



UNIVERSIDADE DO VALE DO TAQUARI
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM BIOTECNOLOGIA

MICROENCAPSULAMENTO DE *Lactobacillus* sp. POR *SPRAY DRYING* UTILIZANDO COMO MATERIAL DE PAREDE SOROS LÁCTEOS DE DIFERENTES ESPÉCIES

Jéssica Aparecida Bressan Soratto da Silva

Lajeado, setembro de 2018

Jéssica Aparecida Bressan Soratto da Silva

MICROENCAPSULAMENTO DE *Lactobacillus* sp. POR *SPRAY DRYING* UTILIZANDO COMO MATERIAL DE PAREDE SOROS LÁCTEOS DE DIFERENTES ESPÉCIES

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade do Vale do Taquari, como parte da exigência para a obtenção do grau de Mestre em Biotecnologia.

Orientador: Prof^a Dr^a Claucia Fernanda Volken de Souza

Coorientador: Prof^a Dr^a Márcia Inês Goettert

Lajeado, setembro de 2018

RESUMO

Bactérias ácido-láticas podem apresentar propriedades probióticas e conferir benefícios à saúde do consumidor, quando ingeridas em quantidade suficientes. A administração oral dessas bactérias resulta em perda de viabilidade. Assim, o microencapsulamento destes microrganismos proporciona uma barreira física protetora contra os ambientes adversos. O encapsulamento por *spray drying* é uma técnica muito utilizada na indústria de alimentos. Os subprodutos de laticínios são uma alternativa de material encapsulante, devido à composição e capacidade de proteção durante a secagem por *spray drying*, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Assim, o objetivo deste trabalho foi avaliar a eficiência do microencapsulamento por *spray drying* de *Lactobacillus* sp. utilizando como materiais de parede soro de queijo de diferentes origens e derivado do soro de queijo bovino. No microencapsulamento por *spray drying*, soro de queijo bovino e bubalino e o permeado de soro bovino foram utilizados como materiais encapsulantes de *Lactobacillus pentosus* ML 82 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Todos os materiais de parede utilizados, independente do microrganismo, provaram ser capazes de promover a proteção contra as altas temperaturas utilizadas no processo de secagem. As microcápsulas foram armazenadas em temperatura de 25 °C e adicionadas em suco de laranja comercial mantido a 4 °C, por 90 dias. *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 livres foram adicionados em suco de laranja e armazenados a 4 °C, por 90 dias. Após o período, apresentaram elevada viabilidade celular. Os microrganismos encapsulados quando expostos ao trato gastrointestinal simulado, apresentaram viabilidade superior a 8 log UFC/g, com exceção à exposição aos sais biliares (0,5% (m/v)), que demonstrou ser mais danoso às bactérias estudadas. Independentemente do material utilizado todas as microcápsulas mostraram morfologias semelhantes, com tamanho entre 7,77 e 17,76 µm. A umidade mostrou ser um ponto crítico afetando a viabilidade celular durante o armazenamento. O encapsulamento por *spray drying* e a utilização dos soros lácteos como materiais encapsulantes mostraram ser capazes de proteger os microrganismos estudados durante o processo de secagem, armazenamento em temperatura ambiente e em suco de laranja, assim como pela passagem pelo trato gastrointestinal simulado. Sendo assim, são uma alternativa de aplicação, promovendo agregação de valor aos soros lácteos.

Palavras-chave: bactérias ácido-láticas; encapsulamento; *spray drying*; armazenamento; trato gastrointestinal simulado; soros lácteos.

ABSTRACT

Acid-lactic bacteria can present probiotic properties and confer benefits to consumer's health, when ingested in sufficient quantity. Oral administration of these bacteria results in loss of viability. Thus, microencapsulation of these microorganisms provides a protective physical barrier against adverse environments. Spray drying encapsulation is a widely used technique in the food industry. Dairy by-products are an alternative of encapsulating material, due to the composition and protective capacity during drying by spray drying, storage and passage through the simulated gastrointestinal tract. Thus, the objective of this work was to evaluate the efficiency of microencapsulation by spray drying of *Lactobacillus* sp. using as wall materials whey from different origins and derived from bovine whey. In microencapsulation by spray drying, bovine and buffalo whey and bovine permeate were used as encapsulating materials of *Lactobacillus pentosus* ML 82 and *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. All wall materials used independently of the microorganism proved to be able of promoting protection against the high temperatures used in the drying process. The microcapsules were stored at 25 °C and added in commercial orange juice kept at 4 °C for 90 days. *L. pentosus* ML 82 and *L. plantarum* ATCC 8014 free were added in orange juice and stored at 4 °C for 90 days. After the period, they presented high cellular viability. The microorganisms encapsulated when exposed to the simulated gastrointestinal tract presented viability greater than 8 log CFU/g, with the exception of exposure to bile salts (0.5% (m/v)), which proved to be more damaging to the bacteria studied. Independently of the material used, all microcapsules showed similar morphologies, with size between 7,77 and 17,76 µm µm. Humidity showed to be a critical point affecting cell viability during storage. Spray drying encapsulation and the use of whey as encapsulating materials were shown to be able to protect the microorganisms studied during drying, storage at room temperature and in orange juice, as well as the passage through the simulated gastrointestinal tract. Therefore, they are an alternative of application, promoting value added to dairy whey.

Keywords: acid-lactic bacteria; encapsulation; spray drying; storage; simulated gastrointestinal tract; dairy whey.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Prováveis mecanismos de ação dos probióticos.....21
- Figura 2. Esquematização da técnica de secagem por *spray drying*.....33
- Figura 3. Viabilidade das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 (log UFC/g) durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C.....48
- Figura 4. Viabilidade das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 (log UFC/g) durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C.....49
- Figura 5. Variações de pH e contagem e células viáveis (log UFC/mL) das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja.....52
- Figura 6. Variações de pH e contagem e células viáveis (log UFC/mL) das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja.....53
- Figura 7. Variações de pH e contagem e células viáveis (log UFC/mL) das células livres de *L. pentosus* ML 82 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja.....55
- Figura 8. Variações de pH e contagem e células viáveis (log UFC/mL) das células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja...56
- Figura 9. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em permeado de soro bovino.....61
- Figura 10. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em soro de queijo bovino.....63

Figura 11. Viabilidade de <i>L. pentosus</i> ML 82 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em soro de queijo bubalino.....	65
Figura 12. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em permeado de soro bovino.....	67
Figura 13. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em soro de queijo bovino.....	69
Figura 14. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias em soro de queijo bubalino.....	71
Figura 15. Micrografias de MEV das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 obtidas por <i>spray drying</i> com soro de queijo bovino, bubalino e permeado de soro bovino (10000 X).....	74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Composição do soro de queijo bovino e bubalino.....	29
Tabela 2. Comparação da composição dos soros de queijo bubalino e bovino.....	29
Tabela 3. Comparação da composição proteica dos soros de queijo bubalino e bovino.....	30
Tabela 4. Caracterização físico-química de permeado de soro bovino, do soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino utilizados na produção das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC 8014.....	44
Tabela 5. Viabilidade de <i>L. pentosus</i> ML 82 antes e após a secagem por <i>spray drying</i> utilizando permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino.....	45
Tabela 6. Viabilidade de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 antes e após a secagem por <i>spray drying</i> utilizando permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino.....	45
Tabela 7. Taxa de sobrevivência (%) do <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC8014 expostos às condições ambientais do TGI simulado.....	58
Tabela 8. Redução da viabilidade celular quanto à exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 com os diferentes materiais de parede: permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino.....	58
Tabela 9. Redução da viabilidade celular quanto à exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 com os diferentes materiais de parede: permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino.....	59

Tabela 10. Características das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 preparadas com permeado de soro bovino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	75
Tabela 11. Características das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 preparadas com soro de queijo bovino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	76
Tabela 12. Características das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 preparadas com soro de queijo bubalino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	76
Tabela 13. Características das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 preparadas com permeado de soro bovino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	77
Tabela 14. Características das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 preparadas com soro de queijo bovino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	77
Tabela 15. Características das microcápsulas de <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 preparadas com soro de queijo bubalino ao longo do armazenamento de 90 dias.....	78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	10
2 OBJETIVOS	14
2.1 Objetivo Geral	14
2.2 Objetivos Específicos	14
3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	16
3.1 Bactérias ácido-láticas	16
3.2 Alimentos funcionais probióticos	17
3.3 Mecanismos de ação dos probióticos	20
3.4 Microencapsulamento de probióticos.....	22
3.5 Materiais utilizados no encapsulamento de probióticos	23
3.5.1 Soro de Queijo	26
3.5.1.1 Composição do soro de queijo bovino e bubalino	28
3.5.1.2 Permeado de Soro.....	30
3.6 Técnicas utilizadas no encapsulamento de probióticos	31
3.6.1 <i>Spray drying</i>	32
4 MATERIAL E MÉTODOS	37
4.1 Material	37
4.1.1 Análise físico-química dos materiais encapsulantes.....	37
4.2 Microrganismos.....	38
4.3 Condições de Cultivo	38

4.4	Microencapsulamento dos probióticos por <i>spray drying</i>	38
4.5	Avaliação dos microencapsulados	39
4.5.1	Viabilidade ao processo de microencapsulamento	39
4.5.2	Sobrevivência das bactérias sob condições gastrintestinais simuladas	40
4.5.3	Sobrevivência das microcápsulas ao armazenamento	41
4.5.4	Sobrevivência das microcápsulas em suco de laranja.....	41
4.6	Caracterização das microcápsulas	41
4.6.1	Morfologia e tamanho da microestrutura	41
4.6.2	Umidade e atividade de água	42
4.6.3	Análise de cor	42
4.7	Análise estatística	42
5	RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1	Análise físico-química dos subprodutos das indústrias de laticínios	44
5.2	Viabilidade das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 após a secagem por <i>spray drying</i>	45
5.3	Viabilidade das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC durante o armazenamento	48
5.4	Viabilidade e pH das microcápsulas e das células livres de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja.....	52
5.5	Sobrevivência das microcápsulas de <i>L. pentosus</i> ML 82 e <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 ao trato gastrintestinal simulado.....	57
5.6	Caracterização das microcápsulas	72
5.6.1	Morfologia e tamanho de partícula.....	72
5.6.2	Umidade, atividade de água e análise de cor	75
	CONCLUSÃO	Erro! Indicador não definido.81
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	83

1 INTRODUÇÃO

Bactérias ácido-láticas (BALs) são microrganismos capazes de produzir uma série de ácidos orgânicos, como o láctico, ácidos acético, succínico, propiônico, fórmico e butírico. BALs também produzem durante a fermentação diacetil, peróxido de hidrogênio e bacteriocinas. Estes metabólitos têm efeitos positivos sobre o sabor, cheiro, cor e textura do alimentos fermentados, e eles também podem ter efeitos benéficos, como prolongar a vida de prateleira e inibir o crescimento de organismos patogênicos. Nos produtos alimentícios, as BALs podem se apresentar naturalmente ou serem adicionadas (MALARADJOU e BUHNIA, 2012).

Estas bactérias podem apresentar propriedades probióticas. Entretanto, vários critérios são estabelecidos na seleção de cepas probióticas, incluindo tolerância a ácidos e bile, sobrevivência através da via gastrointestinal, capacidade de aderir a superfícies intestinais, atividade antimicrobiana contra bactérias potencialmente patogênicas e boas propriedades tecnológicas (NURAJIDA, 2015). As propriedades funcionais dos probióticos incluem atividade hipocolesterolêmica, prevenção e tratamento da diarreia e alteração do sistema imunológico. Os mecanismos pelos quais os probióticos exercem seus efeitos benéficos no hospedeiro incluem a redução do pH luminal, a competição com patógenos por sítios de adesão e fontes nutricionais, a secreção de substâncias antimicrobianas, a inativação de toxinas e a estimulação imunológica (SALMINEN et al., 2010).

A administração oral dessas bactérias resulta numa grande perda de viabilidade associada à passagem através do trato gastrointestinal, o que é atribuído às altas concentrações de ácido e sais biliares presentes. Esta perda de viabilidade reduz efetivamente a eficácia do suplemento administrado. A formulação destas bactérias em microcápsulas é um método emergente para reduzir a morte celular durante a passagem pelo trato gastrointestinal, bem como uma oportunidade para controlar a liberação destas células no intestino grosso (COOK et al., 2012).

O microencapsulamento pode ser definido como o processo em que as células são retidas dentro de uma membrana de encapsulamento, com o objetivo de reduzir danos ou perda das células (SULTANA et al., 2000). É um processo físico-químico ou mecânico, em que as células bacterianas são aprisionadas dentro de revestimentos, também denominados de agente encapsulante ou material de parede, proporcionando proteção contra condições adversas, como pH alto ou baixo, sais biliares, choque por baixas temperaturas (induzido pelo congelamento na liofilização), oxigênio molecular (no caso de microrganismos anaeróbios) e choque por altas temperaturas (causado pelo processo de secagem por *spray drying*) (IRAVANI; KORBKANDI; MIRMOHAMMADI, 2015).

Um grande desafio enfrentado no desenvolvimento de um produto alimentar probiótico é garantir uma alta taxa de sobrevivência das bactérias durante a fabricação do produto e também em toda a sua vida de prateleira, para que essas bactérias sejam entregues em número suficiente para conferir os benefícios esperados para a saúde (TRIPATHI e GIRI, 2014). Assim, o microencapsulamento de células probióticas tem sido amplamente estudado como um método para melhorar a estabilidade destes microrganismos, protegendo-os de ambientes adversos (MACIEL et al., 2014). Devido ao mercado crescente, os produtos probióticos estão sendo amplamente requisitados, em que pós contendo probióticos são preferidos pelas indústrias, devido à estabilidade ao armazenamento e conveniência tanto para o transporte como para a incorporação em alimentos (HUANG et al., 2017). A técnica de secagem por *spray drying* apresenta vantagens, como o custo-benefício relativamente baixo, facilidade de operação e capacidade de expansão para grande escala (GHANDI et al., 2012).

O microencapsulamento de bactérias, pela técnica de *spray drying*, tem sido reconhecido como uma abordagem eficiente, por exercer um efeito protetor contra condições adversas durante o armazenamento e a passagem pelo trato gastrointestinal. Essa secagem implica na atomização de matérias-primas líquidas em um pulverizador de gotículas e no contato destas gotículas com o ar quente da câmara de secagem. O equipamento de *spray drying* possui uma bomba de alimentação, um atomizador, um aquecedor de ar, um dispersor de ar, uma câmara de secagem, um equipamento para a coleta o produto final e um removedor de ar (YONEKURA et al., 2014). Esta técnica é uma aplicação bem estabelecida em indústrias de produtos lácteos e farmacêuticos, sendo que o custo-benefício do processo e a capacidade de produção em larga escala são vantagens do processo. Contudo, o desafio em utilizar a secagem por *spray drying* está relacionado principalmente ao uso de altas temperaturas durante o processamento, que pode danificar as células bacterianas e posteriormente reduzir a sua viabilidade (SCHUCK et al., 2013).

A escolha do material de parede tem relevância na promoção da viabilidade da bactéria encapsulada. O soro de queijo é um líquido verde-amarelado produzido durante o processo tradicional de fabricação do queijo, da precipitação e remoção da caseína do leite. Este líquido apresenta um elevado conteúdo orgânico e salino, devido principalmente à presença de carboidratos do leite (lactose) e proteínas (PRAZERES et al., 2012). O soro de queijo é também um produto com alto valor nutricional e com muitas possibilidades de exploração tecnológica (JANTZEN; GÖPEL; BEERMANN, 2013; LAVARI et al., 2014). A ultrafiltração do soro de queijo para a obtenção da fração protéica para a produção de concentrados de proteínas do soro de queijo, resulta na obtenção do permeado de soro, subproduto lácteo rico em lactose (GUIMARÃES et al., 2010).

Ambos os subprodutos da indústria de laticínios, soro de queijo bovino (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; ILHA et al., 2015; PINTO et al., 2015a) e permeado de soro de queijo bovino vêm sendo avaliados como materiais de parede no microencapsulamento de bactérias lácticas com potencial probiótico por meio da técnica de secagem por *spray drying*, apresentando bons resultados em relação à viabilidade durante o processo de secagem, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal simulado (LAVARI et al., 2015; HUGO et al., 2016). O soro de queijo

de búfala apresenta uma maior concentração de proteínas e lactose (LIRA et al., 2009; ROMÁM et al., 2011), assim como uma maior concentração de β -lactoglobulina e α -lactoalbumina quando comparado ao soro de queijo bovino (BUFFONI et al., 2011) e ainda não tinha sido avaliado como material de parede no microencapsulamento de BALs com potencial probiótico pela técnica de secagem por *spray drying*. Assim, a aplicação destes subprodutos como material encapsulante é uma forma de utilização e aproveitamento, evitando a eliminação como resíduo e o consequente custo com o tratamento de efluentes, permitindo agregação de valor e contribuindo para o desenvolvimento biotecnológico na produção de alimentos.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar o microencapsulamento por *spray drying* de *Lactobacillus* sp. utilizando como materiais de parede soro de queijo de diferentes origens e derivado do soro de queijo bovino por *spray drying*.

2.2 Objetivos Específicos

- Analisar físico-quimicamente os materiais de parede utilizados no processo de microencapsulamento por *spray-drying*;
- Avaliar a viabilidade dos *Lactobacillus* sp. quanto ao processo de microencapsulamento por *spray drying* e comparar a eficiência do microencapsulamento dos diferentes materiais de parede utilizados: soro de queijo bovino e bubalino e permeado de soro bovino;
- Estimar a sobrevivência dos *Lactobacillus* sp. sob condições gastrintestinais simuladas após o processo de encapsulamento por *spray drying*;
- Analisar a sobrevivência dos *Lactobacillus* sp. quanto ao armazenamento a temperatura ambiente após o microencapsulamento;
- Caracterizar as microcápsulas quanto à estrutura, atividade de água, umidade e cor;

- Avaliar a viabilidade e a sobrevivência à passagem pelo trato gastrointestinal simulado dos microencapsulados armazenados em suco de laranja.

3 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1 Bactérias ácido-láticas

As BALs são responsáveis por promover transformações em matérias-primas lácteas, cárneas e vegetais e são utilizadas para alterar propriedades sensoriais, como sabor e textura dos alimentos, e para prolongar a vida de prateleira (ASTERI; KITTAKI; TSAKALIDOU, 2010). Foram os primeiros microrganismos a serem utilizados na produção de alimentos industrializados, sendo bem caracterizados quanto à genética, fisiologia e aplicações (KONINGS et al., 2000). Os microrganismos podem ser empregados no desenvolvimento de bioprodutos inovadores, incluindo a comunidade de BALs, que são consideradas as mais exploradas entre todos os gêneros já identificados, com o maior potencial de produção de metabólitos (NISIOTOU et al., 2014).

Estas constituem um grupo de microrganismos que possuem, em comum, características morfológicas, metabólicas e fisiológicas. Apresentam como principal produto do metabolismo de carboidratos, o ácido láctico (AXELSSON, 2004). Esse ácido apresenta uma ampla gama de aplicações industriais no setor alimentício, sendo utilizado em diversas formas como acidulante, aromatizante e emulsificante, além de inibir a esporulação de bactérias em alimentos processados (OLIVEIRA et al., 2018).

As BALs são usualmente introduzidas nos mais diversos setores produtivos, devido sua elevada capacidade de produção de bioprodutos com aplicabilidade na indústria química, alimentícia e farmacêutica. Também podem reproduzir diferentes tipos de polissacarídeos extracelulares, incluindo dextrana, inulina e levana (ZAFAR et al., 2018). Estes, por sua vez, apresentam aplicabilidade comercial, principalmente como biomaterial, com grande versatilidade em suas propriedades estruturais e funcionais, sendo resistentes e de fácil obtenção, biodegradáveis e biocompatíveis (WASUPALLI e VERMA, 2018).

Estas bactérias são constituintes naturais da microbiota de alimentos e com registro comprovado de produção de metabólitos comerciais incluem os gêneros: *Carnobacterium*, *Oenococcus*, *Enterococcus*, *Pediococcus*, *Lactococcus*, *Streptococcus*, *Lactobacillus*, *Bifidobacterium*, *Tetragenococcus*, *Lactosphaera*, *Vagococcus*, *Leuconostoc*, *Weissella*, *Microbacterium*, *Propionibacterium*, *Enterococcus* e *Melissococcus* (HOLZAPFEL et al., 2001). Além disso, são habitantes naturais do trato gastrointestinal humano, representando a microbiota predominante do intestino delgado (KASSAA et al., 2014; HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA et al., 2018). Estas, não formam esporos, são Gram-positivas, ácido-tolerantes e catalases negativas. São considerados os probióticos mais importantes por terem um efeito benéfico à saúde do hospedeiro, promovendo o equilíbrio da microbiota, fornecendo uma proteção contra patógenos e estimulando o sistema imune (HOLZAPFEL et al., 2001; ANAL; SINGH, 2007).

3.2 Alimentos funcionais probióticos

Os probióticos são microrganismos que contribuem na manutenção do equilíbrio e da composição da flora intestinal e aumentam a resistência contra a invasão de patógenos, resultando em benefícios à saúde. Os gêneros de bactérias probióticas mais conhecidos são os *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* (ROKKA; RANTAMAKI, 2010). A demanda de alimentos funcionais probióticos está crescendo rapidamente, devido à maior conscientização dos consumidores em relação ao impacto dos alimentos sobre a saúde (TRIPATHI; GIRI, 2014). Para que estes microrganismos forneçam efeitos benéficos é necessária a administração em quantidades adequadas (JOHANSSON et al., 2015).

A alta contagem e viabilidade de bactérias são desejadas quando se desenvolve alimentos funcionais com probióticos, para os quais a quantidade de células viáveis foi sugerida em cerca de 10^9 unidades formadoras de colônia (UFC), por dose diária ingerida. Como consequência da crescente procura por esses alimentos probióticos nas últimas décadas, o foco atual está na preservação da viabilidade do probiótico durante o processo de produção, armazenamento e digestão (MOHAMMADI; MORTAZAVIAN, 2011; TRIPATHI; GIRI, 2014).

Os alimentos funcionais são aqueles que fornecem, além das funções nutricionais, efeitos fisiológicos e metabólicos, através do desempenho de algum nutriente na manutenção das funções do organismo. A crescente preocupação com a qualidade de vida da população vem promovendo diversos estudos sobre a alimentação e seus efeitos no organismo humano. Produtos alimentares com probióticos incorporados são considerados alimentos funcionais, devido aos benefícios que podem trazer à saúde dos seres humanos (HUANG et al., 2016).

De acordo com a Resolução RDC nº 02 de 07 de janeiro de 2002, da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), que aprovou o regulamento técnico de substâncias bioativas e probióticos isolados, com alegação de propriedade funcional ou de saúde, considera como produtos funcionais os carotenóides, fitoesteróis, flavonóides, fosfolipídeos, organosulfurados, polifenóis e os probióticos (BRASIL, 2002).

Probióticos são organismos vivos (bactérias ou fungos) que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2002). A funcionalidade dos probióticos depende da dose ingerida (ZHU et al., 2014), sendo que a ANVISA (BRASIL, 2008) regulamenta uma quantidade mínima viável situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC, na recomendação diária do produto pronto para consumo.

Os probióticos incluem uma grande variedade de BALs, do gênero *Lactobacillus* (*acidophilus*, *brevis*, *fermentum*, *gasseri*, *johnsonii*, *paracasei*, *plantarum*, *rhamnosus* e *salivarius*), *Bifidobacterium* (*adolescentis*, *animalis*, *bifidum*, *breve*, *infantis* e *longum*), *Streptococcus* (*thermophilus* e *salivarius*) e *Enterococcus* (*faecium*). Os gêneros *Lactococcus*, *Enterococcus*, *Propionibacterium* e as leveduras *Saccharomyces* (por exemplo, *Saccharomyces cerevisiae* e *Saccharomyces boulardii*) e fungos filamentosos (por exemplo, *Aspergillus oryzae*) também são

usados como probióticos devido aos seus efeitos na promoção da saúde (ANAL; SINGH, 2007).

Os probióticos têm sido empregados em vários ensaios clínicos bem sucedidos para combater patógenos entéricos de origem alimentar e conferir benefícios imunorregulatórios. As BALs são usadas para fornecer antígenos que induzem a resposta protetora frente aos microrganismos patógenos, restaurando as populações saudáveis e expressando respostas terapêuticas eficientes (CANO-GARRIDO, SERAS-FRANZOSO e GARCIA-FRUITÓS, 2015). No intestino humano, as espécies mais comuns encontradas são o *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus salivarius* e *Lactobacillus casei* (DUNNE et al., 1999), e conferem benefícios ao hospedeiro. Os *Lactobacillus*, considerados probióticos, são usados em alimentos fermentados e constituem um grupo heterogêneo de bactérias fermentativas estritas, produtoras de ácido lático (ANAL; SINGH, 2007; ROKKA; RANTAMAKI, 2010).

Pieniz et al. (2015) baseados em estudos recentes, identificaram o potencial probiótico e antioxidante da cepa de *Enterococcus durans* LAB18s, a qual apresenta capacidade de aumentar os níveis de selênio no organismo, podendo ser utilizada na suplementação dietética. Além disso, Rao et al. (2013) avaliaram a adesão da cepa bacteriana *Enterococcus faecium* em cultura celular, e observaram, por meio do processo de adesão celular, a funcionalidade desta como formadora de muco, propício a formação de barreira efetiva no intestino delgado.

