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

TOLERÂNCIA ÀS CONDIÇÕES ADVERSAS DE *Lactobacillus* spp. MICROENCAPSULADOS POR EXTRUSÃO COM TECNOLOGIA DE VIBRAÇÃO

Michele Fangmeier

Lajeado, fevereiro de 2019

Michele Fangmeier

TOLERÂNCIA ÀS CONDIÇÕES ADVERSAS DE *Lactobacillus* spp. MICROENCAPSULADOS POR EXTRUSÃO COM TECNOLOGIA DE VIBRAÇÃO

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

Orientadora: Prof.ª Dra. Claucia F. V. de Souza
Co-orientadora: Prof.ª Dra. Mônica Jachetti Maciel

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001

Lajeado, fevereiro de 2019

AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, professora Dra. Claucia Fernanda Volken de Souza, por todos os ensinamentos transmitidos desde a graduação, pela confiança depositada e disposição. Meu eterno agradecimento por todo o valioso conhecimento adquirido.

A minha coorientadora, professor Dra. Mônica Jachetti Maciel, pelo tempo dedicado e conhecimento transmitido para engrandecer o meu trabalho.

Aos colegas e bolsistas do laboratório de Biotecnologia, Adriano, Daniele, Melissa, João e Amanda pela ajuda no manuseio dos equipamentos, preparação e esterilização de materiais, bem como ajuda nos ensaio analíticos. Aos colegas do laboratório de biotecnologia por toda a ajuda prestada.

A minha amiga e colega Grasciele, por ter enfrentado junto comigo mais esse desafio, pelas conversas e risadas, e pelos auxílios no laboratório, minha gratidão.

A Martha do Tecnovates, pela ajuda nos procedimentos de análise dos aminoácidos e caracterização das micropartículas, pela paciência e disponibilidade.

Aos meus pais, Elisete e Irno, meu irmão Luis, e minhas cunhadas Elenice e Jenniffer, por estarem ao meu lado nos momentos difíceis e felizes, pelas inúmeras caronas, pela força e motivação transmitidas, concretizando comigo mais um sonho.

Ao meu marido Henrique, que compartilhou comigo todos os momentos do mestrado, sempre me dando forças para seguir. Obrigada pela paciência, pelo companheirismo e por acreditar em mim. Obrigada pela pessoa maravilhosa que és.

Aos meus amigos e colegas de trabalho, que me deram força nessa fase da minha vida, que tiveram paciência para entender os longos dias ausentes estudando e por me escutarem por muitas vezes, estando ao meu lado sempre.

À Launer Química por ter cedido as bactérias láctias de sua pesquisa para o desenvolvimento deste estudo, o meu muito obrigado.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001. Minha gratidão à Tecnovates, Universidade do Vale do Taquari - Univates e Secretaria do Desenvolvimento Econômico, Ciência e Tecnologia (SDECT) do Rio Grande do Sul por seus apoios financeiros.

RESUMO

As bactérias lácticas são responsáveis pela fermentação de vários produtos na indústria alimentícia, podendo ser classificadas como probióticas, que propiciam benefícios à saúde do hospedeiro quando ingeridas em quantidades adequadas. Porém, a viabilidade das bactérias probióticas pode ter interferência durante o processamento do alimento, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal humano (TGI). Logo, a sobrevivência destas células pode ser favorecida por meio da técnica de microencapsulamento, a qual consiste na sua incorporação em matrizes que as tornam mais resistentes, protegendo estes microrganismos. Como material de parede, esta técnica pode-se utilizar soro de queijo e permeado de soro, os quais estão disponíveis nas indústrias a um baixo custo, pois frequentemente são considerados resíduos. Portanto, o objetivo deste estudo foi avaliar o microencapsulamento de *Lactobacillus* spp. por meio de extrusão com tecnologia de vibração, utilizando como material de parede diferentes tipos de soros lácteos, em associação ao amido e alginato de sódio. Foram utilizadas as cepas *Lactobacillus paracasei* ML 33 e *Lactobacillus pentosus* ML 82, ambas isoladas de amostras de leite *in natura* do Vale do Taquari, e o microrganismo *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014. Como agentes encapsulantes foram avaliados: o soro de queijo (SBO), o permeado de soro (PBO) e o soro de ricota (RBO), todos de origem bovina, e soro de queijo bubalino (SBU). Entre os soros lácteos avaliados, o SBO e o SBU, devido aos teores mais elevados de proteínas, conferiram maior proteção aos microrganismos encapsulados. Nas formulações encapsulantes, observou-se que a origem do soro (bovino ou bubalino) influenciou nos parâmetros de viscosidade e textura. As micropartículas obtidas, com os diferentes materiais de parede, apresentaram formato esférico com parede contínua, com diâmetro médio de 13,00 $\pm$ 0,02 μm, conforme determinação realizada no microscópio eletrônico de varredura (MEV). A viabilidade celular média após processo de encapsulamento, entre todos os encapsulados, foi de 8,8 log UFC.mL^{-1}, indicando que o uso dos diferentes soros lácteos proporcionou efeito protetor aos microrganismos, principalmente os SBO e SBU. Os encapsulados mantiveram-se viáveis (acima de 7 log UFC.mL^{-1}) no período de 60 dias de armazenamento à 4 ºC, com exceção das micropartículas de RBO e PBO com *Lactobacillus pentosus* ML 82, sendo que as combinações amido e alginato de sódio com SBO e SBU, para as três bactérias lácticas avaliadas, mostraram-se mais eficientes na proteção dos microrganismos. Os resultados da resistência ao TGI simulado evidenciaram que, no primeiro dia de armazenamento, os materiais de parede SBO e SBU, para todos os microrganismos, conferiram taxa média de sobrevivência de 94,44 e 96,01%, e viabilidade média de 9,13 e 8,74 log UFC.mL^{-1}, respectivamente. E *L. paracasei* ML 33 apresentou maior resistência ao TGI simulado, com 92,50% e 87,10% após 30 e 60 dias de armazenamento, respectivamente. Perante avaliação da resistência ao *stress* osmótico a taxa média de sobrevivência de todos os encapsulados foi de 93,70% após 24 horas de incubação a 4 °C para ambas as soluções (sal e sacarose), com exceção das micropartículas de RBO com *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, e RBO e PBO com *Lactobacillus pentosus* ML 82, que não apresentaram viabilidade a partir de 12 horas de incubação para ambas as soluções. Elaborou-se um leite fermentado com *Lactobacillus paracasei* ML 33 livre e encapsulado, por ter apresentado melhor desempenho nas avaliações, e com uma cultura láctica comercial,

sendo as viabilidades mais elevadas observadas para as formulações de leite fermentado com micropartículas (LF-ENC) (7,93 log UFC.mL^{-1}) e leite fermentado com bactérias livres (LF-LIVRE) (7,81 log UFC.mL^{-1}), que apresentaram os teores mais elevados de sólidos (27,80% e 28,83%, respectivamente). A formulação LF-ENC também apresentou os valores mais elevados de viabilidade frente à resistência ao TGI, o que evidência a proteção efetiva conferida pela micropartícula ao microrganismo, perante condições adversas. Sendo assim, conclui-se que os soros lácteos proporcionam proteção aos microrganismos, juntamente com o amido e o alginato de sódio, tendo o soro de queijo bovino e bubalino maior efetividade, em comparação ao soro de ricota e permeado de soro. Logo, o processo de extrusão com tecnologia de vibração é indicado para proteção de probióticos.

Palavras-chave: Microrganismos. Probióticos. Microencapsulamento. Micropartícula. Soro de queijo. Permeado de soro. Soro de queijo de ricota. Soro de queijo de búfalo. Leite fermentado.

ABSTRACT

Lactic acid bacteria are responsible for the fermentation of several products in the food industry, and can be classified as probiotic, which provides benefits to the health of the host when ingested in adequate quantities. However, the viability of probiotic bacteria may interfere during food processing, storage and passage through the human gastrointestinal tract (TGI). Therefore, the survival of these cells can be favored by means of the microencapsulation technique, which consists in their incorporation in matrices that make them more resistant, protecting the probiotic microorganisms. As wall material for this technique one can use whey cheese and whey permeate, which are available in the industries at a low cost, as they are often considered as waste. Therefore, the objective of this study was to evaluate the microencapsulation of *Lactobacillus* spp. by means of extrusion with vibration technology, using as wall material different types of whey cheese in association with sodium starch and alginate. The strains *Lactobacillus paracasei* ML 33 and *Lactobacillus pentosus* ML 82, both isolated from samples of fresh milk from the Vale do Taquari, and the *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014 were used as encapsulating agents: cheese whey (SBO), whey permeate (PBO) and ricotta cheese whey (RBO), all of bovine origin, and buffalo cheese whey (SBU). Among the whey evaluated, SBO and SBU, due to the higher protein levels, gave a greater protection to the encapsulated microorganisms. In the encapsulating formulations, it was observed that the origin of the whey (bovine or buffalo) influenced the parameters of viscosity and texture. The microparticles obtained with the different wall materials showed a spherical shape with a continuous wall, with a mean diameter of 13,00 ± 0,02 μm, as determined by the scanning electron microscope (MEV). The mean cell viability after the encapsulation process was 8,8 UFC.mL^{-1}, indicating that the use of the different whey cheese provided a protective effect to the microorganisms, mainly SBO and SBU. The encapsulates remained viable (above 7 log UFC.mL^{-1}) during the 60 day storage period at 4 ºC, except for the microparticles of RBO and PBO with *Lactobacillus pentosus* ML 82, with the combinations of sodium starch and alginate with SBO and SBU, for the three lactic bacteria evaluated, were shown to be more efficient in the protection of microorganisms. The results of the simulated TGI resistance showed that, on the first day of storage, the SBO and SBU wall materials, for all microorganisms, gave a mean survival rate of 94,44 and 96,01%, and mean viability of 9,13 and 8,74 log UFC.mL^{-1}, respectively. E *L. paracasei* ML 33 presented higher resistance to simulated TGI, with 92,50% and 87,10% after 30 and 60 days of storage, respectively. After evaluating the resistance to osmotic stress the average survival rate of all the encapsulated was 93,70% after 24 hours of incubation at 4 °C for both solutions (salt and sucrose), except for the RBO microparticles with *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, and RBO and PBO with *Lactobacillus pentosus* ML 82, which were not viable after 12 hours of incubation for both solutions. A fermented milk with *Lactobacillus paracasei* ML 33 free and encapsulated, because it presented better performance in the evaluations, with a commercial lactic acid culture was elaborated and the highest viability was observed for the fomulation of fermented milk with microparticles (LF-ENC) (7,93 log UFC.mL^{-1}) and fermented milk with free bacteria (LF-LIVRE) (7,81 log UFC.mL^{-1}), which had the highest solids content (27,80% and 28,83%, respectively). The LF-ENC formulation also showed the highest values of roadway resistance to TGI, which evidences the effective protection

conferred by the microparticle to the microorganism, under adverse conditions. Therefore, it is concluded that the whey cheese provides protection to the microorganisms, together with the starch and the sodium alginate, and the bovine and buffalo cheese whey is more effective when compared to the ricotta cheese whey and whey permeate. Therefore, the extrusion process with vibration technology is indicated for protection of probiotics.

Keywords: Microorganisms. Probiotics. Microencapsulation. Microparticle. Cheese whey. Whey Permeate. Ricotta cheese whey. Buffalo cheese whey. Fermented milk.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Curva de crescimento das células viáveis dos *Lactobacillus* spp (log UFC.mL^{-1}) selecionados para encapsulamento.....48

Figura 2 - Microfotografias de MEV das micropartículas obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, para cada formulação encapsulante testada.....50

Figura 3 - Viabilidade das micropartículas de *Lactobacillus* spp. (log UFC.mL^{-1}) após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento a 4 °C.....57

Figura 4 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0 dias de armazenamento.....60

Figura 5 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 30 dias de armazenamento.....61

Figura 6 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 60 dias de armazenamento.....62

Figura 7 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 4 °C.....67

Figura 8 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 37 °C.....68

Figura 9 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 50 °C.....69

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Micropartículas e suas respectivas formulações encapsulantes.....32

Tabela 2 - Condições avaliadas para rompimento das micropartículas SBO-8014.....33

Tabela 3 - Caracterização físico-química do soro de queijo de leite bovino, soro de queijo de leite bubalino, soro de ricota e permeado de soro de leite bovino utilizados como um dos materiais de parede na produção das micropartículas.....42

Tabela 4 - Composição de aminoácidos presente no soro de queijo de leite bovino, soro de queijo de leite bubalino, soro de queijo de ricota e permeado de soro de leite bovino utilizados como um dos materiais de parede na produção das micropartículas.....44

Tabela 5 - Caracterização físico-química e reológica das formulações encapsulantes utilizadas na produção das micropartículas.....46

Tabela 6 - Densidade óptica das células viáveis dos *Lactobacillus* spp. selecionados para o encapsulamento.....48

Tabela 7 - Testes para rompimento da micropartícula SBO-8014, com suas respectivas variações e resultados.....53

Tabela 8 - Viabilidade dos lactobacilos antes e após processo de encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando diferentes soros como material encapsulante.....54

Tabela 9 - Taxa média de sobrevivência (%) para viabilidade após processo de encapsulamento e TGI simulado após 60 dias de armazenamento dos lactobacilos encapsulados utilizando diferentes soros lácteos como material encapsulante, visando determinar as micropartículas utilizadas na avaliação da capacidade de acidificação (*).....72

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de acidificação de cepas livres e encapsuladas, em leite fermentado à 37 e 42 ° C até atingir pH de 4,6.....73

Tabela 11 - Caracterização físico-química e reológica dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial.....75

Tabela 12 - Resultados microbiológicos dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial.....77

Tabela 13 - Resultados da sobrevivência ao TGI das bactérias lácticas presentes nas formulações dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial.....78

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO 14

2 OBJETIVOS 16

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA 17

3.1 Bactérias lácticas 17

3.2 Probióticos 18

3.3 Encapsulamento 19

3.3.1 Encapsulamento por Extrusão com Tecnologia de Vibração 20

3.4 Materiais de parede para encapsulamento 22

3.4.1 Amido 22

3.4.2 Alginato de sódio 23

3.4.3 Proteínas lácteas 24

3.5 Leite Fermentado 26

4 MATERIAL E MÉTODOS 28

4.1 Materiais encapsulantes 28

4.1.1 Análise físico-química dos materiais encapsulantes 28

4.1.2 Análises físico-químicas e reológicas das formulações encapsulantes 29

4.1 Microrganismos e condições de cultivo 30

4.2 Curvas de crescimento das bactérias lácticas 31

4.3 Encapsulamento por meio de extrusão com tecnologia de vibração 31

4.4 Testes para determinação das condições de rompimento das micropartículas 32

4.5 Avaliação do encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração 34

4.5.1 Caracterização morfológica das micropartículas 34

4.5.2 Viabilidade dos microrganismos ao processo de encapsulamento 34

4.5.3 Sobrevivência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao armazenamento 35
4.5.4 Sobrevivência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao trato gastrointestinal simulado (TGI) 35
4.5.5 Avaliação da resistência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao stress osmótico 36
4.5.6 Avaliação do potencial de acidificação dos microrganismos encapsulados e não encapsulados 36
4.6 Produção de formulações de leite fermentado com microrganismo encapsulado, não encapsulado e cultura láctica comercial 37
4.6.1 Elaboração do leite fermentado 37
4.6.2 Avaliações físico-químicas e reológicas dos leites fermentados 38
4.6.3 Avaliação microbiológica dos leites fermentados 39
4.6.4 Avaliação da resistência ao TGI simulado das bactérias lácticas dos leites fermentados 39
4.7 Análise estatística 40
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO 41
5.1 Caracterização físico-química dos materiais encapsulantes 41
5.2 Caracterização físico-química e reológica das formulações encapsulantes 45
5.3 Curva de crescimento das bactérias lácticas utilizados no encapsulamento 47
5.4 Caracterização das micropartículas 49
5.5 Determinação das condições para rompimento das micropartículas 52
5.6 Viabilidade dos microrganismos encapsulados após o processo de encapsulamento 54
5.7 Sobrevivência dos encapsulados ao longo do armazenamento 56
5.8 Sobrevivência dos encapsulados e não encapsulados ao trato gastrointestinal simulado (TGI) 59
5.9 Resistência dos encapsulados e não encapsulados ao *stress* osmótico 66
5.10 Potencial de acidificação das micropartículas de bactérias lácticas 72
5.11 Leite fermentado produzido com bactérias lácticas encapsuladas, não encapsuladas e cultura láctica comercial 75
5.11.1 Resultados físico-químicos e reológicos dos leites fermentados 75

5.11.2 Resultados microbiológicos e de resistência ao TGI das bactérias lácticas presentes nas formulações de leite fermentado 76

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS 80

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 82

1 INTRODUÇÃO

Os alimentos funcionais, além do valor nutricional, tem o intuito de promover a saúde, sendo de grande interesse dos consumidores atuais. Conforme a Resolução n° 2 de 07 de janeiro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) (BRASIL, 2002), os probióticos são microrganismos vivos capazes de promover o equilíbrio microbiano, produzindo efeitos benéficos à saúde dos indivíduos, podendo ser incorporados como suplementos na dieta (REIG; ANESTO, 2002).

Um dos principais grupos de microrganismos considerados probióticos são as bactérias ácido lácticas (BAL), as quais conduzem a fermentação ácido-láctica e produzem enzimas que transformam os nutrientes do leite e seus derivados, gerando compostos sensorialmente desejáveis. Segundo Vinderola (2000) o uso de probióticos endógenos, do local onde foram isolados, apresentam efeitos ainda melhores, pois estão habituados ao ecossistema intestinal das pessoas, além de estarem adaptados aos alimentos que fazem parte da região. Portanto, utilizar bactérias encontradas em uma determinada localidade, facilita a sua incorporação na rotina alimentar e propicia o desenvolvimento de novos produtos. Neste estudo, utilizou-se *Lactobacillus paracasei* ML 33 e *Lactobacillus pentosus* ML 82, ambos isolados no Vale do Taquari – RS.

