças intestinais (SERVIN; COCONNIER, 2003; SHAH, 2007). No entanto, para exercer esses efeitos benéficos, os probióticos devem ser capazes de tolerar as condições ácidas do estômago e a bile no intestino delgado (SULTANA et al., 2000; DOLEYRES; FLISS; LACROIX, 2004). O ambiente ácido do estômago e os sais biliares secretados no duodeno são os principais obstáculos à sobrevivência da bactéria ingerida. A tolerância de bifidobactéria a

valores de pH do suco gástrico geralmente é considerada baixa (CHARTERIS et al., 1998; MATSUMOTO; OHISHI; BENNO, 2004; TAKAHASHI et al., 2004; COLLADO; SANZ, 2006). Além disso, a sobrevivência dos probióticos durante o processamento e armazenamento dos alimentos é também fundamental para o desenvolvimento de produtos com quantidade adequada de células viáveis (ANAL; SINGH, 2007).

A proteção de probióticos através da microencapsulação em cápsulas de hidrocolóides preparadas por técnicas de extrusão, emulsão ou em micropartículas atomizadas tem sido investigada (DOLEYRES; LACROIX, 2005). Entretanto, a sobrevivência após exposição ao ácido raramente tem resultado satisfatória e quando uma grande proteção contra o suco gástrico foi observada, a sobrevivência das células apresentou grande redução dentro de poucas semanas de armazenamento (ALBERTINI et al., 2010).

A microencapsulação por *spray drying* tem sido usada com sucesso na indústria alimentícia por várias décadas (GOUIN, 2004). Esta técnica envolve a dispersão das células em uma solução polimérica que é atomizada na câmara de secagem (GHARSALLAOUI et al., 2007). Isso leva à evaporação do solvente e, conseqüentemente, a formação das microcápsulas (KAILASAPATHY, 2002). Entre as principais vantagens do *spray drying* estão o baixo custo e a rapidez para produzir grandes quantidades de células viáveis (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995; TEIXEIRA et al., 1995; GARDINER et al., 2000; SILVA et al., 2005).

O soro de leite é o líquido residual obtido a partir da coagulação do leite destinado à fabricação de queijos ou de caseína (BRASIL, 2005). Segundo Smithers (2008) e Dragone et al. (2009), o soro é o principal produto secundário da indústria láctea, sendo composto principalmente por lactose e proteínas solúveis (SCHAAFSSMA, 2008; YORGUN, 2008). Parte do soro de leite gerado pela indústria é utilizada como aditivo alimentar, mas a maioria é descartada como resíduo (AOUIDI et al., 2009), o que causa sérios problemas ambientais, pois o soro é um forte poluente orgânico que apresenta alta demanda bioquímica de oxigênio (40 g/l a 60 g/l) (ATHANASIADIS et al., 2004). As indústrias de medicamentos e alimentos têm um grande interesse em desenvolver produtos utilizando soro de leite e seus derivados como fontes de matérias-primas (SOUZA et al., 2010). Dessa forma, é necessária a busca por novas e interessantes aplicações para o soro a fim de aumentar seu aproveitamento e ao mesmo tempo reduzir seu volume descartado.

Uma variedade de materiais tem sido utilizada para microencapsular probióticos, como goma arábica, alginato, gelatina, maltodextrina, pectina, leite desnatado, amido, quitosana, entre outros (ORJORDAN et al., 2001; CAPELA; HAY; SHAH, 2007; SU; LIN; CHEN, 2007; ANNAN; BORZA; TRUELSTRUP HANSEN, 2008; REDDY; MADHU; PRAPULLA, 2009; SANDOVAL-CASTILLA et al., 2010; SEMYONOV et al., 2010; LI et al., 2011). Alguns trabalhos têm utilizado proteínas do soro de leite na forma de concentrado protéico de soro (WPC), ou ainda isolado protéico de soro (WPI) na tecnologia de microencapsulação de probióticos (GUERIN; VUILLEMARD; SUBIRADE, 2003; PICOT; LACROIX, 2004; REID et al., 2005; REID et al., 2007; RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007; GBASSI et al., 2009; DOHERTY et al., 2010; WEINBRECK; BODNÁR; MARCO, 2010; DOHERTY et al., 2011; GBASSI et al., 2011).

Riveros et al. (2009) utilizaram permeado de soro como agente carreador na atomização de *Lactobacillus acidophilus*. No entanto, o uso de soro de leite na forma líquida foi estudado somente por Pimentel-González et al. (2009) que empregaram o soro doce concentrado como emulsificante na microencapsulação de *L. rhamnosus* por emulsificação. Até o momento, não existem estudos sobre o uso de soro de leite líquido como agente encapsulante de probióticos por *spray drying*.

Dessa forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o potencial do soro de leite líquido como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12 através da avaliação da sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas, tolerância ao NaCl e viabilidade durante o armazenamento.

## 5.2 MATERIAL E MÉTODOS

### 5.2.1 Cultura e preparação das células para microencapsulação

Células liofilizadas de *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 (BB-12<sup>®</sup>, Chr. Hansen, Hónsholm, Dinamarca) foram reidratadas a 2,5 g/100 mL usando uma solução estéril de leite em pó desnatado comercial (Molico<sup>®</sup>, Nestlé, São Paulo, Brasil) reconstituído a 12% e mantidas como solução estoque a -18 °C em frascos estéreis. Antes da microencapsulação, a cultura foi ativada em estufa a 37 °C por 2 h. A cultura livre (não-encapsulada) foi utilizada como controle.

### 5.2.2 Elaboração do soro de leite

O soro de leite foi obtido a partir da coagulação enzimática de leite pasteurizado padronizado, através da adição de quimosina (0,9 mL/L, Chr. Hansen®, Valinhos, SP, Brasil) e solução de Cloreto de Cálcio 40% (m/v) (0,4 mL/L) e subsequente incubação a 37 °C por 40 minutos. O soro foi coletado após a quebra do coágulo e dessora, de acordo com metodologia de Furtado e Neto (1994). As características finais do soro obtido foram: 6,1 g/100g sólidos totais; 0,66 g/100g proteína; 0,53 g/100g cinzas; 0,16 g/100g gordura; 4,74 g/100g carboidratos totais; acidez 0,11 (% ácido láctico); e pH 6,23.

### 5.2.3 Produção das microcápsulas por *spray drying*

*Bifidobacterium* BB-12 foi microencapsulada pelo método de *spray drying* empregando como agente encapsulante soro de leite líquido. O soro de leite foi previamente autoclavado a 121 °C por 15 min. Em seguida, a cultura estoque foi adicionada para obter a solução de alimentação do *spray dryer*. As microcápsulas foram obtidas em um *spray dryer* co-corrente de escala laboratorial (B-290 mini *spray dryer*, Buchi, Flawil, Suíça), à temperatura de entrada constante de 150 °C e temperatura de saída de 55 ± 3 °C. A solução de alimentação contendo *Bifidobacterium* BB-12 foi mantida sob agitação à temperatura ambiente e alimentada para a câmara de secagem através de uma bomba peristáltica, com fluxo de alimentação de 6 mL/min., fluxo do ar de secagem de 35 m<sup>3</sup>/h e pressão do compressor de ar de 0,7 MPa. O pó obtido (microcápsulas) foi coletado da base do ciclone e armazenado em frascos estéreis hermeticamente fechados a 4 °C.

### 5.2.4 Enumeração de *Bifidobacterium* BB-12 livre e encapsulada

*Bifidobacterium* BB-12 foi enumerada em ágar MRS (Difco, Sparks, MD, EUA) modificado com a adição de 0,2% (m/v) de Cloreto de Lítio e 0,3% (m/v) de Propionato de Sódio (MRS-LP) (VINDEROLA; REINHEIMER, 2000), pela técnica de semeadura em profundidade (*Pour plate*). Após incubação a 37 °C por 72 horas em jarras anaeróbicas contendo AnaeroGen® (Oxoid, Hampshire, Reino Unido) foi realizada a contagem de células viáveis, expressa em log de unidade formadora de colônia por mL ou g (log UFC/mL ou g). Os microrganismos encapsulados foram primeiramente liberados das microcápsulas de acordo com metodologia de Kim et al. (2008), com

modificações, homogeneizando 0,1 g das microcápsulas em 9,9 mL de tampão fosfato (0,1 M, pH 7,0) por 10 minutos usando uma barra magnética.

## **5.2.5 Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas**

### *5.2.5.1 Condições ácidas*

Para simulação das condições ácidas foi utilizado o meio NGYC (12% de leite desnatado, 2% de glicose, 1% de extrato de levedura e 0,05% de cisteína). As células livres e encapsuladas foram adicionadas em tubos contendo 10 mL do meio NGYC ajustado a pH 2,0; 3,0; 4,0 ou 6,0 com HCl 5 M ou NaOH 1 M. Os tubos foram incubados a 37 °C e foram retiradas amostras em triplicata de cada tratamento após 0, 1, 2 e 3 horas (LANKAPUTHRA; SHAH, 1995; SULTANA et al., 2000; CHANDRAMOULI et al., 2004). A sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 livre e encapsulada foi avaliada através da enumeração em ágar MRS-LP, como descrito na seção 5.2.4.

### *5.2.5.2 Bile*

A resistência à bile foi determinada adicionando as células livres e encapsuladas a 10 mL do meio MYE (10% leite desnatado, 0,5% de extrato de levedura e 0,05% de cisteína; pH 6,9) contendo 0 (controle), 0,5% e 1% de bile (Oxgall, Difco, Sparks, MD, EUA). Amostras em triplicata foram retiradas após incubação a 37 °C por 0, 3, 6 e 24 horas (TRUELSTRUP HANSEN et al., 2002; CHANDRAMOULI et al., 2004). A sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 livre e encapsulada foi avaliada através da enumeração em ágar MRS-LP, como descrito na seção 5.2.4.

## **5.2.6 Tolerância ao sal**

A fim de investigar o possível dano celular resultante da microencapsulação por *spray drying*, foi determinada a sensibilidade de *Bifidobacterium* BB-12 ao NaCl antes e após o processo, de acordo com metodologia de Gardiner et al. (2000) e Corcoran et al. (2004). As células viáveis da cultura estoque (células livres) e dos pós obtidos por *spray dryer* foram enumeradas através da técnica de semeadura em profundidade (*pour-plate*) em ágar MRS suplementado com NaCl (5



g/100 mL, Synth, SP, Brasil). O número de células viáveis foi comparado ao número obtido nas placas de ágar MRS sem NaCl.

### **5.2.7 Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 durante o armazenamento**

A viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada durante o armazenamento por 12 semanas a 4 °C foi avaliada através da enumeração em ágar MRS-LP, como descrito na seção 5.2.4.

### **5.2.8 Viabilidade das microcápsulas em sobremesa láctea**

As microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 foram incorporadas em sobremesa láctea comercial (sabor chocolate branco, Vigor Delicatessen<sup>®</sup>, São Paulo, Brasil). Dez gramas das microcápsulas foram adicionadas a 100 g da sobremesa. A sobremesa foi armazenada a 4 °C por 6 semanas. A viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada na sobremesa foi avaliada através da enumeração em ágar MRS-LP, como descrito na seção 5.2.4.

### **5.2.9 Análise estatística**

Os dados foram submetidos à análise de variância (ANOVA) usando o *software* Statistica versão 7.0 (2004) (Statsoft Inc., Tulsa, OK, EUA), seguida pelo teste de Tukey para comparação das médias, com nível de significância de 5%, quando encontradas diferenças significativas entre os tratamentos. Todas as análises foram realizadas em triplicata e os dados expressos como média  $\pm$  desvio padrão.

## **5.3 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### **5.3.1 Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 em condições gastrointestinais simuladas**

#### *5.3.1.1 Condições ácidas*

A Figura 1 mostra a sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 livre e microencapsulada por *spray drying* com soro de leite em condições ácidas. Após 3 horas de incubação, em pH 6,0 e em pH 4,0 não foi observada redução ( $p > 0,05$ ) no número de células viáveis tanto para a cultura microencapsulada quanto para a cultura livre. Em pH 3,0

foi observada redução de  $0,56 \pm 0,17$  log UFC/g para a microencapsulada, enquanto a livre não apresentou redução. No entanto, em pH 2,0 houve uma maior redução ( $p < 0,05$ ) da viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 livre ( $1,51 \pm 0,27$  log UFC/g) quando comparada à microencapsulada ( $0,73 \pm 0,18$  log UFC/g). Não houve diferença significativa ( $p > 0,05$ ) entre as reduções nas contagens em pH 2,0 e em pH 3,0 para as microcápsulas obtidas com soro de leite, ou seja, a sobrevivência não foi menor em pH 2,0 quando comparado ao pH 3,0. Esses resultados são semelhantes aos de Li et al. (2011), em que a redução da viabilidade em pH 2,0 e pH 3,0 também foi similar. Microcápsulas de *L. casei* com alginato, quitosana e carboximetil quitosana obtidas por extrusão apresentaram redução de 0,52 a 0,86 log após 2 horas de incubação em pH 2,0.