Certas espécies dos gêneros *Bifidobacterium* e *Lactobacillus*, habitantes comuns da microbiota intestinal, são tradicionalmente consideradas como microrganismos benéficos para a saúde, pelo fato de promoverem exclusivamente efeitos saudáveis em seu ambiente natural. Além disso, algumas destas estirpes mostram uma tolerância adequada para barreiras gastrintestinais e para os parâmetros tecnológicos aplicados na produção de alimentos. Por este fato, as principais estirpes comerciais utilizadas para a fabricação de alimentos funcionais pertencem a estes gêneros (VINDEROLA et al., 2011).

Após a ingestão, um probiótico passa rapidamente pelo esôfago, levando em torno de 10 a 14 segundos, e chegará ao estômago. O pH e a velocidade do trânsito do estômago varia muito entre os indivíduos e é dependente do tempo desde a última alimentação e a idade. Os valores de pH do estômago podem variar de 1 a 2,5, entretanto pode chegar ao pH 5,0 em indivíduos alimentados. O tempo de

esvaziamento gástrico é também altamente variável, podendo variar entre 5 minutos e 2 horas (MCCONNELL; FADDA e BASIT, 2008). Além do pH ácido, o estômago também contém pepsina, uma enzima proteolítica, que degrada proteínas. A pepsina é produzida pela clivagem auto-catalítica do seu zimogênio precursor, o pepsinogênio, na presença de HCl (COOK et al., 2012). Após a passagem pelo estômago, os microrganismos direcionam-se ao intestino delgado, onde há a presença de sais biliares (ERKKILA; PETAJA, 2000). O pH da região proximal varia entre 6,15 e 7,37 e na região distal entre 6,80 e 7,88. Chegando ao intestino grosso, o pH diminui ligeiramente para 5,26 a 6,72 (COOK et al., 2012; GAO et al., 2012).

Assim, o meio ácido e as enzimas do estômago, como a pepsina, assim como os sais biliares secretados no duodeno são os principais obstáculos para a sobrevivência dos microrganismos probióticos ingeridos (DEL PIANO et al., 2011; TRIPATHI; GIRI 2014). Contudo, não apenas as condições físicas do trato gastrointestinal humano, mas também os processos de produção de alimentos e as condições de armazenamento podem afetar a sua eficácia (SCHELL; BEERMANN, 2014). Durante o processamento e armazenamento de alimentos, os probióticos são expostos às condições adversas, como estresse oxidativo, temperatura e variações de pH que comprometem a sua viabilidade (TRIPATHI; GIRI, 2014).

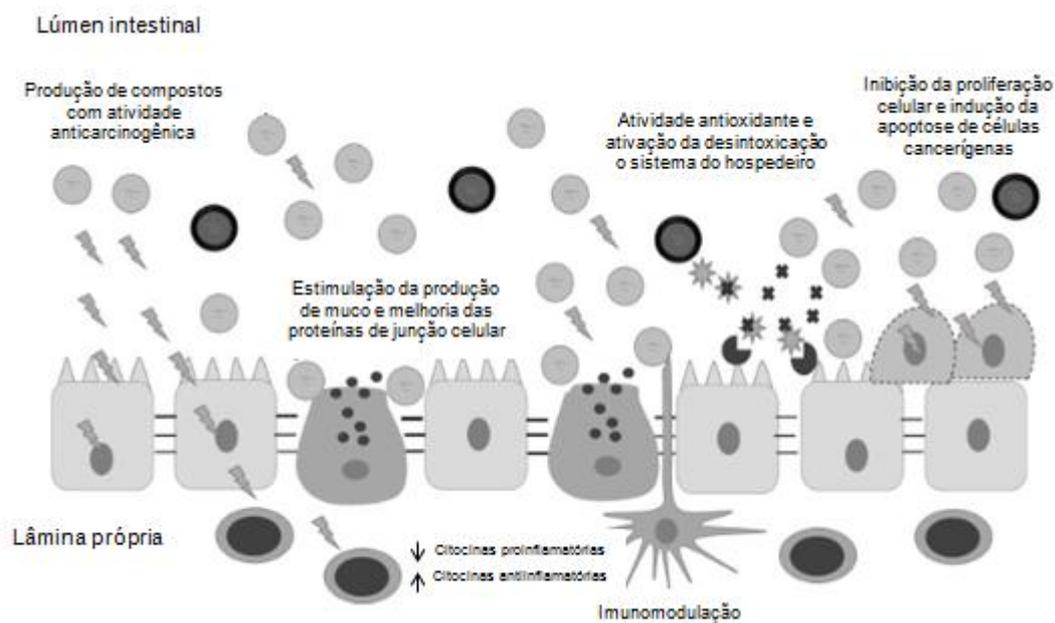
Para o setor de suplementação alimentar, existe um considerável crescimento aos produtos que contêm em sua composição os probióticos (HUDSON, 2016). O iogurte é o principal carreador de probióticos, porém já existem outras matrizes alimentares como o queijo, sucos de frutas e cereais, os quais também contêm espécies probióticas (CHAMPAGNE, CRUZ e DAGA, 2018).

3.3 Mecanismos de ação dos probióticos

Probióticos têm sido incorporados em alimentos devido à regulação do trato gastrointestinal, estimulação do sistema imunológico, decréscimo dos níveis de colesterol e de intolerância à lactose, prevenção do câncer e doenças cardiovasculares (RANADHEERA; BAINES; ADAMS, 2010). Os prováveis mecanismos de ação das cepas probióticas podem ser descritos como, produtores de compostos com atividade anticarcinogênica (ácidos graxos de cadeia curta), estimulação da produção de muco na barreira do epitélio intestinal, imunomodulação, inibição da proliferação celular e apoptose de indução em células

tumorais, modificação da composição da microbiota intestinal, bem como no seu metabolismo (REIS et al., 2017). Alguns destes mecanismos podem ser visualizados na Figura 1.

Figura1. Prováveis mecanismos de ação dos probióticos



Fonte: Reis et al., 2017 (Adaptado)

Os efeitos dos probióticos são classificados em três modos de ação. O primeiro está relacionado com a modulação das defesas do hospedeiro, sendo importante para a prevenção e tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias intestinais (COLLADO et al., 2009). Os probióticos podem influenciar na resposta imune, sendo resultado da interação entre as moléculas presentes na membrana do probiótico e as células epiteliais do hospedeiro, induzindo vias de sinalização do sistema imunológico (CORTHÉSY, GASKINS e MERCENIER, 2007). A presença do microbioma intestinal é necessária e essencial para o desenvolvimento do sistema imunológico e também da tolerância imunológica, mecanismos estes que modulam e protegem o organismo do hospedeiro contra possíveis patógenos oportunistas. A isso se torna importante o fornecimento adequado de cepas probióticas favoráveis à imunomodulação (KOBOZIEV et al., 2013). A interação de um probiótico e o sistema imune ocorre através da interação destes com as células do sistema imune do trato gastrointestinal. O segundo mecanismo de ação está relacionado com o efeito direto

sobre microrganismos patogênicos, impedindo sua aderência ao intestino, através da produção de substâncias antimicrobianas, como bacteriocinas, peróxido de hidrogênio, ácido láctico e ácido acético (BURGAIN et al., 2011; SARKAR; MANDAL, 2016). Em relação ao terceiro mecanismo, os probióticos tem a capacidade de inativar alguns produtos microbianos, como toxinas produzidas pelos microrganismos patogênicos (PATEL et al., 2010).

A capacidade de aderência das estirpes probióticas à superfície intestinal e subsequente colonização constitui um requisito importante para que se verifique uma ação probiótica. Da aderência resulta uma interação entre a estirpe e a superfície da mucosa intestinal, promovendo os efeitos imunológicos e a exclusão competitiva de bactérias patogênicas (SAARELA et al., 2000).

3.4 Microencapsulamento de probióticos

O encapsulamento é um processo físico-químico ou mecânico para aprisionar uma substância num material, a fim de produzir partículas com diâmetro de poucos nanômetros a alguns milímetros (CHEN; CHEN, 2007). A substância ou microrganismo encapsulado é chamado de núcleo, sendo este funcional, e está disperso em uma matriz, também chamada de revestimento ou agente encapsulante ou material de parede, formando as microcápsulas (ZUIDAM; SHIMONI, 2009). O encapsulamento de componentes bioativos pode ser utilizado em muitas aplicações na indústria de alimentos, controlando reações oxidativas; mascarando sabores, cores e odores; proporcionando liberação controlada de ativos e prolongando a vida de prateleira (BURGAIN et al., 2011).

A finalidade do microencapsulamento é proporcionar uma barreira protetora entre os probióticos e as condições adversas no ambiente pelo qual ele é exposto. São fatores importantes a serem considerados em relação ao microencapsulamento de probióticos: garantir a sobrevivência melhorada durante o trânsito gastrointestinal para assegurar uma maior concentração de células viáveis; promover a liberação eficaz do microrganismo aprisionado; proteger as células dos elementos do ambiente externo e de várias tensões durante a produção e/ou armazenamento; e manter a viabilidade do probiótico durante o armazenamento mesmo em temperatura ambiente (GALDEANO et al., 2009). O microencapsulamento tem

provado ser um método promissor para a proteção da célula bacteriana e estudos têm sido realizados para investigar as condições adversas nas quais os probióticos são expostos ao serem submetidos a esse processo (FRITZEN-FREIRE et al., 2013).

O desenvolvimento de microcápsulas probióticas e sua aplicação em alimentos dependem de alguns fatores que são importantes para a otimização da metodologia aplicada para produzi-los. Por exemplo, fatores intrínsecos como, seleção da cepa probiótica, condições de crescimento destes microrganismos, lesões celulares ocasionadas por temperaturas elevadas e pressão osmótica; e condições extrínsecas como, valores de pH, composição da matriz alimentar, nível de oxigênio e condições do processo de fabricação (ERATTE et al., 2018). Os probióticos requerem proteção contra a inativação metabólica frente a todos estes fatores, assim conseguem contribuir de maneira positiva à saúde humana estando viáveis no ambiente intestinal (DE PRISCO e MAURIELLO, 2016).

Embora a simulação *in vitro* não suponha respostas sobre a funcionalidade desses microrganismos no corpo humano, é útil para avaliar a sobrevivência dos probióticos em diferentes matrizes alimentares durante a passagem pelo trato gastrointestinal (PAÉZ et al., 2012). Sendo que, segundo Sohail et al. (2011), a sobrevivência dos probióticos é altamente dependente da espécie que está sendo microencapsulada.

3.5 Materiais utilizados no encapsulamento de probióticos

A primeira etapa para a produção de microcápsulas estáveis para a imobilização de células microbianas é a seleção de um material apropriado para o encapsulamento (RATHORE et al., 2013). Ao ser utilizado na indústria alimentar, este material de parede deve ser de qualidade alimentar, biocompatível e capaz de formar uma barreira para proteger a substância encapsulada, conseguindo viabilizá-la e direcionar a liberação com especificidade (BURGAIN et al., 2011).

Biomateriais são macromoléculas orgânicas ou inorgânicas, que consistem em cadeias repetidas de monômeros unidos por ligações covalentes. A estrutura química e a conformação das cadeias dos monômeros conferem funcionalidades específicas, como a formação de géis. Os polímeros comumente utilizados para o

microencapsulamento de probióticos são carragena (SHI et al., 2013b), amido (ANAL; SINGH, 2007), quitosana (CHÁVARRI et al., 2010), alginato (ROSA et al., 2013), gomas (BURGAIN et al., 2011), pectina (MARTÍN et al., 2015), e proteínas do leite (caseína e proteínas do soro) (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

O alginato é um polissacarídeo naturalmente extraído de várias espécies de algas e tem sido muito utilizado no microencapsulamento de probióticos devido à sua simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo e boa digestibilidade intestinal (ROSA et al., 2013). Entretanto, o mesmo tem desvantagens como a baixa resistência em relação às condições gástricas; a porosidade das cápsulas, não oferecendo uma proteção eficaz contra as condições do ambiente; além de apresentar difícil escalonamento industrial. Contudo, estas desvantagens podem ser diminuídas com a adição de outros compostos poliméricos, aumentando sua resistência (SULTANA et al., 2000; MORTAZAVIAN et al., 2007; BURGAIN et al., 2011).

Pesquisadores testaram o microencapsulamento de *Lactobacillus bulgaricus* em microcápsulas de alginato-leite através do método de extrusão. A viabilidade dos probióticos não foi alterada em fluido gástrico com pH 2,0 após 120 min de exposição. Já na exposição aos sais biliares (1%), ocorreu a redução de 9,98 log UFC/g para 9,24 log UFC/g após uma hora de incubação (SHI et al., 2013a).

As gomas são usadas no microencapsulamento pelas suas propriedades de formação de filme e emulsão. A goma gelana é um polissacarídeo microbiano obtido da *Pseudomonas alodea*, assim como a goma xantana que é produzida pela *Xantomonas campestris*. Uma mistura desses dois compostos foi utilizada para encapsular probióticos (CHEN; CHEN, 2007), o que faz reforçar a resistência das cápsulas às condições ácidas (BURGAIN et al., 2011).

A carragena é um polissacarídeo natural extraído de algas marinhas, muito utilizada na indústria de alimentos. O uso dela para formar uma camada protetora geleificada requer uma temperatura entre 40 e 50 °C. As células são adicionadas ao polímero e ao chegar a esta temperatura ideal, ocorre a gelificação e, em seguida, as micropartículas são estabilizadas com a adição de um agente de endurecimento como, por exemplo, íons de potássio (KRASAEKOOPT et al., 2003). Shi et al. (2013b) testaram a carragena como revestimento das microcápsulas de *Lactobacillus bulgaricus*, tendo como resultado uma proteção significativa aos

probióticos em relação às condições gastrintestinais simuladas, não alterando a viabilidade após 2 h de exposição ao fluido gástrico simulado com pH 2,5. Já na exposição aos sais biliares (1,0%), ocorreu a redução de 1,0 log UFC/g após uma hora de tratamento.

Outro agente de revestimento é o amido, considerado um polissacarídeo que consiste em grande número de unidades de glicose, as quais são unidas por ligações glicosídicas. O amido para ser considerado resistente não deve sofrer degradação pela amilase, enzima pancreática liberada no intestino delgado. Este, por sua vez, deve chegar intacto ao cólon e assim vir a sofrer o processo de fermentação. Esta especificidade promove a liberação dos probióticos no intestino grosso (ANAL; SINGH, 2007; MORTAZAVIAN et al., 2007).

A pectina é um polissacarídeo extraído principalmente de frutos. É utilizada como agente gelificante nos alimentos, nos medicamentos e como fibra alimentar. Ela pode ser adicionada ao alginato no encapsulamento, reforçando o gel e, como consequência, seu efeito protetor. A pectina permanece intacta durante a passagem pelo estômago e intestino delgado (MARTÍN et al., 2015).

A quitosana é um importante material de revestimento isolado a partir de cascas de crustáceos, cutículas de insetos e membranas de fungos. Este componente isolado não promove uma boa eficiência na viabilidade dos probióticos. Assim, a associação deste com o alginato fornece uma proteção adequada às condições do trato gastrintestinal simulado (CHÁVARRI et al., 2010).

As proteínas, os polissacarídeos e suas combinações desempenham um papel considerável como materiais de parede por serem biopolímeros naturais, considerados materiais ativos de superfície, os quais podem ser utilizados em toda a cadeia produtiva alimentar (NIEUWLAND et al., 2013). Além disso, podem representar macromoléculas anfifílicas que desempenham um papel essencial na estabilidade das formulações de alimentos (LIBRÁN et al., 2017). Entre as proteínas utilizadas em revestimentos, as derivadas do leite, como a caseína e as proteínas do soro do queijo, foram as mais utilizadas por diferentes técnicas de microencapsulamento. Normalmente, estes materiais proporcionam um aumento na viabilidade das cepas consideradas probióticas durante o armazenamento, nas mais diferentes condições. A combinação de biopolímeros ou diferentes técnicas utilizadas para microencapsulá-las podem direcionar melhores resultados na

sobrevivência celular (LIBRÁN et al., 2017). As proteínas do soro do queijo são veículos naturais para as células probióticas e apresentam excelentes propriedades de gelificação, sendo utilizadas como material de revestimento barato e eficaz no microencapsulamento de probióticos (GBASSI et al., 2009; MACIEL et al., 2014; PINTO et al., 2015a).

3.5.1 Soro de Queijo

Em 2017, foram captados 24,12 bilhões de litros de leite, 4,1% a mais que em 2016 (IBGE, 2018). O Rio Grande do Sul produz anualmente um total de 4,5 bilhões de litros de leite o que posiciona o Estado como o terceiro maior produtor do país, com aproximadamente 13,0% da produção nacional. Diariamente são entregues às indústrias uma média de 11,3 milhões de litros, para uma capacidade industrial instalada de 18,7 milhões de litros/dia. O Vale do Taquari faz o processamento de 35% do leite do Rio Grande do Sul (EMATER, 2018).

O soro de queijo pode ser considerado um importante subproduto da indústria de laticínios, proveniente da fabricação de queijos (SOUZA et al., 2010). Em que, para produzir um quilo de queijo são produzidos aproximadamente nove quilos de soro (SISO, 1996; BRASIL, 2005). Trata-se de uma solução amarelo-esverdeada composta por água, lactose, proteínas e sais minerais (FOUCQUIER et al., 2012) e representa cerca de 85-90% do volume do leite (SÁNCHEZ et al., 2011). É um subproduto de importância relativa na indústria de laticínios, pois é produzido em grandes quantidades e também devido à sua composição. Embora o soro tenha um alto valor nutricional e seja adequado para várias aplicações nas indústrias alimentícia e farmacêutica, é frequentemente tratado como efluente, devido à sua alta carga biológica (demanda bioquímica de oxigênio) e demanda química de oxigênio ((AKHAVAN et al., 2010; CARVALHO, PRAZERES e RIVAS, 2013). Parte do soro de queijo produzido pela indústria é utilizada como um aditivo alimentar, contudo uma parte é eliminada como resíduo (ATHANASIADIS et al., 2004; AOUIDI et al., 2009).

A maioria das BALs é capaz de digerir o soro de queijo devido à alta atividade proteolítica. Além da lactose, vitaminas e vários minerais, o soro contém uma

composição protéica complexa, predominando β -lactoglobulina e α -lactalbumina. Estas proteínas possuem um perfil distinto de aminoácidos e são uma fonte expressiva de nitrogênio para as bactérias, enquanto que a lactose do soro é uma fonte de carboidratos (PESCUMA et al. 2012).

As proteínas contidas neste soro são conhecidas por apresentarem alto valor biológico e propriedades funcionais versáteis, características que fazem com que sejam amplamente utilizadas na indústria de alimentos (JARA; PILOSO, 2011). As indústrias de alimentos estão interessadas no desenvolvimento de produtos que utilizem o soro de queijo e os seus derivados como fontes de matérias-primas, a fim de aumentar a sua utilização e reduzir a quantidade de soro de queijo descartada como resíduo (SOUZA et al., 2010).

Pesquisadores verificaram que o soro de queijo na sua forma líquida, é um promissor veículo para o microencapsulamento de probióticos através da secagem por *spray drying* e uma nova alternativa para o seu aproveitamento (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012). Pinto et al. (2015a) aplicaram a técnica de secagem por *spray drying* para o microencapsulamento de *Bifidobacterium* BB-12, e utilizando apenas soro de queijo e soro de queijo associado à prebióticos (inulina e polidextose) como material encapsulante, concluíram que a solução de alimentação somente com soro de queijo mostrou uma maior viabilidade ao processo de secagem quando comparado com amostras produzidas com prebióticos.

Um estudo com a cepa *Lactobacillus paracasei* microencapsulada com soro de queijo e leite em pó desnatado (Molico[®], Nestlé) pela técnica de secagem por *spray drying* apresentou resistência *in vitro* ao pH baixo e aos sais biliares, demonstrando que a estirpe é um boa candidata para uma investigação mais aprofundada para elucidar seus potenciais benefícios à saúde e avaliar seu desempenho tecnológico como probiótico. Na secagem por *spray drying*, a temperatura do ar de entrada foi de 160 ± 2 °C e a temperatura do ar de saída foi entre 55 e 60 °C, obtendo-se um rendimento de encapsulamento de 93,12%, sendo que o alto rendimento pode ser explicado pela baixa temperatura de saída (ILHA et al., 2015). Os pesquisadores sugerem que a eficácia dos materiais de parede na proteção da viabilidade celular, durante a secagem por *spray drying*, está relacionada com a presença de proteínas do soro de queijo e a lactose, as quais podem interagir com a membrana celular dos microrganismos, impedindo o

rompimento da mesma durante a remoção da água (FU; CHEN, 2011; SOUKOULIS et al., 2014). Esse fato pode ser comprovado em estudo realizado por Jantzen, Göpel e Beermann (2013), com *Lactobacillus reuteri* DSM 20016 utilizando soro de queijo a uma concentração de 20% e microencapsulamento por *spray drying* a uma temperatura de saída de 55 °C e 65 °C, que demonstraram que o soro de queijo pode ser usado como substrato para crescimento bacteriano. Os resultados demonstraram que as microcápsulas permaneceram estáveis ao armazenamento a 4 °C e sobrevivência ao trato gastrointestinal simulado.

O estudo realizado por Eckert et al. (2017) mostra o microencapsulamento de *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 pela técnica de secagem por *spray drying* utilizando materiais de parede como soro de queijo, permeado de soro e soro retentado. Os pesquisadores concluíram que o soro de queijo e o soro retentado tiveram melhores resultados na proteção da célula após o processo de secagem.

3.5.1.1 Composição do soro de queijo bovino e bubalino

As proteínas do soro bovino correspondem a 20% do total de proteínas contidas no leite (ASGHAR et al., 2011). As principais proteínas presentes no soro de queijo bovino são β -lactoglobulina (55%), α -lactoalbumina e imunoglobulinas (15%), albumina sérica (5%) e outras proteínas em menores concentrações, como a lactoferrina, lactoperoxidase, lisozima, entre outras (LIVNEY, 2010; FOUCQUIER et al., 2012). A Tabela 1 mostra que cerca de 50% dos sólidos do leite estão no soro, juntamente com 100% da lactose e cerca de 20% da proteína total (SMITHERS, 2008).

Tabela 1. Comparação da composição do leite e soro bovino

Componentes	Conteúdo (%)	
	Leite	Soro
Caseína	2,8	< 0,1
Proteínas do soro	0,7	0,7
Gordura	3,7	0,1
Cinzas	0,7	0,5
Lactose	4,9	4,9
Sólidos Totais	12,8	6,3

Fonte: Smithers, 2008

A α -lactalbumina possui propriedades emulsificantes e espumantes, entretanto apresenta uma baixa capacidade de gelificação (RODILES-LÓPEZ et al., 2008). Por outro lado, a β -lactoglobulina tem excelentes propriedades gelificantes e espumantes (FOEGEDING et al., 2002). A α -lactalbumina se mantém instável no trato gastrointestinal, ocorrendo hidrólise na presença de pepsina, enquanto que a β -lactoglobulina permanece intacta (GBASSI et al., 2009).

O leite de búfala apresenta maiores teores de sólidos quando comparado com o leite de vaca, possibilitando um alto rendimento industrial (BUZI et al., 2009). A Tabela 2 demonstra a concentração de proteínas, lactose e gordura presente no soro de queijo bubalino e bovino. Já a Tabela 3 apresenta a concentração de proteínas do soro de queijo de búfala e de vaca, segundo Buffoni et al. (2011).

Tabela 2. Comparação da composição dos soros de queijo bubalino e bovino

Soro de queijo	Proteínas (g/L)	Lactose (g/L)	Gordura (%)
Bubalino	11,90	58,50	1,20
Bovino	5,40	42,60	2,00

Fonte: Lira et al., 2009; Romám et al., 2011

Tabela 3. Comparação da composição proteica dos soros de queijo bubalino e bovino

Proteínas do soro	Concentração média (g/L)	
	Búfala	Vaca
α -Lactoalbumina	2,45 \pm 0,45	0,6-1,7
β -Lactoglobulina	4,04 \pm 0,72	2,0-4,0
Soro albumina	0,35 \pm 0,10	0,4

Fonte: Farrell et al., 2004; Buffoni et al., 2011

3.5.1.2 Permeado de Soro

O soro de queijo pode ser submetido ao processo de ultrafiltração para obtenção das proteínas do soro, que podem ser utilizadas como aditivos alimentares ou suplementos proteicos. O líquido remanescente, rico em lactose e sais (cálcio, fósforo, potássio, sódio, entre outros), é chamado de permeado de soro. Este apresenta inúmeras aplicações, principalmente na indústria de alimentos (GOLOWCZYC et al., 2013; LAVARI et al., 2014).

O permeado de soro é um ingrediente versátil na formulação de diversos alimentos, conferindo sabor agradável, enriquecendo de minerais com elevada biodisponibilidade, substituindo carboidratos e reduzindo a adição de sal. Os benefícios à saúde do permeado inclui a fortificação ou enriquecimento de produtos com micronutrientes (minerais e vitaminas) (GOLOWCZYC et al., 2013).