Entretanto, o desafio está em manter as propriedades probióticas e a viabilidade celular destes microrganismos após o processamento industrial, transporte, armazenamento e passagem pelo trato gastrointestinal (WÜRTH et al., 2015; MOURA et al., 2018). Neste intuito, a indústria alimentícia, juntamente com pesquisadores, tenta minimizar este tipo de problema, empregando técnicas de microencapsulamento (SANDHOLM et al., 2002), que podem ser definidas como o processo de revestimento de materiais, tais como os microrganismos, por meio de uma matriz polimérica, formando microesferas. Esta técnica proporciona a melhoria da resistência às condições adversas, permitindo sua utilização em diversos produtos (O'RIORDAN et al., 2001; KAILASAPATHY, 2005). Portanto, as

micropartículas são constituídas por uma membrana semipermeável, esférica, fina e resistente, que envolve um centro sólido ou líquido, com diferentes diâmetros (ANAL; SINGH, 2007).

Entre as técnicas, o encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração vem se mostrando eficiente e reprodutível para a proteção e estabilidade de microrganismos (SEMBA; TRUSEK-HOLOWNIA, 2017). É um processo simples e de baixo custo, pois consiste na mistura do probiótico com o material encapsulante, que ao passar pelo orifício de um bico injetor, no qual é aplicada uma frequência vibratória definida, resulta na formação de gotas, as quais são imediatamente solidificadas em cápsulas por meio de um processo físico ou químico (HEIDEBACH et al., 2012). A tecnologia de vibração, empregada neste método, baseia-se no princípio de dissolução do jato laminar por aplicação de uma frequência vibratória usando amplitudes definidas para extrusão. Além dos bons resultados quanto a sua eficiência, esta técnica tem levado a produção de micropartículas regulares e homogêneas, sendo atrativa devido à ausência de uso de solventes e aquecimento (DE VOS et al., 2010; WHELEHAN; MARISON, 2011; MARESCA et al., 2016).

Diversos materiais de grau alimentício estão associados ao encapsulamento de microrganismos, os quais atuam de forma estruturalmente diferente, variando assim sua capacidade de proteção (JAIN et al., 2016; FATHI et al., 2017). A eficácia de qualquer material de revestimento depende da sua capacidade de formar cápsulas e da resistência dessas estruturas, pois esse material deve preservar o núcleo das condições de processamento, armazenamento e gastrointestinais (DE SOUZA SIMÕES et al., 2017). Neste contexto, o presente estudo propõe para uso, como material de parede, um subproduto da indústria de laticínios, o soro de queijo, incluindo o soro de ricota e permeado de soro de queijo, o qual possui lipídios específicos, vitaminas, minerais e lactose, e têm sido amplamente estudados por possuir proteínas funcionais e peptídeos com perfis de aminoácidos distintos (SMITHERS, 2008). Apesar do valor nutricional atrativo destes subprodutos, muitas indústrias tratam-os como resíduos, gerando impactos ambientais expressivos quando não tratados de forma adequada (APPELS et al., 2008). Portanto, a utilização de soros de queijo e permeado de soro como materiais de parede para microencapsulamento de probióticos é uma possibilidade atrativa, devido ao baixo custo e fácil disponibilidade, bem como posterior aplicação das micropartículas em alimentos, como por exemplo, produtos lácteos (PINTO et al., 2015).

2 OBJETIVOS

O objetivo geral deste estudo foi avaliar o encapsulamento de *Lactobacillus* spp. por extrusão com tecnologia de vibração utilizando como materiais de parede diferentes tipos de soros lácteos, em associação ao amido e alginato de sódio.

Os objetivos específicos foram:

– Avaliar como agentes encapsulantes no processo de extrusão com tecnologia de vibração: o soro de queijo, o permeado de soro e o soro de ricota, de origem bovina, e o soro de queijo bubalino, todos em associação ao amido e alginato de sódio;

– Analisar físico-quimicamente os materiais de parede e as formulações encapsulantes que foram utilizadas no processo de encapsulamento;

–Estabelecer a curva de crescimento dos microrganismos utilizados no processo de encapsulamento;

– Caracterizar as micropartículas obtidas após o processo de encapsulamento, quanto à morfologia e tamanho;

– Avaliar a viabilidade dos *Lactobacillus* spp. após o processo de encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração com os diferentes materiais de parede;

– Analisar a sobrevivência das micropartículas de *Lactobacillus* spp. encapsulados quanto ao armazenamento, bem como estimar a sua sobrevivência sob condições simuladas do trato gastrointestinal humano, determinar a resistência ao *stress* osmótico e avaliar o potencial de acidificação dos mesmos;

– Desenvolver formulações de leite fermentado, com o microrganismo encapsulado que apresentou o melhor desempenho, e analisá-las por meio de parâmetros físico-químicos e microbiológicos.

3 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1 Bactérias lácticas

As bactérias lácticas (BAL), responsáveis pela fermentação láctica, são potenciais culturas iniciadoras, capazes de conduzir a fermentação ácido-láctica, ou são culturas probióticas, que propiciam benefícios à saúde do hospedeiro (CARR et al., 2002). São microrganismos Gram-positivos, não formadores de esporos e que crescem geralmente sob condições microaeróbias ou estritamente anaeróbicas. Podem ser classificadas pelo produto final de sua fermentação, sendo as homofermentativas produtoras de ácido lático, e as heterofermentativas, produtoras de ácido lático, dióxido de carbono, ácido acético e etanol (CARR et al., 2002).

Conforme Franz et al. (2003), a pesquisa e a utilização de bactérias endógenas do local de origem, caracterizam um potencial biotecnológico para uso industrial. Estas bactérias fazem parte do habitat intestinal das pessoas da região, viabilizando assim a elaboração de produtos com uma espécie representativa do local, conferindo características sensoriais diferenciadas e endêmicas. Além disso, as bactérias endógenas também possuem propriedades importantes relativas à insensibilidade/ resistência ao ataque de bacteriófagos (BERESFORD, 2001), que são vírus intracelulares exclusivos de bactérias (HAGENS; OFFERHAUS, 2008), e a sua infecção na indústria de produtos fermentados pode ocasionar a diminuição da capacidade de acidificação das culturas lácticas, resultando em problemas como a ausência da fermentação e má dessoragem, ocasionando substanciais perdas econômicas (QUIBERONI et al., 2003; GUGLIELMOTTI et al., 2009).

Dentre as BAL, destacam-se os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* como microrganismos probióticos, os quais atuam em substratos que possuem glicídios, principalmente a lactose, tais como o leite e soro de queijo (SILVA; STAMFORD, 2000; O'SULLIVAN, 2006). Os *Lactobacillus* spp. se desenvolvem com o aumento do teor de ácido

láctico, devido a fermentação da lactose, e são proteolíticos, pois obtêm aminoácidos a partir da caseína (glicina, histidina, valina). Sua condição ótima para multiplicação é em temperaturas de 35-40 ºC e pH de 5,5-6,0, utilizando como nutrientes carboidratos, proteínas e os respectivos produtos de degradação, vitaminas do complexo B, derivados dos ácidos nucléicos e minerais (NOGUEIRA, GONÇALVEZ, 2011).

3.2 Probióticos

As BAL podem ser classificadas como probióticas, sendo suas propriedades relacionadas com a capacidade de adesão ao tecido do intestino, requisito importante para sua subsequente colonização (MOSILHEY, 2003). A indústria de alimentos incorpora microrganismos probióticos em alimentos classificados como funcionais, que são aqueles considerados como convencionais e consumidos no cotidiano como parte da dieta, exercendo efeitos benéficos à saúde, além do potencial nutritivo, melhorando o bem-estar e a qualidade de vida, podendo ainda reduzir os riscos de doenças (EL SOHAIMY, 2012; GHOSH et al., 2014). Porém, para exercer esta funcionalidade, os microrganismos devem estar presentes em concentrações maiores que 10^6 UFC.mL^{-1} ou g^{-1} (FAO/WHO, 2006), viabilizando a sua chegada ao cólon humano e subsequente colonização (WIELE et al., 2004). Para tanto, os probióticos precisam sobreviver ao ecossistema gastrointestinal com pH do estômago variando entre 1,0 e 3,0, concentrações de 0,3% de sais biliares no intestino delgado e presença de enzimas digestórias (JENSEN et al., 2012). Assim como, resistir às condições adversas encontradas no processo produtivo e no alimento onde será incorporado, tais como: o ambiente (teor de água, pH, *stress* osmótico) e o armazenamento (temperatura variável, *stress* oxidativo) (BURGAIN et al., 2011).

Sendo assim, as bactérias probióticas são submetidas a diversos efeitos negativos até a chegada ao intestino, que por sua vez resultam na redução do número de células bacterianas viáveis (WÜRTH et al., 2015). A microencapsulação é uma alternativa para proteção eficaz das bactérias probióticas (NEDOVIC et al., 2011), possibilitando a transição dos mesmos em forma de cápsulas protegidas com uma matriz de suporte (KAILASAPATHY, 2002).

3.3 Encapsulamento

Na tecnologia de encapsulamento, os microrganismos estão completamente envolvidos e protegidos por uma barreira física (DE VOS et al., 2010). É também definido como o envolvimento completo do material a ser encapsulado com material pré-selecionado dentro de uma membrana porosa ou impermeável definida, empregando diferentes técnicas a fim de gerar partículas de diferentes tamanhos (WHELEHAN; MARISON, 2011). A membrana formada no processo protege o material encapsulado de condições adversas, sendo assim um processo adequado para manter e melhorar a estabilidade e a proteção de células vivas (FÁVARO-TRINDADE et al., 2008; DE VOS et al., 2010). Na área alimentar, esta técnica auxilia na redução das interações do núcleo com fatores ambientais, retardando alterações que podem resultar em perda de aroma, cor ou valor nutricional (STEPHEN et al., 2006; TROJANOWSKA et al., 2017).

A tecnologia de encapsulamento provou ser uma das mais eficazes na proteção de microganismos probióticos durante o processamento e armazenamento (FU; CHEN, 2011; DE PRISCO et al., 2015). Entretanto, o desafio está na escolha da matriz adequada, bem como a técnica a ser utilizada, pois as matrizes precisam ser estáveis no respectivo alimento e no TGI, mas, por outro lado, também precisam ser digeríveis para garantir a liberação da carga probiótica (FAVARO-TRINDADE et al., 2008; WÜRTH et al., 2015). Portanto, para selecionar o método de encapsulação a ser utilizado, devem-se levar em consideração: tamanho médio da partícula que se espera obter, propriedades físicas do agente encapsulante, organismo ou substância a ser encapsulada, aplicação do material após a encapsulação, mecanismo de liberação, custo, estabilidade da atividade biológica, e eficiência da encapsulação (WHELEHAN; MARISON, 2011; CHAWDA et al., 2017). Dentre os métodos de encapsulação existentes estão:

- Emulsão: O princípio desta técnica é formar gotículas da fase interna dispersa em uma fase externa, pois o material a ser encapsulado é misturado com a suspensão polimérica, sendo adicionados a um grande volume de óleo vegetal. A vantagem deste método é a sua aplicação em grande escala e a formação de cápsulas de diâmetro pequeno, porém apresenta como desvantagem a formação de micropartículas de formas e tamanhos diferentes, e custo elevado devido ao uso de óleo vegetal, surfactante e emulsionante (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012; SOLANKI et al., 2013).

- Liofilização: Este processo tem como princípio o congelamento do material que posteriormente é submetido ao vácuo, e gradual elevação da temperatura, permitindo que a água seja eliminada por sublimação. As vantagens desta técnica são o curto tempo do processo e o fácil manuseio, entretanto trata-se de um processo com alto custo, e os ingredientes bioativos podem sofrer danos, devido à formação de cristais e do *stress* ocasionado em função da alta osmolaridade (HEIDEBACH et al., 2012).

- *Spray drying*: Consiste na atomização de uma suspensão do material a ser encapsulado que está imerso em um polímero, sendo posteriormente submetido ao ar quente, para evaporação rápida da água e secagem, gerando como produto encapsulados em forma de pó seco. Como vantagem pode-se citar o custo-benefício e a capacidade de produção em larga escala, já a desvantagem é a aplicação de temperaturas elevadas que podem prejudicar a bioatividade dos ingredientes (RATHORE et al., 2013; MARESCA et al., 2016).

- Extrusão: Esse processo consiste na mistura da substância bioativa com o material encapsulante, que ao passar pelo orifício extrusor do equipamento resulta na formação de gotas, as quais são imediatamente transformadas em cápsulas em um banho solidificante (WHELEHAN; MARISON, 2011; HEIDEBACH et al., 2012). Esta técnica tem como vantagens a ausência de solventes e temperaturas extremas, no entanto como desvantagem cita-se a dificuldade de ampliação do processo para industrial, pois a taxa de produção produção das microesferas é baixa (HEINZEN et al., 2004; BURGAIN et al., 2011).

3.3.1 Encapsulamento por Extrusão com Tecnologia de Vibração

Não são todas as técnicas que se adequam à encapsulação de microrganismos, pois algumas utilizam solventes orgânicos ou empregam agentes encapsulantes que afetam as características sensoriais, o que dificulta a posterior aplicação em alimentos. Entretanto, a encapsulação por extrusão com tecnologia de vibração, vem se mostrando eficiente para essa aplicação, pois é simples, reprodutível e possui alta eficiência (WANG et al., 2017; ISLAM SHISHIR et al., 2018).

No processo de encapsulamento por extrusão, a mistura encapsulante é extrusada pelo bocal do equipamento, formando um jato laminar, que se rompe livremente devido às perturbações/vibrações naturais e irregulares, levando a formação de micropartículas de diferentes tamanhos e formas, o que não é desejável (HAAS, 1992). Assim, a fim de corrigir esse problema durante a formação das micropartículas, junto ao método de extrusão foi

acrescentada a tecnologia de vibração. Essa técnica baseia-se no princípio do rompimento do jato laminar por aplicação de uma frequência vibratória, gerando assim partículas uniformes, de mesmo tamanho e forma, e menos porosas, que as obtidas pelo processo de *spray drying* (DE VOS et al., 2010; WHELEHAN; MARISON, 2011). Chew e Nyam (2016) avaliaram os efeitos da frequência vibracional na mesma taxa de fluxo, e concluíram que micropartículas produzidas a 500 Hz apresentaram forma mais esférica, em comparação com frequências maiores, que proporcionaram formas irregulares, micropartículas duplas ou de forma caudal. Já Moura et al. (2018) determinaram que uma frequência maior (de 1150 Hz) proporcionaria estabilidade às cápsulas. Existem algumas diferenças entre ambos os trabalhos, que podem explicar esta disparidade entre o parâmetro de frequência utilizado. Moura et al. (2018) realizaram, antes do encapsulamento por extrusão, o método de emulsão em solução de pectina, enquanto que Chew e Nyam (2016) misturaram o encapsulado e o material de parede, submetendo-os à extrusão. Outra diferença está na pressão utilizada para injetar o material no encapsulador, pressão de 200 mbar (para 1150 Hz) (MOURA et al., 2018) e 600 mbar (para 500 Hz) (CHEW; NYAM, 2016). Portanto, os parâmetros pressão e frequência de vibração estão correlacionados e devem ser previamente testados a fim de obter micropartículas com as características adequadas.

Nesse processo, além do uso da tecnologia de vibração, outros fatores de controle de tamanho das micropartículas são a viscosidade da mistura encapsulante, a concentração do material de parede e da solução solidificante, o tamanho do bocal extrusor e a distância entre a seringa e a solução geleificante (BRUN-GRAEPPI et al., 2011; HEIDEBACH et al., 2012). O bocal consiste em um cone de aço inoxidável com um orifício pelo qual passa o polímero extrudido e pode ser encontrado com diâmetros que variam de 50 a 1.000 µm, o que permite a produção de micropartículas de 100 a 2.000 µm (NEMETHOVA et al., 2014).

Nos trabalhos que empregaram a tecnologia de vibração, o fluxo, a frequência de vibração, o potencial elétrico e a amplitude são determinantes para que haja a formação de um jato laminar, evitando a formação de *spray* ou de um jato que aumente o impacto das micropartículas na solução geleificante e consequentemente as deforme (NEMETHOVA et al., 2014; MARESCA et al., 2016). Uma velocidade baixa pode ocasionar aderência do material ao bocal extrusor, enquanto uma velocidade maior pode pulverizar o jato e gerar uma liberação desregulada. Para evitar a coalescência das gotas durante o rompimento do jato e entrada no banho de geleificação, uma carga elétrica é induzida na superfície das mesmas usando um sistema de tensão eletrostática, que aplica um potencial elétrico entre o bocal e o

eletrodo, fazendo com que as gotas sejam desviadas da sua posição vertical, e ao longo do processo de queda estas se espalham e consequentemente se distribuem de forma mais homogênea na solução solidificante. Isto permite a formação de partículas mono-dispersas e de tamanho com desvio padrão máximo de 5% (WHELEHAN, 2014). Na câmara, antes da extrusão pelo bocal, a frequência de vibração é sobreposta em uma amplitude definida sobre o jato, fazendo com que as gotas se repilam ao passar pelo eletrodo, resultando numa distribuição mais uniforme das micropartículas, pois estas tendem a se aglomerar, portanto ambos os parâmetros são responsáveis por romperem o jato em gotas uniformes e de mesmo tamanho (HEINZEN et al., 2004; MARESCA et al., 2016). Salienta-se que além dos parâmetros do equipamento, é necessário que o operador tenha conhecimento de quais são as características adequadas do jato a ser obtido, uma vez que esse pode ser controlado através da observação pela lâmpada estroboscópica acoplada ao encapsulador.

3.4 Materiais de parede para encapsulamento

Os diversos materiais de revestimento se comportam de formas estruturalmente diferentes, variando sua proteção, devido a fatores como a capacidade de formação de partículas e força (JAIN et al., 2016). O material de parede deve preservar o núcleo das condições de processamento e armazenamento, e ainda resistir às condições gastrointestinais (DE SOUZA SIMÕES et al., 2017). Os principais critérios para selecionar um material de parede adequado para o encapsulamento são: as características de bioatividade do núcleo, a aplicação dos encapsulados e o custo (JAIN et al., 2016).