Por outro lado, em estudo realizado por Sultana et al. (2000), houve um maior decréscimo (cerca de 2 log) na contagem de células viáveis de *L. acidophilus* microencapsulado em uma mistura de alginato e amido resistente em pH 4,0 e 3,0; enquanto em pH 2,0 houve uma redução de 5 log UFC/g, após 3 horas de incubação. Quando avaliada a sobrevivência de *Bifidobacterium infantis*, a bactéria apresentou somente uma pequena redução em pH 4,0 e 3,0, enquanto houve um decréscimo de 3 log em pH 2,0 após 3 h de exposição. Chandramouli et al. (2004) relataram redução de 1 log na contagem de células viáveis de *L. acidophilus* microencapsulado em alginato, após 3 h de incubação em pH 3,0. A exposição da bactéria microencapsulada pelo mesmo período de tempo ao pH 2,0 resultou em um decréscimo de 3 log na contagem de células. Annan, Borza e Truelstrup Hansen (2008) observaram reduções de 1,21 a 2,55 log para microcápsulas de *B. adolescentis* com gelatina, genipina e alginato em pH 2,0 após 2 horas. Lorenz (2009) verificou uma redução de 1,05 log na viabilidade de *L. acidophilus* microencapsulado em alginato por *spray drying*, já na primeira hora de incubação em pH 3,0. Em pH 2,0 as células microencapsuladas apresentaram redução de 1,76 log após 3 h de incubação. Microcápsulas de *L. casei* obtidas com caseinato de sódio e goma gelana por emulsificação apresentaram redução de 3,1 log na viabilidade após 2 horas em pH 2,0 (NAG; HAN; SINGH, 2011). Brinques e Ayub (2011) observaram que a microencapsulação em alginato e pectina não protegeu as células de *L. plantarum* quando expostas ao pH 2,0, havendo grande redução da viabilidade (cerca de 3 a 4 log UFC/g).

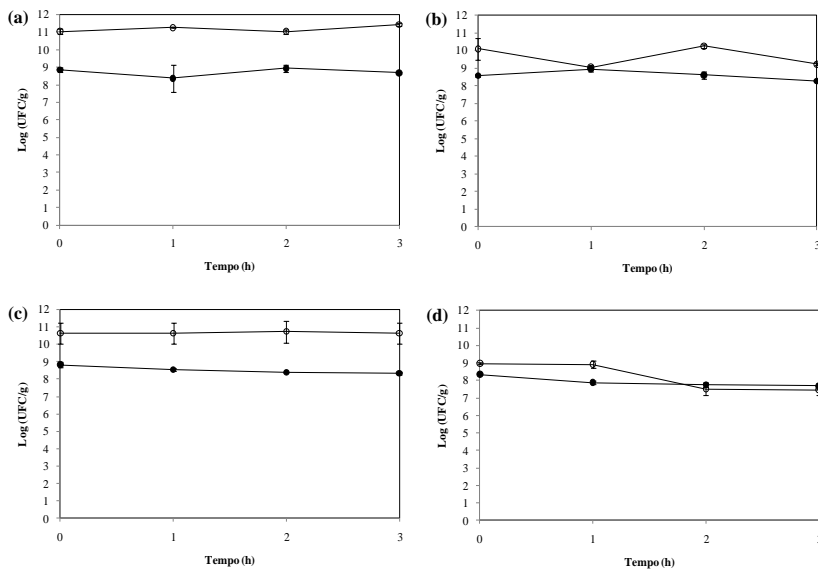


Figura 1. Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 (o) livre e (●) microencapsulada por *spray drying* com soro de leite em (a) pH 6,0 (b) pH 4,0 (c) pH 3,0 e (d) pH 2,0. As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias (n = 3).

Pode-se afirmar que a redução na viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite observada em pH baixo (2,0 e 3,0) foi pequena quando comparada a trabalhos similares. Esta menor redução pode ser devido às diferentes cepas de microrganismos, pois segundo Pham, Lemberg e Day (2008), os probióticos exibem diferenças cepa-específicas com relação à resistência à acidez e à bile. Além disso, o método e material encapsulantes utilizados também têm influência na sobrevivência das microcápsulas à acidez. Desta forma, o soro de leite como agente encapsulante pode ter protegido as células em condições ácidas. Nos pHs estudados, todas as contagens de células viáveis permaneceram acima de 7 log UFC/g, mesmo após 3 horas de incubação.

### 5.3.1.2 Bile

A Figura 2 mostra a sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 livre e microencapsulada por *spray drying* com soro de leite em diferentes concentrações de bile. A viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada em 0,5% de bile foi diminuída  $1,71 \pm 0,65$  log após 6 horas e  $2,63 \pm 0,32$  log UFC/g após 24 horas de incubação. Quando expostas a 1% de bile, as microcápsulas apresentaram reduções de  $2,71 \pm 0,51$  e de  $4,13 \pm 0,26$  log após 6h e 24 horas, respectivamente. Quanto à cultura livre, esta não apresentou redução ( $p > 0,05$ ) da viabilidade nessas concentrações de bile. Resultados similares foram obtidos por Li et al. (2011) que observaram reduções de 0,77 a 2 log em 0,5% de bile e 1,27 a 3 log em 1% de bile após 6 horas de incubação de microcápsulas de *L. casei*.

Sultana et al. (2000) concluíram que a microencapsulação em alginato e amido não melhorou a sobrevivência de probióticos na presença de bile. Após 6 horas de incubação em 2% de bile, foi observada redução de cerca de 2 log nas contagens de *L. acidophilus* e *L. casei*, enquanto *B. infantis* apresentou uma pequena redução nessas mesmas condições. Trindade e Grosso (2000) também reportaram que microcápsulas de *B. bifidum* e *L. acidophilus* obtidas com alginato não protegeram as células em 2 e 4% de bile. Guérin, Vuilleumard e Subirade (2003) observaram reduções desde 2 log até 7 log na viabilidade de *Bifidobacterium bifidum* microencapsulada com alginato, pectina e proteína do soro quando exposta a 2 e 4% de bile após 1 ou 3h. Ding e Shah (2009) elaboraram microcápsulas de várias espécies de *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* e observaram reduções médias de 1,9 a 3,3 log UFC/g em 3% de bile após 4 e 8 horas, respectivamente.

Mandal et al. (2006) relataram que a sobrevivência à bile de *L. casei* microencapsulado em alginato foi dependente da concentração do agente encapsulante. O aumento da concentração de 2 para 4% de alginato conferiu maior proteção às células. De acordo com Sohail et al. (2011), a sobrevivência de probióticos é altamente dependente da espécie microencapsulada. Comparando os resultados obtidos a trabalhos similares, a sobrevivência das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 em bile foi satisfatória. Além disso, apesar da microencapsulação com soro de leite não ter protegido as células probióticas, a viabilidade das microcápsulas permaneceu  $> 6$  log UFC/g mesmo após 24 horas de incubação na maior concentração de bile estudada.

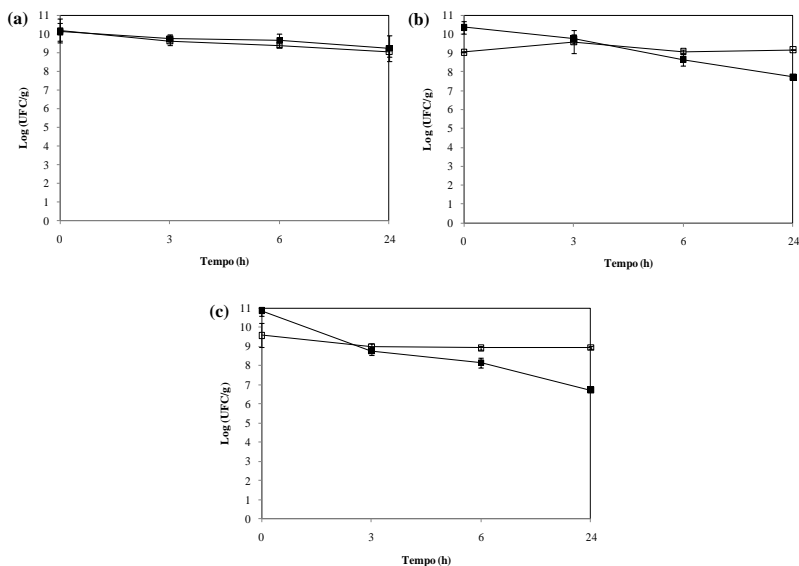


Figura 2. Sobrevivência de *Bifidobacterium* BB-12 (□) livre e (■) microencapsulada por *spray drying* com soro de leite em bile (a) 0% (b) 0,5% (c) 1%. As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias (n = 3).

### 5.3.2 Tolerância ao sal

As contagens de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 livre e microencapsulada com soro de leite em ágar MRS-LP sem adição de sal foram  $10,07 \pm 0,06$  log UFC/mL e  $10,02 \pm 0,07$  log UFC/g, respectivamente. No entanto, não foi observado crescimento tanto para as células livres quanto para as microencapsuladas em MRS-LP com 5% de NaCl, indicando que a microencapsulação não teve influência na suscetibilidade da cultura ao sal.

Sunny-Roberts e Knorr (2009) observaram que duas cepas de *Lactobacillus rhamnosus* (LGG e E800) apresentaram sensibilidade ao NaCl antes e após o *spray drying*. Cerca de 16% das células de LGG e menos que 5% das células de E800 foram sensíveis ao sal antes do processo. Esta sensibilidade provavelmente ocorre como resultado da injúria subletal às células devido a um estresse osmótico imposto pelo

meio carreador, causando uma permeabilização momentânea das membranas destas células (SUNNY-ROBERTS; ANANTA; KNORR, 2007; SUNNY-ROBERTS; KNORR, 2007). Após o *spray drying*, houve um decréscimo no número de células viáveis na presença de sal, revelando um aumento da sensibilidade dos probióticos, sendo que 86% e 40% das células de E800 e LGG, respectivamente, apresentaram sensibilidade ao sal.

Corcoran et al. (2004) relataram que esse aumento da sensibilidade ao sal das culturas probióticas após o *spray drying* é dependente da espécie e cepa utilizadas, sendo que 90% das células de *L. salivarius* UCC 500 foram suscetíveis à presença de NaCl após a microencapsulação. Da mesma forma, em estudo realizado por Gardiner et al. (2000), *L. paracasei* NFBC 338 exibiu somente 4% de sensibilidade ao NaCl antes do *spray drying*, mas 70% de sensibilidade foi observada após o processo. Os resultados obtidos para *L. salivarius* UCC 118 revelaram que esta cepa não foi suscetível ao sal antes do *spray drying*, mas exibiu 100% de suscetibilidade após a microencapsulação.

Estes resultados discordam dos obtidos neste trabalho, no qual não foi possível aplicar a análise de tolerância ao sal como um indicador do dano celular decorrente do processo de microencapsulação por *spray drying*, pois a cultura na sua forma livre já foi altamente suscetível ao NaCl. Um dos sítios na célula bacteriana mais suscetível ao dano é a membrana citoplasmática (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995), e o aumento da sensibilidade da bactéria injuriada ao NaCl tem sido associado a este dano (TEIXEIRA; CASTRO; KIRBY, 1995; TEIXEIRA et al., 1997). Entretanto, existem outros possíveis sítios na célula, como a parede celular e o DNA, onde o dano pode ocorrer como resultado do *spray drying* (TEIXEIRA et al., 1995; TEIXEIRA et al., 1997).

### **5.3.3 Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada durante o armazenamento**

A viabilidade das microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 obtidas por *spray drying* com soro de leite armazenadas a 4 °C manteve-se elevada e constante (> 9 log UFC/g) por 12 semanas (Figura 3). Resultados similares foram encontrados por Brachkova, Duarte e Pinto (2010), que microencapsularam *Lactobacillus* spp. em alginato. A viabilidade das microcápsulas mantidas sobre sílica gel permaneceu estável durante 6 meses de armazenamento a 4 °C.