O permeado de soro de queijo tem múltiplas aplicações, como nos produtos de padaria, misturas de especiarias, bebidas e sorvetes. Além disso, devido ao seu alto teor de lactose, tem sido usado como substrato que permite o crescimento de microrganismos probióticos. Este meio de crescimento tem a vantagem de ser mais econômico do que o meio de crescimento tradicional para *Lactobacillus* sp. (GOLOWCZYC et al., 2013; LAVARI et al., 2014). Hugo et al. (2016) avaliaram o uso do permeado de soro e permeado de soro enriquecido com galacto-oligossacarídeos como substrato para o crescimento e como material de parede no microencapsulamento de *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114 através da técnica de secagem por *spray drying*. Esta estirpe foi capaz de crescer satisfatoriamente em permeado de soro não suplementado, assim como apresentou uma viabilidade

acima de 8 log UFC/g após o processo de secagem. Já em relação ao armazenamento das microcápsulas a uma temperatura de 20 °C durante 10 semanas, a sobrevivência de *L. plantarum*, cultivado e desidratado em permeado de soro enriquecido, foi significativamente maior do que a cepa cultivada e desidratada em permeado de soro ao final do tempo de armazenamento.

Lavari et al. (2015) testaram a suplementação do permeado de soro com extrato de levedura, triptona, NaHCO₃, Tween 80[®] e solução de Mn-Mg para otimizar o crescimento de *L. rhamnosus* 64. A contagem celular somente com permeado de soro foi de 1,1 x 10⁸ UFC/mL. Todos os suplementos tiveram um efeito significativo no crescimento, tendo como melhores resultados o extrato de levedura e a triptona. Já o bicarbonato de sódio teve um efeito negativo.

3.6 Técnicas utilizadas no encapsulamento de probióticos

Existem várias técnicas que podem ser utilizadas para o microencapsulamento de probióticos, entre elas se destacam, a extrusão (ANAL; SINGH 2007), emulsificação (KAILASAPATHY, 2009), liofilização (MARTÍN et al., 2015) e *spray drying* (BURGAIN et al., 2011). A seleção da técnica para o encapsulamento depende, principalmente, da biomolécula que será utilizada como material de parede e a capacidade do microrganismo encapsulado em manter-se viável (EL-SALAM; SHIBINY, 2011). No entanto, alguns pontos são considerados relevantes para a otimização do processo, como, os mecanismos pelos quais ocorrerão a liberação do probiótico no meio específico, a escala de produção, os custos e as condições do processamento, bem como as condições de armazenamento do produto final (ZUIDAM; SHIMONI, 2010).

O microencapsulamento de probióticos pela técnica de extrusão é considerado simples, de baixo custo e apresenta condições de processamento suaves, mantendo assim a viabilidade do probiótico. Baseia-se na injeção de uma mistura de células probióticas viáveis e hidrocolóides, que passará através de um bico para formar gotículas que cairão numa solução de solidificação. O tamanho das cápsulas formadas depende das condições da extrusão, tais como a viscosidade do hidrocolóide, o diâmetro do bico e a distância que as gotículas irão percorrer até alcançar a solução de solidificação (HEIDEBACH; FÖRST; KULOZIK, 2012).

A técnica de emulsificação é baseada na relação entre as fases descontínua e contínua. A fase descontínua corresponde a uma solução de microrganismos e um polímero que é adicionada a um grande volume de óleo (fase contínua). A mistura é homogeneizada para formar uma emulsão de água em óleo e para formar as cápsulas é adicionado um agente de solidificação. A separação das cápsulas é feita através de filtração (DE VOS et al., 2010; BURGAIN et al., 2011). Esta técnica é considerada fácil para ampliação da escala e apresenta alta taxa de sobrevivência dos microrganismos. Entretanto, as cápsulas obtidas apresentam uma grande diversidade de tamanho e formas (EL-SALAM e SHIBINY, 2011).

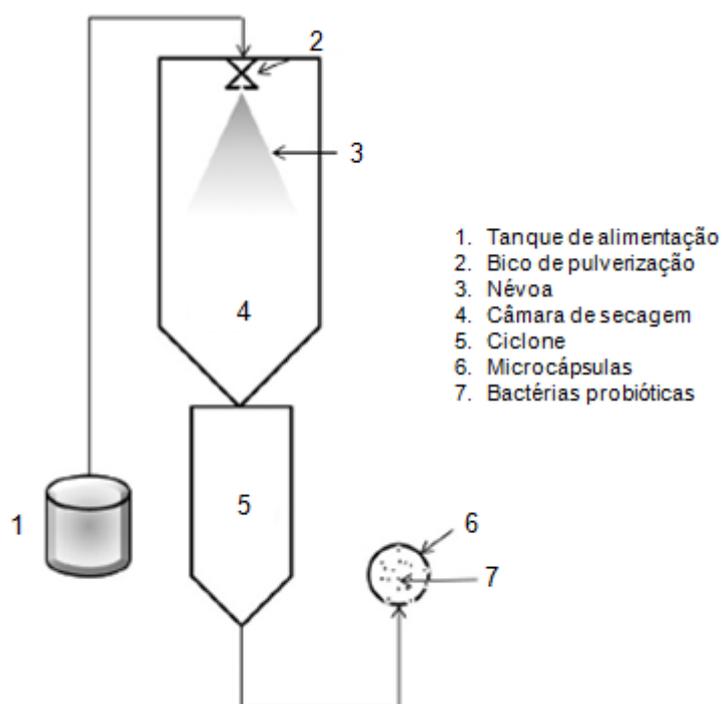
A técnica de liofilização é baseada na sublimação, ocorrendo em três fases: congelamento, secagem primária e secagem secundária. As células são primeiramente congeladas e depois secas por sublimação sob alto vácuo (SOLANKI et al., 2013). Contudo, o congelamento causa danos à membrana celular devido à formação de cristais e estresse pela alta osmolaridade. Agentes protetores podem ser adicionados para proteger a viabilidade dos probióticos durante o processo (BASHOLLI-SALIHU et al., 2014). A liofilização é o principal método atualmente empregado para produzir probióticos secos. No entanto, considerando o elevado custo de produção e a baixa produtividade, a secagem por *spray drying* é um método alternativo para a produção de probióticos na forma de pó em escala industrial (SCHUCK et al., 2013), sendo um processo rápido, de baixo custo-benefício quando comparado com outras técnicas e permite a operação em fluxo contínuo (FERNANDES; BORGES; BOTREL, 2014).

3.6.1 *Spray drying*

A técnica de secagem por *spray drying* é uma operação unitária que consiste na transformação de um produto no estado líquido, podendo ser uma solução, emulsão ou suspensão, em um produto seco (PEIGHAMBARDOUST, TAFTI e HESARI, 2011). No processo de secagem, os pós são produzidos a partir de uma suspensão, sendo o produto aquoso atomizado a uma velocidade elevada, ocorrendo a pulverização das gotículas num fluxo de ar quente, de 150 a 200 °C. As gotículas atomizadas apresentam uma grande área superficial que, quando expostas

ao ar quente na câmara de secagem, levam à rápida remoção da umidade (SANTIVARANGKNA, KULOZIK e FOERST, 2007) (Figura 2).

Figura 2. Esquemática da técnica de secagem por *spray drying*



Fonte: Kent; Doherty, 2014 (adaptado)

O processo pode ser dividido em três etapas principais: atomização do líquido; secagem através da temperatura apropriada; separação e coleta das partículas secas (CAL; SOLOHUB, 2010). Existem três tipos de padrão de fluxo de ar do produto no pulverizador: co-corrente, contra-corrente, e de fluxo misto. No processo de co-corrente, as gotículas e o ar passam através do secador no mesmo sentido. Isto provoca a evaporação rápida da superfície, proporcionando condições seguras para materiais sensíveis ao calor. A configuração em contra-corrente pulveriza as gotículas em direção oposta ao fluxo de ar quente, o que expõe o produto seco a temperaturas elevadas. Esta configuração pode ser apenas utilizada para materiais não sensíveis ao calor. O fluxo misto é uma combinação de co-corrente e fluxo de contra-corrente (OAKLEY, 1997).

A exposição a altas temperaturas pode limitar a aplicabilidade da secagem por *spray drying* na produção de cápsulas de probióticos (FU; CHEN, 2011). A desidratação da célula pode inevitavelmente causar danos à membrana e inativação do microrganismo (PAEZ et al., 2012). Assim, a seleção de um meio de secagem adequado é crucial, pois pode aumentar a taxa de sobrevivência das bactérias ao longo do processo (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012; SILVA et al., 2013; PERDANA et al., 2014). Além disso, as temperaturas de saída superiores a 85-90 °C são letais aos probióticos. Isto indica que a sobrevivência das células é dependente, principalmente, das temperaturas de saída (ANEKELLA; ORSAT, 2013). HUANG et al. (2017) verificaram que a sobrevivência de *L. casei* aumentou de 60% para 100% com a redução de 13 °C na temperatura de saída (de 60 °C para 47 °C) e sofreram, assim, menor estresse térmico.

Testes realizados com o *Lactobacillus acidophilus* resultaram em um produto desidratado com permeado de soro de queijo numa concentração de 10^{10} UFC/g e com umidade abaixo de 10%. Com base nos múltiplos testes de secagem realizados, concluíram que o gerenciamento do processo de secagem por *spray drying*, como por exemplo, pressão, concentração de sólidos e fluxo de alimentação não provocaram mudanças consideráveis na viabilidade bacteriana, exceto a temperatura do ar de entrada. Os autores avaliaram as temperaturas de entrada de ar a 61, 70 e 81 °C e ocorreu uma queda progressiva na viabilidade quando a temperatura do ar de entrada aumentou, o que provocou uma diminuição na viabilidade fundamentalmente devido à degradação térmica (RIVEROS, FERRER e BÓRQUEZ, 2009).

Outros fatores que afetam a viabilidade dos probióticos secos são os tipos de tensão e sua tolerância às condições de estresse, tais como a temperatura de secagem, o tempo de exposição ao calor (antes do processo de secagem por *spray drying*), a atividade de água das microcápsulas e as condições de armazenamento (após o processo de secagem por *spray drying*) (MARTÍN et al., 2015). Após o processo de microencapsulamento por *spray drying*, um parâmetro importante é o teor de água para a estabilidade das culturas secas (SANTIVARANGKNA et al., 2007). O teor de umidade e a atividade de água dos probióticos secos devem ser mantidos constantes com o objetivo de alcançar a estabilização durante o armazenamento (CHÁVEZ; LEDEBOER, 2007).

O material utilizado no microencapsulamento deve oferecer uma proteção adequada aos microrganismos probióticos no processamento de alimentos, armazenamento e também durante o trânsito gastrointestinal (PINTO et al., 2015b). Pesquisadores estudaram a utilização de soro de queijo em diversas concentrações de sólidos totais (5, 10, 20, 30 e 40%), assim como a suplementação com peptona de caseína (0,5%). Na secagem por *spray drying*, utilizaram a temperatura de entrada de 140 °C para o *Lactobacillus casei* e 180 °C para o *Propianibacterium freudenreichii*; e 63 °C para *L. casei* e 73 °C para *P. freudenreichii* como temperatura de saída. Comparando as duas espécies de probióticos, a sobrevivência do *P. freudenreichii* foi mais alta do que *L. casei* após o processo de secagem, apesar da temperatura utilizada ter sido mais alta. Isso sugere que o *P. freudenreichii* é mais tolerante ao processo de secagem por *spray drying* que *L. casei* (HUANG et al., 2016).

Em estudo realizado por Bustos e Bórquez (2013), ao avaliar o microencapsulamento do *Lactobacillus plantarum* LPS 47 utilizando soro de queijo em diferentes concentrações de sólidos (20, 30, 40 e 50%), e misturas como: soro de queijo e maltodextrina; leite desnatado e maltodextrina; soro de queijo, maltodextrina e goma arábica; e, soro de queijo, maltodextrina e pectina, utilizando a técnica de secagem por *spray drying*, mostrou que no que diz respeito às condições de funcionamento do secador por pulverização, um teor de sólidos de alimentação de 20%, com uma pressão de 2 bar e uma temperatura de saída de 70 °C tiveram os melhores resultados. Uma vez que as melhores condições de funcionamento do secador foram determinadas, foi possível obter um produto com alta viabilidade de microrganismos (10^9 UFC/g), utilizando osmoticamente bactérias não estressadas e soro de queijo (20%) como agente de proteção durante a secagem por pulverização. Esta viabilidade permaneceu praticamente inalterada após 10 semanas de armazenamento a 4 °C.

De Castro-Cislaghi et al. (2012) avaliaram a exposição de *Bifidobacterium* BB-12 ao trato gastrointestinal simulado, após o microencapsulamento utilizando soro de queijo com a técnica de *spray drying*. Foi testada a exposição aos pHs 2,0; 3,0; 4,0 e 6,0, concluindo-se que houve um decréscimo na viabilidade dos encapsulados quando expostos em pH mais baixo (pH 2,0 e 3,0). Em relação à exposição aos sais

biliares, a proteção não foi eficaz, com uma viabilidade acima de 6 log UFC/g até mesmo após 24 h de incubação na concentração biliar mais elevada (1,0%).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Material

Os reagentes utilizados em todos os ensaios foram de grau analítico. Como materiais encapsulantes foram utilizados o soro de queijo das espécies bovina e bubalina; e o permeado de soro da espécie bovina. Os soros de queijo e o permeado de soro *in natura* foram gentilmente cedidos por laticínios da região. Estes foram identificados e posteriormente congelados a -20 °C. Os soros de queijo receberam tratamento térmico durante 60 min a 67 °C por banho-maria. Já o permeado de soro foi esterilizado a 110 °C por 15 min.

4.1.1 Análise físico-química dos materiais encapsulantes

Os soros de queijo e o permeado de soro que foram utilizados no processo de microencapsulamento foram analisados quimicamente quanto ao teor de sólidos, teor de gordura, teor de proteína, teor de cinzas e teor de carboidratos. Os procedimentos foram realizados de acordo com a AOAC (2012).

4.2 Microrganismos

Foi utilizada uma bactéria endógena isolada de leite *in natura* da região do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, sendo o *Lactobacillus pentosus* ML 82. Como microrganismo controle foi usada a cepa *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014.

4.3 Condições de Cultivo

Inicialmente, uma colônia isolada da bactéria foi transferida para 50 mL de caldo de *Man, Rogosa and Sharpe* (MRS) e o cultivo foi mantido a 32 °C, por 18 h, até atingir densidade óptica (DO) a 600 nm de $2,0 \pm 0,1$, utilizando espectrofotômetro UV-2600 (Shimadzu®). Após, este período, 40 mL desse cultivo foi novamente incubado em 400 mL de caldo MRS, na mesma temperatura, por 12 h, até $DO_{600nm} = 2,0 \pm 0,1$.

Posteriormente, todo o volume do cultivo em caldo MRS foi centrifugado a 5000 RPM por 10 min a 4 °C. Por duas vezes, a cultura celular foi ressuspensa em solução tampão fosfato (10 mM, pH 7,0), homogeneizada em agitador de tubos tipo vórtex e centrifugada a 5000 RPM por 10 min a 4 °C. Após esse processo de lavagem das células microbianas, o microrganismo foi ressuspensa em 400 mL de soro (bovino ou bubalino) ou permeado e incubado a 32 °C até atingir a fase estacionária de crescimento celular (em torno de 16 h). Após este processo de cultivo, o material de parede juntamente com a bactéria láctica foram submetidos ao processo de encapsulamento por meio de secagem por *spray drying*.

Esse processo de cultivo foi utilizado para os dois microrganismos (*Lactobacillus pentosus* ML 82 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) e para os três materiais de parede (soro de queijo bovino, soro de queijo bubalino e permeado de soro bovino).

4.4 Microencapsulamento dos probióticos por *spray drying*

Foi utilizado o equipamento de *spray drying* MSD 0.5 Labmaq® com bico de duplo fluido de 0,7 mm. A temperatura do ar de entrada foi 90 °C e do ar de saída foi 75 °C. Cada uma das soluções de alimentação contendo a cultura microbiana

(*Lactobacillus pentosus* ML 82 ou *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014) e o material de parede (soro de queijo bovino, soro de queijo bubalino ou permeado de soro bovino) permaneceram sob agitação (por agitador magnético) e em temperatura ambiente, sendo alimentadas através de uma bomba peristáltica com alimentação de 4,5 mL/min e vazão de ar de 2,5 m³/min, com pressão de ar do compressor a 0,3 MPa. O pó resultante (microcápsulas) foi retirado da base do ciclone e mantido em frascos estéreis a 25 °C. Metodologia aplicada conforme Eckert (2016).

4.5 Avaliação dos microencapsulados

4.5.1 Viabilidade ao processo de microencapsulamento

Para determinação da viabilidade do processo, antes de submeter a solução de alimentação ao processo de *spray drying*, as contagens celulares foram determinadas através de diluições seriadas em placas contendo ágar MRS e incubadas por 48 h, na temperatura de 32 °C. Após o processo de microencapsulamento, as células viáveis dos encapsulados foram determinadas através da suspensão de 0,1 g de cápsulas em 10 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,0), sendo expostas à agitação por 15 minutos, 180 rpm, a 20 °C em incubadora com agitação orbital (*shaker*). Este processo teve como objetivo a liberação completa das bactérias contidas nas microcápsulas. Posteriormente, foram realizadas as diluições seriadas e o plaqueamento em ágar MRS, conforme exposto acima. Metodologia aplicada conforme Eckert (2016).

A sobrevivência das bactérias ao processo de *spray drying* foi expresso pela redução de log, utilizando a Equação 1:

$$\text{Redução de log} = \log Nb - \log Na \quad (\text{Equação 1})$$

Em que *Nb* é o número de células viáveis (log UFC/g) nas soluções de alimentação antes do processo de microencapsulamento por *spray drying* e *Na* é o número de células viáveis (log UFC/g) após o processo de encapsulamento, contidas nas microcápsulas.

4.5.2 Sobrevivência das bactérias sob condições gastrintestinais simuladas

O suco gástrico simulado foi preparado utilizando 3 g/L de pepsina de mucosa gástrica de suíno e 5 g/L de NaCl, em pH 2,0, 2,5 e 3,0. O suco intestinal foi preparado utilizando 1 g/L de pancreatina e 5 g/L de NaCl, em pH 8,0 com ou sem sais biliares. Para a preparação do suco intestinal com sais biliares foi acrescentado 5 g/L de uma mistura de colato de sódio e de deoxicolato de sódio, na proporção 1:1. As soluções foram esterilizadas por filtração de membranas com diâmetro de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech[®]). As contagens de células viáveis foram determinadas no tempo zero, após 3 h da exposição ao trato gástrico e após 4 h da exposição ao trato intestinal. Durante este tempo, as amostras foram mantidas em estufa a 37 °C.

Primeiramente foi avaliada a exposição das células livres ao trato gastrintestinal simulado, para isso uma alíquota de 200 μL da cultura microbiana foi exposta à presença de 1 mL de cada um dos sucos gastrintestinais simulados.

Para avaliação da sobrevivência das bactérias microencapsuladas, 0,1 g de cápsulas foi exposta à presença de 1 mL de cada um dos sucos gastrintestinais simulados. E após a mistura foi submetida à agitação por 15 minutos, 180 rpm, a 20 °C em incubadora com agitação orbital. Metodologia aplicada conforme Eckert (2016).

Para determinação da viabilidade da exposição ao trato gastrintestinal, as contagens celulares foram determinadas através de diluições seriadas em água peptonada seguida de plaqueamento em ágar MRS e incubadas por 48 h, na temperatura de 32 °C. A porcentagem de sobrevivência para cada condição exposta foi calculada através da Equação 2 (BAO et al., 2010):

$$\text{Taxa de sobrevivência (\%)} = \frac{\log \text{UFC } N_1}{\log \text{UFC } N_0} \times 100 \quad (\text{Equação 2})$$

Em que, N_1 é a contagem de células viáveis após a exposição ao trato gastrintestinal simulado e N_0 é a contagem de células viáveis antes da exposição.

Este procedimento foi realizado a cada 30 dias durante o armazenamento a 25°C, sendo os dias: 0, 30, 60 e 90.

4.5.3 Sobrevivência das microcápsulas ao armazenamento

Após o processo de secagem por *spray drying*, o produto foi mantido a 25 °C, com o objetivo de simular o armazenamento sob condições de temperatura ambiente. A determinação da sobrevivência dos encapsulados quanto ao armazenamento foi determinada logo após o processo de encapsulamento e durante 90 dias, nos dias 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90, conforme exposto no item 4.5.1. Metodologia aplicada conforme Eckert (2016).

4.5.4 Sobrevivência das microcápsulas em suco de laranja

Os microrganismos livres e microencapsulados foram incorporados em suco de laranja separadamente. Foi adicionado 1,0 mL de células livres ou 1,0 g das microcápsulas para cada 100 mL de suco de laranja integral esterilizado comercial, da marca Del Valle[®]. As amostras foram homogeneizadas e armazenadas a 4 °C, durante 90 dias. Foram analisados o pH e a exposição ao trato gastrintestinal simulado nos dias 0, 30, 60 e 90, conforme já exposto no item 4.5.2. Além disso, foi avaliada a viabilidade das microcápsulas nos dias 0, 7, 15, 30, 45, 60 e 90, conforme técnica descrita no item 4.5.1.

4.6 Caracterização das microcápsulas

4.6.1 Morfologia e tamanho da microestrutura

A aparência externa e o tamanho das microcápsulas foram avaliados por microscopia eletrônica. Uma amostra do pó foi colocada em fita de carbono e Stub para ser levada ao equipamento metalizador (modelo Q150R ES, QUORUM[®]), sob condições de 25 mA e 120 min. Após, as imagens foram observadas em microscópio eletrônico de varredura (MEV) (Modelo LS10 EVO, ZEISS[®]). Para obter

os resultados de tamanho de partícula, 100 microcápsulas foram escolhidas aleatoriamente.

4.6.2 Umidade e atividade de água

A umidade das microcápsulas foi determinada gravimetricamente por secagem em estufa a 105 °C, conforme determinado pela AOAC (2012). A atividade de água foi determinada utilizando o instrumento para atividade de água (WA 99163, Aqualab Lite®). Estes parâmetros foram determinados após o processo de encapsulamento e armazenamento, nos dias 0, 45 e 90 dias.

4.6.3 Análise de cor

Para a determinação da cor das microcápsulas foi utilizado um colorímetro (Konica Minolta® CM-5) e através da escala L*, a*, b* foi realizada a medição dos parâmetros. O eixo L* indica a variação de preto para branco, podendo variar de 0 a 100. O eixo a* demonstra a variação de vermelho (+) e verde (-). E o eixo b* indica a variação de amarelo (+) para azul (-). Esta análise foi realizada logo após o processo de encapsulamento e durante o período de armazenamento nos dias 0, 45 e 90.

4.7 Análise estatística

Todos os experimentos e análises foram realizados em triplicata. A análise dos dados foi realizada com o programa estatístico Biostat 5.3. A análise de variância (ANOVA) foi aplicada para determinar diferenças significativas ($p < 0,05$) entre os resultados e teste de *Tukey* foi utilizado para comparar os valores médios.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Para o microencapsulamento de microrganismos por *spray drying* é mais apropriado que as bactérias estejam em fase estacionária de crescimento celular, devido à taxa de proliferação reduzida, menor atividade fisiológica e aumento da resistência ao estresse (GOLOWCZYC et al., 2010), assim para o presente estudo, as bactérias estavam com 16 horas de crescimento em soro de queijo bovino, soro de queijo bubalino ou permeado de soro bovino, apresentando-se em fase estacionária de crescimento.

O *Lactobacillus pentosus* ML 82, a partir de resultados prévios do nosso grupo de pesquisa, realizado por Eckert (2016), apresenta potencial probiótico, tendo uma sobrevivência maior que 88% na exposição ao trato gástrico (pH 2,5 e 3,0) e acima de 79% na exposição ao trato intestinal com sais biliares. Alimentos funcionais enriquecidos com probióticos podem apresentar melhores efeitos sobre a saúde, caso estes microrganismos utilizados sejam isolados nas regiões habitadas pelos consumidores. A população apresenta hábitos alimentares diferentes e essas bactérias seriam mais adaptadas ao ecossistema intestinal dos indivíduos (VINDEROLA, 2016).

5.1 Análise físico-química dos subprodutos das indústrias de laticínios

A Tabela 4 descreve as características físico-químicas dos materiais de parede utilizados neste trabalho, sendo o permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e o soro de queijo bubalino.

Tabela 4. Caracterização físico-química do permeado de soro bovino, do soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino utilizados na produção das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014

Análises Físico-Químicas					
Materiais	Gordura (%)	Proteína (%)	Carboidrato (%)	Cinzas (%)	Umidade (%)
Permeado	0,20 ± 0,01 ^a	0,09 ± 0,01 ^c	5,84 ± 0,02 ^b	0,50 ± 0,02 ^b	93,37 ± 0,02 ^b
Soro bovino	0,20 ± 0,01 ^a	0,34 ± 0,01 ^b	5,28 ± 0,02 ^c	0,60 ± 0,03 ^a	93,58 ± 0,01 ^a
Soro bubalino	0,20 ± 0,01 ^a	0,52 ± 0,02 ^a	6,19 ± 0,08 ^a	0,47 ± 0,01 ^b	92,62 ± 0,06 ^c

Média ± desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas na mesma coluna indicam diferença estatística (p<0,05).