3.4.1 Amido

O amido é um polissacarídeo não digerido pelas enzimas do pâncreas no intestino delgado, sendo assim, o mesmo atinge facilmente o cólon onde será fermentado. Além disso, o amido é uma superfície ideal para a aderência das células probióticas (ANAL; SINGH, 2007), podendo aumentar a liberação de probióticos viáveis e metabolicamente ativos para o intestino (KRASAEKOOPT et al., 2003; VIVEK, 2013). Lian et al. (2003) estudaram *Lactobacillus rhamnosus* e bifidobactérias com amido, e observaram que elas sobreviveram à passagem através do sistema gastrointestinal. Já Sultana et al. (2000) afirmam que o encapsulamento com amido não protege *L. acidophilus* e *B. infantis* de condições ácidas

elevadas. Enquanto Mattila-Sandholm et al. (2002) afirmam que o encapsulamento de bactérias lácticas com amido de batata, com grânulos tratados enzimaticamente para obter estrutura porosa, aumentam a sobrevivência destes organismos. Ainda Martin et al. (2015) observaram que a mistura de alginato com amido de milho melhorou a eficácia da tecnologia de encapsulamento utilizando diferentes células bacterianas.

3.4.2 Alginato de sódio

O alginato de sódio é um polímero hidrofílico que possui grupos funcionais com carga não iônica, capazes de formar ligações de hidrogênio com a superfície da mucosa (DHAWAN et al., 2004), sendo esta uma excelente propriedade muco-adesiva, importante para a liberação *in situ* de microrganismos probióticos ao longo do trato gastrointestinal (GOMBOTZ; WEE, 2012; CHEN et al., 2013). Por isso, este é considerado o material de encapsulamento mais comumente utilizado, também devido à sua simplicidade, não toxicidade, biocompatibilidade, baixo custo e capacidade de absorver rapidamente a água (KRASAEKOOPT et al., 2003). No encapsulamento por meio da tecnologia de extrusão, uma suspensão de células é misturada com uma solução de alginato de sódio, e esta mistura é gotejada em uma solução contendo geralmente cloreto de cálcio. As gotas formam um gel/ esferas instantaneamente, aprisionando as células em uma estrutura. Isto ocorre devido à troca de íons de sódio do α-L-Gulurônico com o cátion divalente Ca^{+2} (KRASAEKOOPT et al., 2003).

Entretanto, ressalta-se que o alginato de sódio sozinho propicia proteção limitada aos probióticos, pois ele não é estável em ambientes ácidos (MORTAZAVIAN et al., 2008), e possui estrutura porosa, permitindo a difusão de ácido de dentro para fora da partícula. Mas esta desvantagem pode ser compensada pela mistura com outros polímeros, ou revestimento das partículas com outro composto, ou ainda modificação estrutural do alginato usando diferentes aditivos (KRASAEKOOPT et al., 2003; BURGAIN et al., 2011). Neste contexto, Shi et al. (2013a) encapsularam *L. bulgaricus* com alginato de sódio e leite puro, e observaram que as formulações encapsulantes a base de leite foram eficientes para a proteção do microrganismo, pois o encapsulado apresentou maior sobrevivência em pHs 2,0 e 2,5 e nas concentrações de sais biliares de 1,0 e 2,0%, mesmo após 1 mês de armazenamento, em comparação com o microrganismo na forma livre. Assim como, Eckert et al. (2018) que encapsularam lactobacilos com soro de queijo, permeado de soro, alginato de sódio e pectina

e obtiveram viabilidade celular dos microrganismos encapsulados superior a 6 log UFC/mL, após 3 meses de armazenamento.

3.4.3 Proteínas lácteas

As proteínas lácteas são uma boa alternativa como material de parede para encapsulamento de probióticos, pois são biocompatíveis, biodegradáveis, capazes de formar géis e também possuem a capacidade de ligação com íons e interações com outros polímeros para formar complexos (LIVNEY, 2010; EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2012). Além disso, destaca-se que a proteína do leite não precisa ser declarada como aditivo alimentar no rótulo do produto, visto que já está na composição do produto lácteo (YONEKURA et al., 2014). Eckert et al. (2018) explicaram que o soro de queijo pode ser utilizado como material de parede, pois é um habitat natural das bactérias encapsuladas, tornando as micropartículas um ambiente com propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para a manutenção destes microrganismos.

No presente trabalho utilizou-se o soro de queijo como material de parede, que é o líquido remanescente após a remoção da gordura e caseína do leite, por coagulação isoelétrica ou coalho, sendo o maior subproduto da indústria láctea (FOX et al., 2000; SMITHERS, 2008). O soro de queijo possui propriedades biológicas e funcionais, devido aos lipídios específicos, vitaminas, minerais, lactose, peptídeos com perfis de aminoácidos distintos e proteínas funcionais e complexas, tais como a alfa-lactoalbumina, beta-lactoglobulina e lactoferrina (SMITHERS, 2008; LIRA et al., 2009).

3.4.3.1 Soro de queijo bovino e bubalino

O soro de queijo, por ser um subproduto da fabricação do queijo, representa 85 a 90% do volume de leite utilizado e retém em torno de 55% dos nutrientes do leite. Para produção de 1 kg de queijo tradicional utiliza-se 10 L de leite de vaca ou 5,5 L de leite de búfala, sendo assim obtidos 9 e 4,5 L de soro de queijo, respectivamente (TEJAYADI; CHERYAN, 1995; JELEN, 2003). A composição do soro depende do tipo de coagulação e da origem do leite (por exemplo, bovino ou bubalino, ambos utilizados neste estudo), assim como dos ciclos sazonais de lactação e a alimentação do animal. Conforme Pinto et al. (2015), o soro de queijo possui em sua composição, principalmente lactose e proteínas solúveis de leite, sendo as

principais proteínas presentes no soro: β-lactoglobulina (3,2 $g.L^{-1}$), α-lactalbumina (1,2 $g.L^{-1}$), albumina (0,4 $g.L^{-1}$), imunoglobulina (0,8 $g.L^{-1}$) e lactoferrina (0,2 g 0,8 $g.L^{-1}$), entre outras (LIVNEY, 2010; FOUCQUIER et al., 2012). A α-lactalbumina têm características emulsificantes e espumantes, porém não possui boa capacidade de gelificação (RODILES-LÓPEZ et al., 2008). Já a β-lactoglobulina tem excelentes propriedades gelificantes e espumantes (FOEGEDING et al., 2002).

Apesar deste subproduto ter elevado valor nutricional e ser adequado para várias aplicações na indústria alimentar e farmacêutica, é frequentemente tratado como resíduo, causando problemas ambientais devido seus valores de demanda bíoquímica e química de oxigênio que variam de 27 a 60 $kg.m^{-3}$ e 50 a 102 $kg.m^{-3}$, respectivamente. Além dos fatores vinculados a carga de matéria orgânica, o soro de queijo possui sais minerais (0,46 a 10%), tais como NaCl, KCl, sais de cálcio e fosfatos (DRAGONE et al., 2009; VENETSANEAS et al., 2009). Também representa riscos de eutrofização atribuidos à presença de nitrogênio (0,2 a 1,76 $kg.m^{-3}$) e fósforo (0,124 a 0,54 $kg.m^{-3}$) (APPELS et al., 2008).

3.4.3.2 Soro de ricota

O processo de produção do queijo ricota é baseado na precipitação das proteínas do soro de queijo provenientes da produção de outros queijos mediante calor e ácidos orgânicos. É possível adicionar a este soro 5 a 20% de leite integral ou desnatado, para aumentar o rendimento na produção da ricota (FOX e MCSWEENEY, 2004). Portanto, este processo gera um novo subproduto chamado soro de ricota (CARVALHO et al., 2013), o qual possui baixa concentração de proteínas, tornando-o inadequado para os processos que envolvam a valorização da proteína (SANSONETTI et al., 2009). O descarte do soro de ricota também necessita de tratamento prévio, devido sua demanda bioquímica de oxigênio (50.000 $mg.L^{-1}$) e demanda química de oxigênio (80.000 $mg.L^{-1}$), que estão relacionadas principalmente a elevada concentração de lactose (70% dos sólidos totais) (SANSONETTI et al., 2009; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; PISPONEN et al., 2013).

3.4.3.3 Permeado de soro de queijo

As proteínas presentes no soro de queijo são geralmente obtidas através do processo de ultrafiltração e utilizadas como aditivos alimentares ou suplementos protéicos. O subproduto

deste processo é o permeado de soro, rico em lactose e sais. Devido ao elevado teor de lactose o permeado de soro tem sido utilizado como substrato barato para microrganismos probióticos (GOLOWCZYC et al., 2013; LAVARI et al., 2014), e, havendo a necessidade, pode ser suplementado com extrato de levedura e vitaminas, visando aumentar a produção de biomassa (CUI et al., 2000; HUGENSCHMIDT et al., 2011). O permeado de soro é considerado biodegradável, entretanto a sua liberação no meio ambiente contribui com a poluição devido a sua demanda bioquímica e química de oxigênio (40.000-48.000 e 80.000-95.000 $mg.L^{-1}$, respectivamente) (KUSHWAHA et al., 2011).

De modo geral, alguns estudos sugerem que as proteínas do soro resistem a ambientes ácidos (DOHERTY et al., 2012) e a pepsina, pois, embora, a α-lactoalbumina não é estável na presença de pepsina, a β-lactoglobulina permanece intacta (GBASSI et al., 2009). Por isso, as proteínas do soro vêm sendo estudadas para o encapsulamento de probióticos, porém a maioria dos estudos existentes utilizaram proteínas de soro de queijo na forma de concentrado ou isolado proteico de soro de queijo em processos de encapsulamento, diferentes deste estudo. Em relação ao processo de extrusão com tecnologia de vibração, apenas Shi et al. (2013a) e Shi et al. (2013b) utilizaram proteína láctea em forma de leite puro, e Eckert et al. (2018) utilizaram, assim como neste estudo, soro de queijo como material de parede, em conjunto com outros polímeros para o encapsulamento. Shi et al. (2013a) observaram alto rendimento de encapsulação, de 10 log UFC/mL para células livres, e de 9,95 a 9,98 log UFC/mL para células encapsuladas com alginato de sódio e leite puro. Shi et al. (2013b) produziram micropartículas com leite puro, carragena e goma alfarroba, e evidenciaram ausência de microrganismo livre após 1 min em pH 2,5, já o encapsulamento preservou as células microbianas após 2 h em pH 2,0. A proposta do presente estudo foi explorar a proteína presente o soro de queijo líquido proveniente diretamente do processo produtivo.

3.5 Leite Fermentado

Os probióticos são adicionados aos produtos lácteos como, leites fermentados, iogurtes, bebidas lácteas, queijos e sorvetes (BRINQUES; AYUB, 2011; AMINE et al., 2014), podendo torná-los alimentos funcionais (EL SOHAIMY, 2012; GHOSH et al., 2014). Dentre estes está o leite fermentado, que é o produto obtido por meio da fermentação do leite pela ação de bactérias lácticas denominadas de culturas iniciadoras, que devem ser viáveis, ativas e abundantes no produto até a data de validade do mesmo (CODEX ALIMENTARIUS

COMMISSION, 2003). À aproximadamente 100 a 150 a.C., os leites fermentados eram feitos por meio de fermentação espontânea com culturas que eram encontradas naturalmente em leites não pasteurizados, sendo que a reutilização dos utensílios envolvidos no processo de fermentação contribuíam para uma certa repetibilidade e estabilidade do processo de fermentação (SHIBY; MISHRA, 2013).

O consumo de bactérias probióticas através de leites fermentados é uma alternativa interessante para restabelecer o equilíbrio da microbiota intestinal (LOURENS-HATTINGH; VILJOEN, 2001). Após o consumo de leites fermentados, alguns microrganismos (por exemplo, Bifidobactérias) tornam-se parte da microbiota intestinal, enquanto outros, como os *Lactobacillus* spp., exercem seus efeitos de maneira transitória, passando a remodelar ou influenciar a comunidade microbiana existente (GOGINENI et al., 2013). Para tanto, as culturas probióticas devem apresentar boa multiplicação no leite, bem como serem estáveis e viáveis durante o armazenamento (OLIVEIRA et al., 2002). Neste contexto, diversos fatores afetam a viabilidade dos microrganismos probióticos em produtos lácteos fermentados, entre eles a pós-acidificação, a composição da co-cultura, a presença de fatores de crescimento no leite, o valor do pH no qual as células são propagadas e a fase na qual os probióticos são coletados (MOURA et al., 2018). Logo, o desafio é manter as propriedades do probiótico após o processamento industrial, transporte, armazenamento e durante a exposição ao trato gastrointestinal (CHAMPAGNE; FUSTIER, 2007; MOURA et al., 2018).

Quando incorporadas em produtos alimentícios, na forma de micropartículas, as bactérias probióticas conservam a sua viabilidade até o momento de consumo do produto, também auxiliam na fixação e melhoramento das propriedades sensoriais do produto final. Como desvantagem, a produção de produtos fermentados usando bactérias encapsuladas implica custos elevados devido ao longo período de incubação que as mesmas exigem, bem como à necessidade de uso de grandes quantidades de inóculo (MORTAZAVIAN et al., 2008).

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Materiais encapsulantes

Para o desenvolvimento deste projeto foram utilizados nos ensaios de análises reagentes de grau analítico. Os materiais de parede para o encapsulamento foram:

- Soro de queijo de leite bovino (soro em pó diluído para obter aproximadamente 6% (m/v) de lactose, marca Elegê);

- Soro de queijo de leite bubalino (soro líquido da produção de queijo tipo mussarela de búfala, coletado em Laticínio do Rio Grande do Sul);

- Soro de queijo de ricota (soro líquido da produção de ricota, elaborada com soro da produção de queijo tipo mussarela, coletado em Laticínio do Rio Grande do Sul);

- Permeado de soro de queijo bovino (permeado em pó diluído para obter aproximadamente 6% (m/v) de lactose, marca Arla Foods);

- Alginato de sódio 1% (m/v) (marca GastronomyLab);

- Amido 1% (m/v) (amido de milho adquirido em estabelecimento comercial, marca Maisena).

Antes da sua utilização, os soros de queijo e a solução de amido passaram previamente por tratamento térmico durante 60 minutos a 67 °C, em banho-maria. O permeado de soro foi esterilizado em autoclave a 110 °C por 15 minutos, com vapor fluente. A solução de alginato de sódio foi autoclavada a 121 °C por 15 minutos.

4.1.1 Análise físico-química dos materiais encapsulantes

Os materiais encapsulantes (soros de queijo e permeado de soro) foram analisados em triplicata conforme procedimentos descritos na AOAC (2012), para teor de gordura (método

No. 2000,18), teor de proteína (método de Kjeldahl No. 991,20) e teor de cinzas (método No. 968,08). O pH foi determinado empregando o método potenciométrico. A atividade de água foi determinada por equipamento AquaLab (Aqualab Lite - Decagon, Pullman, WA 99163, USA). Para determinar os teores de metais (cálcio e sódio) foram utilizados os Métodos Oficiais da AOAC 991.25 (2002) e AOAC 985.35 (2006), respectivamente, a partir das cinzas das amostras. A análise de cor foi realizada em equipamento colorímetro Konica Minolta CM-5 (Chiyoda, Tóquio, Japão), e a escala L *, a *, b * foi utilizada para a medição dos parâmetros. O eixo L * varia de 0 a 100, indicando a variação de cor de preto para branco. O eixo a * indica a variação de vermelho (+) e verde (-). O eixo b * indica a variação de amarelo (+) para azul (-).

Para determinação dos aminoácidos as amostras dos materiais encapsulantes (SBO, SBU, RBO e PBO) foram preparadas em triplicata, sendo a leitura de cada amostra realizada em duplicata por meio de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). O preparo das amostras foi realizado por meio de hidrólise ácida, utilizando-se 0,5 mL de amostra para 10 mL de solução de HCl 6 M, seguida de aquecimento em estufa por 24 h a 110 °C. Em seguida, a mistura foi acondicionada em dessecador com atmosfera de NaOH, durante 5 dias. Após esse período, foi armazenada em geladeira a 4 °C até o momento do ensaio, no dia seguinte. As soluções foram filtradas em filtro seringa de acetato celulose, com poro de 0,45 µm e diluídas por duas vezes em diluente específico para análises de aminoácidos pelo método Amino Acid Standard H, Lot Nº 20088 (SHIMADZU CORPORATION, 1993). A análise quantitativa dos aminoácidos foi realizada em CLAE (marca Shimadzu), com bomba da fase móvel LC-20AT e bomba reagentes LC-20AD, coluna Shim-parck Amino-Na 6,0 mm id x 100 mm e Trap ISC-30/S 0504 (Na) 4,0 mm id x 50 mm, fase móvel A (AA-MA) pH 3,0; B (AA-MB) pH 10,0 e C (AA-MC) NaOH 10 M. Os reagentes utilizados na análise foram reagente A – OPA – (AA-RA) e reagente B (AA-RB) e a temperatura da coluna foi de 60 °C com fluxo de 0,6 mL/min.

4.1.2 Análises físico-químicas e reológicas das formulações encapsulantes

Foram elaboradas aproximadamente 30 mL de cada formulação encapsulante, constituída por 10 mL de soros lácteos (SBO, SBU, RBO ou PBO), 10 mL de alginato de sódio 1% (m/v) e 10 mL de amido 1% (m/v). As formulações encapsulantes foram avaliadas em triplicata para todos ensaios: pH empregando o método potenciométrico utilizando

pHmetro (Modelo DM-22, Marca Digimed), condutividade utilizando condutivímetro (Modelo AK 50, Marca Akso), turbidez utilizando turbidímetro por meio de leitura direta (Modelo 21000Q, Marca Hach) e viscosidade (por método de Copo Ford). Também foi avaliada a cor por meio de equipamento colorímetro Konica Minolta CM-5 (Chiyoda, Tóquio, Japão).

A textura das formulações foi avaliada por meio de analisador de textura (Brookfield CT3, UK, Software TexturePro CT V1.8 Buid 31). Foi realizado teste de compressão, alvo 3,0 mm, com tempo de retenção de 0 s, carga trigger 3 g, velocidade 1 mm/s, 2 ciclos, ponta de prova NONE, reparo TA-DEC e célula de carga 10.000 g.

4.1 Microrganismos e condições de cultivo

Os microrganismos avaliados neste estudo (8014, 33 e 82), sendo o 33 e 82 microrganismos endógenos isolados de leite *in natura* da região do Vale do Taquari, Rio Grande do Sul, previamente identificado no trabalho de Agostini et al. (2018), estavam armazenados em 1 mL de glicerol a -20 ºC, sendo pré-inoculados em sua totalidade em um tubo contendo 15 mL de meio MRS e incubados por 48 h a 32 ºC sem agitação. Deste, placas contendo ágar MRS foram estriadas por esgotamento para obtenção de culturas puras, sendo incubadas por 48 horas a 32 ºC. Após o crescimento, uma colônia isolada da placa foi reinoculada em um tubo contendo 15 mL de meio MRS líquido, sendo este novamente incubado por 18 h a 32 ºC.