Entretanto, Oliveira (2006) relatou que a viabilidade de *B. lactis* microencapsulada com pectina e caseína por coacervação seguida de *spray drying* começou a diminuir já nos 30 primeiros dias de armazenamento resultando em uma redução final de 4,34 log após 120 dias de armazenamento sob refrigeração. Zhao et al. (2008) observaram redução de 1 a 1,5 log na viabilidade de *L. acidophilus* microencapsulado por *spray drying* com  $\beta$ -ciclodextrina e goma acácia durante o armazenamento a 4 °C por 8 semanas. Lorenz (2009) ao microencapsular *L. acidophilus* por emulsificação e por *spray drying*, verificou que houve redução de 1,75-1,77 log UFC/g na viabilidade das células armazenadas por 12 semanas a -18 °C. No entanto, não houve diferença significativa entre a sobrevivência das células microencapsuladas por emulsificação ou por *spray drying*. Reddy, Madhu e Prapulla (2009) obtiveram aproximadamente 60% de sobrevivência de microcápsulas de *L. plantarum*, *L. salivarius* e *P. acidilactici* com maltodextrina e leite desnatado durante 60 dias de armazenamento a 4 °C.

Albertini et al. (2010) observaram redução de 1,6-1,7 log para microcápsulas de *L. acidophilus* e *B. lactis* obtidas com alginato, goma xantana e acetato de celulose após 6 meses de armazenamento a 5 °C. Em estudo realizado por Chávarri et al. (2010), após 28 dias de armazenamento a 4 °C, a sobrevivência de *L. gasseri* e *B. bifidum* microencapsulados por extrusão com alginato e quitosana diminuiu cerca de 2 log. Quando as cápsulas foram elaboradas também com o prebiótico queretina, a redução da viabilidade foi ainda maior, cerca de 3-4 log após 11 dias. Brinques e Ayub (2011) observaram reduções que variaram de 1,95 a 6,73 log UFC/g, dependendo do agente encapsulante utilizado (alginato ou pectina), na viabilidade de *L. plantarum* microencapsulado durante armazenamento por 38 dias a 4 °C.

O desafio final relacionado ao desenvolvimento de microcápsulas probióticas é representado pela sua estabilidade durante o armazenamento (ALBERTINI et al., 2010). Segundo Corcoran et al. (2004), a estabilidade de probióticos microencapsulados é maior em baixas temperaturas, como à temperatura de refrigeração. Sem dúvida, o agente encapsulante também tem influência direta na estabilidade das microcápsulas. A desnaturação térmica das proteínas do soro influencia as características de emulsificação e, portanto, suas propriedades microencapsulantes (ROSENBERG; SHEU, 1996). O tratamento térmico, como o que ocorre durante o *spray drying*, induz a desnaturação e agregação das proteínas do soro (MILLQVIST-FUREBY; ELOFSSON; BERGENSTAHL, 2001), melhorando sua

adsorção à interface e resultando na formação de uma camada fina semelhante a um gel (KIOKIAS; DIMAKOU; OREOPOULOU, 2007). Dessa forma, o soro de leite mostrou-se como um bom agente encapsulante para manutenção da viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 durante o armazenamento a 4 °C.

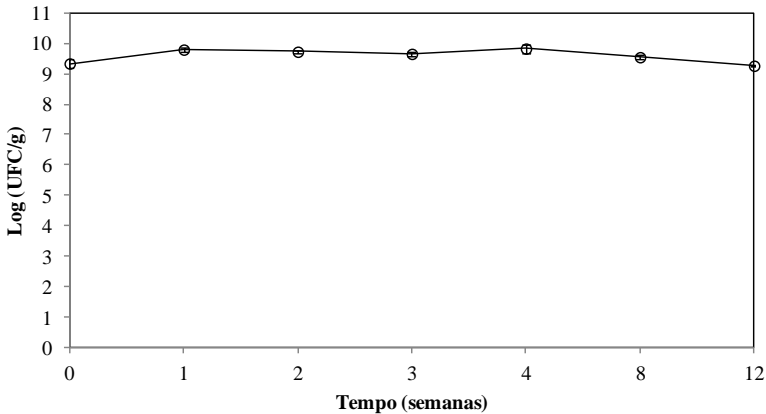


Figura 3. Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite durante o armazenamento a 4 °C. As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias ( $n = 3$ ). A semana 0 corresponde à contagem de células viáveis (log UFC/g) realizada no primeiro dia de armazenamento.

### 5.3.4 Viabilidade das microcápsulas em sobremesa láctea

A Figura 4 apresenta a contagem de células viáveis de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite em sobremesa láctea armazenada a 4 °C. Durante as 6 semanas de armazenamento, ocorreu uma redução de  $1,16 \pm 0,05$  log UFC/g, no entanto a viabilidade permaneceu elevada ( $> 7$  log UFC/g). Resultados similares foram obtidos por Aragon-Alegro et al. (2007) que desenvolveram uma musse de chocolate probiótica e verificaram que *L. paracasei* manteve a viabilidade acima de 7 log UFC/g durante o armazenamento refrigerado por 28 dias. Corrêa, Castro e Saad (2008) avaliaram a viabilidade de *Bifidobacterium* em sobremesa láctea do tipo manjar de coco e observaram que a população de *Bifidobacterium* diminuiu após 28 dias de armazenamento refrigerado em um dos tratamentos, mas manteve-se  $> 7$  log UFC/g.



Entretanto, em outro estudo com musses de chocolate, Borges, Ferreira e Costa (2004) observaram um decréscimo de 3 log na população de *L. acidophilus*, após o 20º dia de armazenamento das musses adicionadas de células livres. Quando empregaram o probiótico microencapsulado em uma matriz de alginato, os autores observaram um decréscimo de 2 log na viabilidade. Em estudo realizado por Buriti, Castro e Saad (2010), a população de *L. acidophilus* em musse de goiaba refrigerado permaneceu acima de 7,5 log UFC/g entre o dia da produção e o sétimo dia de estocagem. Após 14 dias a viabilidade começou a diminuir, chegando a reduções de 1 log até 3 log após 28 dias de armazenamento, dependendo da formulação. Para as sobremesas elaboradas com WPC, a população do probiótico permaneceu acima de 6 log UFC/g durante o armazenamento.

A produção de alimentos contendo cepas probióticas específicas em concentrações apropriadas de células viáveis durante a vida-de-prateleira é um desafio tecnológico (KOURKOUTAS et al., 2005). Nesse estudo, a viabilidade de *Bifidobacterium* microencapsulada por *spray drying* com soro de leite foi elevada tanto durante o armazenamento das microcápsulas quanto durante o armazenamento de um alimento no qual foram adicionadas essas microcápsulas, o que demonstra o potencial do soro de leite como encapsulante.

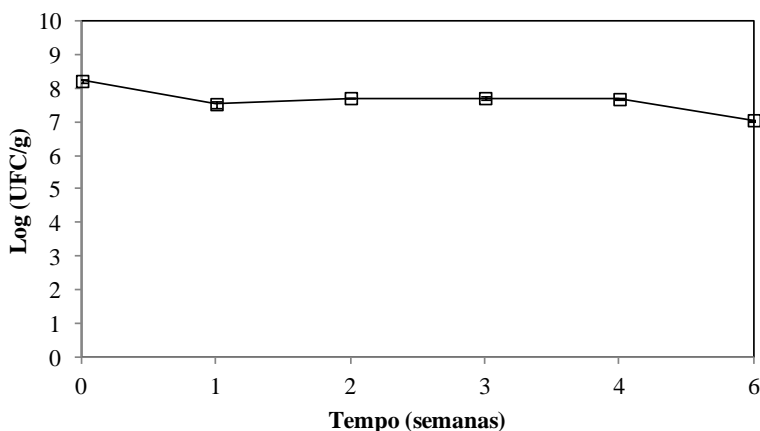


Figura 4. Viabilidade de *Bifidobacterium* BB-12 microencapsulada com soro de leite em sobremesa láctea durante o armazenamento a 4 °C. As barras de erro representam o desvio padrão em relação às médias ( $n = 3$ ). A

semana 0 corresponde à contagem de células viáveis (log UFC/g) realizada no primeiro dia de armazenamento.

## 5.4 CONCLUSÃO

O soro de leite mostrou-se promissor como agente encapsulante de *Bifidobacterium* BB-12. Dessa forma, a microencapsulação de probióticos constitui-se como uma nova alternativa de aproveitamento do soro. Dada a ampla aplicabilidade do soro em pó, não somente em derivados lácteos, mas também em outros produtos, e os benefícios à saúde associados aos probióticos, é possível que o pó obtido (microcápsulas) contendo *Bifidobacterium* Bb-12 possa ser usado em uma grande variedade de alimentos.

## AGRADECIMENTOS

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do projeto e pela concessão de bolsa.

## 5.5 REFERÊNCIAS

ALBERTINI, B.; VITALI, B.; PASSERINI, N.; CRUCIANI, F.; DI SABATINO, M.; RODRIGUEZ, L.; BRIGIDI, P. Development of microparticulate systems for intestinal delivery of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis*. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 40, p. 359–366, 2010.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240–251, 2007.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.

AOUIDI, F.; GANNOUN, H.; OTHMAN, N.B.; AYED, L.; HAMDI, M. Improvement of fermentative decolorization of olive mill wastewater by *Lactobacillus paracasei* by cheese whey's addition. **Process Biochemistry**, v. 44, p. 597–601, 2009.

ARAGON-ALEGRO, L.C.; ALEGRO, J.H.A.; CARDARELLI, H.R.; CHIU, M.C.; SAAD, S.M.I. Probiotic and synbiotic chocolate mousse. **LWT – Food Science and Technology**, v.40, p.669-675, 2007.

ATHANASIADIS, I., PARASKEVOPOULOU, A., BLEKAS, G.; KIOSSEOGLOU, V. Development of a novel whey beverage by fermentation with kefir granules. Effect of various treatments. **Biotechnology Progress**, v. 20, p. 1091–1095, 2004.

BORGES, J.Q., FERREIRA, S.R.S.S., COSTA, G.W. Cinética de sobrevivência de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulados em matriz de alginato de cálcio e veiculados em musse de chocolate. In: Congresso Brasileiro de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 19, Recife, 2004. **Resumos**. Campinas: Sociedade Brasileira de Ciência e Tecnologia de Alimentos, 2004. p.66

BRACHKOVA, M.I.; DUARTE, M.A.; PINTO, J.F. Preservation of viability and antibacterial activity of *Lactobacillus* spp. in calcium alginate beads. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 41, p. 589–596, 2010.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 agosto 2005, sec. 1, p. 7.

BRINQUES, G.B.; AYUB, M.A.Z. Effect of microencapsulation on survival of *Lactobacillus plantarum* in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 103, p.123–128, 2011.

BURITI, F.C.A.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Viability of *Lactobacillus acidophilus* in synbiotic guava mousses and its survival under in vitro simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 137, p. 121–129, 2010.

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

CHANDRAMOULI, V.; KAILASAPATHY, K.; PEIRIS, P.; JONES, M. An improved method of microencapsulation and its evaluation to protect *Lactobacillus* spp. in simulated gastric conditions. **Journal of Microbiological Methods**, v. 56, p. 27–35, 2004.

CHARTERIS, W.P.; KELLY, P.M.; MORELLI, L.; COLLINS, J.K. Development and application of an in vitro methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, p. 759–68, 1998.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M.C. Microencapsulation of a probiotic and prebiotic in alginate-chitosan capsules improves survival in simulated gastrointestinal conditions. **International Journal of Food Microbiology**, v. 142, p. 185–189, 2010.

COLLADO, C.M.; SANZ, Y. Method for direct selection of potentially probiotic *Bifidobacterium* strains from human feces based on their acid-adaptation ability. **Journal of Microbiological Methods**, v. 66, p. 560–3, 2006.

CORCORAN, B.M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Comparative survival of probiotic lactobacilli spray-dried in the presence of prebiotic substances. **Journal of Applied Microbiology**, v. 96, p. 1024–1039, 2004.

CORRÊA, S.B.M.; CASTRO, I.A.; SAAD, S.M.I. Probiotic potential and sensory properties of coconut flax supplemented with *Lactobacillus paracasei* and *Bifidobacterium lactis*. **International Journal of Food Science and Technology**, v. 43, p. 1560–1568, 2008.

DING, W. K.; SHAH, N. P. An improved method of microencapsulation of probiotic bacteria for their stability in acidic and bile conditions during storage. **Journal of Food Science**, v. 74, p. 53–61, 2009.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Efficacy of whey protein gel networks as potential viability-enhancing scaffolds for cell immobilization of *Lactobacillus rhamnosus* GG. **Journal of Microbiological Methods**, v. 80, p. 231–241, 2010.

DOHERTY, S.B.; GEE, V.L.; ROSS, R.P.; STANTON, C.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Development and characterisation of whey protein micro-beads as potential matrices for probiotic protection, **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 1604–1617, 2011.

DOLEYRES, Y.; FLISS, I.; LACROIX, C. Increased stress tolerance of *Bifidobacterium longum* and *Lactococcus lactis* produced during continuous mixed-strain immobilized-cell fermentation. **Journal of Applied Microbiology**, v. 97, p. 527–39, 2004.

DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 973–988, 2005.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, p. 929–935, 2009.

FAO/WHO. (2002). **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Disponível em: <[http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm)>. Acesso em: 21 julho 2010.

FURTADO, M. M.; NETO, J. P. M. **Tecnologia de Queijos—Manual Técnico para Produção Industrial de Queijos**. São Paulo: Dipemar, 1994. 118 p.

GARDINER, G.; O'SULLIVAN, E.; KELLY, J.; AUTY, M.A.E.; FITZGERALD, G.F.; COLLINS, J.K.; ROSS, R.P.; STANTON, C. Comparative survival of human-derived probiotic *Lactobacillus paracasei* and *L. salivarius* strains during heat treatment and spray drying. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 66, p. 2605–2612, 2000.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103–105, 2009.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; YOLOU, F.S.; MARCHIONI, E. In vitro effects of pH, bile salts and enzymes on the release and viability of encapsulated *Lactobacillus plantarum* strains in a gastrointestinal tract model. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 97-102, 2011.

GOUIN, S. Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.

GUERIN, D.; VUILLEMARD, J. C.; SUBIRADE, M. Protection of bifidobacterias encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. **Journal of Food Protection**, v. 66, p. 2076–2084, 2003.

GHARSALLAOUI, A., ROUDAUT, G., CHAMBIN, O., VOILLEY, A., SAUREL, R. Applications of spray drying in microencapsulation of food ingredients: An overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of Probiotic Bacteria: Technology and Potential Applications. **Current Issues Intestinal Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 39-48, 2002.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493–500, 2008.

KOURKOUTAS, Y.; XOLIAS, V.; KALLIS, M.; BEZIRTZOGLU, E.; KANELLAKI, M. *Lactobacillus casei* cell immobilization on fruit pieces for probiotic additive, fermented milk and lactic acid production. **Process Biochemistry**, v.40, p.411-416, 2005.

LANKAPUTHRA, W.E.V.; SHAH, N.P. Survival of *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. in the presence of acid and bile salts. **Cultured Dairy Products Journal**, v. 30, p. 2 – 7, 1995.

LI, X.Y.; CHENB,X.G.; SUNA, Z.H.; PARKC, H.J.; CHAC, D.S. Preparation of alginate/chitosan/carboxymethyl chitosan complex microcapsules and application in *Lactobacillus casei* ATCC 393. **Carbohydrate Polymers**, v. 83, p. 1479–1485, 2011.

LORENZ, J.G. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

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

MATSUMOTO, M.; OHISHI, H.; BENNO, Y. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-ATPase activity in *Bifidobacterium* with special reference to acid tolerance. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 109–13, 2004.

NAG, A.; HAN, K.-S.; SINGH, H. Microencapsulation of probiotic bacteria using pH-induced gelation of sodium caseinate and gellan gum. **International Dairy Journal**, v. 21, p.247-253, 2011.

OLIVEIRA, A.C. **Viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* e *Bifidobacterium lactis*, microencapsulados por coacervação, seguida de secagem por spray drying e leite de jorro**. 2006. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, SP.

O'RIORDAN, K.O.; ANDREWS, D.; BUCKLE, K.; CONWAY, P. Evaluation of microencapsulation of a *Bifidobacterium* strain with starch as an approach to prolonging viability during storage. **Journal Applied Microbiology**, v. 91, p.1059-1066, 2001.

PHAM, M.; LEMBERG, D.A.; DAY, A.S. Probiotics: sorting the evidence from the myths. **Medical Journal of Australia**, v. 188, p. 304–308, 2008.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505–515, 2004.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J.; CAMPOS-MONTIEL, R.G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, p. 292–297, 2009.

REDDY, K.B.P.; MADHU, A.N.; PRAPULLA, S.G. Comparative survival and evaluation of functional probiotic properties of spray-dried lactic acid bacteria. **International Journal of Dairy Technology**, v. 62, p. 240-248, 2009.

REID, A.A.; VUILLEMARD, J.C.; BRITTEN, M.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.; CHAMPAGNE, C.P. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>++</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 603–619, 2005.

REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M31–M37, 2007.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, p. 123-132, 2009.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of aguamiel as



thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

SANDOVAL-CASTILLA, O.; LOBATO-CALLEROS, C.; GARCÍA-GALINDO, H.S.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Textural properties of alginate–pectin beads and survivability of entrapped *Lb. casei* in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **Food Research International**, v. 43, p. 111–117, 2010.

SCHAAFMSMA, G. Lactose and lactose derivatives as bioactive ingredients in human nutrition. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 458–465, 2008.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, p. 193–202, 2010.

SERVIN, A.L.; COCONNIER, M.H. Adhesion of probiotic strains to the intestinal mucosa and the interaction with pathogens. Best Practice & Research. **Clinical Gastroenterology**, v. 17, p. 741–754, 2003.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262–1277, 2007.

SILVA, J.; CARVALHO, A.S.; VITORINO, R.; FERREIRA, R.; DOMINGUES, P.; AMADO, F.; TEIXEIRA, P.; GIBBS, P. Effect of the pH of growth on the survival of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* to stress conditions during spray drying. **Journal of Applied Microbiology**, v. 98, p. 775–782, 2005.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins - From ‘gutter-to-gold’. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695–704, 2008.

SOHAIL, A.; TURNER, M.; COOMBES, A.; BOSTROM, T.; BHANDARI, B. Survivability of probiotics encapsulated in alginate gel microbeads using a novel impinging aerosols method. **International Journal of Food Microbiology**, v. 145, p. 162–168, 2011.

SOUZA, R.R.; BERGAMASCO, R.; COSTA, S.C.; FENG, X.; FARIA, S.H.B.; GIMENES, M.L. Recovery and purification of lactose from

whey. **Chemical Engineering and Processing**, v. 49, p. 1137–1143, 2010.

SU, L.C.; LIN, C.W.; CHEN, M. J. Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p.49-54, 2007.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate-strach and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yogurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 47–55, 2000.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. The protective effect of monosodium glutamate on survival of *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Lactobacillus rhamnosus* E-97800 (E800) strains during spray-drying and storage in trehalose-containing powders. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 209–214, 2009.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; ANANTA, E.; KNORR, D. Flow Cytometry assessment of *Lactobacillus rhamnosus* GG (ATCC 53103) response to non-electrolytes stress. **Nutrition and Food Science**, v. 37, p. 184–200, 2007.

SUNNY-ROBERTS, E.O.; KNORR, D. Physiological analysis of *Lactobacillus rhamnosus* VTT E-97800 adaptive response to osmotic stress induced by trehalose. **British Food Journal**, v. 109, p. 735–748, 2007.

TAKAHASHI, N.; XIAO, J.Z.; MIYAJI, K.; YAESHIIMA, T.; HIRAMATSU, A.; IWATSUKI, K. et al. Selection of acid tolerant bifidobacteria and evidence for a low-pH-inducible acid tolerance response in *Bifidobacterium longum*. **Journal of Dairy Research**, v. 71, p.340–5, 2004.

TEIXEIRA, P. C.; CASTRO, M.H.; MALCATA, F.X.; KIRBY, R.M. Survival of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* following spray drying. **Journal of Dairy Science**, v. 78, p. 1025–1031, 1995.

TEIXEIRA, P.; CASTRO, H.; MOHACSI-FARKAS, C.; KIRBY, R. Identification of sites of injury in *Lactobacillus bulgaricus* during heat stress. **Journal of Applied Microbiology**, v. 83, p. 219–226, 1997.

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

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

TRUELSTRUP HANSEN, L.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35–45, 2002.

VINDEROLA, C.G.; REINHEIMER, J.A. Enumeration of *Lactobacillus casei* in the presence of *L. acidophilus*, bifidobacteria and lactic starter bacteria in fermented dairy products. **International Dairy Journal**, v.10, p.271-275, 2000.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 364–367, 2010.

YORGUN, M.S.; AKMEHMET BALCIOGLU, I.; SAYGIN, O. Performance comparison of ultrafiltration, nanofiltration and reverse osmosis on whey treatment. **Desalination**, v. 229, p. 204–216, 2008.

ZHAO, R.; SUN, J.; TORLEY, P.; WANG, D.; NIU, S. Measurement of particle diameter of *Lactobacillus acidophilus* microcapsule by spray drying and analysis on its microstructure. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1349–1354, 2008.



## 6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

No estudo realizado, quando o soro de leite foi utilizado como agente encapsulante, o rendimento da microencapsulação foi maior do que quando foi utilizada a goma arábica. Além disso, a viabilidade das células manteve-se elevada e constante ( $> 9 \log \text{ UFC/g}$ ) durante doze semanas de armazenamento refrigerado. Quando a goma arábica foi utilizada como agente encapsulante, foi observada uma redução na viabilidade das microcápsulas armazenadas à mesma temperatura, por igual período.

As microcápsulas obtidas com ambos agentes encapsulantes apresentaram diâmetros em torno de  $11 \mu\text{m}$  e formato esférico, com a presença de concavidades, típicas de produtos atomizados. O conteúdo de água residual e a  $A_w$  obtidos estão dentro dos limites para produtos atomizados e também dentro do recomendado para garantir a estabilidade microbiológica. As microcápsulas elaboradas com soro de leite apresentaram dissolução mais rápida tanto em água quanto em óleo quando comparadas às microcápsulas com goma arábica. Ambas as microcápsulas apresentaram coloração clara, sendo observada tonalidade mais vermelha e amarela nas elaboradas com soro do que nas obtidas com goma arábica. As microcápsulas obtidas com soro de leite como agente encapsulante apresentaram características semelhantes às obtidas com goma arábica, a qual é amplamente utilizada.

Quando foi avaliada a sobrevivência em condições gastrointestinais simuladas das microcápsulas obtidas com soro de leite, uma pequena redução na viabilidade em pH baixo (2,0 e 3,0) foi observada. Quanto à exposição à bile, a microencapsulação com soro de leite não protegeu as células probióticas, no entanto a viabilidade das microcápsulas permaneceu  $> 6 \log \text{ UFC/g}$  mesmo após 24 horas de incubação na maior concentração de bile estudada. A microencapsulação não teve influência na suscetibilidade da cultura ao sal. Quando as microcápsulas foram adicionadas em sobremesa láctea, a população do probiótico manteve-se acima de  $7 \log \text{ UFC/g}$  por 6 semanas.

O soro de leite apresentou-se como um eficiente agente encapsulante de *Bifidobacterium* por *spray drying* quando comparado à goma arábica. Desta forma, é possível empregar o soro de leite líquido na tecnologia de microencapsulação de probióticos, o que contribui para sua maior utilização, redução do desperdício e da poluição ambiental. Dada a ampla aplicabilidade do soro em pó, não somente em derivados lácteos, mas também em outros produtos, e os benefícios à saúde

associados aos probióticos, é possível que o pó obtido (microcápsulas) contendo *Bifidobacterium* BB-12 possa ser usado em uma grande variedade de alimentos.

Há necessidade de ampliar as pesquisas sobre microencapsulação de probióticos utilizando o soro de leite líquido. Nesse sentido, sugere-se estudos futuros avaliando a eficiência encapsulante do soro na encapsulação de outras espécies de microrganismos probióticos. Além disso, faz-se necessária também a aplicação das microcápsulas obtidas em outros alimentos, a fim de verificar sua estabilidade.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, R. Probiotics: an emerging food supplement with health benefits. **Food Biotechnology**, v. 19, p. 227–246, 2005.
- ALAMPRESE, C.; FOSCHINO, R.; ROSSI, M.; POMPEI, C.; SAVANI, L. Survival of *Lactobacillus johnsonii* La1 and influence of its addition in retail-manufactured ice cream produced with different sugar and fat concentrations. **International Dairy Journal**, v. 12, p. 201-208, 2002.
- ALLAN-WOJTAS, P.; TRUELSTRUP HANSEN, L.; PAULSON, A.T. Microstructural studies of probiotic bacteria-loaded alginate microcapsules using standard electron microscopy techniques and anhydrous fixation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 101–108, 2008.
- ALMEIDA, K.E. de; BONASSI, I.A.; ROÇA, R. de O. Características físicas e químicas de bebidas lácteas fermentadas e preparadas com soro de queijo Minas frescal. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 21, p.187-192, 2001.
- AL-OTAIBI, M. M. Evaluation of some probiotic fermented milk products from Al-Ahsa markets, Saudi Arabia. **American Journal of Food Technology**, v. 4, p.1-8, 2009.
- ANAL, A.K.; BHOPATKAR, D.; TOKURA, S.; TAMURA, H.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for gastric passage and controlled intestinal release of protein. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v. 29, p. 713–724, 2003.
- ANAL, A.K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery. **Trends in Food Science & Technology**, v. 18, p. 240-251, 2007.
- ANAL, A.K.; STEVENS, W.F. Chitosan-alginate multilayer beads for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 290, p. 45-54, 2005.