O permeado de soro apresenta diferença em relação à concentração de proteínas devido ao processo de ultrafiltração pelo qual o soro de queijo é submetido, em que as proteínas do soro são separadas e empregadas como aditivo alimentar ou suplementos protéicos. Assim, o permeado remanescente após a recuperação da proteína do soro é principalmente composto por lactose e sais (LAVARI et al., 2014). O soro de queijo bubalino apresenta um maior teor de proteínas que o soro de queijo bovino, conforme já descrito por Buffoni et al. (2011) e Lira et al. (2009). Os mesmos autores já descreveram uma maior concentração de carboidratos (lactose) na composição do soro bubalino em relação ao soro bovino. O soro de búfala apresenta menor teor de umidade (maior teor de sólidos totais) quando comparado com o soro bovino, possibilitando um alto rendimento industrial (BUZI et al., 2009).

Portanto, a possibilidade de usar o soro e/ou permeado líquido, que são subprodutos de laticínios de baixo custo e facilmente disponíveis, como substrato para o crescimento bacteriano e como material no microencapsulamento de

probióticos, contribui na redução do descarte destes subprodutos como resíduo (BALDASSO, BARROS e TESSARO, 2011).

5.2 Viabilidade das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 após a secagem por *spray drying*

As Tabelas 5 e 6 mostram a viabilidade celular de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014, respectivamente, antes e após o processo de secagem por *spray drying* com os diferentes materiais de parede utilizados neste estudo.

Tabela 5. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 antes e após a secagem por *spray drying* utilizando permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino

Microcápsulas	Número de células viáveis		Redução log
	Antes do <i>spray drying</i> (log UFC/g)	Depois do <i>spray drying</i> (log UFC/g)	
Permeado	10,88 ± 0,28	10,69 ± 0,07	0,19 ^a
Soro de queijo bovino	10,99 ± 0,12	10,33 ± 0,20	0,66 ^a
Soro de queijo bubalino	10,64 ± 0,02	10,23 ± 0,10	0,41 ^a

Média ± desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05)

Tabela 6. Viabilidade de *L. pantarum* ATCC 8014 antes e após a secagem por *spray drying* utilizando permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino

Microcápsulas	Número de células viáveis		Redução log
	Antes do <i>spray drying</i> (log UFC/g)	Depois do <i>spray drying</i> (log UFC/g)	
Permeado	10,68 ± 0,09	10,20 ± 0,13	0,48 ^a
Soro de queijo bovino	10,76 ± 0,05	10,27 ± 0,06	0,49 ^a
Soro de queijo bubalino	10,66 ± 0,16	10,54 ± 0,04	0,12 ^a

Média ± desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05)

Os resultados mostraram que os três materiais de parede utilizados no estudo apresentaram o mesmo efeito protetor, independente do microrganismo. Considerando os resultados das contagens logo após o processo de encapsulamento e que, para propósitos probióticos, a contagem de bactérias deve estar entre 10^6 a 10^8 UFC/g (PEIGHAMBARDoust, TAFTI e HESARI, 2011), todos os materiais de parede avaliados nesse trabalho poderiam ser utilizados para este fim.

O soro de queijo e o permeado de soro de queijo são compostos principalmente de lactose, um dissacarídeo. Uma vez que as moléculas de água são removidas, os dissacarídeos são capazes de formar ligações de hidrogênio com proteínas da membrana celular dos microrganismos, o que ajuda a prevenir sua desnaturação e, com isso, ajuda a prevenir a ruptura total da membrana (KNORR, ANANTA e VOLKERT, 2005; ROKKA e RANTAMÄKI, 2010).

A alta concentração de água é útil para manter a temperatura do material de secagem em torno do bulbo úmido, impedindo assim que as células sejam superaquecidas pela alta temperatura do ar de entrada (FU e CHEN, 2011). Um fator crítico para a sobrevivência bacteriana no processo de secagem é a exposição ao ar quente, que leva calor e estresse osmótico às células. Em contrapartida, altas temperaturas são necessárias para facilitar a suficiente evaporação da água ao longo do processo, pois o produto seco deve conter um baixo teor de umidade para manter uma boa estabilidade durante o armazenamento. Por meio disto, a sensibilidade da linhagem bacteriana ao calor e as propriedades higroscópicas do material de encapsulamento são fatores importantes (ANANTA, VOLKERT e KNORR, 2005; GOLOWCZYC et al., 2011).

Bustos e Bórquez (2013) afirmam que a temperatura de saída afeta principalmente a viabilidade celular, em que a medida que a temperatura do ar de saída aumenta, ocorre uma queda na viabilidade celular. Os pesquisadores utilizaram a temperatura de entrada de ar de 180 ± 2 °C e as temperaturas de saída de 70, 80 e 90 °C. Por este fato, a temperatura de ar de saída escolhida para o presente estudo foi de 75 °C, em que temperaturas abaixo de 70 °C não são recomendadas para a manutenção da baixa umidade e garantir o longo prazo de validade do produto (MENSHUTINA et al., 2010). No presente estudo, foi utilizada a temperatura de entrada de 90 °C e temperatura de saída de 75 °C, contribuindo

assim para a manutenção da alta viabilidade celular após a secagem, mantendo uma contagem acima de 10^{10} UFC/g.

Pinto et al. (2015a) ao microencapsular *Bifidobacterium* BB-12 com soro de queijo bovino com adição de inulina e polidextrose, obtiveram uma redução de $0,44 \pm 0,09$ log UFC/g após a secagem por *spray drying* utilizando somente soro de queijo bovino como material encapsulante. Foi utilizada a temperatura de entrada de 150 °C e temperatura de saída de 50 ± 3 °C. A adição de inulina e polidextrose não melhorou a viabilidade das bactérias após o processo de secagem. Resultados semelhantes foram encontrados no presente estudo utilizando o permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino.

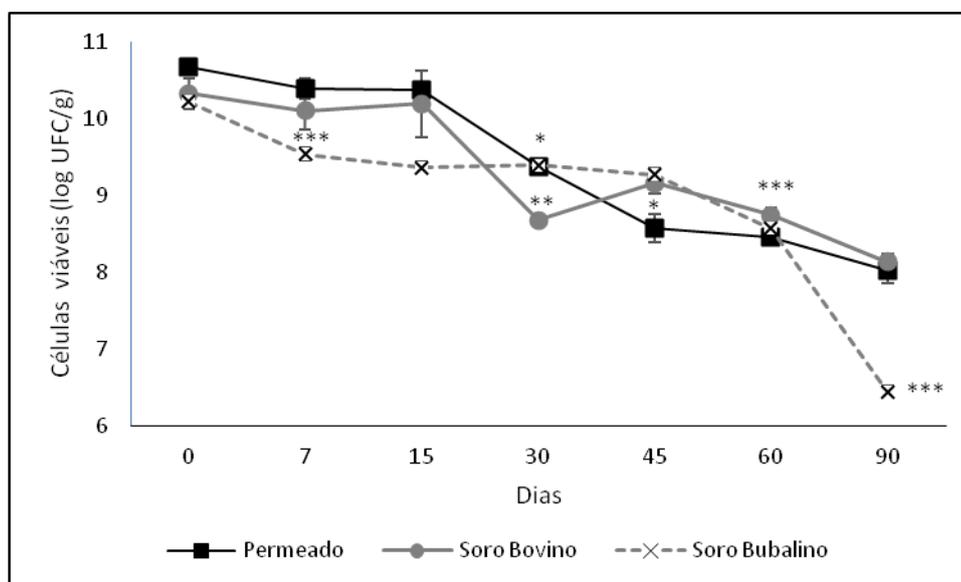
Ilha et al. (2015) microencapsularam *Lactobacillus paracasei* utilizando soro de queijo bovino como material de parede pela técnica de secagem por *spray drying*, com temperatura de entrada de 160 ± 2 °C e temperatura de saída entre 55 e 60 °C. O percentual de sobrevivência após a secagem foi de $93,12 \pm 2,15\%$, com uma redução de 0,71 log UFC/g. Neste estudo, o percentual de sobrevivência de *L. pentosus* ML 82, após a secagem, com permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino foi de $96,60 \pm 1,33$; $94,00 \pm 1,66$ e $96,12 \pm 0,92\%$, respectivamente. Já o percentual de sobrevivência de *L. plantarum* ATCC 8014 foi de $95,48 \pm 1,07$; $95,51 \pm 1,01$ e $98,05 \pm 0,49\%$, respectivamente. O presente estudo apresentou melhores percentuais de sobrevivência, provavelmente em função da temperatura de entrada de ar do *spray drying* (90 °C), enquanto que os pesquisadores utilizaram temperaturas elevadas (160 °C), sendo consideradas danosas aos microrganismos.

Hugo, Bruno e Golowczyc (2016) avaliaram o microencapsulamento de *L. plantarum* CIDCA 83114 com permeado de soro bovino. A viabilidade celular antes do processo de secagem foi de $8,28 \pm 0,07$ log UFC/mL. Logo após o processo de secagem por *spray drying* com temperatura de entrada de 170 °C e temperatura de saída entre 70 e 75 °C, a viabilidade celular foi de $8,15 \pm 0,07$ log UFC/g, com uma redução na viabilidade de 0,13. As altas contagem celulares (acima de 10^8 UFC/g) demonstram que o permeado bovino promove a proteção das bactérias quando expostas às altas temperaturas. Resultados semelhantes foram encontrados utilizando o mesmo material de parede no microencapsulamento de *L. pentosus* ML 82.

5.3 Viabilidade das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC durante o armazenamento

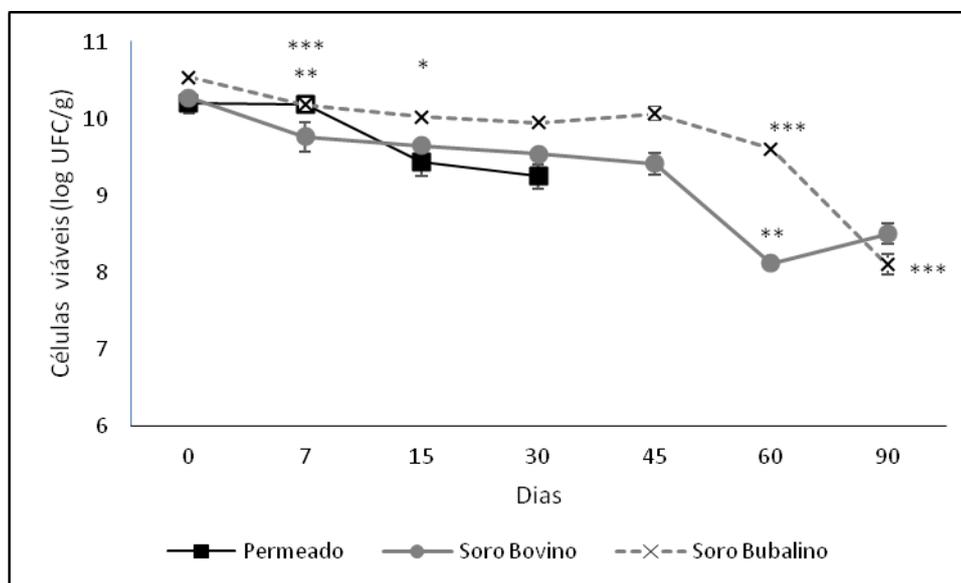
A viabilidade das células probióticas deve ser mantida durante a fabricação e armazenamento do alimento e também ao longo da passagem pelo trato gastrointestinal, a fim de exercer seus benefícios de saúde (YING et al., 2010). Um dos benefícios da secagem de bactérias é a possibilidade de produzir um produto estável, altamente viável e que pode ser armazenado a um baixo custo. Pesquisadores afirmam que o armazenamento a temperaturas acima de 4 °C diminui a viabilidade das bactérias microencapsuladas por *spray dryer* (GOLOWCZYC et al., 2011). No entanto, para este estudo, foi selecionada a temperatura de 25 °C por ser mais econômica para armazenar produtos probióticos em nível comercial, e a sobrevivência das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 foi analisada durante o armazenamento de 90 dias. Os resultados são mostrados nas Figuras 3 e 4.

Figura 3. Viabilidade das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 (log UFC/g) durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C



Média \pm desvio padrão (n=3). Mudanças estatísticas (p<0,05): permeado de soro bovino (*); soro de queijo bovino (**); soro de queijo bupalino (**).

Figura 4. Viabilidade das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 (log UFC/g) durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C



Média \pm desvio padrão (n=3). Mudanças estatísticas ($p < 0,05$): permeado de soro bovino (*); soro de queijo bovino (**); soro de queijo bubalino (**).

A viabilidade das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 produzidas com permeado de soro bovino e soro de queijo bovino manteve-se constante nos primeiros 15 dias de armazenamento, com redução de 0,32 e 0,13 ciclos de log ($p < 0,05$), respectivamente. Contudo, apesar da perda de viabilidade ambas as microcápsulas produzidas com permeado de soro bovino e soro de queijo bovino mantiveram uma sobrevivência superior a 8 log UFC/g durante os 90 dias de armazenamento.

As microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 de soro de queijo bubalino já apresentaram perda de viabilidade nos primeiros sete dias de armazenamento, com diminuição de 0,69 ciclos de log ($p < 0,05$) e permaneceu constante até os 45 dias de armazenamento, apresentando uma viabilidade de $9,27 \pm 0,08$ log UFC/g. Até este período, a umidade das microcápsulas se manteve abaixo de 10%. Aos 90 dias, a umidade estava em $15,42 \pm 0,07\%$ e ocorreu uma acentuada morte celular (entre 45 e 90 dias de armazenamento), sendo 2,83 log UFC/g. Apesar disto, a viabilidade celular se manteve acima de 6 log UFC/g, concentração mínima de probióticos exigido para alimentos funcionais pela FAO/WHO (2002) e recomendado para um alimento exercer seus benefícios probióticos (TRIPATHI e GIRI, 2014).

L. plantarum ATCC 8014 microencapsulados com permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino apresentaram perda de viabilidade celular nos primeiros sete dias de armazenamento, com uma diminuição de 0,02; 0,50 e 0,36 ciclos de log ($p < 0,05$), respectivamente. A sobrevivência das microcápsulas com permeado de soro bovino foi observada até 30 dias de armazenamento, após este período, não houve mais crescimento de *L. plantarum* ATCC 8014 nas análises de viabilidade. Uma justificativa para a morte celular é a alta umidade apresentada no mesmo período, sendo $11,82 \pm 0,16\%$. As microcápsulas produzidas com soro de queijo bovino e bubalino apresentaram uma sobrevivência superior a 8 log UFC/g após o armazenamento de 90 dias. As microcápsulas produzidas com soro de queijo bubalino apresentaram uma umidade superior, entretanto houve a manutenção da viabilidade celular, diferente do que ocorreu com as microcápsulas produzidas com permeado de soro bovino. Assim, é possível concluir que o soro de queijo bubalino apresenta uma proteção superior quando comparado ao permeado de soro bovino, em alta umidade durante o armazenamento.

Ao comparar os dois microrganismos estudados e os diferentes materiais de parede utilizados, foi possível observar que os microencapsulados de *L. plantarum* ATCC 8014 apresentaram uma viabilidade maior após os 90 dias de armazenamento, com soro de queijo bovino e bubalino. Porém, com o permeado de soro bovino o *L. pentosus* ML 82 apresentou maior viabilidade.

Pesquisadores avaliaram o microencapsulamento do *Lactobacillus acidophilus* com permeado de soro bovino pela técnica de secagem por *spray drying* e para as amostras armazenadas à temperatura ambiente (25 °C) ocorreu uma rápida diminuição da viabilidade após a primeira semana, com perda de um ciclo logaritmico. Os autores afirmam que este resultado implica que após a etapa de secagem, o produto deve ser armazenado refrigerado para evitar a perda de viabilidade, já que quando armazenado a 4 °C o produto exibe uma viabilidade de quase 10^9 UFC/g após 50 dias de armazenamento (RIVEROS, FERRER e BÓRQUEZ, 2013). Com exceção das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 com permeado de soro bovino, todas as microcápsulas produzidas apresentaram uma viabilidade semelhante, no mesmo período, em temperatura a 25 °C. Assim,

ressalta-se a manutenção da alta viabilidade celular durante o armazenamento, mesmo em temperatura ambiente, não necessitando de refrigeração.

Pós de *L. plantarum* CIDCA 83114 e permeado de soro bovino foram armazenados por 70 dias a 20 °C. Após quatro semanas de armazenamento houve uma redução de 1,2 log UFC/g (HUGO, BRUNO e GOLOWCZYC, 2016). No presente estudo, no mesmo período, mesmo material de parede e em temperatura semelhante, as microcápsulas produzidas com *L. plantarum* ATCC 8014 apresentaram uma perda de viabilidade menor (0,96 log UFC/g). Já as microcápsulas produzidas com *L. pentosus* ML 82 apresentaram uma perda maior (1,31 log UFC/g). Assim, *L. plantarum* ATCC 8014 são mais resistentes ao armazenamento a 25 °C, quando comparado com *L. pentosus* ML 82.

Lactobacillus casei BL23 foi microencapsulado com soro de queijo bovino por *spray drying*, com temperatura de entrada de 140 ± 5 °C e temperatura de saída de 60 ± 3 °C. Os pós foram armazenados a uma temperatura de 4 °C e 25 °C, por 6 meses. Microcápsulas de *L. casei* armazenadas a 4 °C mantiveram a viabilidade constante nos dois primeiros meses e uma perda de 1 log UFC/g ocorreu após os 6 meses de armazenamento. Para as microcápsulas de *L. casei* mantidas a 25 °C, em um mês, ocorreu a perda de 2 ciclos log UFC/g. Após seis meses de armazenamento, a viabilidade celular permaneceu 4 log UFC/g (HUANG et al., 2017). Nesse estudo, todas as microcápsulas produzidas, independente do material de parede e do microrganismo, em 30 dias, ocorreu uma perda menor (0,59-1,65 log UFC/g).

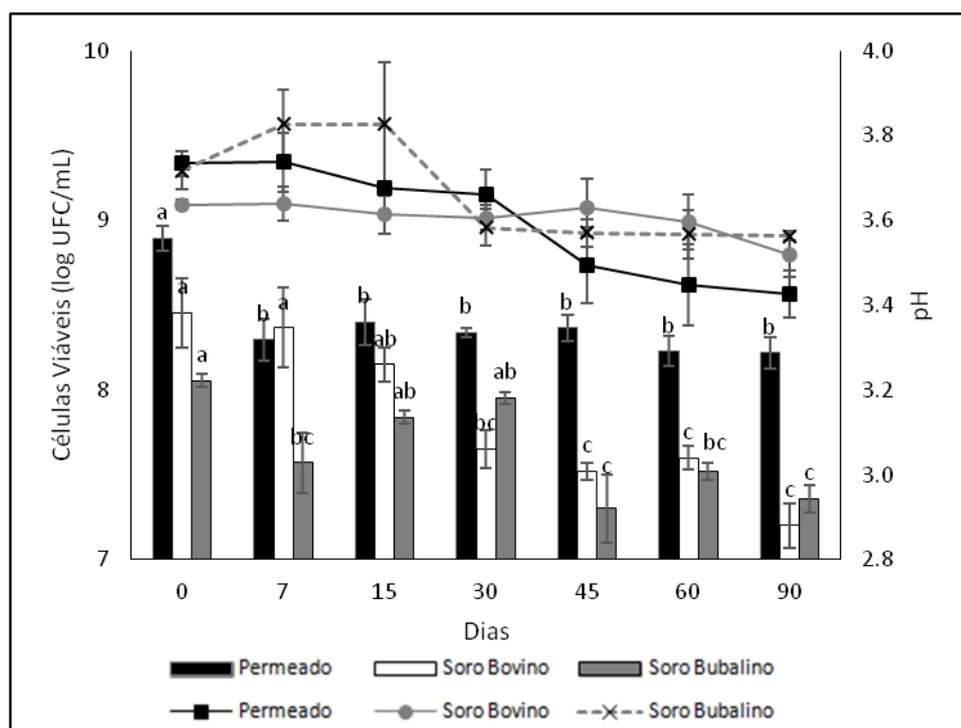
Foi possível observar que os materiais de parede estudados foram capazes de proteger as bactérias durante o armazenamento a 25 °C. Além disso, a umidade mostrou uma forte influência na perda da viabilidade, em que o aumento deste parâmetro promoveu a morte celular nas microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 com soro de queijo bubalino e nas microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 e permeado de soro bovino. As microcápsulas que apresentaram uma umidade entre 3 e 8% durante o armazenamento, mantiveram uma viabilidade superior a 8,0 log UFC/g, durante os 90 dias.

5.4 Viabilidade e pH das microcápsulas e das células livres de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja

Manter a viabilidade probiótica em matrizes alimentares antes do consumo é fundamental, e continua a ser um desafio para a entrega bem sucedida das células no intestino. Sucos de frutas apresentam um maior desafio imposto às células, devido à acidez presente no produto (HAFFNER e PASC, 2018).

Microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 foram incorporadas em suco de laranja integral comercial, conforme as Figuras 5 e 6.

Figura 5. Variações de pH e contagem de células viáveis (log UFC/mL) das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja



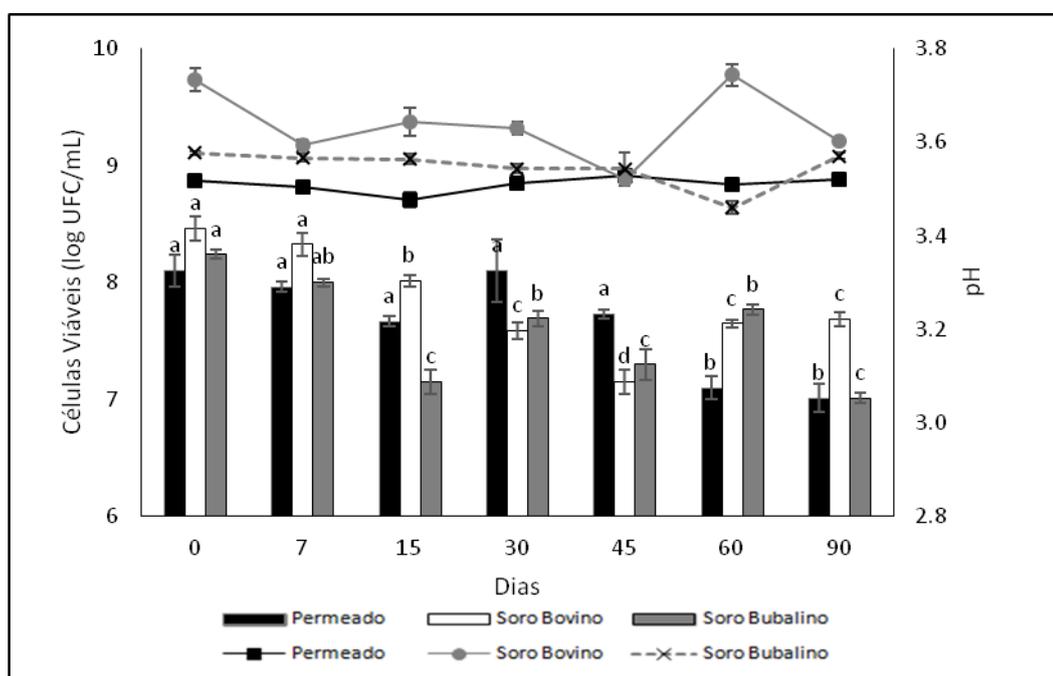
Média \pm desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística em relação à viabilidade celular ao longo do armazenamento de 90 dias de cada material de parede estudado ($p < 0,05$). Gráfico em barras está relacionado à viabilidade celular (Log UFC/mL). Gráfico em linha está relacionado ao pH.

As microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 produzidas com permeado de soro bovino e soro de queijo bubalino apresentaram uma perda de viabilidade celular logo nos primeiros 7 dias de armazenamento, com uma redução de 0,59 e 0,48 log UFC/mL ($p < 0,05$), respectivamente. Já nas microcápsulas produzidas com soro de

queijo bovino, a sobrevivência das bactérias se manteve estável nos primeiros 15 dias, com diminuição de 0,30 log UFC/mL ($p < 0,05$). Aos 90 dias de armazenamento em suco de laranja, a viabilidade celular estava acima de 7 log UFC/mL das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 com os três materiais de parede estudados.

Em relação ao pH, este se manteve constante durante os 90 dias nos sucos com adição de microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 de soro de queijo bovino e bubalino ($p < 0,05$). Já o suco com as microcápsulas com permeado de soro bovino, ocorreu uma acidificação do meio aos 30 dias de armazenamento, com um pH de $3,49 \pm 0,02$ ($p < 0,05$). Eckert (2016) afirma que o processo de encapsulamento reduz a atividade microbiana, com conseqüente manutenção do pH.

Figura 6. Variações de pH e contagem de células viáveis (log UFC/mL) das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja



Média \pm desvio padrão ($n=3$). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação à viabilidade celular ao longo do armazenamento de 90 dias de cada material de parede estudado. Gráfico em barras está relacionado à viabilidade celular (Log UFC/mL). Gráfico em linha está relacionado ao pH.

As microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 produzidas com soro de queijo bovino e bubalino apresentaram uma viabilidade celular constante nos sete

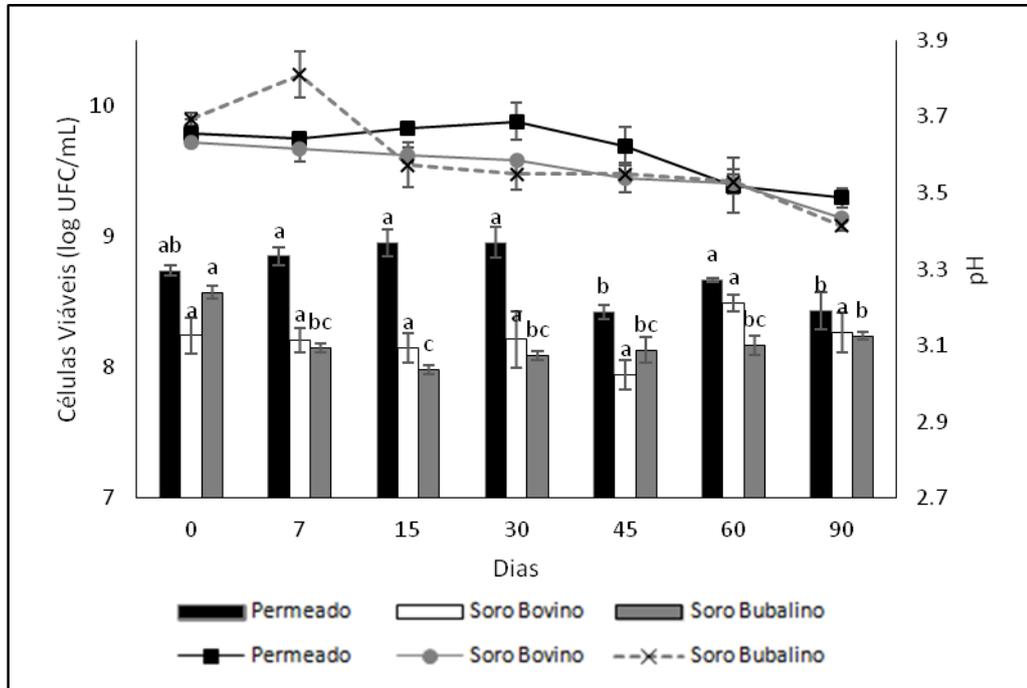
primeiros dias de armazenamento em suco de laranja, com redução de 0,13 e 0,24 log UFC/mL ($p < 0,05$), respectivamente. Já as microcápsulas de permeado de soro bovino permaneceram estáveis até os 45 dias de armazenamento, com diminuição na sobrevivência de 0,37 log UFC/mL ($p < 0,05$). Independente do material de parede utilizado, aos 90 dias de armazenamento em suco de laranja, a viabilidade celular estava acima de 7 log UFC/mL das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014.

Em relação ao pH do meio, o suco de laranja com microcápsulas de permeado de soro bovino permaneceu com o pH constante ao longo de 90 dias e as microcápsulas de soro de queijo bubalino ao longo de 45 dias de armazenamento ($p < 0,05$). Ocorreu acidificação do meio nos sete primeiros dias nas microcápsulas de soro de queijo bovino, com pH de $3,59 \pm 0,01$ ($p < 0,05$). Alterações no pH está relacionado ao metabolismo microbiano, sendo característica de cada espécie.

A alta contagem celular (acima de 10^7 UFC/mL) observada ao longo do período estudado demonstra a lenta desintegração das microcápsulas produzidas com permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino. Assim, os subprodutos dos laticínios apresentam uma potencial proteção no microencapsulamento e introdução em produtos alimentares. A ANVISA (BRASIL, 2008) regulamenta uma quantidade mínima viável situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC, na recomendação diária do produto pronto para consumo. Sendo assim, uma porção de 100 mL do suco produzido apresentaria a concentração recomendada de probióticos, mesmo após os 90 dias de armazenamento.

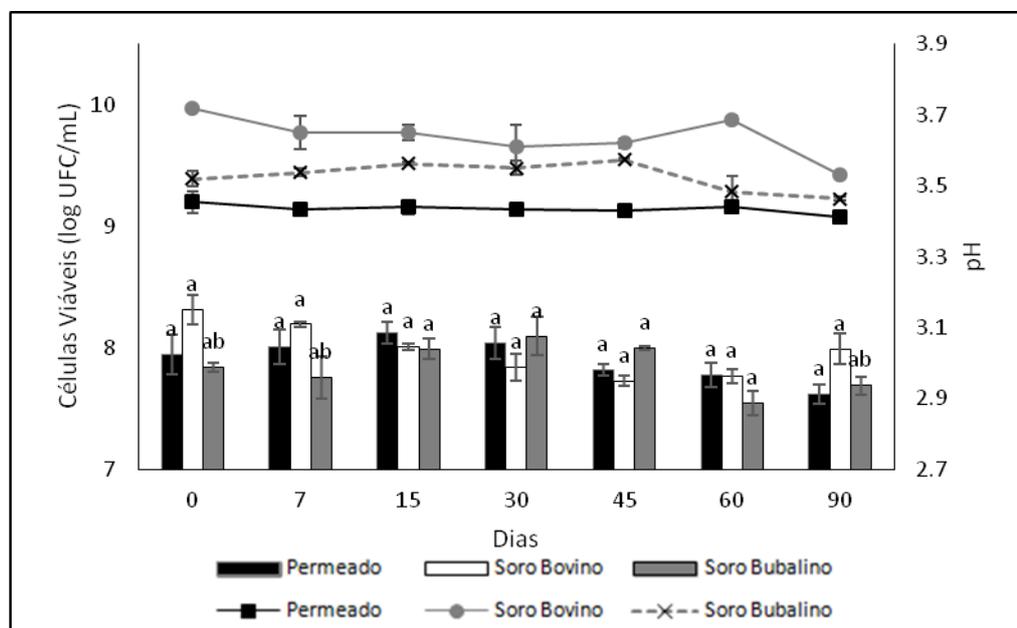
Células livres de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 que cresceram nos soros lácteos (permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino) por 16 horas, foram incorporadas em suco de laranja comercial e armazenados por 90 dias, a 4 °C. A viabilidade celular e a variação do pH do suco foi avaliada no decorrer do período de armazenamento, sendo demonstradas nas Figuras 7 e 8.

Figura 7. Variações de pH e contagem de células viáveis (log UFC/mL) das células livres de *L. pentosus* ML 82 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja



Média \pm desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobscritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) em relação à viabilidade celular ao longo do armazenamento de 90 dias de cada material de parede estudado. Gráfico em barras está relacionado à viabilidade celular (Log UFC/mL). Gráfico em linha está relacionado ao pH.

Figura 8. Variações de pH e contagem de células viáveis (log UFC/mL) das células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 no armazenamento a 4 °C em suco de laranja



Média \pm desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05) em relação à viabilidade celular ao longo do armazenamento de 90 dias de cada material de parede estudado. Gráfico em barras está relacionado à viabilidade celular (Log UFC/mL). Gráfico em linha está relacionado ao pH.

L. pentosus ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 livres permaneceram estáveis ao longo do período de armazenamento, com exceção de *L. pentosus* ML 82 com crescimento e encapsulamento em soro de queijo bubalino. Observou-se uma redução na viabilidade logo nos primeiros 7 dias de armazenamento, com diminuição de 0,42 log UFC/mL, e a partir deste dia, permanecendo constante ao final dos 90 dias (p<0,05). A alta contagem celular (acima de 10^7 UFC/mL) e a estabilidade ao longo do tempo das bactérias livres estudadas provavelmente é devido aos nutrientes disponíveis no suco de laranja, como o carboidrato, sendo utilizado como fonte de energia no processo de fermentação (ANAL; SINGH, 2007).

O pH do suco de laranja com as células livres após os 90 dias de armazenamento ficou entre 3,41-3,53. Em estudo realizado por Haffner e Pasc (2018), os *Lactobacillus rhamnosus* liofilizados livres mantiveram alta viabilidade após uma semana de armazenamento em suco de maçã (pH = 3,6), com contagem inicial de $5,6 \times 10^6$ UFC/mL e após uma semana de $1,7 \times 10^6$ UFC/mL. Sheehan, Ross e Fitzgerald (2007) observaram que não houve perda de viabilidade de *L.*

ramnosus em suco de laranja durante uma semana a 4 °C. Assim como nos estudos relatados, pode-se observar a tolerância dos *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 ao pH ácido do suco de laranja.

Pode-se afirmar que as condições experimentais aplicadas neste estudo com o permeado de soro bovino, o soro de queijo bovino e o bubalino, foram capazes de assegurar a viabilidade das bactérias aplicadas no suco de laranja. Em estudo realizado por outros pesquisadores, microcápsulas de alginato revestidas com quitosana foram produzidas pela técnica de extrusão, contendo *L. plantarum* NCIMB 8826 e incorporadas em suco de romã, sendo armazenado a 4 °C, por 6 semanas. Uma concentração de células livres também foi incorporada ao suco, e após 4 semanas todas as células morreram. Já para as células revestidas, após 6 semanas de armazenamento, a viabilidade foi superior a 5,5 log UFC/mL (NUALKAEKUL et al., 2012). A morte celular pode ser justificada pelo alto teor de fenol presente no suco de romã quando comparado à concentração no suco de laranja (NUALKAEKUL, SALMERON e CHARALAMPOPOULOS, 2011).

5.5 Sobrevivência das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 ao trato gastrointestinal simulado

Uma amostra de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 não encapsulada foi exposta diretamente ao trato gastrointestinal simulado e avaliada a taxa de sobrevivência (Tabela 7).

Tabela 7. Taxa de sobrevivência (%) do *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC8014 expostos às condições ambientais do TGI simulado

Bactéria	Trato Gástrico (%)			Trato Intestinal (%)	
	2,0	2,5	3,0	0% sais biliares	0,5% sais biliares
<i>L. pentosus</i> ML 82	68,95 ± 1,67	73,85 ± 2,92	92,03 ± 2,59	94,76 ± 1,26	69,35 ± 7,10
<i>L. plantarum</i> ATCC 8014	58,96 ± 1,88	85,42 ± 1,03	96,86 ± 2,10	96,26 ± 1,73	90,28 ± 5,87

Média ± desvio padrão, n = 3.

As células livres de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 apresentaram uma tolerância menor em relação ao trato gástrico pH 2,0 e 2,5, com redução de $1,77 \pm 0,14$ e $1,56 \pm 0,16$ ciclos de log, respectivamente ($p < 0,05$) para *L. pentosus* ML 82; e uma redução de $2,87 \pm 0,14$ e $1,02 \pm 0,07$ ciclos de log, respectivamente ($p < 0,05$) para *L. plantarum* ATCC 8014, quando comparado às bactérias microencapsuladas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 com os diferentes materiais de parede (Tabelas 8 e 9). Não houve diferença estatística entre as células livres e microencapsuladas em relação ao trato gástrico (pH 3,0) e trato intestinal sem e com sais biliares. Os materiais de parede estudados foram capazes de proteger as células bacterianas em relação ao pH 2,0 e 2,5 ($p < 0,05$), em que as bactérias estudadas mostraram ter uma tolerância menor em relação ao pH ácido. No geral, enzimas digestivas como a pepsina e a pancreatina, apesar de serem danosas aos microrganismos, apresentam uma menor influência sobre a viabilidade das bactérias, já o baixo pH é um fator mais crítico (RANADHEERA et al., 2014).

As Tabelas 8 e 9 mostram a exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 comparando os diferentes materiais de parede utilizados no estudo, no primeiro dia de armazenamento.

Tabela 8. Redução da viabilidade celular quanto à exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 com os diferentes materiais de parede: permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino

	Microcápsulas <i>L. pentosus</i> ML 82 (Redução log UFC/g)		
	Permeado	Soro de queijo bovino	Soro de queijo bubalino
pH 2,0	$0,55 \pm 0,25^a$	$0,57 \pm 0,16^a$	$0,64 \pm 0,21^a$
pH 2,5	$0,29 \pm 0,16^a$	$0,34 \pm 0,10^a$	$0,56 \pm 0,15^a$
pH 3,0	$0,43 \pm 0,16^a$	$0,22 \pm 0,06^a$	$0,57 \pm 0,10^a$
Sem sais	$0,49 \pm 0,20^a$	$0,85 \pm 0,19^a$	$0,91 \pm 0,16^a$
Com sais	$5,52 \pm 0,21^a$	$4,56 \pm 0,20^b$	$5,97 \pm 0,16^a$

Média \pm desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística ($p < 0,05$) entre os materiais de parede estudados (mesma linha). Exposição ao trato gástrico: suco gástrico por 180 min em pH 2,0; 2,5 e 3,0. Trato intestinal: suco intestinal por 240 min, sem sais biliares e com sais biliares (5 g/L). Estes resultados foram obtidos no primeiro dia de armazenamento.

Tabela 9. Redução da viabilidade celular quanto à exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 com os diferentes materiais de parede: permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e soro de queijo bubalino

	Microcápsulas <i>L. plantarum</i> ATCC 8014 (Redução log UFC/g)		
	Permeado	Soro de queijo bovino	Soro de queijo bubalino
pH 2,0	0,95 ± 0,18 ^a	0,50 ± 0,16 ^b	0,11 ± 0,01 ^b
pH 2,5	0,90 ± 0,23 ^a	0,12 ± 0,04 ^b	0,22 ± 0,04 ^a
pH 3,0	0,89 ± 0,20 ^a	0,12 ± 0,06 ^b	0,33 ± 0,06 ^a
Sem sais	0,86 ± 0,16 ^a	0,61 ± 0,03 ^a	0,65 ± 0,04 ^a
Com sais	5,91 ± 0,20 ^a	5,71 ± 0,06 ^a	4,18 ± 0,04 ^b

Média ± desvio padrão (n=3). Diferentes letras sobrescritas indicam diferença estatística (p<0,05) entre os materiais de parede estudados (mesma linha). Exposição ao trato gástrico: suco gástrico por 180 min em pH 2,0; 2,5 e 3,0. Trato intestinal: suco intestinal por 240 min, sem sais biliares e com sais biliares (5 g/L). Estes resultados foram obtidos no primeiro dia de armazenamento.

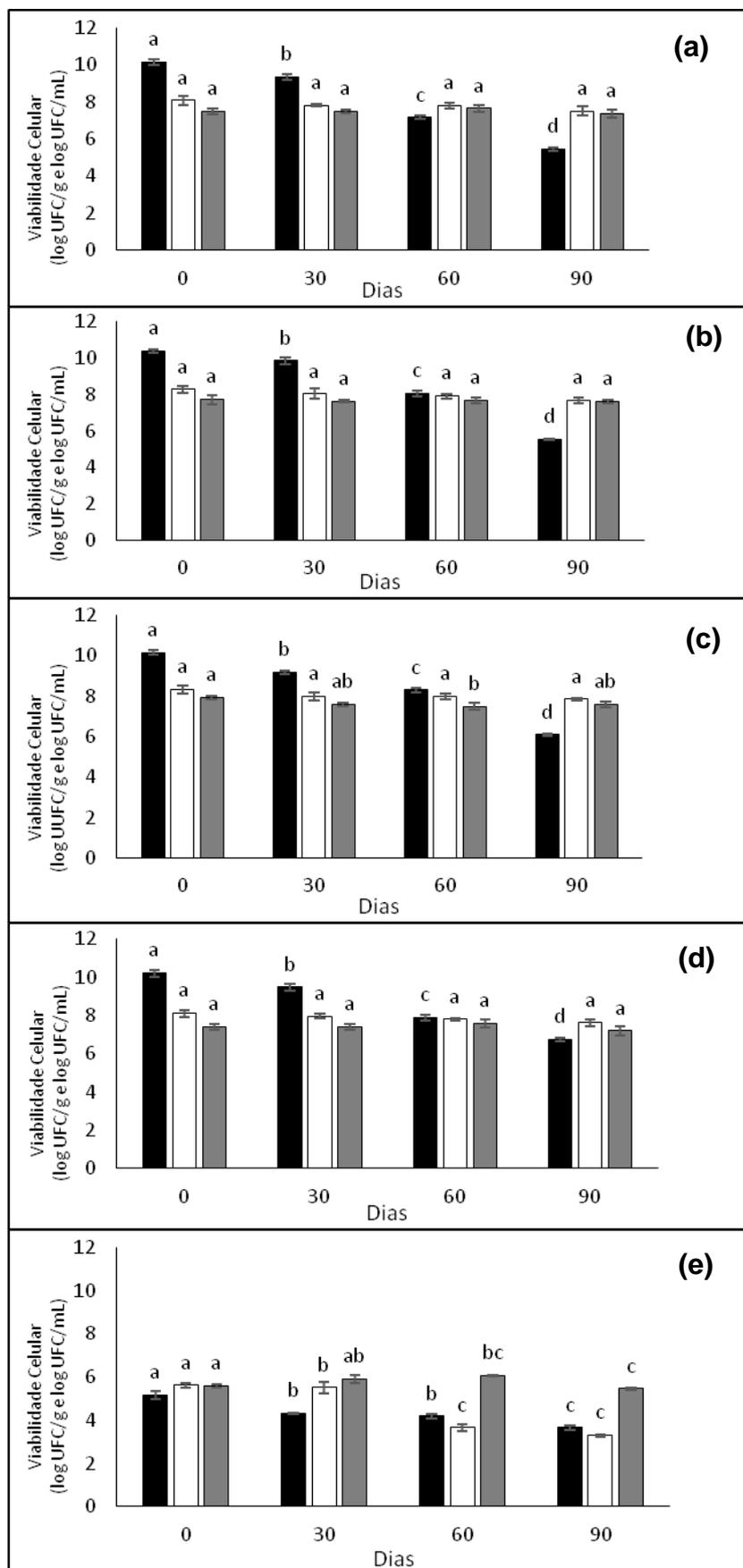
No geral, não houve diferença estatística (p>0,05) na exposição ao trato gastrointestinal simulado das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 produzidas com permeado de soro, soro de queijo bovino e bubalino. As microcápsulas de soro de queijo bovino e bubalino de *L. plantarum* ATCC 8014 apresentaram melhores resultados (p<0,05), que pode ser explicado pela maior concentração de proteínas na sua composição quando comparados ao permeado de soro. A interação da proteína e a lactose presente no soro de queijo promovem a proteção da célula bacteriana quando expostas aos ambientes adversos (MACIEL et al., 2014).

De Castro-Cislaghi et al. (2012) avaliaram a exposição ao trato gastrointestinal simulado de microcápsulas de *Bifidobacterium* BB-12 produzidas por *spray drying* com soro de queijo bovino. Foram analisadas às exposições ao pH ácido (2,0; 3,0; 4,0 e 6,0). Após 180 min horas de incubação em pH 2,0 houve um decréscimo na viabilidade celular de 0,73 ± 0,18 UFC/g. Para todos os pHs estudados, as contagens de células viáveis permaneceram acima de 7,0 log UFC/g após 3 h de incubação. No presente estudo, as microcápsulas produzidas com *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 com os diferentes materiais de parede apresentaram uma redução na viabilidade celular entre 0,12 e 0,95 em pH 2,0. Nos pHs estudados (2,0; 2,5 e 3,0), a viabilidade permaneceu acima de 9,0 log UFC/g.

A viabilidade celular das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 produzidas com permeado de soro bovino, soro e queijo bovino e bubalino permaneceram superior a 10^9 UFC/g após a exposição ao trato gástrico (pH 2,0; 2,5 e 3,0) e ao trato intestinal sem a presença de sais biliares. A maior perda de viabilidade foi observada quando as microcápsulas foram expostas ao sais biliares (5 g/L). A taxa de sobrevivência permaneceu entre 37,83 e 55,86 % para *L. pentosus* ML 82 e entre 42,06 e 60,34 % para *L. plantarum* ATCC 8014, após a exposição de 240 min. Em estudo realizado por Huang et al. (2017) com microcápsulas de soro de queijo bovino de *Lactobacillus casei* BL23, a sobrevivência após as 3 h de exposição ficou abaixo de 20 %.

As microcápsulas armazenadas a 25 °C, armazenadas em amostras de suco de laranja e o suco de laranja com as células livres de *L. pentosus* ML 82 foram avaliadas quanto à exposição ao trato gastrintestinal simulado ao longo do armazenamento de 90 dias (dias 0, 30, 60 e 90), e os resultados são mostrados nas Figuras 9, 10 e 11. O mesmo foi realizado com *L. plantarum* ATCC 8014 e os resultados estão nas Figuras 12, 13 e 14.

Figura 9. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em permeado de soro bovino



Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com 5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

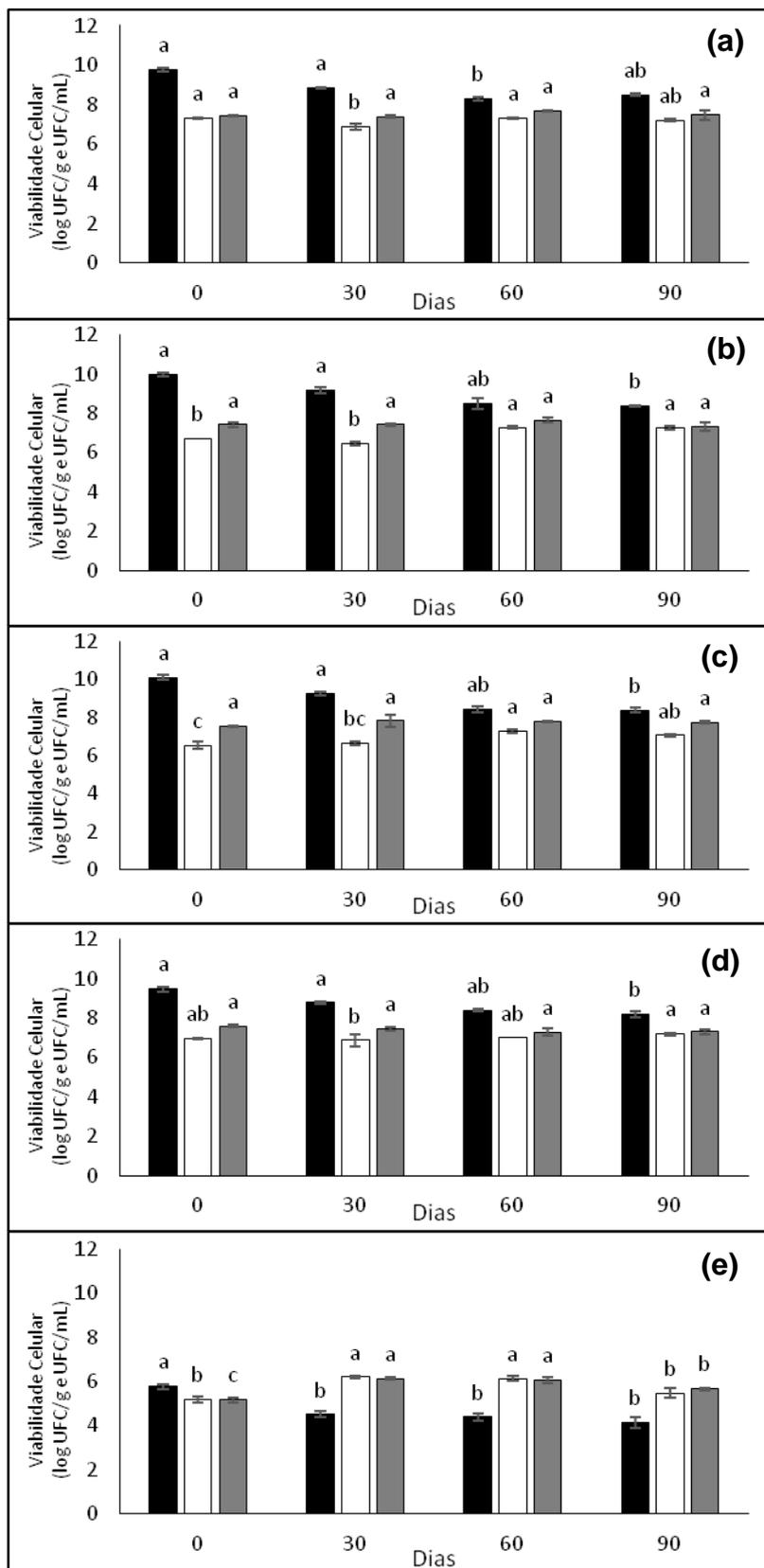
Na Figura 9, em relação à exposição das microcápsulas a 25 °C de *L. pentosus* ML 82 ao trato gástrico simulado, é possível observar uma redução entre o dia 0 e o dia 90 de armazenamento ($p < 0,05$) de 4,68 log UFC/g em pH 2,0; 4,86 log UFC/g em pH 2,5; e, 4,06 log UFC/g em pH 3,0. Nota-se uma redução maior da viabilidade celular nos pHs mais ácidos, confirmando a menor tolerância destas bactérias nestes ambientes. No trato intestinal simulado sem os sais biliares, foi observada uma redução de 3,44 log UFC/g, demonstrando que os *L. pentosus* ML 82 apresentam uma considerável resistência à exposição à pancreatina. Já na presença de sais biliares, uma acentuada perda de viabilidade foi observada logo no primeiro dia de armazenamento com redução de 5,52 log UFC/g após exposição aos sais biliares por 240 minutos. Após os 90 dias, ocorreu uma redução de 1,52 log UFC/g. Assim, é possível afirmar que os sais biliares são danosos aos *L. pentosus* ML 82.