Após, padronizou-se os tubos para DO 2,0 ± 0,1 em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Kyoto 604-8511, Japan) a 600 nm. Em seguida, o volume foi centrifugado a 5000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Por duas vezes, as culturas celulares foram ressuspendidas, lavadas e centrifugadas em solução tampão fosfato salino 10 mM (pH 7,0). Após a lavagem, as culturas equivalentes a 2 tubos de 15 mL de meio MRS foram ressuspendidas em 30 mL de formulação encapsulante, constituída por 10 mL de soros lácteos (SBO, SBU, RBO ou PBO), 10 mL de alginato de sódio 1% (m/v) e 10 mL de amido 1% (m/v). Esta mistura foi abastecida na seringa que alimenta o sistema de encapsulamento.

4.2 Curvas de crescimento das bactérias lácticas

Os microrganismos *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, *Lactobacillus paracasei* ML 33 e *Lactobacillus pentosus* ML 82 foram selecionados para realização das curvas de crescimento. A construção das curvas teve como objetivo relacionar a densidade óptica (DO) com o número de células viáveis (log UFC.mL^{-1}). Os isolados previamente armazenados em 1 mL de glicerol a -20 ºC foram pré-inoculados em sua totalidade em um tubo contendo 15 mL de meio *Man, Rogosa and Sharpe* preparado conforme fabricante Merck® KGaA (MRS) e incubados por 48 h a 32 ºC sem agitação. Destes, placas contendo ágar MRS foram estriadas por esgotamento para obtenção de culturas puras, sendo incubadas por 48 h a 32 ºC. Após o crescimento, uma colônia isolada da placa foi reinoculada em um tubo contendo 20 mL de meio MRS líquido, sendo este novamente incubado por 48 h a 32 ºC. Após, os inóculos foram analisados coletando-se 1 mL do tubo para uma cubeta, a qual foi avaliada por meio da medição da densidade óptica (DO) em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Kyoto 604-8511, Japan) a 600 nm. Padronizaram-se os tubos para DO igual a 2,0 ± 0,1, sendo utilizado meio MRS puro para padronização do inóculo, caso necessário, e também como branco para leitura no equipamento.

Uma alíquota de 5 mL de inóculo padronizado para DO 2,0 ± 0,1 foi adicionada em frasco contendo 100 mL de caldo MRS e este foi incubado a 32 ºC, e avaliado quanto ao crescimento ao longo do tempo, até atingir a fase estacionária. Alíquotas do cultivo de cada uma das bactérias lácticas foram coletadas periodicamente para a determinação da DO. As contagens celulares foram determinadas por meio de diluições seriadas em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e, após, alíquotas de 20 μL das diluições seriadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar MRS e incubadas por 48 h a 32 ºC, conforme Kim et al. (2008) com modificações, como o não uso das jarras anaeróbicas, por se constatar que não influenciaram no ensaio. O tempo total das coletas foi estabelecido com base no conhecimento prévio do desenvolvimento dos microrganismos, num total de 24 h.

4.3 Encapsulamento por meio de extrusão com tecnologia de vibração

O encapsulamento de células bacterianas foi realizado por meio de Encapsulator B-395 Pro (BÜCHI Labortechnik AG, Meierseggstrasse 40, CH-9320 Flawil 1, Switzerland), equipado com um bico de 120 μm e uma bomba de seringa, de acordo com De Prisco et al.

(2015). A seringa utilizada no sistema de alimentação foi carregada com a mistura de 30 mL da formulação encapsulamente ressuspendida com a cultura láctea, sendo a formulação composta por 10 mL de soro de queijo (SBO, SBU, PBO ou RBO), 10 mL de alginato de sódio 1,0% (m/v) e 10 mL de amido 1,0% (m/v).

A solução foi injetada a uma taxa de alimentação de 5 mL/min, frequência de vibração de 1740 Hz, tensão de eletrodo de 950 V, amplitude 1 e pressão de 500 mbar. As cápsulas foram solidificadas em 200 mL de uma solução $CaCl_2$ (0,5 M), sob agitação, durante cerca de 30 minutos. Ao final do encapsulamento, as suspensões contendo as micropartículas foram recolhidas em frascos estéreis, após filtradas por meio de papel filtro esterilizado, ressuspendidas com auxílio de uma espátula para 100 mL de tampão fosfato (10 mM, pH 7,0), sendo armazenadas a 4 °C. Foram produzidos três lotes de cada encapsulado, conforme Tabela 1, sendo cada lote avaliado em triplicada para todos os ensaios.

Tabela 1 - Micropartículas e suas respectivas formulações encapsulantes

Encapsulados	**Formulação**
SBO-33	Alginato-Amido-Soro de queijo bovino-*L. paracasei* ML33
SBO-82	Alginato-Amido-Soro de queijo bovino-*L. pentosus* ML82
SBO-8014	Alginato-Amido-Soro de queijo bovino-*L. plantarum* ATCC8014
SBU-33	Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino-*L. paracasei* ML33
SBU-82	Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino-*L. pentosus* ML82
SBU-8014	Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino-*L. plantarum* ATCC8014
RBO-33	Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino-*L. paracasei* ML33
RBO-82	Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino-*L. pentosus* ML82
RBO-8014	Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino-*L. plantarum* ATCC8014
PBO-33	Alginato-Amido-Permeado de soro bovino-*L. paracasei* ML33
PBO-82	Alginato-Amido-Permeado de soro bovino-*L. pentosus* ML82
PBO-8014	Alginato-Amido-Permeado de soro bovino-*L. plantarum* ATCC8014

4.4 Testes para determinação das condições de rompimento das micropartículas

A fim de avaliar o procedimento mais adequado para o rompimento completo das micropartículas realizaram-se testes prévios utilizando as micropartículas SBO-8014, sendo empregadas diferentes condições de rompimento, e avaliando a concentração celular antes e após o processo de rompimento. A viabilidade média do microrganismo antes do

encapsulamento foi 9 log UFC.mL^{-1}, tendo por objetivo portanto o rompimento completo das micropartículas a fim de encontrar viabilidade similar à célula livre. Utilizaram-se diferentes soluções e concentrações, em tempos, temperaturas e rotações distintas, conforme Tabela 2. Também avaliou-se a possibilidade de melhorar ainda mais o rompimento, adicionando-se ao teste que apresentou o melhor resultado de viabilidade celular, pérolas de vidro de 1,0 mm de diâmetro esterilizadas, que mediante agitação se chocariam com as micropartículas e proporcionariam maior rompimento das micropartículas e consequentemente liberação completa dos microrganismos. Após cada teste de rompimento, determinou-se em triplicata o crescimento microbiológico por meio de diluições seriadas em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e, após, alíquotas de 20 μL das diluições seriadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar MRS e incubadas por 48 h a 32 ºC, conforme Kim et al. (2008) com modificações.

A condição de rompimento determinada como ideal consistiu em expor as micropartículas em solução tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) à agitação por 45 minutos em *shaker* (incubadora com agitação orbital) a 30 °C e 250 rpm, tendo por objetivo a liberação completa das bactérias contidas nas micropartículas. Na Tabela 2 são apresentadas as condições avaliadas nos diferentes testes realizados.

Tabela 2 - Condições avaliadas para rompimento das micropartículas SBO-8014, na temperature de 30 ºC

Solução	**Agitação (rpm)**	**Tempo (min)**
a) NaCl 0,5% (pH 2,5)	150	60
b) NaCl 0,5% (pH 3,0)	150	60
c) NaCl 0,5% (pH 8,0)	150	60
d) Citrato de sódio tribásico 1%	150	60
e) Água peptonada 1%	150	60
f) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	150	60
g) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	250	30
h) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	250	45

4.5 Avaliação do encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração

4.5.1 Caracterização morfológica das micropartículas

As micropartículas foram caracterizadas quanto a sua morfologia e tamanho logo após o encapsulamento por meio de extrusão com tecnologia de vibração, sendo que para esta avaliação não foram agregados os microrganismos, somente o material de parede. As micropartículas ainda em solução de cloreto de cálcio foram filtradas em papel filtro esterilizado, em seguida, neste filtro foi realizada a passagem de 200 mL de água Milli-Q para remoção do cloreto de cálcio remanescente. Após, a fixação das micropartículas se deu pelo contato direto dos pinos utilizados para captação das imagens pelo MEV, no filtro contendo as micropartículas, sendo os mesmos secos em estufa a 30 °C por 3 horas. As micropartículas foram analisadas quanto à morfologia e tamanho por MEV (LS 10 - Carl Zeiss, Jena, Alemanha), a uma tensão de aceleração de 20 kV, distância de trabalho 7,00 mm e aumento de 12.000 X, para verificação da morfologia da superfície, bem como a estimativa do seu tamanho. Todas as amostras foram fixadas e tratadas por pulverização em um metalizador (Q 150R ES - Quorum Technologies, East Sussex, Inglaterra) com ouro-paládio e, em seguida, observadas em modo alto vácuo.

4.5.2 Viabilidade dos microrganismos ao processo de encapsulamento

Para determinar a viabilidade dos microrganismos ao processo de encapsulamento, coletou-se uma alíquota da solução de alimentação antes de submeter ao processo. As contagens celulares foram determinadas por meio de diluições seriadas em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e, após, alíquotas de 20 μL das diluições seriadas foram inoculadas em placas de Petri contendo meio ágar MRS e incubadas por 48 horas a 32 ºC, conforme Kim et al. (2008) com modificações.

Após o processo de microencapsulamento, as concentrações de células viáveis dos encapsulados foram determinadas por meio da suspensão de 1 mL de micropartículas em 10 mL de tampão fosfato (100 mM e pH 7,4), sendo expostas ao processo de rompimento das micropartículas conforme determinado previamente. Em seguida, foram realizadas as diluições em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e, após, alíquotas de 20 μL das diluições

seriadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar MRS e incubadas por 48 h a 32 ºC.

4.5.3 Sobrevivência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao armazenamento

Os encapsulados foram armazenados a 4 °C e a contagem de células viáveis realizada diretamente após o processo de encapsulamento e após 15, 30 e 60 dias, conforme descrito no item "Viabilidade dos microrganismos ao processo de encapsulamento". As bactérias lácticas livres foram armazenadas nas mesmas condições dos encapsulados para verificar a sobrevivência.

4.5.4 Sobrevivência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao trato gastrointestinal simulado (TGI)

A avaliação da sobrevivência dos encapsulados ao TGI simulado foi realizada de acordo com Meira et al. (2012). Para o ensaio da sobrevivência, uma alíquota de 1,0 mL dos encapsulados, e não encapsulados, foi exposta separadamente à presença de 1,0 mL de suco gástrico e intestinal simulado. O suco gástrico simulado foi preparado contendo 3,0 $mg.mL^{-1}$ de pepsina de mucosa gástrica de suíno, 0,5% (m/v) de NaCl ajustados a pH 2,0, 2,5 e 3,0. O suco intestinal simulado foi preparado contendo 1,0 $mg.mL^{-1}$ de pancreatina, 0,5% (m/v) de NaCl ajustado a pH 8,0, sem e com 5,0 $g.L^{-1}$ de uma mistura 1:1 de colato de sódio e deoxicolato de sódio. Após, ambas as soluções foram esterilizadas por filtração com membranas de 0,22 μm (Sartorius Stedim Biotech, GmbH, Goettingen, Alemanha).

Para determinação da viabilidade, após a exposição as soluções simuladas do TGI, as células viáveis dos encapsulados foram determinadas por meio da suspensão de 1 mL de micropartículas em 10 mL de tampão fosfato (100 mM e pH 7,4), sendo expostas ao processo de rompimento das micropartículas conforme determinado previamente. As contagens celulares foram determinadas por meio de diluições em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e, após, alíquotas de 20 μL das diluições seriadas foram transferidas para placas de Petri contendo meio ágar MRS e incubadas por 48 h a 32 ºC. As determinações de sobrevivência para os microrganismos encapsulados foram avaliadas no momento inicial (zero) e após 3 h para sobrevivência ao trato gástrico simulado e 4 h para sobrevivência ao trato intestinal

simulado. Já para os microrganismos não encapsulados, além dos tempos citados, avaliou-se também após 5 minutos e 1 h de contato, por estimar menor resistência dos mesmos. Este procedimento foi realizado para as micropartículas a cada 30 dias durante o armazenamento, sendo assim nos tempos: 0, 30 e 60 dias.

4.5.5 Avaliação da resistência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao stress osmótico

A resistência das micropartículas a condições de *stress* osmótico foi avaliada logo após o encapsulamento para as micropartículas, tendo sido adotado o mesmo procedimento para avaliar a resistência das células livres. Foi adicionado 2,0 mL de encapsulados/ células livres para cada 20 mL de solução - sal (NaCl) ou sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$) - na concentração de 100 g/L, a 4, 37 e 50 °C, em estufa bacteriológica, por 24 horas, conforme adaptado de Corbo et al. (2013) e De Prisco et al. (2015). A resistência dos encapsulados foi determinada através da suspensão de 1,0 mL de cada amostra no tempo 0, 12 h e 24 h, ressuspendidos em 10 mL de tampão fosfato (100 mM, pH 7,4), sendo expostas ao processo de rompimento das micropartículas conforme determinado previamente. Em seguida, foram realizadas as diluições seriadas em água peptonada tamponada 0,1% (m/v) e a incubação de alíquotas de 20 μL em placas de Petri (meio ágar MRS, 48 h, 32 ºC).

4.5.6 Avaliação do potencial de acidificação dos microrganismos encapsulados e não encapsulados

As micropartículas que obtiveram melhor desempenho nos seus respectivos materiais de parede, nas taxas de sobrevivência após o encapsulamento e após as condições do TGI simulado, foram avaliadas quanto a sua capacidade de acidificação. Assim como, avaliaram-se as bactérias lácticas não encapsuladas. As micropartículas e as bactérias livres foram adicionadas separadamente em uma solução de 50 mL de solução soro de queijo bovino e leite bovino pasteurizados 1:1, e mantidas nas temperaturas de 37 e 42 °C. O soro de queijo bovino e leite bovino foram previamente submetidos a tratamento térmico durante 60 minutos a 67 °C, em banho-maria, sendo este tempo e temperatura previamente testados. No caso das micropartículas, foram utilizadas todas aquelas contidas no filtro após processo de encapsulamento. Já para as bactérias lácticas livres, utilizou-se a quantidade de bactéria crescida em 2 tubos de 15 mL de meio MRS (MARAFON et al., 2011; KRUNIĆ et al., 2015).

As amostras foram homogeneizadas, e o potencial de acidificação das bactérias lácticas encapsuladas e não encapsuladas foi monitorado por medidas periódicas de pH (Digimed DM-22, São Paulo, Brasil), até o ponto isoelétrico da caseína, entre pH 4,30 - 4,60. Foram avaliados os seguintes parâmetros cinéticos de acidificação: V_{max} (taxa máxima de acidificação, em unidades de pH por hora ($pH.h^{-1}$)); t_{Vmax} (tempo em horas para atingir V_{max}); pH_{max} (valor de pH correspondente a V_{max}); e ΔpH (variação do pH no tempo inicial e do pH após x horas de incubação). Esta avaliação teve por objetivo simular o uso das micropartículas no processo produtivo de um leite fermentado, podendo assim estimar o tempo necessário para o abaixamento de pH.

4.6 Produção de formulações de leite fermentado com microrganismo encapsulado, não encapsulado e cultura láctica comercial

4.6.1 Elaboração do leite fermentado

Foram elaborados leites fermentados com:

- O encapsulado que apresentou melhor resistência ao TGI simulado após 60 dias de armazenamento e aos *stress* osmótico;

- O microrganismo na forma livre;

- Cultura láctica comercial (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), contendo os microrganismos *Lactobacillus acidophilus* LA-5, *Bifidobacterium lactis* BB-12 *e Streptococcus thermophilus*.

Foram elaborados dois lotes de cada formulação de leite fermentado, sendo as análises realizadas em triplicata.

Como base láctea utilizou-se o leite em pó diluído (9 g/ 100 mL), sendo adicionado em seguida os ingredientes: 4,0% (m/v) de leite em pó, 16,0% (m/v) açúcar, 1,0% (m/v) amido e 1,0% (m/v) gelatina. Em seguida, a mistura foi agitada em *shaker* (225 rpm/ 37 ºC/ 30 min) e posteriormente pasteurizada (67 ºC/ 1 hora). Após, a base para produção do leite fermentado foi resfriada e mantida a 37 °C, sendo submetida à fermentação.

Para fermentação de 100 mL de base de leite fermentado utilizou-se a quantidade de microrganismos (encapsulados e não encapsulados) equivalente a 2 tubos com 15 mL de meio MRS com inóculo, incubados por 18 h a 32 ºC sem agitação, o equivalente a aproximadamente 9 log UFC/mL. Os inóculos foram previamente padronizados por meio da

medição da DO igual a 2,0 ± 0,1, em espectrofotômetro (UV-2600, Shimadzu, Kyoto 604-8511, Japan) a 600 nm, sendo utilizado meio MRS puro como branco para leitura no equipamento, e para padronização do inóculo, caso necessário. Em seguida, o volume foi centrifugado a 5000 rpm, por 10 minutos a 4 °C. Por duas vezes, as culturas celulares foram ressuspendidas, lavadas e centrifugadas em solução tampão fosfato salino 10 mM (pH 7,0). Após a lavagem as culturas foram ressuspendidas diretamente na base de leite fermentado. Já para o leite fermentado com a cultura comercial utilizou-se 0,02% (m/m) de inóculo, conforme indicação no rótulo do mesmo.

Durante a fermentação, o pH foi controlado até atingir o ponto isoelétrico da caseína de 4,6. Na sequência, foi realizada a quebra do coágulo mediante agitação em *shaker* (225 rpm/ 37 ºC/ 30 min), resfriamento e adição de 1 mL de polpa de morango (Launer/ RS). As formulações foram acondicionadas em embalagem apropriada e armazenadas a 8 °C.