ANAL, A. K.; STEVENS, W. F.; REMUÑÁN-LÓPEZ, C. Iontropic cross-linked chitosan microspheres for controlled release of ampicillin. **International Journal of Pharmaceutics**, v. 312, p. 166-173, 2006.

ANDRADE, C.T.; NASSER, R.O. Estudo reológico da gelificação induzida pelo calor de proteínas do soro do leite e dos géis resultantes sob condições variadas de pH. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 25, p. 315-321, 2005.

ANNAN, N.T.; BORZA, A.D.; TRUELSTRUP HANSEN, L. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v.41, p.184-193, 2008.

ANTUNES, A.J. **Funcionalidade de proteínas do soro de leite bovino**. São Paulo: Manole, 2003. 135p.

ANTUNES, A.E.C.; CAZETTO, T.F.; BOLINI, H.M.A. Iogurtes desnatados probióticos adicionados de concentrado protéico do soro de leite: perfil de textura, sinérese e análise sensorial. **Alimentos e Nutrição**, v.15, p.107-114, 2004.

ARSHADY, R. Microcapsules for food. **Journal of Microencapsulation**, v. 10, p. 413-435, 1993.

ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v. 19, p. 1559-1597, 1999.

AULTON, M.E. 2002. **Pharmaceutics: The Science of Dosage Form Design**. 2 ed. Edinburg: Churchill Livingstone, p. 388-390.

AURELI, P.; CAPURSO, L.; CASTELLAZZI, A.M.; CLERICI, M.; GIOVANNINI, M.; MORELLI, L.; POLI, A.; PREGLIASCO, F.; SALVINI, F.; ZUCCOTTI, G.V. Probiotics and health: An evidence-based review. **Pharmacological Research**, v. 63, p. 366-376, 2011.

AZEREDO, H.M.C. Encapsulação: Aplicação à Tecnologia de Alimentos. **Alimentos e Nutrição**, v. 16, p. 89-97, 2005.



BALASSA, L.L.; FANGER, G.O. Microencapsulation in the food industry. **CRC Reviews in Food Technology**, v. 2, p. 245–263, 1971.

BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; ORTEGA-RIVAS, E.; JULIANO, P.; YAN, H. (2005). **Food powders: Physical properties, processing, and functionality**. New York: Kluwer Academic/Plenum Publishers.

BARRETT, E.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Rapid screening method for analyzing the conjugated linoleic acid production capabilities of bacterial cultures. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 73, p. 2333–2337, 2007.

BENITA, SIMON. **Microencapsulation: Methods and Industrial Applications**. Taylor & Francis, 2a. Ed., 2005.

BHANDARI, B.R.; DUMOULIN, E.D.; RICHARD, H.M.J.; NOLEAU, I.; LEBERT, A.M. Flavor encapsulation by spray drying: application to citral and linalyl acetate. **Journal of Food Science**, v. 57, p. 217–221, 1992.

BIAVATI, B.; MATTARELLI, P. The family *Bifidobacteriaceae*. **The Prokaryotes**, p. 1–70, 2001.

BICKERS, P.O.; BHAMIDIMARRI, R. Aerobic treatment of reverse osmosis permeate in the dairy industry for reuse. **Water Science and Technology**, v.38, p.61–67, 1998.

BOYLSTON, T.D.; VINDEROLA, C.G.; GHODDUSI, H.B.; REINHEIMER, J.A. Incorporation of bifidobacteria into cheeses: challenges and rewards. **International Dairy Journal**, v.14, p. 375–387, 2004.

BOZANIC, R.; TRATNIK, L. Quality of cow's and goat's fermented bifido milk during storage. **Food Technology Biotechnology**, v. 39, p.109–114, 2001.

BRANS, G.; SCHROËN, C. G. P. H.; VAN DER SMAN, R. G. M.; BOOM, R. M. Membrane fractionation of milk: state of the art and challenges. **Journal of Membrane Science**, v. 243, p. 263–272, 2004.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa nº 16, de 23 de agosto de 2005. Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Bebida Láctea. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 24 agosto 2005, sec. 1, p. 7.

BRASIL. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Alimentos Com Alegações de Propriedades Funcionais e ou de Saúde**. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br>. Acesso em 12 de janeiro de 2012a.

BRASIL. Embrapa Gado de Leite. **Estatísticas do leite. Leite em números**. Disponível em: <http://www.cnpgl.embrapa.br/>. Acesso em 12 de janeiro de 2012b.

BRASILEIRO, J.S.L. **Microencapsulação de compostos bioativos: inovação em diferentes áreas**. 2011. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Fernando Pessoa, Porto, 2011.

BROADHEAD, J.; ROUAN, E.; RHODES, C.T. The spray drying of pharmaceuticals. **Drug Development and Industrial Pharmacy**, v.18, p. 1169 – 1206, 1992.

CANANI, R.B.; CIRILLO, P.; TERRIN, G.; CESARANO, L.; SPAGNUOLO, M.I.; DE VICENZO, A.; ALBANO, F.; PASSARIELLO, A.; DE MARCO, G.; MANGUSO, F.; GUARINO, A. Probiotics for treatment of acute diarrhea in children: a randomized clinical trial of five different preparations. **British Medical Journal**, v. 335, p. 340– 342, 2007.

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

CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; BARRETO, P. L. M.; AMBONI, R. D. M. C.; PRUDÊNÇIO, E. S. Effect of oligofructose incorporation on the properties of fermented probiotic lactic beverages. **International Journal of Dairy Technology**, v.62, p.68-74, 2009a.

CASTRO, F. P.; CUNHA, T. M.; OGLIARI, P. J.; TEÓFILO, R.F.; FERREIRA, M.M.C.; PRUDÊNÇIO, E.S. Influence of different content of cheese whey and oligofructose on the properties of fermented lactic

beverages: Study using response surface methodology. **LWT - Food Science and Technology**, v.42, p.993-997, 2009b.

CHATTERTON, D.E.W.; SMITHERS, G.; ROUPAS, P.; BRODKORB, A. Bioactivity of  $\beta$ -lactoglobulin and  $\alpha$ -lactalbumin - Technological implications for processing. **International Dairy Journal**, v.16, p. 229–1240, 2006.

COAKLEY, M.; ROSS, R.; NORDGREN, M.; FITZGERALD, G.; DEVERY, R.; STANTON, C. Conjugated linoleic acid biosynthesis by human-derived *Bifidobacterium* species. **Journal of Applied Microbiology**, v. 94, p. 138–145, 2003.

COIMBRA, P.M.A. **Preparação e caracterização de sistemas de libertação controlada de fármacos com base em polímeros de origem natural**. 2010. Dissertação (Doutorado em Engenharia Química) – Faculdade de Ciências e Tecnologia da Universidade de Coimbra, Coimbra, 2010.

COSTA, E.L. **Efeito do processamento térmico e enzimático na obtenção de hidrolisados do isolado protéico do soro de leite com atividade antihipertensiva**. 2004. 100f. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2004.

CRISTIANI-URBINA, E.; NETZAHUATI-MUÑOZ, A.R.; MANRIQUEZ-ROJAS, F.J.; JUAREZ-RAMIREZ, C.; RUIZ-ORDAZ, N.; GALINDEZ-MAYER, J. Batch and fed-batch cultures for the treatment of whey with mixed yeast cultures. **Process Biochemistry**, v.35, p. 649-657, 2000.

CRUZ, A.G.; ANTUNES, A.E.C.; SOUSA, A.L.O.P.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Ice-cream as a probiotic food carrier. **Food Research International**, v. 42, p. 1233-1239, 2009a.

CRUZ, A.G.; BURITI, F.C.A.; SOUZA, C.H.B.; FARIA, J.A.F.; SAAD, S.M.I. Probiotic cheese: Health benefits, technological and stability aspects. **Trends in Food Science & Technology**, v.20, p.344-354, 2009b.

CUI, J.H.; GOH, J.S.; KIM,P.H.; CHOI, S.H.; LEE, B.J. Survival and stability of bifidobacteria loaded in alginate poly-*l*-lysine microparticles. **International Journal of Pharmaceutics**, v.210, p. 51-59, 2000.

CUNHA, T. M.; CASTRO, F. P.; BARRETO, P. L. M.; BENEDET, H. D.; PRUDÊNCIO, E. S. Avaliação físico-química, microbiológica e reológica de bebida láctea e leite fermentado adicionados de probióticos. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 29, p.103-116, 2008.

CUNHA, T. M.; ILHA, E. C.; AMBONI, R. D. M. C.; BARRETO, P. L. M.; CASTRO, F. P.; PRUDÊNCIO, E. S. A influência do uso de soro de queijo e bactérias probióticas nas propriedades de bebidas lácteas fermentadas. **Brazilian Journal of Food Technology (ITAL)**, v. 12, p.23-33, 2009.

CURTIS, M. M.; SPERANDIO, V. A complex relationship: The interaction among symbiotic microbes, invading pathogens and their mammalian host. **Mucosal Immunology**, v. 4, p. 133–138, 2011.

DALMORO, A.; BARBA, A.A.; LAMBERTI, G.; D'AMORE, M. Intensifying the microencapsulation process: Ultrasonic atomization as an innovative approach. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 80, p. 471-477, 2012.

DAVE, R.I.; SHAH, N.P. Viability of yoghurt and probiotic bacteria in yoghurts made from commercial starter cultures. **International Dairy Journal**, v. 7, p. 31-41, 1997.

DE CAMPOS, A.M. **Desenvolvimento de extratos secos nebulizados de *Ilex paraguariensis* St. Hill. Aquifoliaceae (erva-mate)**. 1996. 149p. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS, 1996.

DE VOS, P.; FAAS, M.M.; SPASOJEVIC, M.; SIKKEMA, J. Encapsulation for preservation of functionality and targeted delivery of bioactive food components. **International Dairy Journal**, v. 20, p. 292–302, 2010.

DEFAYE J, WONG E. Structural Studies of Gum-Arabic, The exudate polysaccharide from acacia-senegal. **Carbohydrate Research**, 150, 221-231, 1986.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G.P.; ALLESINA, S.; BARBA, M.; DEIDDA, F.; LORENZINI, P.; BALLARÉ, M.; MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, S.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, p. S248–S255, 2006.

DELCENSERIE, V.; GAVINI, F.; BEERENS, H.; TRESSE, O.; FRANSSEN, C.; DAUBE, G. Description of a new species, *Bifidobacterium crudilactis* sp. nov., isolated from raw milk and raw milk cheeses. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 30, p. 381–389, 2007.

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

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

DESOBRY, S. A.; NETTO, F. M.; LABUZA, T. B. Comparison of spray-drying, drum drying and freeze-drying for (1-3, 1-4)- $\beta$ - carotene encapsulation and preservation. **Journal of Food Science**, v. 62, p. 1158–1162, 1997.

DICKINSON, E. Hydrocolloids at interfaces and the influence on the properties of dispersed systems. **Food Hydrocolloids**, v. 17, p. 25–39, 2003.

DOHERTY, S.B.; AUTY, M.A.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; BRODKORB, A. Survival of entrapped *Lactobacillus rhamnosus* GG in whey protein micro-beads during simulated ex vivo gastro-intestinal transit. **International Dairy Journal**, v. 22, p. 31-43, 2012.

DOLEYRES, Y.; LACROIX, C. Technologies with free and immobilised cells for probiotic bifidobacteria production and protection. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 973–988, 2005.

DONKOR, O.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Proteolytic activity of dairy lactic acid bacteria and probiotics as determinant of growth and in vitro angiotensin-converting enzyme inhibitory activity in fermented milk. **Lait**, v. 86, p. 21–38, 2007.

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S.I.; OLIVEIRA, J.M.; TEIXEIRA, J.A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation. **Food Chemistry**, v. 112, p. 929–935, 2009.

DZIEZAK, J.D. Microencapsulation and encapsulated ingredients. **Food Technology**, v.42, p.136-151, 1988.

EL-GAWAD, I. A. A.; EL-SAYED, E. M.; HAFEZ, S. A.; EL-ZEINI, H. M.; SALEH, F. A. The hypocholesterolaemic effect of milk yoghurt and soy-yoghurt containing bifidobacteria in rats fed on a cholesterol-enriched diet. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 37-44, 2005.

FAO/WHO. **Guidelines for the evaluation of probiotics in food**. Food and Agriculture Organization of the United Nations and World Health Organization Working Group Report. Canadá, 2002. Disponível em: [http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood\\_probio\\_en.stm](http://www.fao.org/es/ESN/food/foodandfood_probio_en.stm). Acesso em: 26 março 2009.