De maneira geral, não ocorreu diferença estatística na exposição ao TGI simulado ao longo do armazenamento de 90 dias das microcápsulas e das células livres de *L. pentosus* ML 82 inseridas em suco de laranja. No trato gástrico em pH 3,0, ocorreu uma redução ($p < 0,05$) de 0,44 log UFC/mL das células livres. No trato intestinal com a presença de sais biliares, foi evidenciada morte celular em ambas as condições (células encapsuladas e livres) ($p < 0,05$) de 2,32 e 0,14 log UFC/mL, respectivamente.

A maior perda de viabilidade ocorreu na presença de sais biliares (5 g/L). A concentração de sais biliares representa um ponto crítico para a sobrevivência celular (RANADHEERA et al., 2014). O mesmo ocorreu com Eckert et al. (2017) no microencapsulamento de *L. plantarum* ATCC 8014 em permeado de soro, com uma redução de 5,0 log UFC/g no dia 0 e após 28 dias não foi observada sobrevivência da bactéria.

Pode-se verificar que os *L. pentosus* ML 82 (microencapsulados e livres) armazenados em suco de laranja apresentaram uma melhor tolerância ao TGI simulado quando comparado às microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 mantidas a 25 °C. O fato pode estar relacionado à adaptação das bactérias ao pH ácido do suco de laranja no qual elas foram expostas por 90 dias.

Figura 10. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em soro de queijo bovino

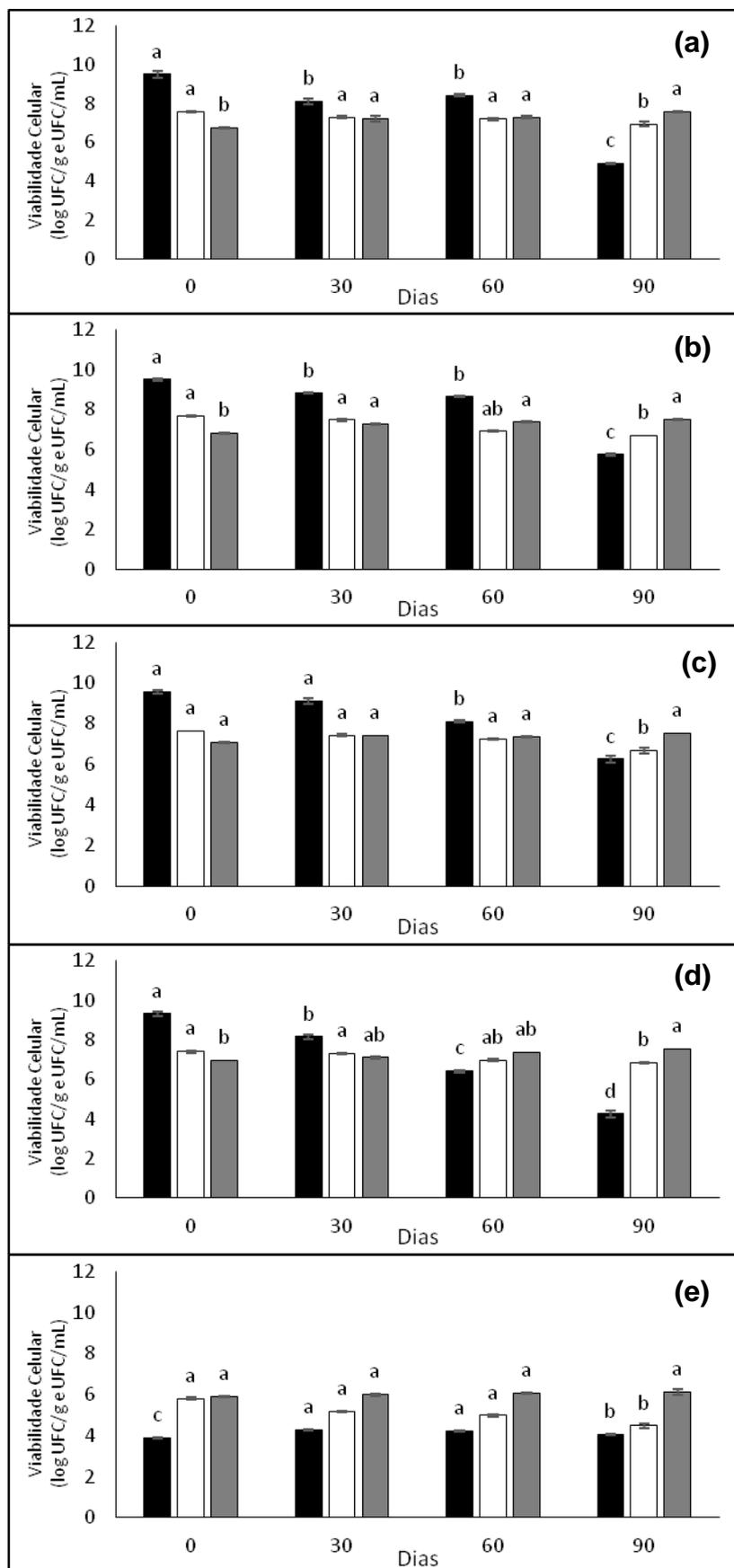


Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com ,5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

Na Figura 10, em relação á exposição das microcápsulas a 25 °C de *L. pentosus* ML 82 ao trato gástrico simulado, é possível observar uma redução ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 de armazenamento de 1,27 log UFC/g em pH 2,0; 1,63 log UFC/g em pH 2,5; e, 1,72 log UFC/g em pH 3,0. No trato intestinal simulado sem os sais biliares, foi observada uma redução de 1,28 log UFC/g e na presença de sais biliares, foi evidenciada uma morte celular de 1,64 log UFC/g. Ao comparar as microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 produzidas com permeado de soro bovino e soro de queijo bovino, pode-se verificar uma maior resistência das microcápsulas produzidas com soro de queijo bovino na exposição ao TGI simulado ao logo dos 90 dias de armazenamento. Isso se deve, provavelmente, à composição do soro de queijo em comparação ao permeado de soro.

Nas microcápsulas e nas células livres de *L. pentosus* ML 82 produzidas com soro de queijo e armazenadas em suco de laranja ficou constatado o crescimento bacteriano ao longo do armazenamento, com utilização dos nutrientes disponíveis no suco de laranja e também, a adaptação dos *L. pentosus* M 82 ao pH ácido do meio, permitindo uma maior resistência ao TGI simulado. Segundo Nguyen et al. (2014) choques de temperatura sub-letais induzem as cepas a uma adaptação às variações das condições ambientais via indução de genes específicos e proteínas responsivas ao estresse.

Figura 11. Viabilidade de *L. pentosus* ML 82 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em soro de queijo bubalino



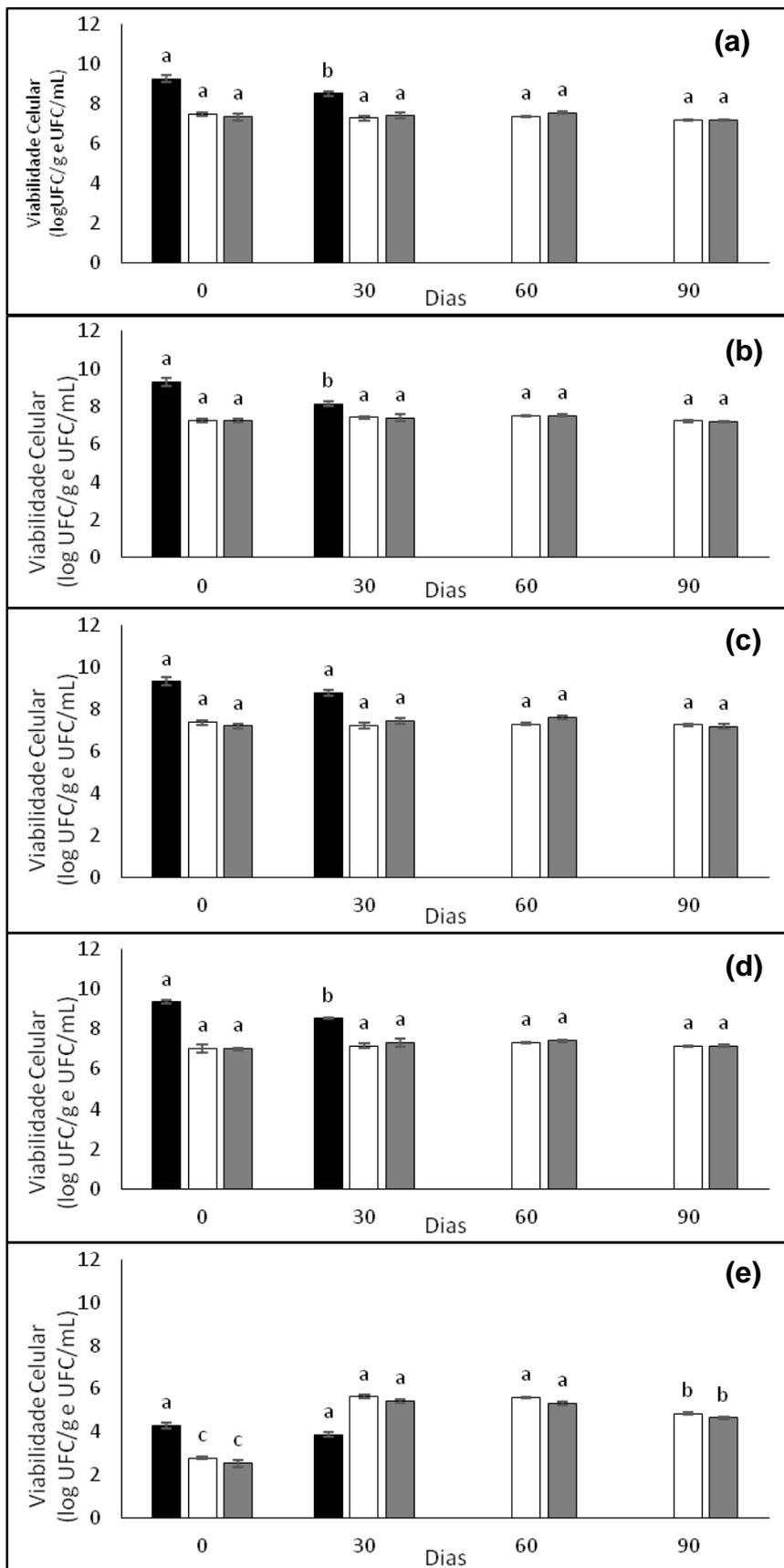
Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com 5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05).

Na Figura 11, em relação á exposição das microcápsulas a 25 °C de *L. pentosus* ML 82 ao trato gástrico simulado, é possível observar uma redução ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 de armazenamento de 4,58 log UFC/g em pH 2,0; 3,76 log UFC/g em pH 2,5; e, 3,31 log UFC/g em pH 3,0. No trato intestinal simulado sem os sais biliares, foi observada uma redução de 5,07 log UFC/g e na presença de sais biliares, não foi evidenciada uma morte celular. Ao comparar as microcápsulas produzidas com soro de queijo bovino e bubalino, é possível constatar uma maior perda de viabilidade ao TGI simulado após 90 dias de armazenamento nas microcápsulas produzidas com soro de queijo bubalino. Entretanto, foi evidenciada uma redução na viabilidade ao longo do armazenamento a 25 °C devido ao aumento da umidade.

As microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 armazenadas em suco de laranja apresentaram uma redução ($p < 0,05$) de 0,64 log UFC/mL em pH 2,0; 0,95 log UFC/mL em pH 2,5; e, 0,98 log UFC/mL em pH 3,0, após os 90 dias de armazenamento. Na exposição ao trato intestinal sem sais biliares, ocorreu uma perda de viabilidade de 0,56 log UFC/mL. Na exposição aos sais biliares, ocorreu uma perda foi de 1,33 log UFC/mL.

Não ocorreu perda de viabilidade em relação ao TGI simulado das células livres após os 90 dias de armazenamento. Novamente ficou constatado o crescimento bacteriano ao longo do armazenamento, com utilização dos nutrientes disponíveis no suco de laranja e também, a adaptação dos *L. pentosus* M 82 ao pH ácido do meio, permitindo uma maior resistência ao TGI simulado.

Figura 12. Viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em permeado de soro bovino

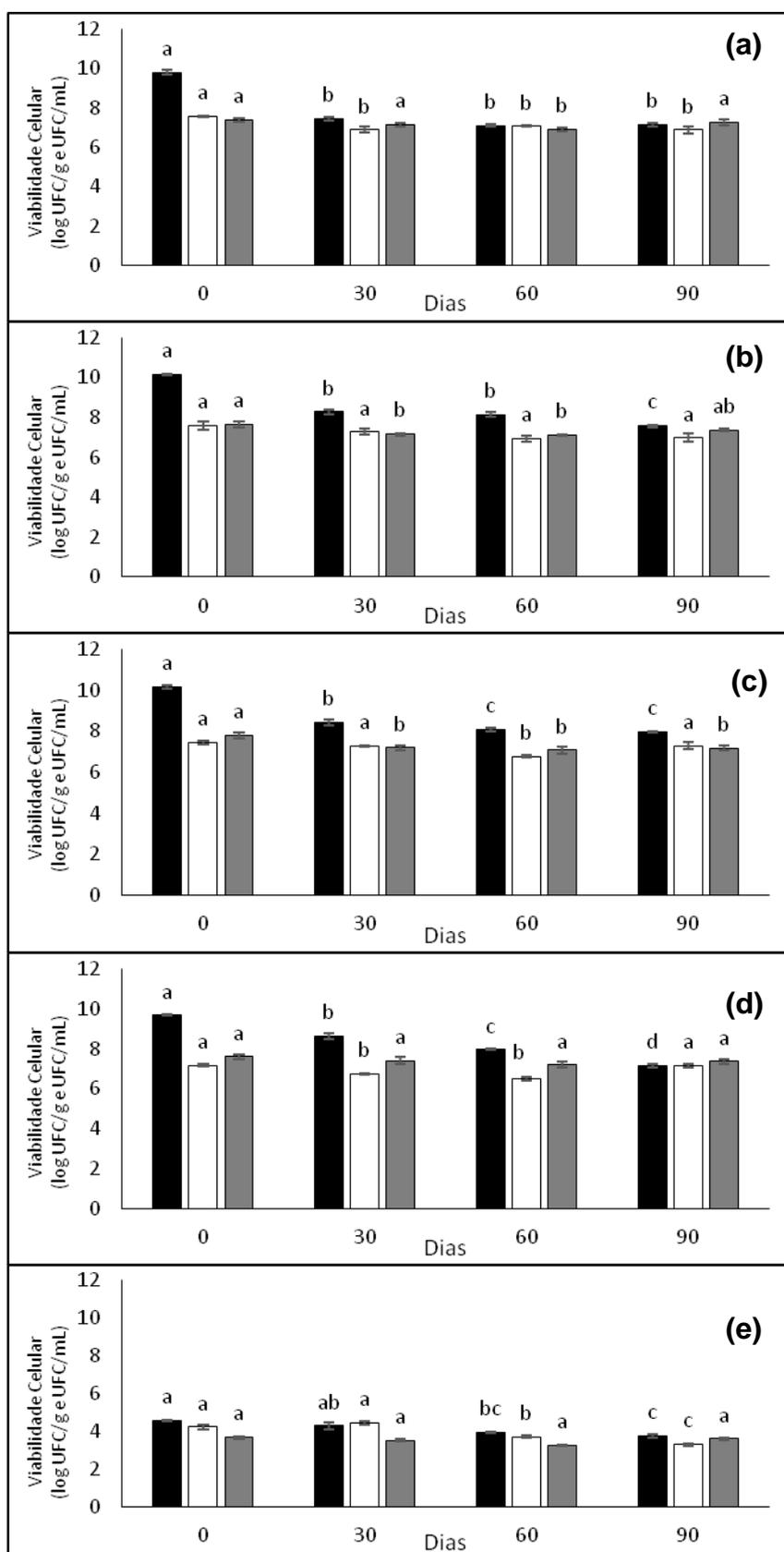


Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com 5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

A Figura 12, é possível observar que as microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas a temperatura de 25 °C apresentaram uma redução ($p < 0,05$) ao trato gástrico de 0,54 log UFC/g em pH 2,0 e de 1,14 log UFC/g em pH 2,5, entre o dia 0 e o dia 30. No trato intestinal, ficou evidenciado o menor número de bactérias ($p < 0,05$) na ausência de sais biliares, com redução de 0,82 log UFC/g.

Nas microcápsulas e nas células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja foi observado um aumento na viabilidade após os 90 dias na exposição aos sais biliares, ressaltando o crescimento bacteriano ao longo do armazenamento e o aumento na resistência quanto à exposição ao trato intestinal.

Figura 13. Viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em soro de queijo bovino

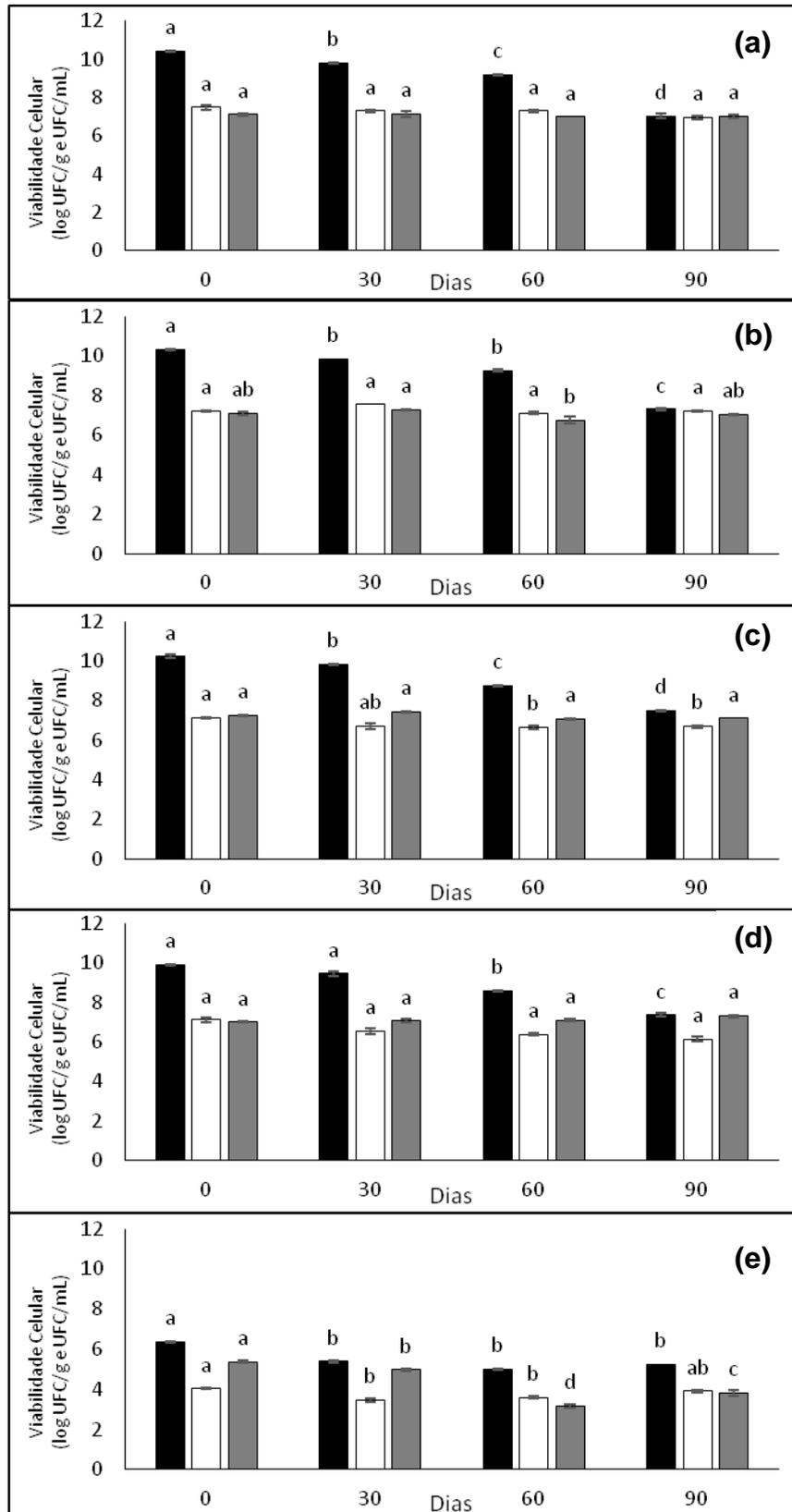


Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com 5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p<0,05).

Na Figura 13, em relação á exposição das microcápsulas a 25 °C de *L. plantarum* ATCC 8014 ao trato gástrico simulado, é possível observar uma redução ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 de armazenamento de 2,62 log UFC/g em pH 2,0; 2,58 log UFC/g em pH 2,5; e, 2,19 UFC/g em pH 3,0. No trato intestinal simulado sem os sais biliares, foi observada uma redução de 2,54 log UFC/g e na presença de sais biliares, foi evidenciada uma morte celular de 0,81 log UFC/g.

Nas microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja ficou evidenciada diferença ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 em pH 2,0 com redução de 0,67 log UFC/mL; e no trato intestinal com sais biliares de 0,93 log UFC/mL. Nas células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 inseridas em suco de laranja apenas em pH 3,0 foi observada redução de 0,62 log UFC/mL.

Figura 14. Viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 (microcápsulas armazenadas a 25 °C; microcápsulas armazenadas em suco de laranja; células livres em suco de laranja) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0, 30, 60 e 90 dias, em soro de queijo bubalino



Suco gástrico durante 180 min (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 (c) pH 3,0. Suco intestinal durante 240 min (d) sem sais biliares (e) com 5 g/L de sais biliares. ■ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82; □ microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em suco de laranja; ▒ células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 em suco de laranja. Média ± desvio padrão (n = 3) diferentes letras sobrescritas em períodos diferentes indicam diferença significativa (p < 0,05).

Na Figura 14, em relação à exposição das microcápsulas a 25 °C de *L. plantarum* ATCC 8014 ao trato gástrico simulado, é possível observar uma redução ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 de armazenamento de 3,40 log UFC/g em pH 2,0; 3,02 log UFC/g em pH 2,5; e, 2,75 log UFC/g em pH 3,0. No trato intestinal simulado sem os sais biliares, foi observada uma redução de 2,52 log UFC/g e na presença de sais biliares, foi evidenciada uma morte celular de 1,11 log UFC/g.

Nas microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja ficou evidenciada diferença ($p < 0,05$) entre o dia 0 e 90 em pH 3,0 com redução de 0,43 log UFC/mL. Nas células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 inseridas em suco de laranja apenas no trato intestinal com sais biliares foi observada redução de 1,57 log UFC/mL.

De maneira geral, foi possível constatar que as microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 com permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino, armazenadas a 25 °C e em suco de laranja, permaneceram com uma viabilidade superior a 10^3 UFC/g e 10^3 UFC/mL após a exposição ao trato gástrico (pH 2,0; 2,5 e 3,0) e trato intestinal com e sem sais biliares, mesmo após os 90 dias de armazenamento. Nas mesmas condições, células livres de *L. pentosus* ML 82 apresentaram uma sobrevivência superior a 10^5 log UFC/mL, no mesmo período e células livres de *L. plantarum* ATCC 8014 apresentaram uma viabilidade superior a 10^3 UFC/mL.