4.6.2 Avaliações físico-químicas e reológicas dos leites fermentados

As formulações de leite fermentado foram analisadas em triplicata conforme procedimentos descritos na AOAC (2012): teor de sólidos/ extrato seco total (método No. 990,20), teor de gordura (método No. 2000,18), teor de proteína (método de Kjeldahl No. 991,20) e teor de carboidratos (método 986,25). Os teores de umidade e de cinzas foram avaliados baseando-se na metodologia do Instituto Adolfo Lutz (INSTITUTO ADOLFO LUTZ, 2008). Já o pH foi determinado empregando o método potenciométrico. A atividade de água foi determinada por equipamento AquaLab (Aqualab Lite - Decagon, Pullman, WA 99163, USA). O teor de açúcar (expresso em °Brix) foi analisado por refratômetro digital (marca Akso, modelo MA871, Brasil). Para determinar a acidez foi utilizado o método de acidez titulável de leite fluído (Método B), conforme Instrução Normativa n° 68 de 12 de dezembro de 2006 (BRASIL, 2006). A textura das formulações foi avaliada por meio de analisador de textura (Brookfield CT3, UK, Software TexturePro CT V1.8 Buid 31). Foi realizado teste de compressão, alvo 3,0 mm, com tempo de retenção de 0 s, carga trigger 3 g, velocidade 1 mm/s, 2 ciclos, ponta de prova NONE, reparo TA-DEC e célula de carga 10.000 g.

4.6.3 Avaliação microbiológica dos leites fermentados

A avaliação microbiológica foi realizada logo após a produção das formulações, através de diluições em solução peptonada estéril 0,1%. As amostras foram avaliadas quanto à presença de coliformes 36 e 45 °C, bolores e leveduras, e *Salmonella* sp., conforme Instrução Normativa n° 62 (BRASIL, 2003). Para pesquisa de coliformes foi utilizado meio de cutura *Violet Red Bile Agar* (VRBA) por meio de plaquemento em profundidade e aplicação de sobrecamada, e posterior incubação a 36 e 45 °C, por 48 h. A confirmação da presença de coliformes totais se dará em caldo Verde Brilhante Bile (Brila), a 36 °C e de coliformes termotolerantes em caldo *Escherichia coli* (EC) a 45 °C. A contagem de bolores e leveduras foi determinada por meio de incubação em meio de cultura batata dextrose ágar (BDA) 2% e L (+) Ácido tartárico 10%, em pH próximo a 3,5 e temperatura de incubação de 25 ºC.

Já para pesquisa de *Salmonella* sp. a amostra foi transferida para tubo com água peptonada e incubados a 37 ºC, durante 24 h. Após, foi realizado o enriquecimento seletivo, sendo 1 mL da amostra transferido para tubo com 10 mL de caldo Selenito Cistina (SC) e 1 mL para tubo com 10 mL de caldo Rappaport Vassiliadis (RV), incubados a 41 ºC por 24 h. A inoculação ocorreu por estriamento na superfície de ágar MRS, sendo as placas incubadas a 35 ºC por 24 h. As colônias suspeitas foram replicadas em tubos com ágar tríplice açúcar ferro e lisina ferro, sendo novamente incubadas a 35 ºC por 24 h.

Para enumerar os *Lactobacillus* spp. foi utilizada a metodologia adaptada de Vinderola e Reinheimer (2000), em triplicada para cada formulação produzida. Os microrganismos foram quantificados pela técnica de semeadura em profundidade de 1 mL, sendo as placas incubadas em anaerobiose por 72 h a 37 ºC em ágar Bile (0,15%)-MRS. As formulações de leite fermentado não passaram por nenhum processo para rompimento das cápsulas antes dos ensaios microbiológicos.

4.6.4 Avaliação da resistência ao TGI simulado das bactérias lácticas dos leites fermentados

A avaliação foi realizada logo após a produção das formulações, tendo sido adotado o mesmo procedimento de análise descrito no item “Sobrevivência dos microrganismos encapsulados e não encapsulados ao trato gastrointestinal simulado (TGI)” deste trabalho. Utilizou-se uma alíquota de 1 mL de cada formulação de leite fermentado para avaliação da

resistência ao TGI simulado. Neste caso, o procedimento de rompimento das micropartículas foi realizado somente para a formulação de leite fermentado elaborado com as micropartículas.

4.7 Análise estatística

A avaliação estatística dos resultados foi realizada por meio de Análise de Variância (ANOVA), e verificada a significância dos modelos pelo Teste-F. Nos modelos significativos, as médias foram comparadas entre si pelo Teste de Tukey, ao nível de 95% de significância ($p<0,05$). Os cálculos estatísticos foram efetuados utilizando o software *BioEstat* 5.3.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Caracterização físico-química dos materiais encapsulantes

O desenvolvimento de novas tecnologias industriais torna-se necessário para a criação de novos produtos, devendo estar sempre aliado ao baixo custo de produção (LAVARI et al., 2014). Neste contexto, a inclusão de subprodutos do processamento de alimentos é uma boa alternativa para minimizar o impacto dos resíduos descartados, dando a eles uma nova aplicação. No encapsulamento de microrganismos, os subprodutos dos laticínios têm se destacado, por que demandam elevado custo de tratamento devido à carga orgânica (PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009; BURGAIN et al., 2011; CARVALHO; PRAZERES; RIVAS, 2013; LAVARI et al., 2014; ARSLAN et al., 2015). Portanto, para utilização do soro de queijo no encapsulamento, é imprescindível conhecer a sua composição, conforme apresentado nas Tabelas 3 e 4.

Tabela 3 - Caracterização físico-química do soro de queijo de leite bovino, soro de queijo de leite bubalino, soro de ricota e permeado de soro de leite bovino utilizados como um dos materiais de parede na produção das micropartículas

Análises	**SBO**	**SBU**	**RBO**	**PBO**
Lipídeos (% m/v)	0,20 (0,01)^{a}	0,20 (0,00)^{a}	0,00 (0,00)^{b}	0,20 (0,01)^{a}
Proteína (% m/v)	0,35 (0,01)^{b}	0,51 (0,02)^{a}	0,17 (0,02)^{c}	0,10 (0,01)^{c}
Cinzas (% m/v)	0,60 (0,04)^{a}	0,47 (0,01)^{b}	0,57 (0,01)^{a}	0,50 (0,02)^{b}
pH	6,26 (0,01)^{b}	6,61 (0,01)^{a}	5,77 (0,01)^{c}	5,52 (0,01)^{d}
Atividade de água	0,921 (0,001)^{c}	0,930 (0,001)^{b}	0,930 (0,001)^{b}	0,996 (0,002)^{a}
Na (ppm)	76,80 (0,30)^{b}	70,23 (0,51)^{c}	83,63 (0,45)^{a}	36,03 (0,21)^{d}
Ca (ppm)	9,83 (0,40)^{a}	4,53 (0,25)^{b}	4,73 (0,21)^{b}	5,10 (0,10)^{b}
Cor L*	57,56 (0,21)^{b}	66,90 (0,01)^{a}	38,56 (0,09)^{c}	14,60 (0,02)^{d}
Cor a*	- 6,05 (0,02)^{a}	- 5,14 (0,03)^{b}	- 4,48 (0,05)^{c}	- 2,03 (0,03)^{d}
Cor b*	4,05 (0,02)^{b}	8,96 (0,03)^{a}	1,72 (0,03)^{d}	2,53 (0,03)^{c}

abcd Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). L * (0 preto à 100 branco), a * (+ vermelho à - verde), b * (+ amarelo à - azul).

Os subprodutos diferem entre si físico-quimicamente devido aos processos de separação aos quais foram submetidos. Conforme a Tabela 3 percebe-se que o teor de proteína e sais variou significativamente ($p < 0,05$) entre os subprodutos, e isso ocorre devido à origem do leite. Por exemplo, o leite de búfala difere do leite de vaca por conter elevado teor de proteína, 4,0 e 3,5% respectivamente (VENTURINI et al., 2007). Quando comparamos o soro de queijo com o permeado de soro, ambos bovinos, as diferenças entre os teores de proteínas e sais podem ser explicadas devido ao processo de obtenção, pois as proteínas contidas no soro de queijo são separadas por ultrafiltração, produzindo assim o permeado de soro (HUGO; BRUNO; GOLOWCZYC, 2016).

Vicenzi et al. (2014) caracterizaram o soro de ricota em seu estudo, e obtiveram teor de cinzas de 0,51% (m/v) e ausência de teor de lipídeos, similar à esta pesquisa que revelou 0,57% (m/v) de cinzas e também não evidenciou presença de lipídeos para o soro de ricota. Já Barile et al. (2009) avaliaram permeado de soro de queijo após o processo de ultrafiltração e encontraram teor de 0,17% (m/v) de proteínas, enquanto neste estudo evidenciou-se teor de 0,10% (m/v).

Quanto aos parâmetros de cor, percebeu-se diferença significativa ($p < 0,05$) para todas as amostras, destacando-se o valor mais elevado para o parâmetro de cor b* (8,96), para amostra de soro de queijo bubalino, sendo esta coloração amarelada relacionada a presença da riboflavina (vitamina B2) no leite de búfala, que deu origem à este soro (DE WIT, 2001). Observou-se também que os parâmetros de cor L* e b* indicaram tendência para cor branca e amarela, respectivamente, nos soros de queijo de leite bovino e bubalino, provavelmente devido à presença de lipídeos, pois os glóbulos de gordura, juntamente com partículas coloidais de caseína e fosfato de cálcio, são responsáveis pela cor branca amarelada do leite/ soro de queijo.

Conforme Antunes (2003), as proteínas do soro de queijo possuem alto valor biológico devido à presença de aminoácidos essenciais, destacando-se a presença de cisteína, leucina, isoleucina e lisina. Além disso, são de fácil digestibilidade, têm propriedades funcionais, tais como emulsificante, geleficante e espumante, e propriedades biológicas, como reparação celular, construção e reparação de músculos e ossos (ANTUNES, 2003). Na Tabela 4 são apresentados os aminoácidos presentes nos subprodutos utilizados como materiais de parede para o encapsulamento das bactérias lácticas.

Tabela 4 - Composição de aminoácidos presente no soro de queijo de leite bovino, soro de queijo de leite bubalino, soro de queijo de ricota e permeado de soro de leite bovino utilizados como um dos materiais de parede na produção das micropartículas

Aminoácidos (mg/g de proteína)	**Soro de queijo de leite bovino**	**Soro de queijo de leite bubalino**	**Soro de queijo de ricota**	**Permeado de soro de leite bovino**
Asparagina	3,72 (0,10)^{c}	2,66 (0,03)^{d}	6,63 (0,16)^{b}	11,09 (0,00)^{a}
Serina	6,61 (0,55)^{b}	5,85 (0,19)^{bc}	7,64 (0,61)^{a}	2,69 (0,09)^{d}
Glutamato	16,98 (1,54)^{a}	13,26 (0,52)^{a}	15,26 (0,98)^{a}	6,18 (0,26)^{b}
Prolina	5,85 (0,65)^{a}	4,08 (0,16)^{b}	5,60 (0,62)^{a}	4,14 (0,00)^{b}
Glicina	2,34 (0,13)^{c}	1,57 (0,04)^{d}	3,12 (0,12)^{b}	3,65 (0,08)^{a}
Alanina	4,40 (0,35)^{a}	3,35 (0,10)^{b}	4,09 (0,25)^{a}	2,97 (0,09)^{b}
Cisteína	2,33 (0,16)^{b}	1,88 (0,05)^{c}	2,76 (0,19)^{a}	1,94 (0,00)^{c}
Valina	2,70 (0,03)^{c}	2,86 (0,06)^{c}	5,65 (0,12)^{b}	8,98 (0,12)^{a}
Metionina	4,77 (0,38)^{ab}	3,82 (0,13)^{c}	5,32 (0,50)^{a}	0,00 (0,00)^{d}
Isoleucina	8,38 (0,75)^{a}	5,94 (0,29)^{b}	5,43 (0,36)^{b}	0,00 (0,00)^{c}
Leucina	2,02 (0,13)^{a}	1,45 (0,04)^{a}	0,67 (0,14)^{b}	0,00 (0,00)^{c}
Tirosina	8,04 (0,74)^{b}	3,67 (0,20)^{c}	8,77 (0,87)^{b}	17,76 (1,65)^{a}
Fenilalanina	4,94 (0,19)^{c}	3,23 (0,18)^{d}	7,06 (0,34)^{b}	12,33 (0,40)^{a}
Histidina	8,08 (0,93)^{a}	6,53 (0,56)^{b}	1,95 (0,72)^{c}	7,55 (0,16)^{a}
Lisina	25,13 (3,94)^{b}	25,65 (1,41)^{b}	39,55 (3,86)^{a}	27,38 (0,94)^{b}

^{abcd} Média (desvio padrão), n=6. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$).

As proteínas são formadas por combinações de 20 aminoácidos em diferentes proporções, que por sua vez são responsáveis pela estruturação, regulagem, defesa e transporte de fluídos biológicos. Dentre os aminoácidos, os não-essenciais são aqueles sintetizados pelo organismo, e os essenciais são aqueles que necessitam ser ingeridos. Os aminoácidos essenciais são: histidina, isoleucina, leucina, lisina, metionina, fenilanina, treonina, triptofano e valina (ANTUNES, 2003). Sendo assim, percebe-se que, com exceção da treonina e triptofano, todos os demais aminoácidos esseciais estão presentes nos soros de queijo avaliados, e sabe-se que estes são responsáveis pela manutenção dos probióticos, pois estimulam a fermentação e consequentemente mantêm a viabilidade das bactérias (ALBENZIO et al., 2013).

Por esta avaliação pode-se afirmar que as proteínas solúveis do soro de queijo apresentam excelente perfil de aminoácidos, o teor de aminoácidos essenciais da proteína do soro é maior do que qualquer outra fonte e corresponde a 60% do valor proteico total do soro. Haraguchi et al. (2006) também avaliaram a composição de aminoácidos em soro de queijo de leite bovino e encontraram teores similares para aspargina (3,8 mg/g) e alanina (4,9 mg/g), as demais concentrações foram diferentes, estando relacionadas ao processo de obtenção dos soros de queijo, como o tipo de queijo que foi produzido, a coagulação utilizada e a composição do leite, que por sua vez varia de acordo com a época do ano, raça do animal, e período de lactação.

Os aminoácidos presentes no soro de queijo, assim como aqueles produzidos pelas bactérias probióticas a partir das proteínas do soro, contribuem para realçar sabores característicos em derivados lácteos, além de auxiliar como precursores para outras reações catabólicas que originam cetoácidos, amônia, aminas, aldeídos, ácidos e álcoois, que colaboram para o desenvolvimento de sabor e aroma (ILICIC et al., 2012).

5.2 Caracterização físico-química e reológica das formulações encapsulantes

Nesse processo, além do uso da tecnologia de vibração, outras formas de controlar o tamanho das micropartículas são a viscosidade da mistura encapsulante, a concentração do material de parede e da solução solidificante, o tamanho do bocal extrusor e a distância entre a seringa e a solução geleificante (BRUN-GRAEPPI et al., 2011; HEIDEBACH et al., 2012). Para tanto, as formulações encapsulantes foram avaliadas quanto a alguns parâmetros físico-químicos e reológicos, conforme a Tabela 5. Todas as amostras apresentaram para o parâmetro de adesividade resultado igual a zero.

Tabela 5 - Caracterização físico-química e reológica das formulações encapsulantes utilizadas na produção das micropartículas

Análises	Formulações encapsulantes			
	SBO	**SBU**	**RBO**	**PBO**
pH	6,93 (0,01)[a]	6,73 (0,01)[b]	6,48 (0,01)[c]	6,32 (0,01)[d]
Condutividade (mS/cm)	2,52 (0,01)[a]	2,26 (0,01)[b]	2,56 (0,00)[a]	2,00 (0,00)[c]
Turbidez (NTU)	2694,33 (52,99)[b]	4136,67 (15,14)[a]	2037,67 (29,57)[c]	1319,33 (8,74)[d]
Cor L*	46,03 (0,33)[b]	50,90 (0,05)[a]	34,85 (0,01)[c]	18,92 (0,03)[d]
Cor a*	- 2,35 (0,10)[d]	- 2,01 (0,01)[c]	- 1,45 (0,01)[b]	4,78 (0,01)[a]
Cor b*	0,16 (0,01)[c]	1,14 (0,00)[b]	0,14 (0,01)[c]	19,89 (0,10)[a]
Viscosidade (mm^2/s)	35,00 (0,02)[b]	87,06 (0,04)[a]	25,81 (0,05)[c]	25,13 (0,03)[d]
Dureza (g)	9,00 (0,00)[b]	24,33 (1,15)[a]	9,00 (1,00)[b]	10,00 (1,00)[b]
Coesividade (adm)	0,68 (0,05)[b]	-0,91 (0,01)[c]	0,64 (0,01)[b]	1,21 (0,12)[a]
Elasticidade (mm)	0,99 (0,03)[b]	1,17 (0,10)[a]	1,17 (0,08)[a]	1,01 (0,00)[ab]

[abcd] Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). adm: adimensional. L * (0 preto à 100 branco), a * (+ vermelho à - verde), b * (+ amarelo à - azul). SOB (Alginato-Amido-Soro de queijo bovino); SBU (Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino); RBO (Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino); PBO (Alginato-Amido-Permeado de soro bovino).

Os resultados de pH e condutividade diferiram significativamente, podendo estar relacionado aos diferentes soros incorporados nas formulações, que por sua vez tem diferente origens e formas de obtenção. Quanto maior a viscosidade da mistura encapsulante, menor o efeito da vibração sobre a produção das micropartículas, e maior a probabilidade de entupimento dos bicos, que por sua vez determinam o tamanho das partículas (RAZGA et al., 2014). Porém, a baixa viscosidade pode gerar limitações na produção de partículas totalmente esféricas. Para contextualizar o parâmetro viscosidade, traz-se o exemplo para um bico de 120 μm, onde a faixa de viscosidade indicada pelo fabricante do equipamento é de 25 a 75 cP, o que corresponde à uma solução de 1,0% de alginato de sódio a 25 °C, aproximadamente (NEMETHOVA et al., 2014; WHELEHAN, 2014). Neste estudo, utilizou-se alginato de sódio 1,0%, em conjunto com amido 1,0% e soro de queijo/ permeado de soro de queijo, e observou-se que a viscosidade diferiu significativamente ($p < 0,05$) entre as formulações encapsulantes, destacando-se o valor mais elevado (87,06 mm^2/s) para formulação elaborada com soro de queijo bubalino, estando este resultado relacionado à composição deste soro, que conforme a Tabela 3 apresentou elevado teor de proteínas.