FÁVARO, S.L.; GUILHERME, M.R.; OLIVEIRA, F.; RADOVANOVIC, E.; MUNIZ, E.C. **Modificação química da goma arábica para obtenção de hidrogéis superabsorventes**. In: 17º Congresso Brasileiro de Engenharia e Ciência dos Materiais, 2006, Foz do Iguaçu, PR, Brasil. Disponível em: [www.metallum.com.br/17Cbecimat/resumos/17Cbecimat-401-018.pdf](http://www.metallum.com.br/17Cbecimat/resumos/17Cbecimat-401-018.pdf). Acesso em: 14 fevereiro 2012.

FAVARO-TRINDADE, C.S. Microencapsulação de probióticos. In: SAAD, S.M.I.; CRUZ, A.G.; FARIA, J.A.F. (ed.). **Probióticos e prebióticos em alimentos. Fundamentos e aplicações tecnológicas**. São Paulo: Varela, 2011. p. 239-254.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Microencapsulation of *L. acidophilus* (La-05) and *B. lactis* (Bb-12) and evaluation of their survival at the pH values of the stomach and in bile. **Journal of Microencapsulation**, v. 19, p. 485-494, 2002.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. Encapsulação de culturas probióticas. **Boletim SBCTA**, v.37 (supl.), p.88-93, 2003.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; PINHO, S.C. de; ROCHA, G.A. Revisão: Microencapsulação de ingredientes alimentícios. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, p. 103-112, 2008.

FERCHICHI, M.; CRABBE, E.; GIL, G.H.; HINTZ, W.; ALMADIDY, A. Influence of initial pH on hydrogen production from cheese whey. **Journal of Biotechnology**, v. 120, p. 402-409, 2005.

FORSSTEN, S.D.; SINDELAR, C.W.; OUWEHAND, A.C. Probiotics from an industrial perspective. **Anaerobe**, v. 17, p. 410-413, 2011.

FREITAS, S.; MERKLE, H.; GANDER, B. Microencapsulation by solvent extraction/evaporation: reviewing the state of the art of microsphere preparation process technology. **Journal of Controlled Release**, v. 102, p. 313–332, 2005.

FRITZEN-FREIRE, C.B.; MÜLLER, C.M.O.; LAURINDO, J.B.; PRUDÊNCIO, E.S. The influence of *Bifidobacterium* Bb-12 and lactic acid incorporation on the properties of Minas Frescal cheese. **Journal of Food Engineering**, v. 96, p. 621–627, 2010.

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

GAREAU, M. G.; SHERMAN, P. M.; WALKER, W. A. Probiotics and the gut microbiota in intestinal health and disease. *Nature Reviews. Gastroenterology and Hepatology*, v. 7, p. 503–514, 2010.

GARRITY, G.M.; LILBURN, T.G.; COLE, J.R.; HARRISON, S.H.; EUZEBY, J.; TINDALL, B.J. 2007. **The bacteria: phylum Actinobacteria: class “Actinobacteria”**. Taxonomy Outline of the

Bacteria and Archaea, Release 7.7. Michigan State University Board of Trustees, East Lansing, MI, pp. 399–541.

GBASSI, G.K.; VANDAMME, T.; ENNAHAR, S.; MARCHIONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* spp in an alginate matrix coated with whey proteins. **International Journal of Food Microbiology**, v. 129, p. 103–105, 2009.

GHARSALLAOUI, A.; ROUDAUT, G.; CHAMBIN, O.; VOILLEY, A.; SAUREL, R. Applications of spray-drying in microencapsulation of food ingredients: an overview. **Food Research International**, v. 40, p. 1107–1121, 2007.

GIBBS, B.F.; KERMASHA, S.; ALLI, I.; MULLIGAN, C.N. Encapsulation in the food industry: a review. **International Journal of Food Sciences and Nutrition**, v. 50, p. 213–224, 1999.

GILLILAND, S. E. Acidophilus milk-products – a review of potential benefits to consumers. **Journal of Dairy Science**, v. 72, p. 2483-2495, 1989.

GIROTO, J. M.; PAWLOWSKY, U. O soro do leite e as alternativas para seu beneficiamento. **Brasil Alimentos**, n. 10, p. 43-46, 2001.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: Biological, biochemical, technological, and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, p. 139–157, 1999.

GONZÁLEZ SISO, M.I. The biotechnological utilization of cheese whey: a review. **Bioresource Technology**, v.57, p.1-11, 1996.

GONZALEZ-GONZALEZ, C.R.; TUOHY, K.M.; JAUREGI, P. Production of angiotensin-I-converting enzyme (ACE) inhibitory activity in milk fermented with probiotic strains: Effects of calcium, pH and peptides on the ACE-inhibitory activity. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 615-622, 2011.

GOUIN, S. Micro-encapsulation: Industrial appraisal of existing technologies and trends. **Trends in Food Science and Technology**, v. 15, p. 330–347, 2004.



GRIDER, J. R.; PILAND, B. E. The peristaltic reflex induced by short-chain fatty acids is mediated by sequential release of 5-HT and neuronal CGRP but not BDNF. **American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology**, v. 292, p. G429-G437, 2007.

GUERIN, D.; VUILLEMARD, J. C.; SUBIRADE, M. Protection of Bifidobacteria encapsulated in polysaccharide-protein gel beads against gastric juice and bile. **Journal of Food Protection**, v.66, p. 2076-2084, 2003.

GUILLOTEAU, P.; MARTIN, L.; EECKHAUT, V.; DUCATELLE, R.; ZABIELSKI, R.; VAN IMMERSEEL, F. From the gut to the peripheral tissues: the multiple effects of butyrate. **Nutrition Research Reviews**, v. 23, p. 366-384, 2010.

HADADJI, M.; BENAMA, R.; SAIDI, N.; HENNI, D.E.; KIHAL, M. Identification of cultivable *Bifidobacterium* species isolated from breast fed infant faeces. **African Journal of Biotechnology**, v. 4, p. 422-430, 2005.

HAYES, M.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; HILL, C.; STANTON, C. Casein-Derived Antimicrobial Peptides Generated by *Lactobacillus acidophilus* DPC6026. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 72, p. 2260-2264, 2006.

HSIAO, H.C.; LIAN, W.C.; CHOU, C.C. Effect of packaging conditions and temperature on viability of microencapsulated bifidobacteria during storage. **Journal of the Science of Food and Agriculture**, v. 84, p.134-139, 2004.

ISHIZUKA, A.; TOMIZUKA, K.; AOKI, R.; NISHIJIMA, T.; SAITO, Y.; INOUE, R.; USHIDA, K.; MAWATARI, T.; IKEDA, T. Effects of administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* GCL2505 on defecation frequency and bifidobacterial microbiota composition in humans. **Journal of Bioscience and Bioengineering** (2012), doi:10.1016/j.jbiosc.2011.12.016.

JACKSON, L.S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 24, p. 289-297, 1991.

JANER C, ARIGONI F, LEE BH, PELAEZ C, REQUENA T. Enzymatic ability of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* to hydrolyze milk proteins: identification and characterization of endopeptidase O. **Applied Environmental Microbiology**, v. 71, p. 8460 - 8465, 2005.

JANKOVIC, I.; SYBESMA, W.; PHOTHIRATH, P.; ANANTA, E.; MERCENIER, A. Application of probiotics in food products – challenges and new approaches. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, p. 175–181, 2010.

KAILASAPATHY, K.; CHIN, J.C. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v.78, p. 80-88, 2000.

KAILASAPATHY, K.; MASONDOLE, L. Survival of free and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* and their effect on texture of feta cheese. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 60, p. 252-258, 2005.

KEKKONEN, R.A.; VASANKARI, T.J.; VUORIMAA, T.; HAAHTELA, T.; JULKUNEN, I.; KORPELA, R. The effect of probiotics on respiratory infections and gastrointestinal symptoms during training in marathon runners. **International Journal of Sport Nutrition and Exercise Metabolism**, v. 17, p. 352–363, 2007.

KHALIL, A.H.; MANSOUR, E.H. Alginate Encapsulated Bifidobacteria Survival in Mayonnaise. **Journal of Food Science**, v. 63, p. 702-705, 1998.

KIM, S.J.; CHO, S.Y.; KIM, S.H.; SONG, O.J.; SHIN, S.; CHA, D.S.; PARK, H.J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus* ATCC 43121. **LWT – Food Science and Technology**, v. 41, p. 493–500, 2008.

KIOKIAS, S.; DIMAKOU, C.; OREOPOULOU, V. Effect of heat treatment and droplet size on the oxidative stability of whey protein emulsions. **Food Chemistry**, v. 105, p. 94–100, 2007.

KITTS, D.D.; WEILER, K. Bioactive proteins and peptides from food sources. Applications of bioprocesses used in isolation and recovery. **Current Pharmaceutical Design**, v. 9, p. 1309–1323, 2003.

KOMATSU, T.R.; BURITI, F.C.A.; SAAD, S.M.I. Inovação, persistência e criatividade superando barreiras no desenvolvimento de alimentos probióticos. **Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences**, v. 44, p. 329-347, 2008.

KONSTANTINOV, S. R.; SMIDT, H.; DE VOS, W. M.; BRUIJNS, S. C.; SINGH, S. K.; VALENCE, F.; MOLLE, D.; LORTAL, S.; ALTERMANN, E.; KLAENHAMMER, T.R.; VAN KOOYK, Y. S layer protein A of *Lactobacillus acidophilus* NCFM regulates immature dendritic cell and T cell functions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 19474-19479, 2008.

KORHONEN, H. Milk-derived bioactive peptides: From science to applications. **Journal of Functional Foods**, v. 1, p. 177 –187, 2009.

KOSSEVA, M.R.; PANESAR, P.S.; KAUR, G.; KENNEDY, J.F. Use of immobilised biocatalysts in the processing of cheese whey. **International Journal of Biological Macromolecules**, v.45, p.437-447, 2009.

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

LACROIX, C.; GRATTEPANCHE, F.; DOLEYRES, Y.; BERGMAIER, D. Immobilized cell technologies for dairy industry. In: NEVIDOVIC, V.; WILLAERT, R. (Eds.). **Applications of Cell Immobilisation Biotechnology**. Focus on Biotechnology, vol 8B. Alemanha: Springer-Verlag, 2005. p. 295-319.

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.

- LAGRANGE, V.; DALLAS, P. Produtos de soro dos EUA: disponibilidade, recursos tecnológicos, aplicações. **Engenharia de alimentos**, n.15, p.27-29, 1997.
- LEBLANC, J.G.; MATAR, C.; VALDEZ, J.C.; LEBLANC, J.; PERDIGON, G. Immunomodulating effects of peptidic fractions issued from milk fermented with *Lactobacillus helveticus*. **Journal of Dairy Science**, v.85, p. 2733-2742, 2002.
- LEE, S.J.; ROSENBERG, M. Whey protein-based microcapsules prepared by double emulsification and heat gelation. **LWT – Food Science and Technology**, v. 33, p. 80–88, 2000.
- LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; & CHOU, C. C. Survival of bifidobacteria after spray-drying. **International Journal of Food Microbiology**, v. 74, p. 79-86, 2002.
- LIAN, W.C.; HSIAO, H.C.; CHOU, C.C. Viability of microencapsulated bifidobacteria in simulated gastric juice and bile solution. **International Journal of Food Microbiology**, v. 86, p. 293–301, 2003.
- LIN, W.H.; HWANG, C.F.; CHEN, L.W.; TSEN, H.Y. Viable counts, characteristic evaluation for commercial lactic acid bacteria products. **Food Microbiology**, v. 23, p. 74–81, 2006.
- LIRA, H.L.; SILVA, M.C.D.; VASCONCELOS, M.R.S.; LIRA, H.L.; LOPEZ, A.M. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, p. 33-37, 2009.
- LIU, X.; CHUNG, Y. K.; YANG, S. T.; YOUSEF, A. E. Continuous nisin production in laboratory media and whey permeate by immobilized *Lactococcus lactis*. **Process Biochemistry**, v. 40, p. 13–24, 2005.
- LORENZ, J.G. **Comparação dos métodos de emulsificação e spray drying na microencapsulação de *Lactobacillus acidophilus* (La-5) e aplicação em sorvete**. 2009. Dissertação (Mestrado em Ciência dos Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência dos Alimentos, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC.

LOURENS-HATTINGH, A.; VILJOEN, B. Yogurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1-17, 2001.

LUYER, M.D.; BUURMAN, W.A.; HADFOUNE, M.; SPEELMANS, G.; KNOL, J.; JACOBS, J.A.; DEJONG, C.H.C.; VRIESEMA, A.J.M.; GREVE, J.W.M. Strain specific effects of probiotics on gut barrier integrity following hemorrhagic shock. **Infection and Immunity**, v. 73, p. 3689-3692, 2005.