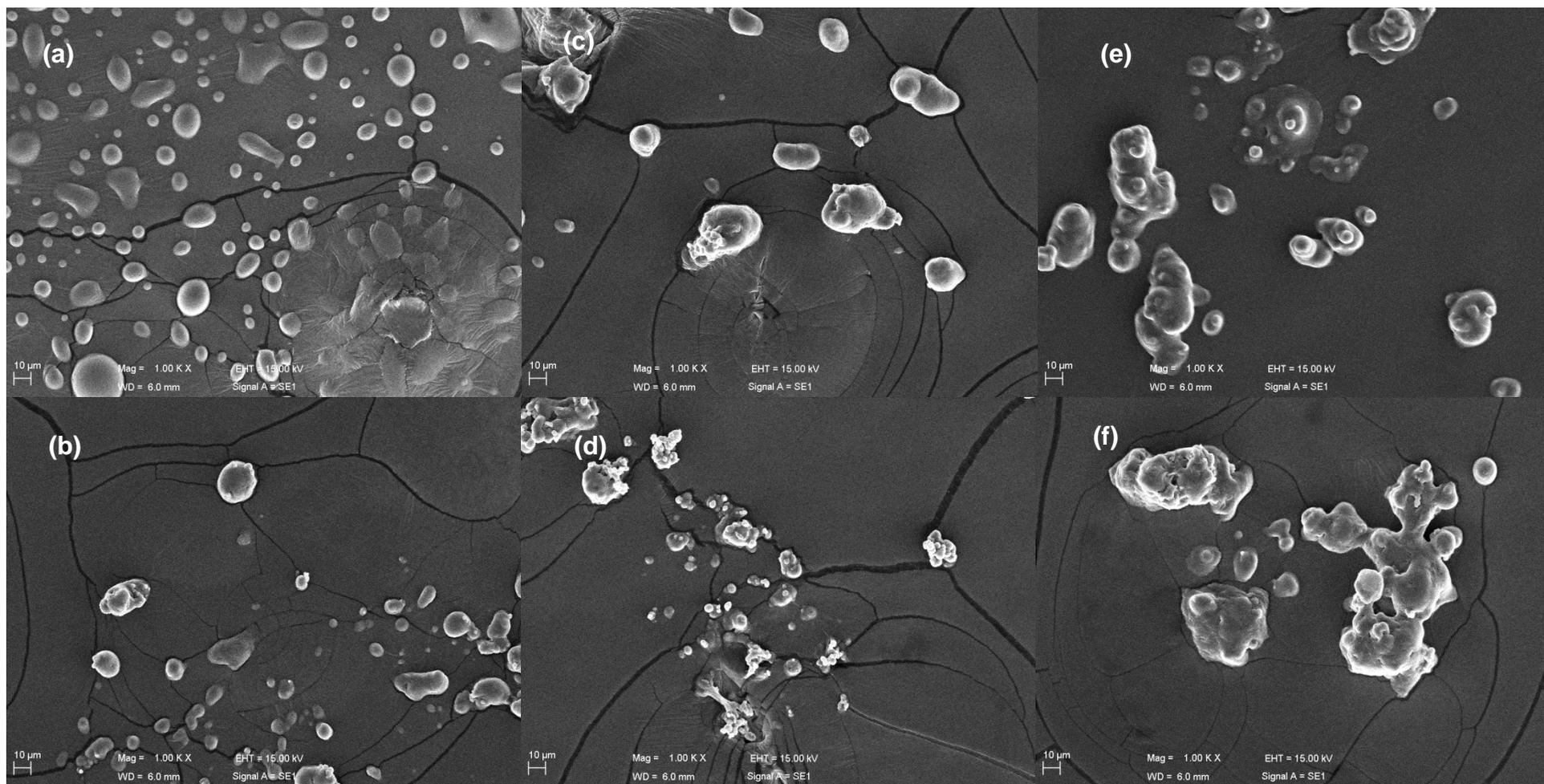
5.6 Caracterização das microcápsulas

5.6.1 Morfologia e tamanho de partícula

Partículas de pequeno porte são mais favoráveis por não afetar a textura e a qualidade sensorial dos produtos, em que um tamanho médio abaixo de 40 μm é esperado para a formulação de alimentos (DUONGTHINGOC et al., 2013). Entretanto, o tamanho das microcápsulas pode variar entre 10 a 100 μm (FANG e BHANDARI, 2010). Além disso, o tamanho de partícula deve permitir o total encapsulamento bacteriano (CHEN e SUBIRADE, 2006). A Figura 17 mostra as micrografias de MEV das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 obtidas por *spray drying* com os diferentes materiais de parede.

Microcápsulas de *Lactobacillus pentosus* ML 82 e *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 foram produzidas com diferentes agentes encapsulantes, como o soro de queijo bovino e bubalino e o permeado de soro de queijo bovino, conforme a Figura 15. Independentemente do material utilizado todas as microcápsulas mostraram morfologias semelhantes, com tamanho entre 7,77 e 16,87 μm . Foi possível notar que as células bacterianas não eram visíveis fora ou na superfície das microcápsulas, confirmando o encapsulamento. Foram observadas partículas de tamanhos diferentes e com concavidades, sendo características de produtos secos por *spray drying* (FAVARO-TRINDADE et al., 2010). A formação destas concavidades são dependentes da temperatura de secagem, sendo que temperaturas moderadas causam esta característica, que por sua vez dão ao pó resistência à fratura mecânica e difusão de soluto (RODRÍGUEZ-HUEZO et al., 2007). Resultados semelhantes foram encontrados por outros pesquisadores utilizando soro de queijo bovino como material de parede, com tamanhos das microcápsulas de $10,55 \pm 2,99 \mu\text{m}$ (PINTO et al., 2015b) e $11,23 \pm 4,21 \mu\text{m}$ (DE CASTRO-CISLAGHE et al., 2012).

Figura 15. Micrografias de MEV das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 obtidas por *spray drying* com soro de queijo bovino, bubalino e permeado de soro bovino



(a) Microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em permeado de soro de queijo bovino; (b) Microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 em permeado de soro de queijo bovino; (c) Microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em soro de queijo bovino; (d) Microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 em soro de queijo bovino (e) Microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 em soro de queijo bubalino; (f) Microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 em soro de queijo bubalino.

5.6.2 Umidade, atividade de água e análise de cor

As microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 com diferentes materiais de parede foram analisadas quanto à umidade, atividade de água e cor durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C, conforme mostram as Tabelas 10, 11 e 12.

Tabela 10. Características das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 preparadas com permeado de soro bovino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	4,93 ± 0,52 ^a	0,375 ± 0,011 ^a	L* = 80,04 ± 0,38 a* = 4,28 ± 0,05 b* = 25,03 ± 0,16
45	4,73 ± 0,44 ^a	0,409 ± 0,013 ^a	L* = 88,33 ± 0,44 a* = 4,99 ± 0,29 b* = 26,87 ± 0,14
90	3,40 ± 0,33 ^a	0,481 ± 0,007 ^a	L* = 78,54 ± 0,06 a* = 5,15 ± 0,05 b* = 27,53 ± 0,03

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

Tabela 11. Características das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 preparadas com soro de queijo bovino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	5,50 ± 0,01 ^a	0,380 ± 0,020 ^a	L* = 95,17 ± 0,97 a* = -1,31 ± 0,03 b* = 7,97 ± 0,05
45	2,63 ± 0,13 ^c	0,389 ± 0,010 ^a	L* = 87,72 ± 1,17 a* = -1,10 ± 0,06 b* = 7,06 ± 0,10
90	4,60 ± 0,16 ^b	0,393 ± 0,010 ^a	L* = 87,60 ± 1,09 a* = -0,87 ± 0,09 b* = 6,14 ± 0,10

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

Tabela 12. Características das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 preparadas com soro de queijo bubalino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	5,26 ± 0,07 ^c	0,361 ± 0,011 ^b	L* = 93,73 ± 0,48 a* = -1,74 ± 0,09 b* = 8,52 ± 0,19
45	7,69 ± 0,20 ^b	0,344 ± 0,015 ^b	L* = 93,03 ± 0,86 a* = -1,72 ± 0,09 b* = 10,92 ± 0,06
90	15,42 ± 0,07 ^a	0,549 ± 0,001 ^a	L* = 86,02 ± 1,41 a* = -0,53 ± 0,32 b* = 21,37 ± 0,33

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

As microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 com diferentes materiais de parede foram analisadas quanto à umidade, atividade de água e cor durante o armazenamento de 90 dias a 25 °C, conforme mostram as Tabelas 13, 14 e 15.

Tabela 13. Características das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 preparadas com permeado de soro bovino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	4,71 ± 0,14 ^b	0,303 ± 0,006 ^a	L* = 78,39 ± 0,30 a* = 4,89 ± 0,08 b* = 26,64 ± 0,19
45	11,82 ± 0,16 ^a	0,350 ± 0,011 ^a	L* = 70,84 ± 0,31 a* = 7,57 ± 0,38 b* = 30,69 ± 0,12

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

Tabela 14. Características das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 preparadas com soro de queijo bovino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	4,03 ± 0,02 ^c	0,299 ± 0,002 ^a	L* = 94,32 ± 1,66 a* = -1,20 ± 0,04 b* = 8,61 ± 0,35
45	6,44 ± 0,24 ^a	0,359 ± 0,027 ^a	L* = 93,94 ± 0,70 a* = -1,09 ± 0,02 b* = 6,52 ± 0,06
90	5,32 ± 0,20 ^b	0,370 ± 0,047 ^a	L* = 89,57 ± 1,43 a* = -0,86 ± 0,05 b* = 6,12 ± 0,39

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

Tabela 15. Características das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 preparadas com soro de queijo bubalino ao longo do armazenamento de 90 dias

Dia	Umidade (%)	Atividade de água	Cor
0	3,32 ± 0,06 ^c	0,316 ± 0,010 ^a	L* = 96,65 ± 0,13 a* = -1,67 ± 0,07 b* = 7,58 ± 0,30
45	5,53 ± 0,24 ^b	0,302 ± 0,026 ^a	L* = 96,50 ± 0,19 a* = -1,59 ± 0,03 b* = 7,90 ± 0,10
90	7,10 ± 0,13 ^a	0,351 ± 0,027 ^a	L* = 95,47 ± 0,15 a* = -1,39 ± 0,12 b* = 8,39 ± 0,05

Média ± desvio padrão (n = 3). Letras diferentes sobrescritas indicam diferença significativa (p<0,05) ao longo do armazenamento de 90 dias (mesma coluna).

A atividade de água se manteve constante no decorrer do armazenamento nas microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014, com exceção das microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 com soro de queijo de búfala. Um aumento na atividade de água (p<0,05) foi observado com 90 dias de armazenamento, chegando a 0,549 ± 0,001 (Tabela 12).

Para a manutenção da estabilidade microbiológica, é recomendado um limite de atividade de água de 0,300. O intervalo normal para produtos atomizados é menor que 0,600 (TONON et al., 2009). A atividade de água necessária para a sobrevivência de populações microbianas microencapsuladas varia entre 0,28 e 0,65 (DESMOND et al., 2002). Assim, a sobrevivência das culturas bacterianas durante o armazenamento pode ser melhorada com o controle da atividade de água (PODDAR et al., 2014).

O teor de água em pós probióticos é um fator crítico que influencia a estabilidade das bactérias durante o armazenamento (CHAN et al., 2011). Em geral, os microrganismos sobrevivem melhor com baixa atividade de água, tendo assim menos água livre disponível para reações bioquímicas, prolongando a validade (TONON et al., 2009). Apesar do aumento da atividade de água de *L. pentosus* ML 82 microencapsulados com soro de queijo de búfala, a viabilidade celular se

manteve acima de 10^6 UFC/g, aos 90 dias de armazenamento a 25 °C. Em estudo semelhante com permeado de soro bovino, a atividade de água foi de $0,302 \pm 0,009$ (HUGO, BRUNO e GOLOWCZYC, 2016). Outro estudo mostrou a atividade de água de $0,230 \pm 0,008$ no microencapsulamento de *L. paracasei* e soro de queijo bovino (ILHA et al., 2015). Liao et al. (2017) afirmam que a atividade de água influenciam significativamente a viabilidade de *L. casei* LK-1 durante o armazenamento a 25 °C.

Riveros, Ferrer e Bórquez (2013) afirmam que a umidade deve estar abaixo de 10 % para manutenção da viabilidade e estabilidade ao armazenamento. O teor de umidade dos produtos desidratados é importante para a estabilidade do produto e da bactéria durante o armazenamento. Ananta, Volkert e Knorr (2005) afirmam que o teor ótimo de umidade está entre 4 e 7% para o armazenamento.

Foi possível observar que as microcápsulas de *L. pentosus* ML 82 de soro de queijo de búfala apresentaram uma umidade de $15,42 \pm 0,07$ (Tabela 12) aos 90 dias de armazenamento, parâmetro acima do recomendado por pesquisadores (ANANTA et al., 2005; RIVEROS, FERRER e BÓRQUEZ, 2013). Apesar disto, a viabilidade celular no mesmo período manteve-se acima de 10^6 UFC/g. Um aumento na umidade ($p < 0,05$) das microcápsulas de *L. plantarum* ATCC 8014 com permeado de soro bovino foi observado, chegando a $11,82 \pm 0,16$ (Tabela 13) aos 45 dias de armazenamento. A alta umidade apresentada provavelmente limitou a viabilidade celular, em que no mesmo período não houve crescimento das bactérias microencapsuladas. Alterações foram observadas ($p < 0,05$) com os demais materiais de parede estudados, entretanto a umidade se manteve dentro dos parâmetros recomendados para manutenção da viabilidade celular.

Quanto aos atributos de cor, o parâmetro L^* (luminosidade) foi alto em todos os materiais de parede, indicando que as microcápsulas apresentavam cor clara. Entretanto, foi observado que, ao longo do armazenamento de 90 dias, ocorreu uma redução nestes valores, indicando o escurecimento das amostras. As amostras de permeado de soro bovino apresentaram valores positivos para os parâmetros a^* e b^* , tendendo a coloração laranja. Ao longo do armazenamento, estes valores aumentaram, demonstrando um escurecimento no tom laranja. As amostras de soro de queijo bovino e bubalino apresentaram valores negativos para o parâmetro a^* e positivos para o parâmetro b^* , tendendo a uma coloração esverdeada, sendo a cor do soro de queijo *in natura* (CARVALHO, PRAZERES e RIVAS, 2013). Ao longo do

armazenamento, as microcápsulas de soro de queijo bovino tiveram o parâmetro b^* diminuído, tendendo a uma coloração azulada, enquanto que o soro de queijo bubalino aumentou, tendendo a uma coloração amarelada. Além disso, a tendência de cor pode estar relacionada a reação de Maillard, que acontece entre os açúcares e a proteína durante o processo de secagem por *spray drying* (DE CASTRO-CISLAGHI et al., 2012).

CONCLUSÃO

Os materiais de parede utilizados no estudo (permeado de soro bovino, soro de queijo bovino e bubalino) são capazes de promover a proteção dos microrganismos quando expostos às altas temperaturas utilizadas no processo de secagem por *spray drying*, permanecendo uma viabilidade superior a 10^{10} log UFC/g.

A elevada sobrevivência das bactérias lácticas microencapsuladas foi mantida ao longo do armazenamento de 90 dias, a 25 °C. Entretanto, o aumento da umidade promove uma perda da viabilidade celular.

A elevada viabilidade das microcápsulas e das células livres de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 armazenadas em suco de laranja a 4 °C também foi observada, com uma sobrevivência superior a 10^7 log UFC/mL após os 90 dias. Ambos os microrganismos se adaptaram ao pH ácido do meio, assim como as variações deste ao longo do tempo.

Células livres de *L. pentosus* ML 82 e *L. plantarum* ATCC 8014 expostas ao trato gastrointestinal simulado mostraram, principalmente, uma tolerância inferior aos pHs 2,0 e 2,5. Todos os materiais de parede promoveram a proteção das bactérias lácticas, entretanto, o soro de queijo bovino e bubalino apresentaram melhores resultados.

As microcápsulas armazenadas a 25 °C e armazenadas em suco de laranja a 4 °C, assim como as células livres armazenadas em suco de laranja a 4 °C apresentaram uma viabilidade superior a 10^3 UFC/g (ou UFC/mL) após exposição ao

trato gastrointestinal simulado, após os 90 dias de armazenamento. A presença de sais biliares promoveu uma maior perda de viabilidade celular.

De forma geral, o *L. pentosus* ML 82 manteve uma maior viabilidade ao longo do armazenamento de 90 dias a temperatura de 25 °C, e o soro de queijo bovino promoveu uma maior proteção às células microbianas em relação ao processo de secagem e TGI simulado.

As microcápsulas formadas não apresentaram diferenças em relação à morfologia e tamanho. Foi observado um aumento na umidade, com conseqüente diminuição da viabilidade celular. A atividade de água, no geral, se manteve constante ao longo do armazenamento. Em relação à cor das microcápsulas, verificou-se um escurecimento ao longo dos 90 dias de armazenamento.

O desenvolvimento de trabalhos futuros com as bactérias lácticas isoladas na região do vale do Taquari são imprescindíveis para avaliar o potencial probiótico destes microrganismos.

Assim, a continuidade da pesquisa envolverá:

- O microencapsulamento das demais BALs isoladas na região do Vale do Taquari por *spray drying* e extrusão por tecnologia de vibração;
- A aplicação do soro de queijo caprino como material de parede no microencapsulamento de BALs;
- Desenvolvimento biotecnológico de um alimento funcional probiótico em pó com adição das BALs microencapsuladas isoladas na região do Vale do Taquari;
- Avaliação da adesão de BALs microencapsuladas em linhagem de adenocarcinoma humano Caco-2, após o processo de secagem por *spray drying* e exposição ao TGI simulado.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AKNAVAN, T.; LUHOVYY, B. L.; BROWN, P. H.; CHO, C. E.; ANDERSON, G. H. Effect of premeal consumption of whey protein and its hydrolysate on food intake and postmeal glycemia and insulin responses in young adults. **The American Journal of Clinical Nutrition**, v.91, p. 966-975, 2010.

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

ANANTA, E., VOLKERT, M.; KNORR, D. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399–409, 2005.

ANEKELLA, K.; ORSAT, V. Optimization of microencapsulation of probiotics in raspberry juice by spray drying. **LWT- Food Science and Technology**, v. 50, p. 17-24, 2013.

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.

ASGHAR, A.; ANJUM, F. M.; ALLEN, J. C. Utilization of dairy by product proteins, surfactants and enzymes in frozen dough. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v.51, p.374-382, 2011.

ASTERI, I.; KITTAKI, N.; TSAKALIDOU, E. The effect of wild lactic acid bacteria on the production of goat's milk soft cheese. **International Journal Dairy Technology**, v. 63, n. 2, p. 234-242, 2010.

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

AXELSSON, L. Lactic acid bacteria: classification and physiology. In: SALMNEN, S.; VON WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. **Lactic Acid Bacteria: Microbiological and Functional Aspects**. New York: Marcel Dekker Inc, p. 01-66, 2004.

BALDASSO, C.; BARROS, T. C.; TESSARO, I. C. Concentration and purification of whey proteins by ultrafiltration. **Desalination**, v. 278, n. 1–3, p. 381–386, 2011.

BAO, Y. ZHANG, Y.; LIU, Y.; WANG, S.; DONG, X.; WANG, Y.; ZHANG, H. Screening of potential probiotic properties of *Lactobacillus fermentum* isolated from traditional dairy products. **Food Control**, v. 21, p. 695-701, 2010.

BASHOLLI-SALIHU, M.; MUELLER, M.; SALAR-BEHZADI, S.; UNGER, F.M.; VIERNSTEIN, H. Effect of lyoprotectants on b-glucosidase activity and viability of *Bifidobacterium infantis* after freeze-drying and storage in milk and low pH juices. **LWT - Food Science and Technology**, v. 57, 276-282, 2014.

BRASIL, 2002. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. Aprova o Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.

BRASIL, 2008. Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA. Disponível em: <[HTTP://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm#](http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm#)> Acesso: 20 de novembro de 2016.

BRASIL, 2005. 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, pp. 7.

BUFFONI, J. N.; BONIZZI, I.; PAUCIULLO, A.; RAMUNNO, L.; FELIGINI, M. Characterization of the major whey proteins from milk of Mediterranean water buffalo (*Bubalus bubalis*). **Food Chemistry**, v. 127, p. 1515-1520, 2011.

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

BUSTOS, P.; BÓRQUEZ, R. Influence of Osmotic Stress and Encapsulating Materials on the Stability of Autochthonous *Lactobacillus plantarum* after Spray Drying. **Drying Technology: An International Journal**, v. 31, p. 57-66, 2013.

BUZI, K. A.; PINTO, J. P. A. N.; RAMOS, P. R. R.; BIONDI, G. F. Microbiological analysis and electrophoretic characterization of mozzarella cheese made from buffalo milk. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n.1, p.7-11, 2009.

CAL, K.; SOLLOHUB, K. Spray drying technique I: Hardware and Process Parameters. **Journal of Pharmaceutical sciences**, v. 99, n. 2, p. 575-586, 2010.

CANO-GARRIDO, O.; SERAS-FRANZOSO, J.; GARCIA-FRUITÓS, E. Lactic acid bacteria: reviewing the potential of a promising delivery live vector for biomedical purposes. **Microb Cell Fact**, v. 14, p. 137, 2015.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A.R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Science of the Total Environment**, v. 445–446, p. 385–396, 2013.

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, n. 1, p. 225-232, 2011.

CHAMPAGNE, C. P.; CRUZ, A. G.; DAGA, M. Strategies to improve the functionality of probiotic in supplements and foods. **Current Opinion in Food Science**, v. 22, p. 160-166, 2018.

CHÁVARRI, M.; MARAÑÓN, I.; ARES, R.; IBÁÑEZ, F.C.; MARZO, F.; VILLARÁN, M. D. 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, n. 1–2, p. 185-189, 2010.

CHAVEZ, B. E.; LEDEBOER, A. M. Drying of probiotics: optimization of formulation and process to enhance storage survival. **Drying Technology**, v. 25, p. 1193-1201, 2007.

CHEN, M. J.; CHEN, K. N. **Applications of probiotic encapsulation in dairy products**. In: Encapsulation and Controlled Release Technologies in Food Systems. Wiley-Blackwell, USA, p. 83-107, 2007.

CHEN, J.; CHEN, K. N.; KUO, Y.T. Optimal thermotolerance of *Bifidobacterium bifidum* in gellan–alginate microparticles. **Biotechnol Bioeng**, v. 98, p. 411-419, 2007.

CHEN, L.; SUBIRADE, M. Alginate–whey protein granular microspheres as oral delivery vehicles for bioactive compounds. **Biomaterials**, v. 27, p. 4646–4654, 2006.

COLLADO, M. C.; ISOLAURI, E.; SALMINEN, S.; SANZ, Y. The impact of probiotic on gut health. **Current Drug Metabolism**, v. 10, n. 1, p. 68-78, 2009.

COOK, M. T.; TZORTZIS G., CHARALAMPOPOULOS, D.; KHUTORYANSKIY, V. V. Microencapsulation of probiotics for gastrointestinal delivery. **Journal of Controlled Release**, v. 162, p. 56-67, 2012.

CORTHÉSY, B.; GASKINS, H.R.; MERCENIER, A. Cross talk between probiotic bacteria and the host immune system. **Journal of Nutrition**, v. 137, n. 3, p. 781–790, 2007.

DE CASTRO-CISLAGHI, F. P.; SILVA, C. D. R. E.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; LORENZ, J. G.; SANT'ANNA, E. S. *Bifidobacterium* Bb-12 microencapsulated by spray drying with whey: survival under simulated gastrointestinal conditions, tolerance to NaCl, and viability during storage. **J. Food Eng.**, v. 113, p. 186-193, 2012.

DEL PIANO, M.; ARMAGNOLA, S.; BALLARÈ, M.; SARTORI, M.; ORSELLO, M.; BALZARINI, M.; PAGLIARULO, M.; TARI, R.; ANDERLONI, A.; STROZZI, G. P.; MOGNA, L.; SFORZA, F.; CAPURSO, L. Is microencapsulation the future of probiotic preparations? The increased efficacy of gastro-protected probiotics. **Gut Microbes**, v. 2, n. 2, p. 120-123, 2011.

DE PRISCO, A.; MAURIELLO, G. Probiotication of foods: A focus on microencapsulation tool. **Trends in Food Science & Technology**, v. 48, p. 27-39, 2016.

DESMOND, C.; ROSS, R. P.; O'CALLAGHAN, E.; FITZGERALD, G.; STANTON, C. Improved survival of *Lactobacillus paracasei* NFBC 338 in spray-dried powders containing gum Acacia. **J Appl Microbiol**, v. 93, p.1003–101, 2002.

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, n. 4, p, 292-302, 2010.

DUNNE, C.; MURPHY, L.; FLYNN, S.; O'HALLORAM, S.; FEENEY, M. Probiotics: from myth to reality. Demonstration of functionality in animal models of disease and in human clinical trials. 6th Symposium on Lactic Acid Bacteria, Holanda, 1999.

DUONGTHINGOC, D.; GEORGE, P.; KATOPO, L.; GORCZYCA, E.; KASAPIS, S. Effect of whey protein agglomeration on spray dried microcapsules containing *Saccharomyces boulardii*. **Food Chemistry**, v. 141, n. 3, p. 1782–1788, 2013.

ECKERT, C. Bactérias Lácticas: **Avaliação da resistência ao trato gastrintestinal simulado e encapsulamento com soro lácteos**. 2016. 113 f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade do Vale do Taquari, Lajeado.

ECKERT, C.; SERPA, V. G.; SANTOS, A. C. F.; COSTA, S. M.; DALPUBEL, V.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Microencapsulation of *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 through spray drying and using dairy whey as wall materials. **LWT – Food Science and Technology**, v. 82, p. 176-183, 2017.

EL-SALAM, M.H.A; EL-SHIBINY, S. A comprehensive review on the composition and properties of buffalo milk. **Dairy Science and Technology**, v. 91, p. 663-699, 2011.

EMATER, 2018. Disponível em :<
<http://www.emater.tche.br/site/regionais/lajeado.php#.VkHv0rerTIU>> Acesso em:
12/07/2018.

ERKKILA, S.; PETAJA, E. Screening of commercial meat starter cultures at low pH and in the presence of bile salts for potential probiotic use. **Meat Science**, v. 55, p. 295-300, 2000.

ERATTE, D.; DOWLING, K.; BARROW, C. J.; ADHIKARI, B. Recent advances in the microencapsulation of omega-3 oil and probiotic bacteria through complex coacervation: A review. **Trends in the Food Science & Technology**, v. 71, p. 121-131, 2018.

FANG, Z. X.; BHANDARI, B. Encapsulation of polyphenols-A review. **Trends in Food Science & Technology**, v. 21, n. 10, p. 510–523, 2010.

FAO/WHO. Guidelines for the evaluation of probiotics in food. Report of a joint FAO/WHO working group on drafting guidelines for the evolution of probiotics in food. **Food and Agriculture Organization of the United Nations/World Health Organization**. London, Ontario, Canada, 2002.

FARRELL, H. M., JR., JIMENEZ-FLORES, R., BLECK, G. T., BROWN, E. M., BUTLER, J. E., CREAMER, L. K. Nomenclature of the Proteins of Cows' Milk—Sixth Revision. **Journal of Dairy Science**, v. 8, n. 6, p. 1641–1674, 2004.