A turbidez pode ser definida como a redução da transparência de determinada solução, devido à presença de materiais em suspensão, que por sua vez interferem na passagem de luz

através do fluído (KITCHENER et al, 2017). Quanto mais elevada a turbidez, maior a afinidade dos polímeros uns pelos outros, o que pode conduzir a uma maior concentração dos materiais de revestimento sobre o núcleo esférico (SOGIAS et al., 2010). Portanto, os resultados de turbidez indicam maior afinidade entre as formulações encapsulantes SBU e SBO com os demais materiais utilizados, alginato de sódio e amido.

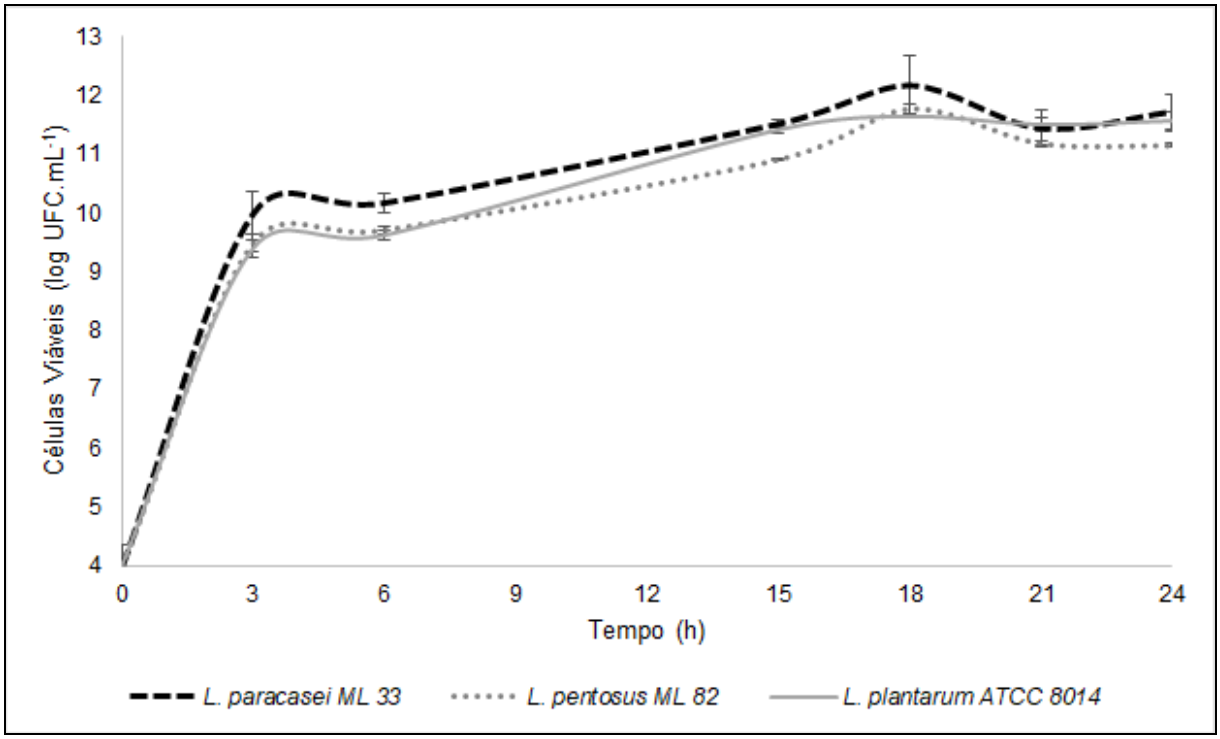
As formulações elaboradas apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para o parâmetro de cor L*, entretanto SBO (46,03) e SBU (50,90) apresentaram maior tendência à cor branca, se comparadas as demais. E a explicação está relacionada a composição dos soros, os quais possuem concentrações mais elevadas de lipídeos e proteínas.

Também foram avaliados parâmetros de textura, tais como a dureza (força necessária para realizar uma determinada deformação), coesividade (força das ligações internas) e elasticidade (velocidade com a qual o material deformado volta ao seu estado inicial após remoção da força que o deformou) (STEELE et al., 2015). Os resultados da dureza das formulações SBO, RBO e PBO são significativamente similares ($p < 0,05$), podendo estar relacionados à origem do soro, leite bovino. Já para coesividade, SBO e RBO foram semelhantes significativamente ($p < 0,05$), sendo ambos originados de leite bovino e formulados com soros oriundos de processos de coagulação das proteínas lácteas; diferente das formulações SBU originada de leite bubalino (espécie diferente), e PBO elaborada com permeado de soro, que além do processo de coagulação, também passa por ultrafiltração. No parâmetro elasticidade, SBU e RBO apresentaram o mesmo resultado.

5.3 Curva de crescimento das bactérias lácticas utilizados no encapsulamento

O padrão de crescimento de um determinado microrganismo em um meio de cultura específico pode ser observado através da elaboração de uma curva de crescimento. Isto por sua vez, reflete nas etapas de adaptação das células às condições ambientais, permitindo controlar a fase em que as células serão utilizadas em um determinado experimento (ALVES; GUIMARÃES, 2010). Na Figura 1 estão relacionadas as curvas de crescimento para os *Lactobacillus* spp. utilizados no presente trabalho.

Figura 1 - Curva de crescimento das células viáveis dos *Lactobacillus* spp. (log UFC.mL^{-1}) selecionados para encapsulamento



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão.

Através da curva de crescimento foi possível estipular o número de células viáveis em determinado intervalo de tempo. Sendo assim, observou-se que o perfil de crescimento é semelhante para os microrganismos avaliados, e a fase estacionária, na qual os experimentos foram desenvolvidos, no geral é atingida a partir de 18 h de incubação. Percebe-se que após 4 h de incubação também é atingido um pico elevado de crescimento, mas optou-se pela incubação por 18 h para garantir o máximo de células viáveis disponíveis. Ainda, a construção das curvas permitiu relacionar a densidade óptica (DO) com a contagem celular em UFC.mL^{-1}, conforme Tabela 6.

Tabela 6 - Densidade óptica das células viáveis dos *Lactobacillus* spp. selecionados para o encapsulamento

Tempo (horas)	Densidade Óptica (600 nm)		
	Microrganismos		
	L. paracasei ML 33	*L. pentosus* ML 82	*L. plantarum* ATCC 8014
0	0,37 (0,01)	0,32 (0,00)	0,20 (0,04)
3	0,65 (0,00)	0,39 (0,00)	0,22 (0,04)
6	2,42 (0,01)	0,52 (0,01)	0,30 (0,02)
15	6,88 (0,01)	4,58 (0,02)	5,85 (0,05)
18	8,19 (0,01)	5,89 (0,03)	6,83 (0,01)
21	8,38 (0,02)	6,04 (0,00)	7,29 (0,00)
24	8,24 (0,01)	6,80 (0,02)	7,96 (0,05)

Média (desvio padrão), n=2.

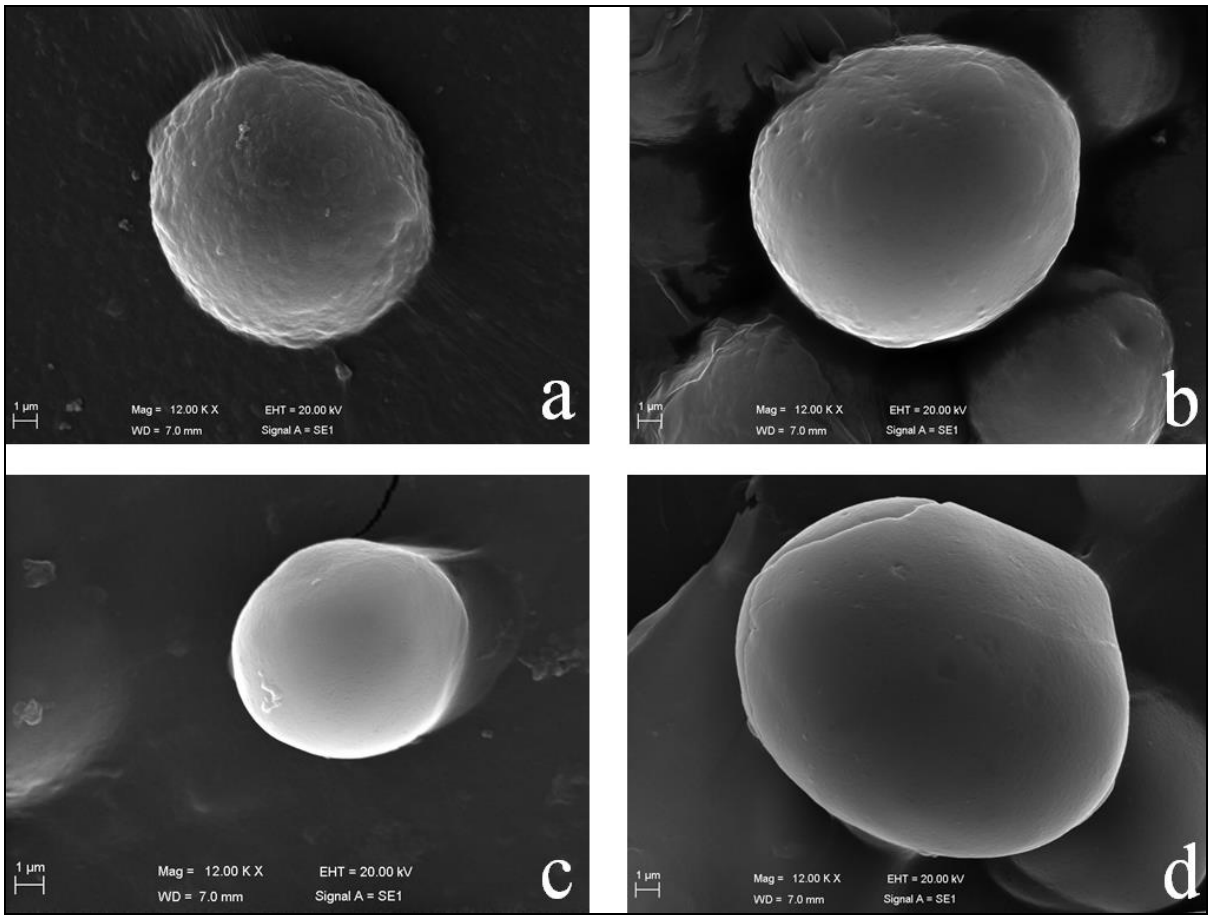
Por meio da medição da DO avalia-se a turbidez da cultura microbiana por um método rápido, porém indireto, que auxilia na estimativa da concentração celular do meio. O feixe de luz que passa pela suspensão microbiana é parcialmente desviado pelas células e a percentagem de luz não desviada é medida pelo equipamento, conforme Manual do equipamento UV-2600, Shimadzu, Kyoto 604-8511, Japan. Conforme a Tabela 6 percebe-se que mesmo após as 18 horas de incubação, onde é atingido o pico máximo de crescimento e logo após inicia-se a fase de declínio, a DO continua aumentando. Isso ocorre por que este método não permite distinguir células viáveis de células mortas, bem como não permite obter diretamente valores absolutos da concentração celular, sendo especialmente utilizado quando se pretende confirmar se uma dada cultura se encontra em crescimento ou para acompanhar o crescimento microbiano com base no aumento da DO. Por isso, neste estudo utilizou-se a DO apenas para padronização dos inóculos dos cultivos das bactérias lácticas.

5.4 Caracterização das micropartículas

A morfologia e o tamanho das micropartículas são diretamente influenciados por parâmetro de encapsulamento, características da solução de alimentação, tamanho do bico (neste estudo utilizou-se bico de 120 μm), taxa de alimentação, viscosidade e concentração da solução do hidrocolóide (material de parede), concentração da solução solidificante, distância entre a seringa e a solução (KRASAEKOOPT et al., 2003; BRUN-GRAEPPI et al., 2011;

HEIDEBACH et al., 2012). Além disso, sabe-se que as micropartículas não devem afetar as propriedades sensoriais quando inseridas em produtos alimentícios e para tanto devem apresentar valores de diâmetro <100 μm (BURGAIN et al., 2011; MARTÍN et al., 2015). A Figura 2 revela as micrografias de MEV das micropartículas obtidas neste estudo.

Figura 2 - Microfotografias de MEV das micropartículas obtidas por extrusão com tecnologia de vibração, para cada formulação encapsulante testada



(a) Micropartícula de Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (b) Micropartícula de Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (c) Micropartícula de Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (d) Micropartícula de Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. As imagens foram obtidas por Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV) (LS 10 - Carl Zeiss, Jena, Alemanha), tensão de aceleração 20,00 kV, distância de trabalho 7,00 mm, aumento de 12.000 X.

As micropartículas apresentaram formato esférico com parede contínua, sem quaisquer fendas e fissuras na superfície das partículas, sendo esta uma propriedade típica da proteína do soro de queijo, que forma uma espécie de pele como envolvente (ANANDHARAMAKRISHNAN et al., 2005). Isso é um atributo benéfico, pois um material de parede contínua protege o encapsulado, implicando na sobrevivência dos microrganismos. As Figuras 2a e 2b mostram que as micropartículas apresentam uma superfície levemente

irregular em comparação as demais, o que não compromete a capacidade de proteção das mesmas. Tal resultado pode estar relacionado ao depósito de sal cloreto de cálcio, utilizado como solução geleificante no processo de encapsulamento. Sabe-se que a formação das micropartículas ocorre devido a trocas de íons presentes nos materiais de parede com o cátion divalente presente na solução geilificante (Ca^{+2}) (KRASAEKOOPT et al., 2003). Logo, como as micropartículas SBO (Figura 2a) e SBU (Figura 2b) possuem maior concentração de proteínas, geram maior interação com o cálcio, em comparação as micropartículas RBO (Figura 2c) e PBO (Figura 2d).

O tamanho esperado para as micropartículas formadas, para todas as combinações de materiais da parede, era em torno de 240 μm, o dobro do diâmetro do bocal de alimentação usado neste experimento (BÜCHI - Encapsulador B-395 Pro Datasheet). Entretanto, conforme determinado pelas imagens de MEV (Figura 2), o tamanho da partícula foi semelhante entre as amostras, com o diâmetro médio de 13,00 $\pm$ 0,02 μm. Eckert et al. (2018) encapsularam lactobacilos com soro de queijo e permeado de soro de queijo agregados a alginato de sódio e pectina, e assim como neste estudo realizaram imagens através de MEV e também observaram redução (37,50% a menos) no tamanho esperado para as micropartículas, e atribuíram o resultado à perda de água. No MEV, as micropartículas sofrem aquecimento e vácuo o que gera a perda de água, tendo sido observado durante a análise, que ao aproximar a imagem, as partículas entravam em colapso e rompiam-se.

Não existe consenso quanto à definição do tamanho da partícula, entretanto Whelehan e Marison (2011) definiram em seu estudo a seguinte classificação: nanocápsulas (< 1 μm), micropartículas (1-1.000 μm) e macrocápsulas (> 1.000 μm). Logo, considerando o tamanho das micropartículas preparadas, elas são adequadas para serem adicionadas aos alimentos, pois as partículas garantem um produto homogêneo e de qualidade sem afetar as propriedades sensoriais (ARSLAN et al., 2015; MARTÍN et al., 2015). A maioria dos estudos utilizando extrusão por tecnologia vibracional produz micropartículas com diâmetros maiores, o que pode ser um fator negativo para sua aplicabilidade em alimentos (MARTONI et al., 2008; ; SHI et al., 2013ab; NEMETHOVA et al. 2015).

De fato, os tamanhos das micropartículas diferiram dos estudos que utilizaram o mesmo método de encapsulamento e observaram diâmetros maiores que os bicos de extrusão utilizados, como Olivares et al. (2017) que produziram micropartículas de lactobacilos com alginato de sódio com diâmetros entre 600 a 800 μm (bico de 450 μm). Já De Prisco et al. (2015) utilizaram a mesma metodologia de análise deste estudo e obtiveram encapsulados de

Lactobacillus reuteri DSM 17938 com alginato e quitosana-alginato com diâmetro médio de 110±5 µm (bico de 80 µm). Enquanto Yeung et al. (2016) observaram encapsulados de bifidobactérias com alginato de sódio e quitosana por meio de microscópio óptico e determinaram diâmetros de 135 a 292 µm (bico de 120 µm), assim como Shi et al. (2013b) que também utilizaram este equipamento para analisar as micropartículas de *L. bulgaricus* com leite, tendo como resultado 530 µm de diâmetro, forma esférica e irregular (bicos de 200 e 450 µm).

Pode-se pensar que o equipamento utilizado para determinação das imagens não é adequado, e neste contexto Yeung et al. (2016) avaliaram dois equipamentos para visualizar as micropartículas, sendo que por meio do microscópio eletrônico de varredura o resultado foi uma superfície enrugada, enquanto que as imagens em microscópio óptico apresentaram superfícies lisas. O microscópio eletrônico de varredura utiliza feixes de elétrons que incidem na amostra e são refletidos, permitindo maior ampliação e resolução da imagem da microcápsula, entretanto o equipamento aplica nas partículas temperatura elevada e o vácuo, que podem afetar as suas características morfológicas e dimensão. Já o microscópio óptico utiliza apenas luz visível, causando menos impacto na estrutura das micropartículas, porém a sua capacidade de aumento é menor, dificultando a determinação das características da camada formada. Portanto, verifica-se que há variações na interpretação dos parâmetros morfologia e tamanho das micropartículas em decorrência do método de análise escolhido, sendo ideal realizar avaliações em diferentes equipamentos e avaliar o que causa menos prejuízos as micropartículas.

5.5 Determinação das condições para rompimento das micropartículas

Na Tabela 7 são apresentados os testes de rompimentos realizados na micropartícula SBO-8014, bem como os respectivos resultados obtidos. O objetivo destas determinações foi o rompimento completo das micropartículas a fim de obter viabilidade média em torno de 9 log UFC.mL^{-1}, sendo esta a viabilidade inicial dos microrganismos antes do encapsulamento.