LYTE, M. Probiotics function mechanistically as delivery vehicles for neuroactive compounds: Microbial endocrinology in the design and use of probiotics. **Bioessays**, v. 33, p. 574-581, 2011.

MACHADO, R. M. G.; SILVA, P. C.; FREIRE, V. H. Controle Ambiental em indústrias de laticínios. **Brasil Alimentos**, n. 7, p. 34-36, 2001.

MADRID, A.; CENZANO, I.; VICENTE, J.M. **Manual de indústrias dos alimentos**. São Paulo: Varela, 1996. 599p.

MAGENIS, R.B.; PRUDÊNCIO, E.S.; AMBONI, R.D.M.C.; CERQUEIRA JÚNIOR, N.G.; OLIVEIRA, R.V.B.; SOLDI, V.; BENEDET, H.D. Compositional and physical properties of yogurts manufactured from milk and whey cheese concentrated by ultrafiltration. **International Journal of Food Science and Technology**, v.41, p.560-568, 2006.

MARTÍNEZ-VILLALUENGA, C.; FRÍAS, J.; GÓMEZ, R.; VIDAL-VALVERDE, C. Influence of addition of raffinose family oligosaccharides on probiotic survival in fermented milk during refrigerated storage. **International Dairy Journal**, v.16, p.768-774, 2006.

MASCO, L.; HUYS, G.; DE BRANDT, E.; TEMMERMAN, R.; SWINGS, J. Culture-dependent and culture-independent qualitative analysis of probiotic products claimed to contain bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 102, p.221-230, 2005.

MATSUMOTO, M.; IMAI, T.; HIRONAKA, T.; KUME, H.; WATANABE, M.; BENNO, Y. Effect of yogurt with *Bifidobacterium*

*lactis* LKM512 in improving fecal microflora and defecation of healthy volunteers. **Chonai Saikingaku Zasshi**, v. 14, p. 97–102, 2001.

MATTILA-SANDHOLM, T.; MYLLARINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN, G.; FONDEN, R.; SAARELA, M. Technological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, v.12, p. 173-182, 2002.

McINTOSH, G.H. et al. Whey proteins as functional food ingredients? **International Dairy Journal**, v. 8, p. 425-434, 1998.

MEILE, L., LUDWIG, W., RUEGER, U., GUT, C., KAUFMANN, P., DASEN, G., WENGER, S., TEUBER, M. *Bifidobacterium lactis* sp. nov, a moderately oxygen tolerant species isolated from fermented milk. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 20, p. 57–64, 1997.

MEISEL, H. Overview on Milk protein-derived peptides. **International Dairy Journal**, v.8, p.363-373, 1998.

MENEZES, A.C.S. **Desenvolvimento de bebida láctea fermentada à base de soro de leite e polpa de cajá (*Spondias Mombin L.*) com potencial atividade probiótica**. 2011. 106f. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) – Programa de Pós-graduação em Ciência e Tecnologia de Alimentos, Universidade Federal Rural de Pernambuco, Recife, PE.

MILLQVIST-FUREBY, A.; ELOFSSON, U.; BERGENSTAHL, B. Surface composition of spray-dried milk protein-stabilised emulsions in relation to pre-heat treatment of proteins. **Colloids and Surfaces B: Biointerfaces**, v. 21, p. 47–58, 2001.

MIZUBUTI, I.Y. Soro de Leite: Composição, Processamento e Utilização na Alimentação. **Semina: Ciências Agrárias**, v. 15, p. 80-94, 1994.

MORENO, Y.M.F. **Influência das proteínas de soro de leite bovino no estado nutricional, composição corporal e sistema imune em coorte de crianças com Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (AIDS)**. 2002. 105f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

MORR, C. V.; HÁ, E. Y. W. Whey Protein Concentrates and Isolates: Processing and Functional Properties. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.33, p.431-476, 1993.

MORTAZAVIAN, A.; RAZAVI, S.H.; EHSANI, M.R.; SOHRABVANDI, S. Principles and methods of microencapsulation of probiotic microorganisms. **Iranian Journal of Biotechnology**, v. 5, p. 1-18, 2007.

NAGPAL, R.; YADAV, H.; PUNIYA, A. K.; SINGH, K.; JAIN, S.; MAROTTA, F. Potential of probiotic and prebiotics for synbiotic functional dairy foods: an overview. **International Journal of Probiotics and Prebiotics**, v. 2, p. 75-84, 2007.

NAZZARO, F.; ORLANDO, P.; FRATIANNI, F.; COPPOLA, R. Microencapsulation in food science and biotechnology. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 23, p. 1–5, 2011.

NOMOTO, K. Prevention of infections by probiotics. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 100, p. 583–592, 2005.

NUSSINOVITH, A. **Hydrocolloid Applications: gum technology in the food and other industries**. London: Black Academic & Professional, 1997. 354p.

O'SHEA, E.F.; COTTER, P.D.; STANTON, C.; ROSS, R.P.; HILL, C. Production of bioactive substances by intestinal bacteria as a basis for explaining probiotic mechanisms: Bacteriocins and conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Microbiology**, v. 152, p. 189–205, 2012.

OAKLEY, D. E. Produce uniform particles by spray drying. **Chemical Engineering Progress**, v. 93, p. 48-54, 1997.

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

OH, D.K.; HONG, G.H.; LEE, Y.; MIN, S.G.; SIN, H.S.; CHO, S.K. Production of conjugated linoleic acid by isolated *Bifidobacterium*

strains. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 19, p. 907–912, 2003.

OHASHI, Y; USHIDA, K. Health-beneficial effects of probiotics: Its mode of action. **Animal Science Journal**, v. 80, p. 361-371, 2009.

OLIVEIRA, V.M. **Formulação de bebida láctea fermentada com diferentes concentrações de soro de queijo, enriquecida com ferro: caracterização físico-química, análises bacteriológicas e sensoriais**. 2006. 78f. Dissertação (Mestrado em Medicina Veterinária) - Curso de Pós-graduação em Medicina Veterinária, Universidade Federal Fluminense, RJ.

ONG, L.; HENRIKSSON, A.; SHAH, N. P. Angiotensin converting enzyme-inhibitory activity in Cheddar cheeses made with the addition of probiotic *Lactobacillus casei* sp.. **Lait**, v. 87, 149–165, 2007.

ORDÓÑEZ, J.A.; RODRÍGUEZ, M.I.C.; ÁLVAREZ, L.F.; SANZ, M.L.G.; MINGUILLÓN, G.D.G.F.; PERALES, L.H.; CORTECERO, M.D.S. **Tecnología de alimentos - Alimentos de origem animal**. Porto Alegre: Artmed, 2005. Vol. 2. 279p.

OZMIHICI, S.; KARGI, F. Effects of feed sugar concentration on continuous ethanol fermentation of cheese whey powder solution (CWP). **Enzyme and Microbial Technology**, v. 41, p. 876–880, 2007.

PANESAR, P.S.; KENNEDY, J.F.; GANDHI, D.N.; BUNKO, K. Bioutilisation of whey for lactic acid production. **Food Chemistry**, v.105, p.1-14, 2007.

PAPACHRISTOU, E.; LAFAZANIS, C.T. Application of membrane technology in the pretreatment of cheese dairies wastes and co-treatment in a municipal conventional biological unit. **Water Science and Technology**, v.36, p.361-367, 1997.

PEIGHAMBARDOUST, S.H.; TAFTI, A.G.; HESARI, J. Application of spray drying for preservation of lactic acid starter cultures: a review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 22, p. 215-224, 2011.

PENNA, A. L. B.; OLIVEIRA, M. N.; TAMIME, A. Y. Influence of carrageenan and total solids content on the rheological properties of



lactic beverage made with yogurt and whey. **Journal of Texture Studies**, v. 34, p. 95–113, 2003.

PESSOA, C.A.; JORDÃO, E.P. **Tratamento de esgotos domésticos**. Rio de Janeiro: Associação Brasileira de Engenharia Sanitária e Ambiental - ABES, cap. 2, p.9-29, 1982.

PHILLIPS, G.O.; OGASAWARA, T.; USHIDA, K. The regulatory and scientific approach to defining gum arabic (*Acacia senegal* and *Acacia seyal*) as a dietary fibre. **Food Hydrocolloids**, v. 22, p. 24–35, 2008.

PICOT, A.; LACROIX, C. Production of Multiphase Water-Insoluble Microcapsules for Cell Microencapsulation Using an Emulsification/Spray-drying Technology. **Journal of Food Science**, v. 68, p.2693-2700, 2003.

PICOT, A.; LACROIX, C. Encapsulation of bifidobacteria in whey protein-based microcapsules and survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 505–515, 2004.

PIHALANTO, A.; KORHONEN, H. Bioactive peptides and proteins. In: TAYLOR, S.L.; ed. **Advances in Food and Nutrition Research**, v.47, San Diego: Elsevier, p.175-276, 2003.

PIMENTEL-GONZÁLEZ, D.J.; CAMPOS-MONTIEL, R.G.; LOBATO-CALLEROS, C.; PEDROZA-ISLAS, R.; VERNON-CARTER, E.J. Encapsulation of *Lactobacillus rhamnosus* in double emulsions formulated with sweet whey as emulsifier and survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Research International**, v. 42, p. 292–297, 2009.

PITKÄLÄ, K.H.; STRANDBERG, T.E.; FINNE-SOVERI, U.H.; OUWEHAND, A.C.; POUSSA, T.; SALMINEN, S. Fermented cereal with specific bifidobacteria normalizes bowel movements in elderly nursing home residents. A randomized, controlled trial. **The Journal of Nutrition, Health & Aging**, v. 11, p. 305-311, 2007.

PRAKASH, A.J.M.; MANGINO, M.E. The effects of added proteins on the functionality of gum arabic in soft drink emulsion systems. **Food Hydrocolloids**, v.4, p.177-187, 1990.

PRATA, A.S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa.**

2006. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição) – Pós-graduação em Alimentos e Nutrição, Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

PRIOULT, G.; PECQUET, S.; FLISS, I. Stimulation of interleukin-10 production by acidic lactoglobulin-derived peptides hydrolyzed with *Lactobacillus paracasei* NCC2461 peptidases. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.11, p.266-271, 2004.

RAMCHANDRAN, L., & SHAH, N. P. Growth, proteolytic and ACE – I activities of *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus* and *Streptococcus thermophilus* and rheological properties of low fat yogurt as influenced by the addition of raftiline HP<sup>®</sup>. **Journal of Food Science**, v. 73, p. M368–M374, 2008.

RANADHEERA, R.D.C.S.; BAINES, S.K.; ADAMS, M.C. Importance of food in probiotic efficacy. **Food Research International**, v. 43, p. 1-7, 2010.

RANDALL, R.C.; PHILLIPS, G.O.; WILLIAMS, P.A. Fractionation and characterization of gum from *Acacia Senegal*. **Food Hydrocolloids**, v. 3, p. 65-75, 1989.

RÉ, M.I. Formulating Drug Delivery Systems by Spray Drying. **Drying Technology**, v. 24, p.433-446, 2006.

RÉ, M. I. Microencapsulation by spray drying. **Drying Technology**, v.16, p.1195-1236, 1998.

RÉ, M. I. Microencapsulação: Em busca de produtos inteligentes. **Ciência Hoje**, v. 27, p. 24-29, 2000.

REID, A.A.; VUILLEMARD, J.C.; BRITTEN, M.; ARCAND, Y.; FARNWORTH, E.; CHAMPAGNE, C.P. Microentrapment of probiotic bacteria in a Ca<sup>++</sup>-induced whey protein gel and effects on their viability in a dynamic gastro-intestinal model. **Journal of Microencapsulation**, v. 22, p. 603–619, 2005.

REID, A. A.; CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N.; FUSTIER, P.; VUILLEMARD, J. C. Survival in food systems of *Lactobacillus rhamnosus* R011 microentrapped in whey protein gel particles. **Journal of Food Science**, v. 72, p. M31–M37, 2007.

REID, G. Neuroactive probiotics. **Bioessays**, v. 33, p. 562, 2011.

REINECCIUS, G.A. Carbohydrates for flavor encapsulation. **Food Technology**, v.45, p. 144-146, 1991.

RENARD, D.; ROBERT, P.; LAVENANT, L.; MELCION, D.; POPINEAU, Y.; GUEGUEN, J.; DUCLAIROIR, C.; NAKACHE, E.; SANCHEZ, C.; SCHMITT, C. Biopolymeric colloidal carriers for encapsulation or controlled release applications. **International Journal of Pharmaceutics**, v.242, p. 163-166, 2002.