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.

FERNANDES, R. V. D. B.; BORGES, S. V.; BOTREL, D. A. Gum arabic/starch/maltodextrin/inulin as wall materials on the microencapsulation of rosemary essential oil. **Carbohydrate Polymers**, 101, 524-532, 2014.

FOEGEDING, E. A.; DAVIS, J. P.; DOUCET, D.; MCGUFFEY, M. K. Advances in modifying and understanding whey protein functionality. **Trends in Food Science and Technology**, v. 13, p. 151-159, 2002.

FOUCQUIER, J.; CHANTOISEAU, E.; LE FEUNTEUN, S.; FLICK, D.; GAUCEL, S.; PERROT, N. Toward an integrated modeling of the dairy product transformations, a review of the existing mathematical models. **Food Hydrocolloids**, v.27, p.1-13, 2012.

FRITZEN-FREIRE, C. B.; PRUDÊNCIO, E. S.; PINTO, S. S.; MUÑOZ, I. B.; AMBONI, R. D. M. C. Effect of microencapsulation on survival of *Bifidobacterium* BB-12 exposed to simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **LWT - Food Science and Technology**, v. 50, n. 1, p. 39-44, 2013.

FU, N.; CHEN, X.D. Towards a maximal cell survival in convective thermal drying processes. **Food Res. Int.**, v. 44, p. 1127-1149, 2011.

GALDEANO, C. M.; DE LEBLANC, A., CARMUEGA, E.; WEILL, R.; PERDIGÓN, G. Mechanisms involved in the immunostimulation by probiotic fermented milk. **J Dairy Res.**, v. 76, p. 446-454, 2009.

GAO, Y.; LI, D.; LIU, S.; LIU, Y. Probiotic potential of *L. sake* C2 isolated from traditional Chinese fermented cabbage. **Eur Food Res Technol**, v. 234, p. 45–51, 2012.

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

GHANDI, A., POWELL, I.P., HOWES, T., CHEN, X.D., & ADHIKARI, B. Effect of shear rate and oxygen stresses on the survival of *Lactococcus lactis* during the atomization and drying stages of spray drying: A laboratory and pilot scale study. **Journal of Food Engineering**, v. 113, n. 2, 194–200, 2012.

GOLOWCZYC, M. A.; SILVA, J.; TEIXEIRA, P.; DE ANTONI, G. L.; ABRAHAM, A.G. Cellular injuries of spray-dried *Lactobacillus* spp. isolated from kefir and their impact on probiotic properties. **Int J Food Microbiol**, v. 144, p. 556–560, 2011.

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

GOLOWCZYC, M.; VERA, C.; SANTOS, M.; GUERRERO, C.; CARASI, P.; ILLANES, A. Use of whey permeate containing in situ synthesised galacto-oligosaccharides for the growth and preservation of *Lactobacillus plantarum*. **Journal of Dairy Research**, v. 80, p. 374-381, 2013.

GUIMARÃES, P. M.; TEIXEIRA, J. A.; DOMINGUES, L. Fermentation of lactose to bioethanol by yeasts as part of integrated solutions for the valorization of cheese whey. **Biotechnology Advances**, v. 28, p. 375-384, 2010.

HAFFNER, F. B.; PASC, A. Freeze-dried alginate-silica microparticles as carriers of probiotic bacteria in apple juice and beer. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 175–179, 2018.

HEIDEBACH, T.; FÖRST, P.; KULOZIK, U. Microencapsulation of probiotic cells for food applications. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 52, p. 291-311, 2012.

HERNÁNDEZ-ALCÁNTARA, A. M.; WACHER, C.; LLAMAS, M. G.; LÓPEZ, P.; PÉREZ-CHABELA, M. L. Probiotic properties and stress response of thermotolerant lactic acid bacteria isolated from cooked meat products. **LWT - Food Science and Technology**, v. 91, p. 249-257, 2018.

HOLZAPFEL, H. W.; HABERER, P.; GEISEN, R.; BJORKROTH, J.; SCHILLINGER, U. Taxonomy and important features of probiotic microorganisms in food and nutrition. **American Society for Clinical Nutrition**, v. 73, p. 365-373, 2001.

HUANG, S. CAUTY, C. DOLIVET, A.; LOIR, Y. L.; CHEN, X. D.; SCHUCK, P.; JAN, G. JEANTET, R. Double use of highly concentrated sweet whey to improve the biomass production and viability of spray-dried probiotic bacteria. **Journal of Functional Foods**, v. 23, p. 453-463, 2016.

HUANG, S.; MEJÉAN, S.; RABAH, H.; DOLIVET, A.; LOIR, Y. E.; CHEN, X. D.; JAN, G.; JEANTET, R.; SCHUCK, P. Double use of concentrated sweet whey for growth and spray drying of probiotics: Towards maximal viability in pilot scale spray dryer. **Journal of Food Engineering**, v. 196, p. 11-17, 2017.

HUANG, S.; RABAH, H.; JARDIN, J.; BRIARD-BION, V.; PARAYRE, S.; LOIR, Y. E.; CHEN, X. D.; SCHUCK, P.; JEANTET, R.; JAN, G. Hyperconcentrated Sweet Whey, a New Culture Medium That Enhances *Propionibacterium freudenreichii* Stress Tolerance. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 82,n. 15, p. 4641-4651, 2016.

HUDSON, E. The future of probiotics. Evolution of digestion and immune support probiotics. Chronic disease and science versus regulation Euromonitor International Global Head of Health and Wellness Research, 2016.

HUGO, A. A.; BRUNO, F.; GOLOWCZYC, M. A. Whey permeate containing galacto-oligosaccharides as a médium for biomass production and spray drying of *Lactobacillus plantarum* CIDCA 83114. **LWT - Food Science and Technology**, v. 69, p. 185-190, 2016.

IBGE - Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. **Estatística da Produção Pecuária**, 2018.

ILHA, E. C.; SILVA, T.; LORENZ, J. G.; ROCHA, G. O.; SANT'ANA, E. S. *Lactobacillus paracasei* isolated from grape sourdough: acid, bile, salt and feat tolerance after spray drying with skim milk and cheese whey. **European Food Research Technology**, v. 240, p. 977-984, 2015.

IRAVANI, S.; KORBKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products. **Journal of Food Science Technology**, v. 52, n. 8, p. 4679-4696, 2015.

JANTZEN, M.; GÖPEL, A.; BEERMANN, C. Direct spray drying and microencapsulation of probiotic *Lactobacillus reuteri* from slurry fermentation with whey. **Journal of Applied Microbiology**, v. 115, p. 1029-1036, 2013.

JARA, F.; PILOSOFF, A. M. R; Partitioning of α -lactalbumin and β -lactoglobulin in whey protein concentrate/hydroxypropylmethylcellulose aqueous two-phase systems. **Food Hydrocolloids**, v. 25, p. 374-380, 2011.

JOHANSSON, M. E. V.; JAKOBSSON, H. E.; HOLMÉN-LARSSON, J.; SCHÜTTE, A.; ERMUND, A.; RODRÍGUEZ-PIÑEIRO, A. M.; ARIKE, L.; WISING, C.; SVENSSON, F.; BÄCKHED, F.; HANSSON, G. C. Normalization of host intestinal mucus layers requires longterm microbial colonization. **Cell Host & Microbe**, v. 18, n. 5, p. 582-592, 2015.

KAILASAPATHY, K. Encapsulation technologies for functional foods and nutraceutical product development. CAB Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science. **Nutrition and Natural Resources**, v. 4, n. 6, 2009.

KASSAA, I. A.; HOBBER, D.; HAMZE, M.; CHIHIB, N. E.; DRIDER, D. Antiviral Potential of Lactic Acid Bacteria and Their Bacteriocins. **Probiotics and Antimicrobial Proteins**, v. 6, p. 177-185, 2014.

KENT, R. M.; DOHERTY, S. B. Probiotic bacteria in infant formula and follow-up formula: Microencapsulation using milk and pea proteins to improve microbiological quality. **Food Research International**, v. 64, p. 567-576, 2014.

KOBOZIEV, I.; WEBB, C. R.; FURR, K. L.; GRISHAM, M. B. Role of the enteric microbiota in intestinal homeostasis and inflammation. **Free Radic Biol Med**, v. 68, p. 122-133, 2013.

KONINGS, W. N.; KOK, J.; KUIPERS, O. P.; POOLMAN, B. Lactic acid bacteria: the bugs of the new millennium. **Current Opinion in Microbiology**, v. 3, n. 3, p. 276-282, 2000.

KNORR, D.; ANANTA, E.; VOLKERT, M. Cellular injuries and storage stability of spray-dried *Lactobacillus rhamnosus* GG. **International Dairy Journal**, v. 15, p. 399-409, 2005.

KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, n.1, p. 3-13, 2003.

LAVARI, L.; IANNIELLO, R.; PÁEZ, R.; ZOTTA, T.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J. PARENTE, E.; VINDEROLA, G. Growth of *Lactobacillus rhamnosus* 64 in whey permeate and study of the effect of mild stresses on survival to spray drying. **LWT - Food Science and Technology**, v. 63, p. 322-330, 2015.

LAVARI, L.; PÁEZ, R.; CUATRIN, A.; REINHEIMER, J.; VINDEROLA, G. Use of cheese whey for biomass production and spray drying of probiotic lactobacilli. **Journal of Dairy Research**, v. 81, p. 267-274, 2014.

LIAO, L. K.; WEI, X. Y.; GONG, X.; LI, J. H.; HUANG, T.; XIONG, T.; Microencapsulation of *Lactobacillus casei* LK-1 by spray drying related to its stability and in vitro digestion, **Food Science and Technology**, 2017.

LIBRÁN, C. M.; CASTRO, S.; LAGORON, J. M. **Encapsulation by electrospray coating atomization of probiotic strains** . **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 39, p. 216-222, p. 2017.

LIRA, H. L.; SILVA, M. C. D.; VASCONCELOS, M. R. S.; LIRA, E. L.; LOPEZ, A. M. Q. Microfiltração do soro de leite de búfala utilizando membranas cerâmicas como alternativa ao processo de pasteurização. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 29, n. 1, p. 33-37, 2009.

LIVNEY, Y. D. Milk proteins as vehicles for bioactives. **Current Opinion in Colloid and Interface Science**, v.15, p.73-83, 2010.

MACIEL, G. M.; CHAVES, K. S.; GROSSO, C. R. F.; GIGANTE, M. L. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* La-5 by spray-drying using sweet whey and skim milk as encapsulating materials. **Journal of Dairy Science**, v. 97, n. 4, p. 1991-1998, 2014.

MALARADJOU, M. A. R.; BHUNIA A. K. Modern Approaches in Probiotics. Research to Control Foodborne Pathogens. **Elsevier Inc.**; 2012.

MARTÍN, M. J., LARA-VILLOSLADA, F., RUIZ, M. A., MORALES, M. E. Microencapsulation of bacteria: A review of different technologies and their impact on the probiotic effects. **Innovative Food Science and Emerging Technologies**, v. 27, p. 15-25, 2015.

MCCONNELL, E. L.; FADDA, H. M.; BASIT, A. W. Gut instincts: explorations in intestinal physiology and drug delivery. **Int. J. Pharm.**, v. 364, p. 213-226, 2008.

MENSHUTINA, N. V.; GORDIENKO, M. G.; VOINOVSKIY, A. A.; ZBICINSKI, I. 2010. Spray drying of probiotics: Process development and scale-up. **Drying Technology**, v. 28, p. 1170–1177, 2010.

MOHAMMADI, R.; MORTAZAVIAN, A. M. Technological aspects of prebiotics in probiotic fermented milks. **Food Reviews International**, v. 27, p. 192-212, 2011.

MORTAZAVIAN, A. M.; EHSANI, M. R.; MOUSAVI, S. M.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J. Effect of refrigerated storage temperature on the viability of probiotic microorganisms in yoghurt. **Int J Dairy Technol**, v. 60, p.123-127, 2007.

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

NGUYEN, H. T.; RAZAFINDRALAMBO, H.; BLECKER, C.; N'YAPO, C.; THONART, P.; DELVIGNE, F. Stochastic exposure to sub-lethal high temperature enhances exopolysaccharides (EPS) excretion and improves *Bifidobacterium bifidum* cell survival to freeze–drying. **Biochemical Engineering Journal**, v. 88, p. 85–94, 2014.

- NIEUWLAND, M.; GEERDINK, P.; BRIER, P.; VAN DEN EIJNDEN, P. HENKET, J. T. M. M.; LANGELAAN, M. L. P.; MARTIN, A. H. **Food-grade electrospinning of proteins. Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 20, p. 269-275, 2013.
- NISIOTOU, A.; DOUROU, D.; FILIPPOUSI, M.; BANILAS, G.; TASSOU, C. *Weissella uvarum* sp. nov., isolated from wine grapes. **Int. Food Res. J.**, v. 20, p. 3885-3890, 2014.
- NUALKAEKUL, S.; LENTON, D.; COOK, M. T.; KHUTORYANSKIY, V. V.; CHARALAMPOPOULOS, D. Chitosan coated alginate beads for the survival of microencapsulated *Lactobacillus plantarum* in pomegranate juice. **Carbohydrate Polymers**, v. 90, p. 1281– 1287, 2012.
- NUALKAEKUL, S.; SALMERON, I.; CHARALAMPOPOULOS, D. Investigation of the factors influencing the survival of *Bifidobacterium longum* in model acidic solutions and fruit juices. **Food Chemistry**, v. 129, p. 1037–1044, 2011.
- NURAIIDA, L. A review: Health promoting lactic acid bacteria in traditional Indonesian fermented foods. *Food Science and Human Wellness*, v. 4, p. 47-55, 2015.
- OAKLEY, D. E. Produce uniform particles by spray drying. **Chemical Engineering Progress**, v. 93, p. 48-54, 1997.
- OLIVEIRA, R. A.; KOMESU, A.; ROSSELL, C. E. V.; MACIEL, R. Challenges and opportunities in lactic acid bioprocess design - From economic to production aspects. **Biochemical Engineering Journal**, v. 133, p. 219-239, 2018.
- PAEZ, R.; LAVARI, L.; VINDEROLA, G.; AUDERO, G.; CUATRIN, A.; ZARITZKY, N.; RENHEIMER, J. Effect of heat treatment and spray drying on lactobacilli viability and resistance to simulated gastrointestinal digestion. **Food Research International**, v. 48, n. 2, p. 748-754, 2012.
- PATEL, A. K.; SINGHANIA, R. R.; PANDEY, A.; CHINCHOLKAR, S. B. Probiotic bile salt hydrolase: current developments and perspectives. **Applied Biochemistry and Biotechnology**, v. 162, n. 1, p. 166-180, 2010.
- PESCUMA, M.; HEBERT, E.M.; BRU, E.; DE VALDEZ, G.F.; MOZZI, F. Diversity in growth and protein degradation by dairy relevant lactic acid bacteria species in reconstituted whey. **J Dairy Res**, v. 79, p. 201–208, 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.
- PERDANA, J.; FOX, M. B.; SIWEI, C.; BOOM, R. M.; SCHUTYSER, M. A. I. Interactions between formulation and spray drying conditions related to survival of *Lactobacillus plantarum* WCFS1. **Food Res. Int.**, v. 56, p. 9-17, 2014.

PIENIZ, S.; DE MOURA, T. M.; VAZ CASSANEGO, A. P.; ANDREAZZA, R.; GUEDES FRAZZON, A. P.; CAMARGO, F. A. O.; BRANDELLI, A. Evaluation of resistance genes and virulence factors in a food isolated *Enterococcus durans* with potential probiotic effect. **Food Control**, v. 51, p. 49-54, 2015.

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BENEDETTI, S.; MURAKAMI, F. S.; PETRUS, J. C. C.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMBONI, R. D. M. C. Potential use of whey concentrate and prebiotics as carrier agents to protect *Bifidobacterium*-BB-12 microencapsulated by spray drying. **Food Research International**, v. 67, p. 400-408, 2015a.

PINTO, S. S.; VERRUCK, S.; VIEIRA, C. R. W.; PRUDÊNCIO, E. S.; AMANTE, E. R.; AMBONI, R. D. M. C. Influence of microencapsulation with sweet whey and prebiotics on the survival of *Bifidobacterium*-BB-12 under simulated gastrointestinal conditions and heat treatments. **Food Science and Technology**, v. 64, p. 1004-1009, 2015b.

PODDAR, D.; DAS, S.; JONES, G.; PALMER, J.; JAMESON, G. B.; HAVERKAMP, R. G. Stability of probiotic *Lactobacillus paracasei* during storage as affected by the drying method. **International Dairy Journal**, v. 39, p. 1-7, 2014.

PRAZERES, A. R.; CARVALHO, F.; RIVAS, J. J. Cheese whey management: a review. **Journal of Environmental Management**, v. 110, p. 48-68, 2012.

RANADHEERA, C. S.; EVANS, C. A.; ADAMS, M. C.; BAINES, S. K. Effect of dairy probiotic combinations on *in vitro* gastrointestinal tolerance, intestinal epithelial cell adhesion and cytokine secretion. **Journal of Functional Foods**, v. 8, p.18-25, 2014.

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

RAO, S.; IHARA, Y.; SUKEGAWA, S.; ARAKAWA, F. FUJIMURA, T.; MURAKAMI, H.; MORIMATSU, F. Characterization of probiotic properties of *Enterococcus faecium* NHRD IHARA isolated from porcine faeces. **Bioscience Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, n. 9, p. 1967-1969, 2013.

RATHORE, S.; DESAI, P. M.; LIEW, C. V.; CHAN, L. W.; HENG, P. W. S. Microencapsulation of microbial cells. **Journal of Food Engineering**, v. 116, p. 369-381, 2013.

REIS, S. A.; CONCEIÇÃO, L. L.; SIQUEIRA, N. P.; ROSA, D. D.; SILVA, L.L.; PALUZIO, M. C. G. Review of the mechanisms of probiotic actions in the prevention of colorectal cancer. **Nutrition Research**, v. 37, p. 1-19, 2017.

RIVEROS, B.; FERRER, B.; BÓRQUEZ, R. Spray Drying of a Vaginal Probiotic Strain of *Lactobacillus acidophilus*. **Drying Technology: An International Journal**, v. 27, n. 1, p. 123-132, 2009.

RODILES-LÓPEZ, J. O.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; FOSADO-QUIROZ, R. E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.;

HERNÁNDEZ-SÁNCHEZ, H. Effect of high hydrostatic pressure on bovine [alpha]-lactalbumin functional properties. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 363-370, 2008.

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.

ROKKA, S.; RANTAMAKI, P. Protecting probiotic bacteria by microencapsulation: challenges for industrial applications. **European Food Research and Technology**, v. 231, n. 1, 1-12, 2010.

ROMÁM, A.; WANG, J.; CSANÁDI, J.; HODÚR, C.; VATAI, G. Experimental investigation of the sweet whey concentration by nanofiltration. **Food Bioprocess Technology**, v.4, p. 702-709, 2011

ROSA, P. R.; SÁ, E. M. COUTINHO FILHO, U.; CARDOSO, V. L. Immobilized *Lactobacillus acidophilus* produced from whey and alginate. **Brazilian Journal of chemical Engineering**, v. 30, n. 02, p. 267-276, 2013.

SAARELA, M.; MOGENSEN, G.; FONDÉN, R.; MÄTTÖ, J.; MATTILA-SANDHOLM, T. Probiotic bacteria: safety, functional and technological properties. **Journal of Biotechnology**, v. 84, p.197-215, 2000.

SALMINEN, S.; NYBOM, S.; MERILUOTO, J.; COLLADO, C.; VESTERLUN, S.; EL-NEZAMI, H. Interaction of probiotics and pathogens-benefits to human health? **Current Opinion in Biotechnology**, v. 21, n. 2, p. 157-167, 2010.

SÁNCHEZ, J.; HERNÁNDEZ, E.; AULEDA, J.M.; RAVENTÓS, M. Freeze concentration of whey in a falling-film based pilot plant: process and characterization. **Journal of Food Engineering**, v.103, p.147-155, 2011.

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.

SARKAR, A.; MANDAL, S. Bifidobacteria – Insight into clinical outcomes and mechanisms of probiotic action. **Microbiological Research**, v. 192, p. 159-171, 2016.

SCHELL, D.; BEERMANN, C. Fluidized bed microencapsulation of *Lactobacillus reuteri* with sweet whey and shellac for improved acid resistance and in-vitro gastrointestinal survival. **Food Research International**, v. 62, p. 308-314, 2014.

SCHUCK, P.; DOLIVET, A.; MEJEAN, S.; HERVE, C.; JEANTET, R. Spray drying of dairy bacteria: new opportunities to improve the viability of bacteria powders. **Int. Dairy J.**, v. 31, n. 01, p. 12-17, 2013.

SHEEHAN, V. M.; ROSS, P.; FITZGERALD, G. F. Assessing the acid tolerance and the technological robustness of probiotic cultures for fortification in fruit juices. **Innovative Food Science & Emerging Technologies**, v. 8, n. 2, p. 279–284, 2007.

SHI, L. E.; LI, Z. H.; XU, M.; CHEN, H. M.; ZHANG, Z. L.; TANG, Z. X. Encapsulation of probiotic *Lactobacillus bulgaricus* in alginate–milk microspheres and evaluation of the survival in simulated gastrointestinal conditions. **Journal of Food Engineering**, v. 117, p. 99-104, 2013a.

SHI, L. E.; LI, Z. H.; ZHANG, Z. L.; ZHANG, T. T.; YU, W. M.; ZHOU, M. L.; TANG, Z. X. Encapsulation of *Lactobacillus bulgaricus* in carrageenan-locust bean gum coated milk microspheres with double layer structure. **Food Science and Technology**, v. 54, p. 147-151, 2013b.

SILVA, J.; FREIXO, R.; GIBBS, P.; TEIXEIRA, P. Spray-drying for the production of dried cultures. **International Journal of Dairy Technology**, v. 64, n. 3, p. 321-335, 2013.

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

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.

SOLANKI, H. M.; PAWAR, D. D.; SHAH, D. A.; PRAJAPATI, V. D.; JANI, G. K.; MULLA, A. M.; THAKAR, P. M. Development of microencapsulation delivery system for long-term preservation of probiotics as biotherapeutics agent. **BioMed Research International**, v. 2013, p. 21, 2013.

SOUKOULIS, C.; BEHBOUDI-JOBBEHDAR, S.; YONEKURA, L.; PARMENTER, C.; FISK, I. Impact of milk protein type on the viability and storage stability of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 using spray drying. **Food and Bioprocess Technology**, v. 7, n. 5, p. 1255-1268, 2014.

SOUZA, R. R.; BERGAMASCO, R.; DA COSTA, S. C.; FENG, X.; FARIA, S. H. B.; GIMENES, M. L. Recovery and purification of lactose from whey. **Chemical Engineering and Processing: Process Intensification**, v. 49, n. 11, p. 1137-1143, 2010.

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.

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, n. 10, p. 1950–1958, 2009.

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

VINDEROLA, G.; BINETTI, A.; BURNS, P.; REINHEIMER, J. Cell Viability and Functionality of Probiotic Bacteria in Dairy Products. **Frontiers in Microbiology**, v. 2, n. 70, p. 1-6, 2011.

VINDEROLA, G. Disponível em: <<http://negociosdaterra.com.br/alimentos-probioticos-regionais-podem-apresentar-vantagens-para-o-consumidor/>> Acesso em: 12 de novembro de 2016.

WASUPALI, G. K.; VERMA, D. Polysaccharides as biomaterials. **Fundamental Biomaterials: Polymers**, p. 37-70, 2018.

YING, Y. D.; PHOON, M. C.; SANGUANSRI, L.; WEERAKKODY, R.; BURGAR, I. M. A. Microencapsulated *Lactobacillus rhamnosus* GG powders: relationship of powder physical properties to probiotic survival during storage. **Journal of Food Science**, v. 75, p. 588-595, 2010.

YONEKURA, L.; SUN, H.; SOUKOULIS, C.; FISK, I. Microencapsulation of *Lactobacillus acidophilus* NCIMB 701748 in matrices containing soluble fibre by spray drying: Technological characterization, storage stability and survival after in vitro digestion. **Journal of Functional Foods**, v. 6, p. 205-214, 2014.

ZAFAR, S. B.; SIDDIQUI, N. N.; SHAHID, F.; QADER, S. A. U.; AMAN, A. **Bioprospecting of indigenous resources for the exploration of exopolysaccharide producing lactic acid bacteria. Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, v. 16, p. 17-22, 2018.

ZHU, Y. H.; LI, X. Q.; ZHANG, W.; ZHOU, D.; LIU, H.-Y.; WANG, J.F. Dose-dependent effects of *Lactobacillus rhamnosus* on serum Interleukin-17 production and intestinal T-cell responses in pigs challenged with *Escherichia coli*. **Appl. Environ. Microbiol.**, v. 80, 1787-1798, 2014.

ZUIDAM, N.J.; SHIMONI, E. **Overview of microencapsulates for use in food products or processes and methods to take them.** In: Encapsulation Technologies for Active Food Ingredients and Food Processing. Springer-Verlag, New York Inc., p. 3–29, 2009.

ZUIDAM, N. J.; SHIMONI, E. **Encapsulation technologies for active food ingredients and food processing.** New York, U. S. A.: Springer, 2010.