Tabela 7 - Testes para rompimento da micropartícula SBO-8014, na temperature de 30 ºC, com suas respectivas variações e resultados

Solução	Agitação (rpm)	Tempo (min)	Resultado
a) NaCl 0,5% (pH 2,5)	150	60	0,0 log UFC.mL^{-1}
b) NaCl 0,5% (pH 3,0)	150	60	0,0 log UFC.mL^{-1}
c) NaCl 0,5% (pH 8,0)	150	60	0,0 log UFC.mL^{-1}
d) Citrato de sódio tribásico 1%	150	60	0,0 log UFC.mL^{-1}
e) Água peptonada 1%	150	60	0,0 log UFC.mL^{-1}
f) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	150	60	7,2 log UFC.mL^{-1}
g) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	250	30	7,1 log UFC.mL^{-1}
h) Tampão fosfato 100 mM (pH 7,4)	250	45	8,8 log UFC.mL^{-1}

Sabe-se que o alginato de sódio, utilizado na composição do material de parede das micropartículas, tem baixa estabilidade mecânica e sensibilidade frente compostos quelantes, tais como os fosfatos. Sendo assim, o processo de rompimento das micropartícula deve deter-se a redução da estabilidade mecânica do hidrogel formado, causando a dissolução da estrutura da rede de gel, e gerando consequentemente o rompimento da micropartícula e liberação da carga microbiológica (WYSS et al., 2004).

Conforme Tabela 7, a solução de tampão fosfato 100 mM (pH 7,4) obteve maior eficiência no rompimento das micropartículas, em comparação com as demais avaliadas, conforme já previsto por De Prisco et al. (2015) que também utilizaram solução tampão fosfato, porém em concentração e pH diferentes (500 mM - pH 7,0), não tendo indicado neste estudo o tempo e temperatura utilizados, para o rompimento de suas microcápsulas com revestimento de alginato de sódio e quitosana. Portanto, o parâmetro determinante para o rompimento das micropartículas foi a agitação, que quanto mais intensa, proporcionou maior liberação dos microrganismos. Sendo assim, as condições do teste “h” foram estabelecidas como o procedimento padrão para rompimento das micropartículas.

A fim de verificar a possibilidade de melhorar ainda mais o rompimento, adicionaram-se ao teste “h” pérolas de vidro de 1,0 mm de diâmetro esterilizadas, que mediante agitação se chocariam com as micropartículas e proporcionariam maior rompimento e consequentemente

liberação completa dos microrganismos, entretanto o resultado obtido de concentração celular foi similar ao teste sem as pérolas de vidro, por isso as mesmas não foram utilizadas.

5.6 Viabilidade dos microrganismos encapsulados após o processo de encapsulamento

O encapsulamento por meio de extrusão com tecnologia de vibração é mais ameno para o microrganismo, em comparação com demais técnicas existentes, como por exemplo *spray drying* que utiliza temperatura elevada, e a liofilização que envolve congelamento. Logo, a extrusão com tecnologia de vibração não causa grandes impactos na viabilidade celular, pois não utiliza temperaturas altas ou baixas, trabalhando em temperatura ambiente, assim como, não utiliza solventes orgânicos ou agentes encapsulantes que afetam as características sensoriais. Sendo assim, estas características tornam o produto resultante desta técnica passível de aplicação em matrizes alimentares (WANG et al., 2017; ISLAM SHISHIR et al., 2018). Neste estudo foram combinados alginato de sódio, amido e soros de queijo, como materiais de parede, a fim de proteger a viabilidade dos isolados. As viabilidades dos lactobacilos antes e após o processo de encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração utilizando diferentes formulações encapsulantes estão descritas na Tabela 8.

Tabela 8 - Viabilidade dos lactobacilos antes e após processo de encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração, utilizando diferentes soros como material encapsulante

Micropartículas	**Número de células viáveis (log UFC.mL^{-1})**		**Redução log**
	Antes do encapsulamento	**Após o encapsulamento**	
SBO-33	10,67 (0,01)	10,41 (0,01)	$0,26^{Cb}$
SBO-82	10,87 (0,00)	9,49 (0,01)	$1,38^{Aa}$
SBO-8014	9,27 (0,06)	9,15 (0,08)	$0,12^{Cb}$
SBU-33	10,44 (0,01)	9,50 (0,00)	$0,95^{Bb}$
SBU-82	9,19 (0,04)	8,81 (0,03)	$0,38^{Bc}$
SBU-8014	10,63 (0,00)	9,00 (0,00)	$1,63^{Ba}$
RBO-33	9,65 (0,01)	8,54 (0,03)	$1,11^{ABb}$
RBO-82	9,28 (0,05)	7,59 (0,06)	$1,69^{Aa}$
RBO-8014	9,42 (0,02)	7,38 (0,10)	$2,04^{Aa}$

PBO-33	9,69 (0,01)	8,61 (0,06)	$1,08^{ABb}$
PBO-82	9,41 (0,07)	7,80 (0,03)	$1,61^{Aab}$
PBO-8014	9,93 (0,00)	7,75 (0,01)	$2,18^{Aa}$

Média (desvio padrão), n=3. ^{abcd} (microrganismos) ^{ABC} (formulações encapsulantes), diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Legenda: SBO (Alginato-Amido-Soro de queijo bovino); SBU (Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino); RBO (Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino); PBO (Alginato-Amido-Permeado de soro bovino). 33 (*L. paracasei* ML 33); 82 (*L. pentosus* ML 82); 8014 (*L. plantarum* ATCC 8014).

Os resultados indicam que o uso dos diferentes soros lácteos proporcionou efeito protetor aos microrganismos encapsulados, principalmente os soros de queijo bovino e bubalino, possibilitando elevada viabilidade celular para todas as micropartículas (acima de 8,81 log UFC.mL^{-1}). Sendo assim, torna-se uma alternativa para incorporação destas micropartículas em alimentos, tendo em vista conformidade com a literatura (FAO/WHO, 2006) em relação à concentração de probióticos a serem consumidos, para melhorar as propriedades funcionais ao indivíduo.

O alginato de sódio e o amido, quando combinados, formam um complexo com efeito sinérgico que produz géis a valores baixos de pH, que são obtido em meios contendo bactérias produtoras de ácido láctico. Este complexo formado permite a ligação entre os hidrogéis devido à adição de cátions divalentes (Ca^{2+} presente na solução geleificante), melhorando assim a estabilidade química e mecânica da micropartícula formada, bem como a eficiência de encapsulação (CHEW et al., 2015; COGHETTO et al., 2016; ECKERT et al., 2018). No entanto, as partículas produzidas por gelificação ionotrópica são geralmente porosas, o que pode prejudicar a proteção da micropartículas, e por isso é importante a combinação com outros materiais de parede, para fortalecer a barreira imposta pelo encapsulamento. Um exemplo de material que pode ser combinado é o soro de queijo, promissor para microencapsulação de microrganismos probióticos. O soro de queijo possui proteínas com alto valor biológico, que têm um efeito emulsificante que ajuda a reduzir a porosidade e a difusão do encapsulado (ECKERT et al., 2018). Portanto, as proteínas contidas no soro de queijo, possuem efeito gelificante e aumentam a densidade da rede formada no encapsulado, reduzindo a taxa de difusão das micropartículas e proporcionando proteção às células (GEBARA et al., 2013; PRASANNA; CHARALAMPOPOULOS, 2018).

Logo, relaciona-se a proteção mais eficiente das micropartículas SBO (0,35%) e SBU (0,51%) à concentração de proteínas presentes nos soros de queijo utilizados. Percebe-se também que a superfície levemente irregular das micropartículas SBO e SBU (Figura 2a e

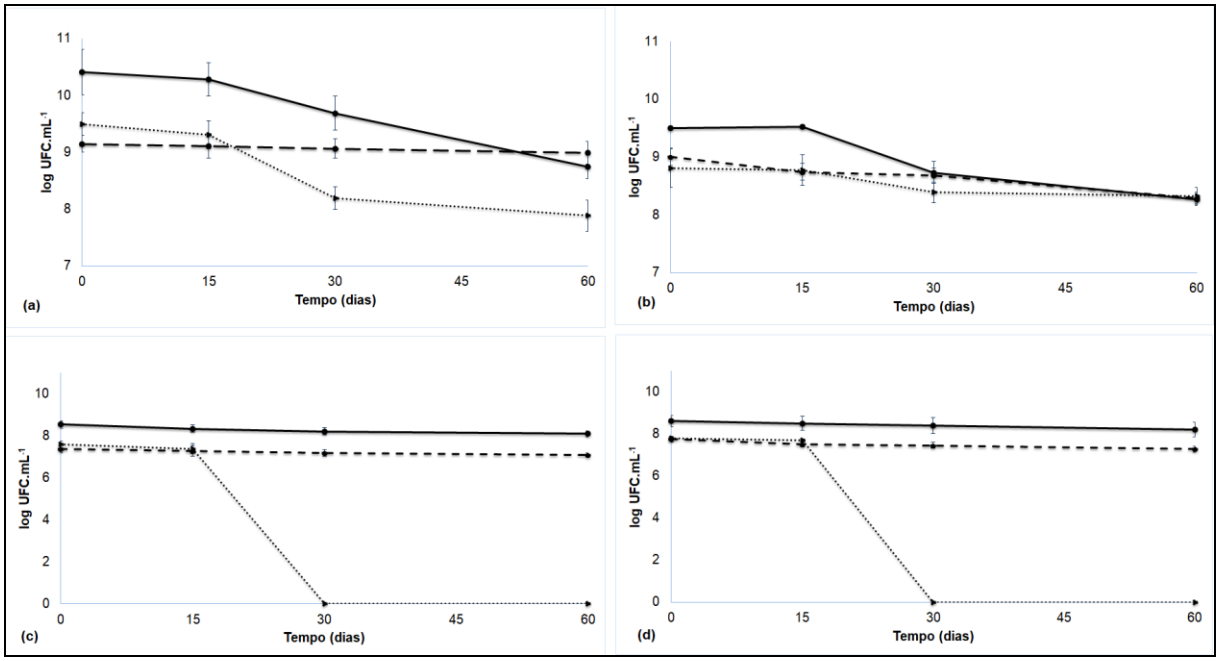
2b), em comparação as demais, não comprometeu a capacidade de proteção das mesmas. O uso de proteínas lácteas como material de parede para encapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração já foi estudado por Shi et al. (2013b) que encapsularam *L. bulgaricus* com carragena e leite, tendo relatado assim como neste estudo, proteção das células encapsuladas quando expostas a condições adversas. Eckert el al. (2018) também encapsularam *Lactobacillus* spp. com alginato-pectina e soro lácteo, e obtiveram viabilidades acima de 9 log UFC.mL^{-1}, similar aos resultados observados para as micropartículas SBO e SBU.

Em relação aos microrganismos encapsulados, as micropartículas SBO-33, SBO-8014 e SBU-82 apresentaram menor redução log após processo de encapsulamento, e foram avaliadas quanto ao potencial de acidificação. Já em relação ao material de parede, as formulações encapsulantes RBO e PBO não apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) na redução log, sugerindo que o soro que queijo de ricota e permeado de soro de queijo, ambos de origem bovina, comportam-se da mesma forma como materiais de parede para os microrganismos estudados. O permeado de soro é obtido a partir da ultrafiltração do soro, já o soro de queijo de ricota é o subproduto da precipitação das proteínas do soro de queijo provenientes da produção de outros queijos (FOX e MCSWEENEY, 2004).

5.7 Sobrevivência dos encapsulados ao longo do armazenamento

As micropartículas foram armazenadas sob refrigeração 4 ºC em tampão fosfato (10 mM pH 7,4), sendo avaliada a sobrevivência a cada 15 dias, por um período de 60 dias, conforme resultados da Figura 3.

Figura 3 - Viabilidade das micropartículas de *Lactobacillus* spp. (log UFC.mL^{-1}) após 0, 15, 30 e 60 dias de armazenamento a 4 °C



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. Legenda: (a) SBO: Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (b) SBU: Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (c) RBO: Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (d) PBO: Alginato-Amido-Permeado de soro bovino.▬ *L. paracasei* ML 33; •••*L. pentosus* ML 82; ▬ ▪ *L. plantarum* ATCC 8014.

Durante o armazenamento, um fator importante para manutenção da viabilidade dos probióticos encapsulados, é a interação dos mesmos com os materiais de parede utilizados. A carga superficial e a hidrofobicidade das bactérias estão envolvidas com a interação entre as proteínas e os açúcares que compõem esses materiais, que por sua vez são específicos da linhagem e podem ser afetados pelos componentes dos materiais da parede e os valores de pH do meio a que estão expostos (EL-SALAM; EL-SHIBINY, 2015). Mas, sabe-se que o soro de queijo usado como material de parede é um habitat natural das bactérias lácticas, tornando assim as micropartículas um ambiente com propriedades físico-químicas e biológicas adequadas para a manutenção desses microrganismos (ECKERT et al., 2018).

Em geral, a combinação de alginato de sódio, amido e soro de queijo, protegeu os microrganismos ao longo do armazenamento, o que provavelmente está relacionado a composição de proteínas do soro de queijo, que reforçam a rede formada entre os polímeros utilizados, aumentando a resistência das micropartículas (SHI et al., 2013ab). Evidenciou-se após 30 dias de armazenamento, a ausência de desenvolvimento do microrganismo *L.*

pentosus ML 82 nas micropartículas RBO e PBO. Entretanto as taxas de sobrevivência para os demais microrganismos encapsulados com estes mesmos materiais de parede foram elevadas: RBO-33 (94,71%), RBO-8014 (96,01%), PBO-33 (95,35%) e PBO-8014 (93,91%), assim como o microrganismo *L. pentosus* ML 82 com os demais materiais de parede também apresentou taxa de sobrevivência satisfatória: SBO-82 (83,07%) e SBU-82 (94,49%). Sendo assim, o resultado insatisfatório restringe-se, especificamente, a combinação dos materiais de parede soro de queijo de ricota e permeado de soro com o microrganismo *L. pentosus* ML 82.

Observa-se que os encapsulados mantiveram-se viáveis ao longo de 60 dias de armazenamento para todas as micropartículas produzidas, com viabilidade acima de 7 log UFC.mL^{-1}, com exceção de RBO-82 e PBO-82. As formulações encapsulantes SBO e SBU apresentaram maior eficiência na proteção dos microrganismos, podendo novamente estar relacionado à composição do soro de queijo (bovino e bubalino). Prasanna e Charalampopoulos (2018) encapsularam *Bifidobacterium longum subsp. infantis* CCUG 52486 com alginato de sódio e matrizes de leite (bovino e caprino), e observaram diminuição drástica (8,96 para 3,96 log UFC.mL^{-1}) para os microrganismos livres, indicando a incapacidade das células livres manterem a sua viabilidade sob a condição de armazenamento refrigerado. Já os resultados para os encapsulamentos revelaram que houve melhoria na viabilidade das células bacterianas durante o armazenamento refrigerado por 28 dias, similar a este estudo, porém avaliado por 60 dias. Logo, conclui-se que a incorporação de outros compostos ao alginato de sódio é necessária para manter a estabilidade da micropartícula e consequente viabilidade dos microrganismos encapsulados, e que os soros de queijo e o amido apresentam potencial de proteção aos isolados durante o armazenamento.

Destaca-se a micropartícula SBO-8014 que obteve a maior taxa de sobrevivência (98,28%), mesmo após 60 dias de armazenamento. Resultados semelhantes foram descritos por Shi et al. (2013a), porém em período de tempo inferior ao deste estudo, ao encapsularem *L. bulgaricus* com alginato-leite, seguindo armazenamento em água destilada estéril a 4 ºC. Os autores relatam que as cápsulas apresentaram excelente viabilidade em um período de 30 dias, com a mesma contagem inicial, de 10 log UFC.g^{-1}. Células não encapsuladas foram utilizadas como controle, e neste caso, uma redução de 7,7 log UFC.g^{-1} foi observada, indicando que a combinação de alginato-leite foi essencial na manutenção da viabilidade do microrganismo.

Assim como a avaliação de Shi et al. (2013a), neste estudo também avaliaram-se os microrganismos livres, tendo sido armazenados nas mesmas condições das micropartículas

(tampão fosfato 10 mM a 4 °C), e para estes observou-se redução expressiva logo na primeira semana, de 2 a 3 ciclos log, com a ausência de crescimento após 3 semanas de armazenamento. Portanto, pode-se afirmar que as formulações encapsulantes são eficientes na proteção da viabilidade dos probióticos ao longo do armazenamento, na respectiva temperatura avaliada.

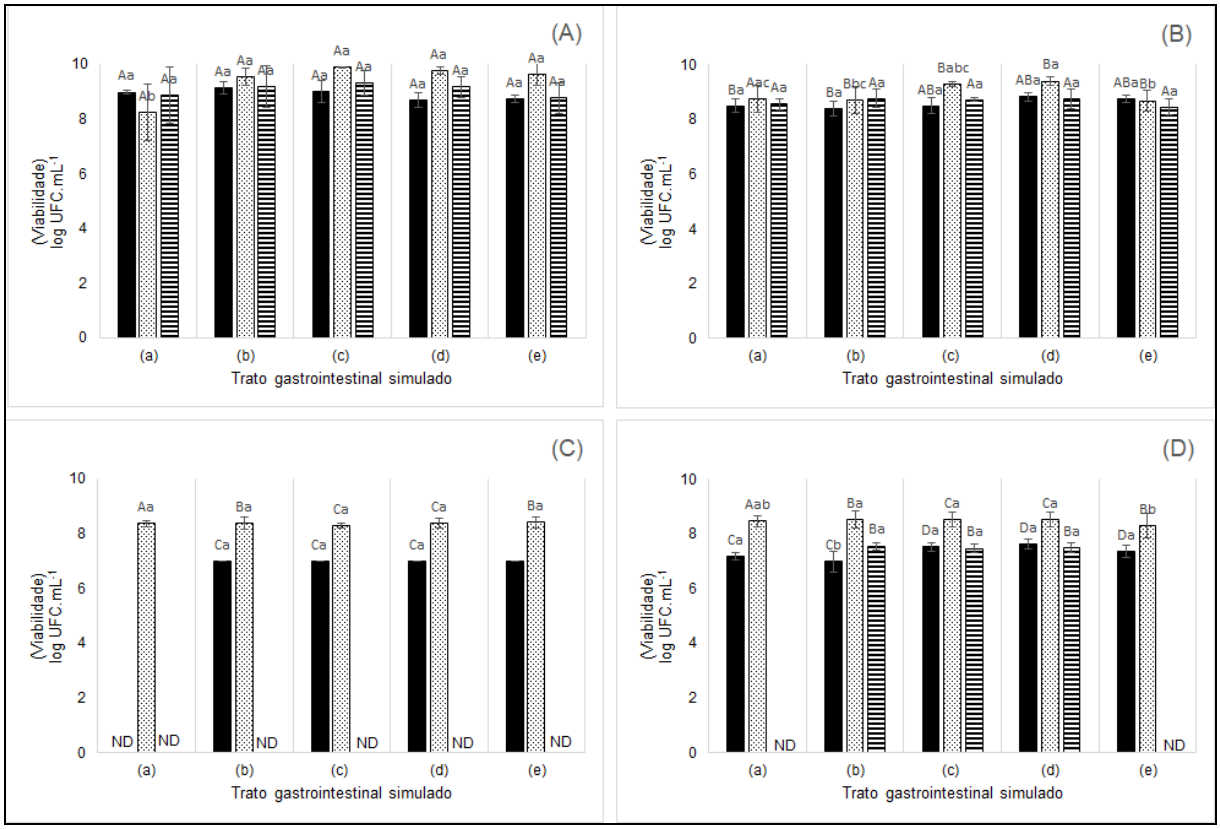
Outro sim, percebe-se que não existe um consenso quanto as condições de armazenamento das micropartículas obtidas por extrusão com tecnologia de vibração. Neste estudo utilizou-se solução tampão de fosfato, Shi et al. (2013a) utilizaram água destilada e Yeung et al. (2016) utilizaram solução salina fisiológica. O meio aquoso auxilia na manutenção das micropartículas, que são formadas por um material geleificante que requer umidade. Entretanto, a ausência de umidade diminui a propensão à contaminação por bolores e leveduras, e viabilizam manutenção das mesmas sem controle de temperatura.