RICHARDS, N.S.P.S. Soro lácteo: Perspectivas industriais e proteção ao meio ambiente. **Food Ingredientes**, v.3, p.20-27, 2002.

RIVEROS, B.; FERRER, J.; BORQUEZ, R. Spray drying of a vaginal probiotic strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology**, v. 27, p. 123-132, 2009.

RODRIGUES, D.; ROCHA-SANTOS, T.; SOUSA, S.; GOMES, A.M.; PINTADO, M.M.; MALCATA, F.X.; LOBO, J.M.S.; SILVA, J.P.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; FREITAS, A.C. On the viability of five probiotic strains when immobilised on various polymers. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, p. 137-144, 2011a.

RODRIGUES, D.; SOUSA, S.; ROCHA-SANTOS, T.; SILVA, J.P.; SOUSA LOBO, J.M.; COSTA, P.; AMARAL, M.H.; PINTADO, M.M.; GOMES, A.M.; MALCATA, F.X.; FREITAS, A.C. Influence of L-cysteine, oxygen and relative humidity upon survival throughout storage of probiotic bacteria in whey protein-based microcapsules. **International Dairy Journal**, v. 21, p. 869-876, 2011b.

RODRÍGUEZ-HUEZO, M.E.; DURÁN-LUGO, R.; PRADO-BARRAGÁN, L.A.; CRUZ-SOSA, F.; LOBATO-CALLEROS, C.; ALVAREZ-RAMÍREZ, J.; VERNON-CARTER, E.J. Pre-selection of protective colloids for enhanced viability of *Bifidobacterium bifidum* following spray-drying and storage, and evaluation of agumiel as

thermoprotective prebiotic. **Food Research International**, v. 40, p. 1299–1306, 2007.

ROSANELI, C. F. **Atividade antiulcerogênica de um concentrado de soro de leite bovino em modelos experimentais com ratos**. 2002. 81f. Dissertação (Mestrado em Alimentos e Nutrição) - Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2002.

ROSENBERG, M.; KOPELMAN, I.J. & TALMON, Y. Factors affecting retention in spray-drying microencapsulation of volatile materials. **Journal of Agriculture and Food Chemistry**, v. 36, p. 1288-1294, 1990.

ROSENBERG, M.; SHEU, T.Y. Microencapsulation of volatiles by spray-drying in whey protein-based wall systems. **International Dairy Journal**, v. 6, p. 273–284, 1996.

RUSSELL, D.A.; ROSS, R.P.; FITZGERALD, G.F.; STANTON, C. Metabolic activities and probiotic potential of bifidobacteria. **International Journal of Food Microbiology**, v. 149, p. 88–105, 2011.

SAIER, M.H.; MANSOUR, N.M. Probiotics and prebiotics in human. **Journal of Molecular Microbiology and Biotechnology**, v. 10, p. 22–25, 2005.

SANCHEZ, C.; RENARD, D; ROBERT, P.; SCHMITT, C.; LEFEBVRE, J. Structure and rheological properties of acacia gum dispersions. **Food Hydrocolloids**, v. 16, p.257-267, 2002.

SANTIVARANGKNA, C.; KULOZIK, U.; FOERST, P. Alternative drying processes for the industrial preservation of lactic acid starter cultures. **Biotechnology Progress**, v.23, p. 302-315, 2007.

SAULNIER, D.M.A.; SPINLER, J.K.; GIBSON, G.R.; VERSALOVIC, J. Mechanisms of probiosis and prebiosis: considerations for enhanced functional foods. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 20, p. 135-141, 2009.

SCHILLINGER, U. Isolation and identification of lactobacilli from novel-type probiotic and mild yoghurts and their stability during

refrigerated storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 47, p. 79-87, 1999.

SEMYONOV, D.; RAMON, O.; KAPLUN, Z.; LEVIN-BRENER, L.; GUREVICH, N.; SHIMONI, E. Microencapsulation of *Lactobacillus paracasei* by spray freeze drying. **Food Research International**, v. 43, p. 193-202, 2010.

SGARBIERI, V.C. Propriedades fisiológicas-funcionais das proteínas do soro de leite. **Revista de Nutrição**, v.17, p. 397-409, 2004.

SHAH, N.P. Probiotic Bacteria: Selective Enumeration and Survival in Dairy Foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894-907, 2000.

SHAH, N.P. Functional cultures and health benefits. **International Dairy Journal**, v. 17, p. 1262-1277, 2007.

SHAHIDI, F.; HAN, X.Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical reviews in food science and nutrition**, v. 33, p.501-547, 1993.

SHALAKA, D.; NAIK, S.R.; AMRUTA, A.; PARIMAL, K. Vitamin E loaded pectin alginate microspheres for cosmetic application. **Journal of Pharmacy Research**, v.2, p.1098-1102, 2009.

SILVA, K.; BOLINI, H.M.A. Avaliação sensorial de sorvete formulado com produto de soro ácido de leite bovino. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 26, p. 116-122, 2006.

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.

SIRAGUSA, S.; DE ANGELIS, M.; DI CAGNO, R.; RIZZELLO, C.G.; CODA, R.; GOBBETTI, M. Synthesis of  $\gamma$ -Aminobutyric Acid by Lactic Acid Bacteria Isolated from a Variety of Italian Cheeses. **Applied and Environmental Microbiology**, v.73, p. 7283-7290, 2007.

SIVIERI, K.; OLIVEIRA, M.N. Avaliação da vida-de-prateleira de bebidas lácteas preparadas com “fat replacers” (Litesse e Dairy-lo). **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v.22, p.24-31, 2002.

SMITHERS, G.W. Whey and whey proteins - From „gutter-to-gold“. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 695–704, 2008.

SOARES, L.A.L. **Obtenção de comprimidos contendo alto teor de produto seco por aspersão de *Maytenus ilicifolia* Mart. ex Reissek – Celastraceae. Desenvolvimento tecnológico de produtos intermediários e final.** 2002. 285p. Tese (Doutorado em Ciências Farmacêuticas) - Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas, UFRGS, Porto Alegre, RS, 2002.

STACKEBRANDT, E., RAINEY, A., WARD-RAINEY, N.L. Proposal for a new hierarchic classification system, Actinobacteria classis nov. **International Journal of Systematic Bacteriology**, v. 47, p. 479–491, 1997.

SU, L.C.; LIN, C.W.; CHEN, M. J. Development of an Oriental-style dairy product coagulated by microcapsules containing probiotics and filtrates from fermented rice. **International Journal of Dairy Technology**, v. 60, p.49-54, 2007.

SUAVE, J.; DALL'AGNOL, E. C.; PEZZIN, A. P. T.; SILVA, D. A. K.; MEIER, M. M.; SOLDI, V. Microencapsulação: Inovação em diferentes áreas. **Revista Saúde e Ambiente**, v. 7, p.12-20, 2006.

SULTANA, K.; GODWARD, G.; REYNOLDS, N.; ARUMUGASWAMY, R.; PEIRIS, P.; KAILASAPATHY, K. Encapsulation of probiotic bacteria with alginate–starch and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions and in yoghurt. **International Journal of Food Microbiology**, v. 62, p. 47–55, 2000.

SUN, J.L.; ZHAO, R.X.; WANG, D.H.; NIU, S.Y. Study on vacuum spray dehydration micro-encapsulation of *Lactobacillus acidophilus*. **Transactions of the Chinese Society of Agricultural Engineering**, v. 22, p. 161–164, 2006.

TALWALKAR, A.; KAILASAPATHY, K. Effect of microencapsulation on oxygen toxicity in probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 58, p. 36-39, 2003.

TAMIME, A. Y. (2002). **Microbiology of starter cultures**. In R. K. Robinson (Ed.), *Dairy microbiology handbook* (3rd ed.) (pp. 261– 366). New York, NY: Wiley.

THEVENET, F. Acacia Gums. Stabilizers for flavor encapsulation. In: RISCH, S.J.; REINECCIUS, G.A. (Eds.). **Flavor encapsulation**. ACS Symposium Series 370. USA: American Chemical Society, 1988. p. 37-44.

TODD, R. D. Microencapsulation and flavour industry. **Flavour Industry**, v. 1, p. 768-771, 1970.

TRUELSTRUP HANSEN, L.; ALLAN-WOJTAS, P.M.; JIN, Y.L.; PAULSON, A.T. Survival of Ca-alginate microencapsulated *Bifidobacterium* spp. in milk and simulated gastrointestinal conditions. **Food Microbiology**, v. 19, p. 35-45, 2002.

TULLIO, L.T. **Isolamento e Caracterização do Glicomacropéptídeo do Soro de Leite**. 2007. 97f. Dissertação (Mestrado em Tecnologia em Alimentos) – Programa de pós-graduação em Tecnologia em Alimentos, Universidade Federal do Paraná, PR.

VAN BAARLEN, P., TROOST, F. J., VAN HEMERT, S., VAN DER MEER, C., DE VOS, W. M., DE GROOT, P. J.; HOOIVELD, G. J. E. J.; BRUMMER, R.J.M.; KLEEREBEZEM, M. Differential NF- $\kappa$ B pathways induction by *Lactobacillus plantarum* in the duodenum of healthy humans correlating with immune tolerance. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, p. 2371-2376, 2009.

VAN NIEUWENHOVE, C.P.; OLISZEWSKI, R.; GONZÁLEZ, S.N.; CHAIA, A.B.P. Conjugated linoleic acid conversion by dairy bacteria cultured in MRS broth and buffalo milk. **Letters in Applied Microbiology**, v. 44, p. 467–474, 2007.

VASBINDER, A. J.; ALTING, A. C.; VISSCHERS, R. W.; DE KRUIF, C. G. Texture of acid milk gels: Formation of disulfide cross-links during acidification. **International Dairy Journal**, v.13, p. 29–38, 2003.

VASILJEVIC, T.; SHAH, N.P. Probiotics - From Metchnikoff to bioactives. **International Dairy Journal**, v. 18, p. 714–728, 2008.

VAUGHAN, E.E.; HEILIG, H.; BEN-AMOR, K.; DE VOS, W.M. Diversity, vitality and activities of intestinal lactic acid bacteria and bifidobacteria assessed by molecular approaches. **FEMS Microbiology Reviews**, v. 29, p. 477–490, 2005.

VERBEKEN, D.; DIERCKX, S.; DEWETTINCK, K. Exudate gums: occurrence, production and applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v.63, p.10-21, 2003.

VIEIRA, A.A.M.T. **Estudo da Hidrólise enzimática do soro de queijo utilizando as lactases Lactozym e prozyn**. 2006. 77f. Dissertação (mestrado) – Programa de pós-graduação em Engenharia Química, Universidade Federal de Uberlândia, MG.

WANG, Y.; YU, R.; CHOU, C. Viability of lactic acid bacteria and bifidobacteria in fermented soymilk after drying, subsequent rehydration and storage. **International Journal of Food Microbiology**, v. 93, p. 209-217, 2004.

WATANABE, K.; FUJIMOTO, J.; SASAMOTO, M.; DUGERSUREN, J.; TUMURSUH, T.; DEMBEREL, S. Diversity of lactic acid bacteria and yeasts in Airag and Tarag, traditional fermented milk products of Mongolia. **World Journal of Microbiology and Biotechnology**, v. 24, p. 1313–1325, 2008.

WEESE, J.S. Microbiologic evaluation of commercial probiotics. **Journal of the American Veterinary Medicine Association**, v. 220, p. 794–797, 2002.

WEINBRECK, F.; BODNÁR, I.; MARCO, M.L. Can encapsulation lengthen the shelf-life of probiotic bacteria in dry products? **International Journal of Food Microbiology**, v. 136, p. 364–367, 2010.

WONG, N.P.; JENESS, R.; KEENEY, M.; MARTH, E.H. **Fundamentals of Dairy Chemistry**. New York: Aspen Publication, 779 p., 1999.



YAESHIMA, T.; TAKAHASHI, S.; MATSUMOTO, N.; ISHIBASHI, N.; HAYASAWA, H.; IINO, H. Effect of Yogurt Containing *Bifidobacterium longum* BB536 on the intestinal environment, fecal characteristics and defecation frequency, **Bioscience and Microflora**, v. 16, p. 73–77, 1997.

YOSHIOKA, H.; FUJITA, K.; SAKATA, H.; MURONO, K.K.I. Development of the normal intestinal flora and its clinical significance in infants and children. **Bifidobacteria and Microflora**, v. 10, p. 11–17, 1991.

ZHAO, C.Y.; ZHANG, G.H. Review on microencapsulated phase change materials (MEPCMs): Fabrication, characterization and applications. **Renewable and Sustainable Energy Reviews**, v. 15, p. 3813–3832, 2011.