5.8 Sobrevivência dos encapsulados e não encapsulados ao trato gastrointestinal simulado (TGI)

As BAL são conhecidas por promover benefícios à saúde, entre eles a produção de ácido e/ou bacteriocinas, melhora do sistema imune e competição com patógenos. Entretanto, para exercerem esses benefícios elas devem estar metabolicamente estáveis e ativas, além de sobreviver à passagem do trato gastrointestinal em grande número, para então atingirem o intestino e promoverem os efeitos benéficos no hospedeiro (ANAL; SINGH, 2007; VIVEK, 2013; MARTÍN et al., 2015). Sendo assim, é imprescindível a avaliação da viabilidade de microrganismos à exposição de enzimas, baixos níveis de pH do estômago e presença de sais biliares no intestino.

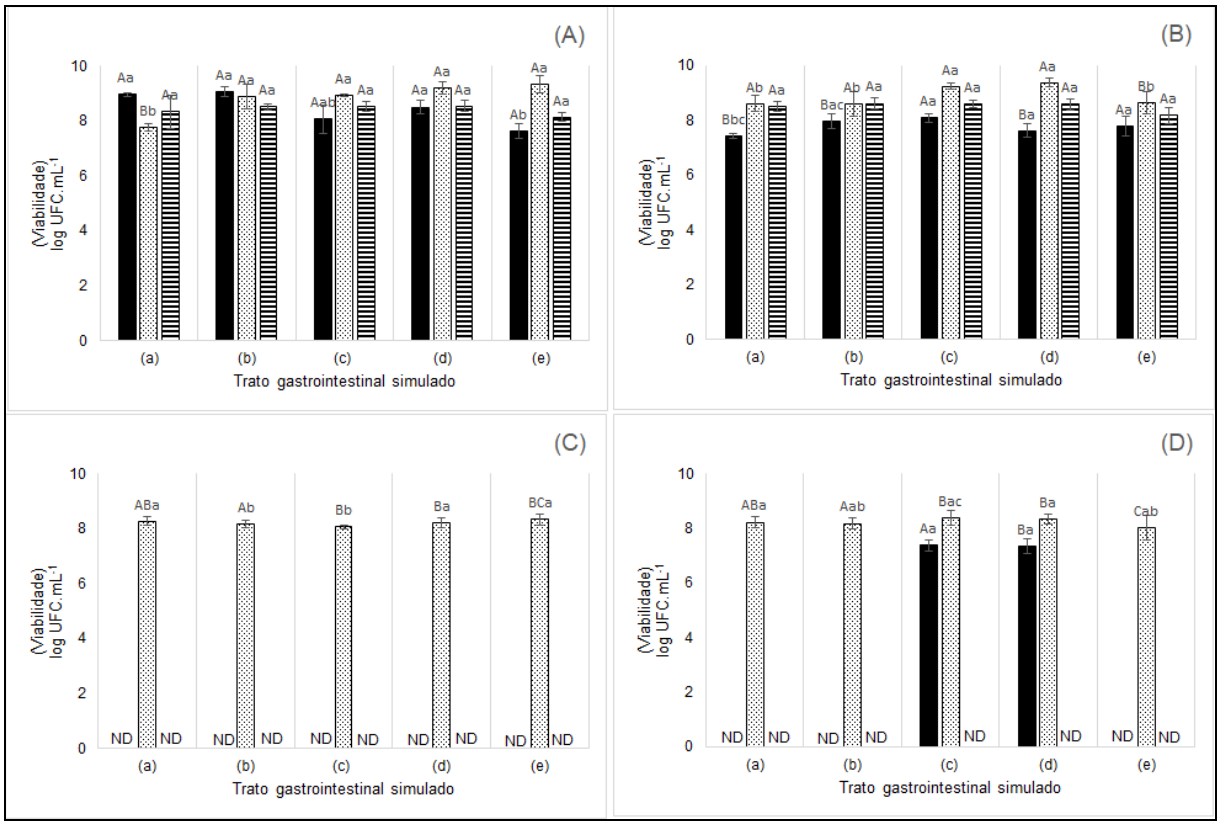
A viabilidade dos lactobacilos utilizados neste estudo, livres e encapsulados com as diferentes formulações, armazenados a 4 ºC durante 60 dias foram avaliadas quanto ao trato gastrointestinal simulado. Nas Figuras 4, 5 e 6 são apresentados os resultados encontrados para as micrpartículas produzidas.

Figura 4 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 0 dias de armazenamento



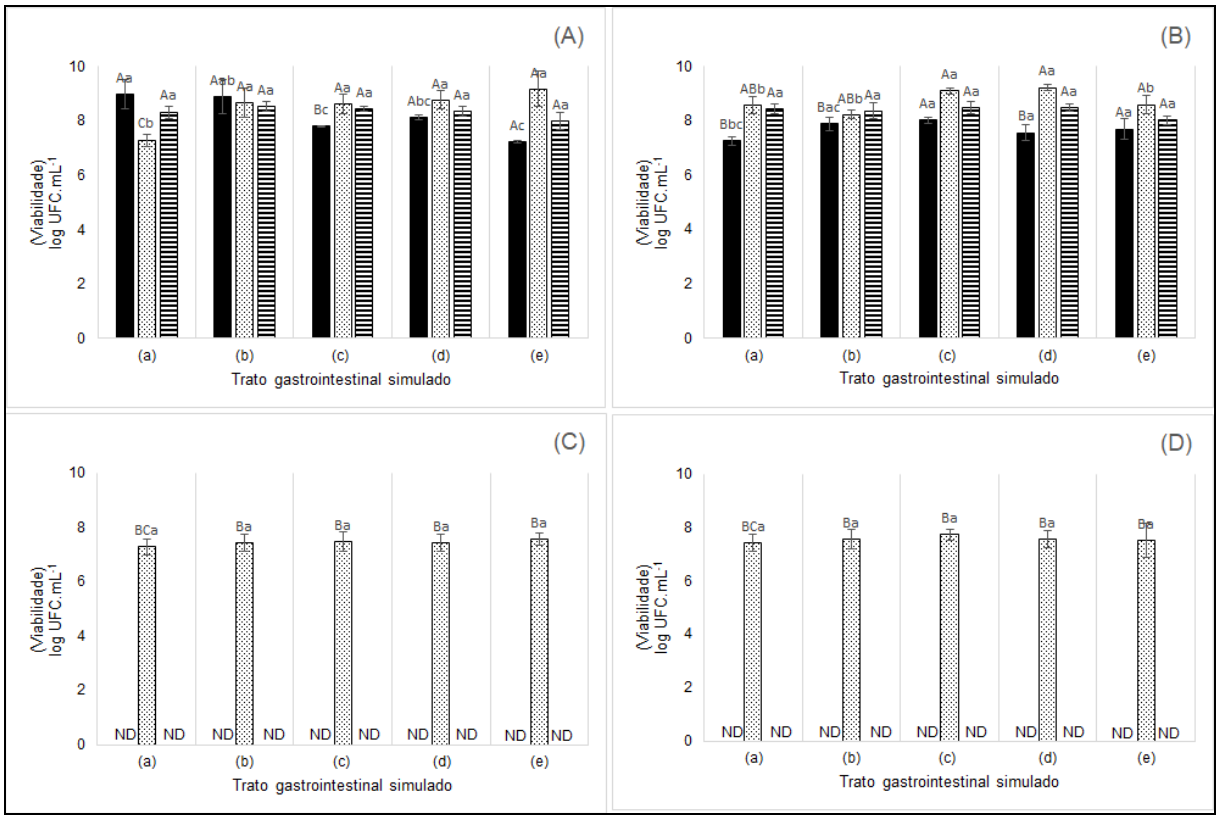
Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. ^{abc} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente as diferentes soluções de TGI, para cada material de parede individualmente), ^{ABCD} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente a mesma solução de TGI, para os diferentes materiais de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 e (c) pH 3,0; TI (Trato intestinal): Suco intestinal durante 240 minutos (d) pH 8,0 sem sais biliares e (e) pH 8,0 com 0,5% (m/v) de sais biliares. Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014; ▩ *L. paracasei* ML 33; ▤ *L. pentosus* ML 82. ND = não detectado.

Figura 5 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 30 dias de armazenamento



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. ^{abc} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente as diferentes soluções de TGI, para cada material de parede individualmente), ^{ABCD} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente a mesma solução de TGI, para os diferentes materiais de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 e (c) pH 3,0; TI (Trato intestinal): Suco intestinal durante 240 minutos (d) pH 8,0 sem sais biliares e (e) pH 8,0 com 0,5% (m/v) de sais biliares. Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014; ▩ *L. paracasei* ML 33; ▤ *L. pentosus* ML 82. ND = não detectado.

Figura 6 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição ao trato gastrointestinal simulado, em 60 dias de armazenamento



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. ^{abc} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente as diferentes soluções de TGI, para cada material de parede individualmente), ^{ABCD} (comparativo entre o mesmo microrganismo, frente a mesma solução de TGI, para os diferentes materiais de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 e (c) pH 3,0; TI (Trato intestinal): Suco intestinal durante 240 minutos (d) pH 8,0 sem sais biliares e (e) pH 8,0 com 0,5% (m/v) de sais biliares. Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014; ▩ *L. paracasei* ML 33; ▤ *L. pentosus* ML 82. ND = não detectado.

Os microrganismos livres (não encapsulados) foram expostos ao trato gastrointestinal simulado com viabilidade inicial média de 8 log UFC.mL^{-1}, e de modo geral, apresentaram tolerância inferior em relação aos microencapsulados. Observou-se viabilidade de *L. plantarum* ATCC 8014 (3,35 log UFC.mL^{-1} em pH 2,0; 7,12 log UFC.mL^{-1} em pH 2,5 e 6,32 log UFC.mL^{-1} em pH 3,0) após 5 min de exposição, ocorrendo ausência de viabilidade celular após 1 h. Já em solução TI, após 5 min de exposição não observou-se mais viabilidade. O microrganismo *L. paracasei* ML 33 manteve-se viável ao TGI simulado (média de 2,10 log UFC.mL^{-1} para TG e 1,0 log UFC.mL^{-1} para TI) após 3 horas de exposição, não sobrevivendo

após 4 horas. E *L. pentosus* ML 82 manteve-se viável ao TGI simulado (média de 3,22 log UFC.mL^{-1} para TG e 2,15 log UFC.mL^{-1} para TI) após 2 horas de exposição, não havendo viabilidade após 3 horas.

Estudos relataram que a maioria dos microrganismos probióticos não suportam as condições ácidas do estômago. Entretanto, as proteínas do soro de queijo que possuem propriedades tecno-funcionais, como a capacidade de formação de géis e emulsões, combinadas com alginato de sódio e amido, podem melhorar a viabilidade destes microrganismos às condições adversas. O efeito gelificante dessa combinação é uma excelente barreira ao pH baixo, o que propicia a sobrevivência de microrganismos encapsulados em matrizes hidrocolóides com soro de queijo. Isso se deve à densa rede de hidrogel formada, que por sua vez reduz a taxa de difusão para a micropartícula, reduzindo a exposição dos microrganismos ao meio ácido (DOHERTY et al., 2012; PRASANNA; CHARALAMPOPOULOS, 2018).

Quanto as micropartículas avaliadas neste estudo, logo após o processo de encapsulamento, percebeu-se satisfatória resistência ao TGI, especialmente das micropartículas com os materiais de parede SBO e SBU, para todos os microrganismos, com taxa média de sobrevivência de 94,44 e 96,01%, e viabilidade média de 9,13 e 8,74 log UFC.mL^{-1}, respectivamente. Sendo assim, estas micropartículas podem ser consideradas probióticas conforme a FAO/WHO (2006), que admite viabilidade mínima de 10^6 UFC.mL^{-1} ou g^{-1}. Conforme a Tabela 3, os soros de queijo bovino e bubalino, que juntamente com o amido e alginato de sódio, compõem o material de parede das micropartículas SBO e SBU, possuem teores de lipídeos e proteínas mais elevados que os demais soros lácteos utilizados, provavelmente esta característica da composição desses materiais está relacionada à maior proteção por eles conferida.

Avaliando especificamente o material de parede soro de queijo de ricota bovino, no tempo 0, percebe-se que a micropartícula com melhor desempenho foi a RBO-33, que apresentou resistência média de 8,37 log UFC.mL^{-1} (Figura 4C) para todas as soluções do TGI. Já RBO-82 não resistiu ao TGI simulado, e não foi possível evidenciar viabilidade para RBO-8014 no TG simulado pH 2,0 após 3 h de exposição (Figura 4C). Para o material de parede permeado de soro de queijo bovino, no tempo 0, destacaram-se PBO-8014 (7,17 log UFC.mL^{-1}) e PBO-33 (7,42 log UFC.mL^{-1}), já a micropartícula PBO-82 não registiu ao TG simulado em pH 2,0 e ao TI simulado em pH 8,0 com sais biliares (Figura 4D).

Percebe-se, no tempo 0 (Figura 4), que as viabilidades dos encapsulados após TGI simulado com o mesmo material de parede, para diferentes microrganismos, não diferem estatisticamente ($p < 0,05$), sendo evidenciada também similaridade entre os revestimentos SBO e SBU. Assim como, os encapsulados PBO-33 apresentaram viabilidade similar ($p < 0,05$) para os revestimentos SBO (em pH 2,0), SBU (em pH 2,5 e 8,0 com sais biliares), e RBO (pH 3,0 e 8,0).

Olivares et al. (2017) utilizaram o mesmo método de encapsulamento para três estirpes de lactobacilos, entretanto aplicaram como material de parede somente o alginato de sódio. As avaliações no tempo 0 mostram que para valores de pH inferiores a 3,0, a sensibilidade dos lactobacilos microencapsulados depende do tempo de exposição. Já no pH 2,0 observaram uma redução drástica logo após 5 min de incubação, somente o *L. casei* encapsulado apresentou 75% de sobrevivência após 30 min em pH 2,0, e 77,7% após 90 min em pH 2,5. Neste estudo, o microrganismo *L. paracasei* ML 33 também se mostrou resistente a todas as soluções do TGI, para todos os materiais de parede ao longo do tempo. As espécies *L. casei* DSM 20011 (utilizada por Olivares et al. (2017)) e *L. paracasei* (utilizada neste estudo) pertencem ao grupo dos *L. casei* (VÁSQUEZ et al., 2005), e são bactérias lácticas Gram-positivas, não esporuladas, anaeróbias, mas aerotolerantes, ácido-tolerantes e estritamente fermentativas (SALMINEN et al., 2004). Os microrganismos pertencentes a este grupo são aptos a colonizar vários ambientes, inclusive o trato gastrointestinal humano, e por isso têm sido amplamente estudados com relação a suas propriedades promotoras à saúde, sendo freqüentemente empregadas como probióticos em alimentos industrializados (VÁSQUEZ et al., 2005).

Após 30 e 60 dias de armazenamento (Figuras 5 e 6), os encapsulados foram novamente submetidos ao TGI simulado. As micropartículas SBO e SBU para todos os microrganismos continuaram apresentando elevada taxa de sobrevivência, SBO (88,53 e 86,45% - Figuras 5A e 6A) e SBU (92,15 e 90,75% - Figuras 5B e 6B) para 30 e 60 dias respectivamente. Assim como, as micropartículas de *L. paracasei* ML 33, para RBO (96,06 e 86,93% - Figuras 5C e 6C) e PBO (95,53 e 87,70% - Figuras 5D e 6D), que apresentaram respectivamente taxas de sobrevivência após 30 e 60 dias de armazenamento.

Após 30 dias não se detectou viabilidade para as micropartículas RBO-8014 e RBO-82 (Figura 5C), para todas as soluções de TGI simulado, e para PBO-8014 (TG pH 2,0; 2,5; TI 8,0 com sais biliares) e PBO-82 (Figura 5D) para soluções de TGI simulado. Já após 60 dias

de armazenamento, não resistiram ao TGI simulado, as micropartículas RBO-8014 e RBO-82 (Figura 6C), e PBO-8014 e PBO-82 (Figura 6D).

Através da avaliação estatística, percebe-se que após 30 dias, as micropartículas que resistiram ao TGI, com material de parede RBO e PBO apresentaram viabilidades similares ($p < 0,05$) às micropartículas SBO e SBU, quando se correlaciona o material de parede, isto nas soluções de TG simulado (pH 2; 2,5 e 3,0). Logo, observa-se que a presença de pepsina em diferentes pHs nos quais as micropartículas foram expostas (Figura 5 A-D), não afetou a viabilidade das células.

Na avaliação comparativa entre os materiais de parede utilizados, os soros de queijo bovino e bubalino conferem maior proteção aos diferentes microrganismos, tendo apresentado taxa média de sobrevivência ao TGI simulado de 88,5% e 92,15% após 30 dias de armazenamento, e 86,4 e 90,7% após 60 dias de armazenamento, respectivamente. Já quando comparamos os diferentes microrganismos encapsulados *L. paracasei* ML 33 apresentou maior resistência ao TGI simulado, com 92,5% e 87,1% após 30 e 60 dias respectivamente.

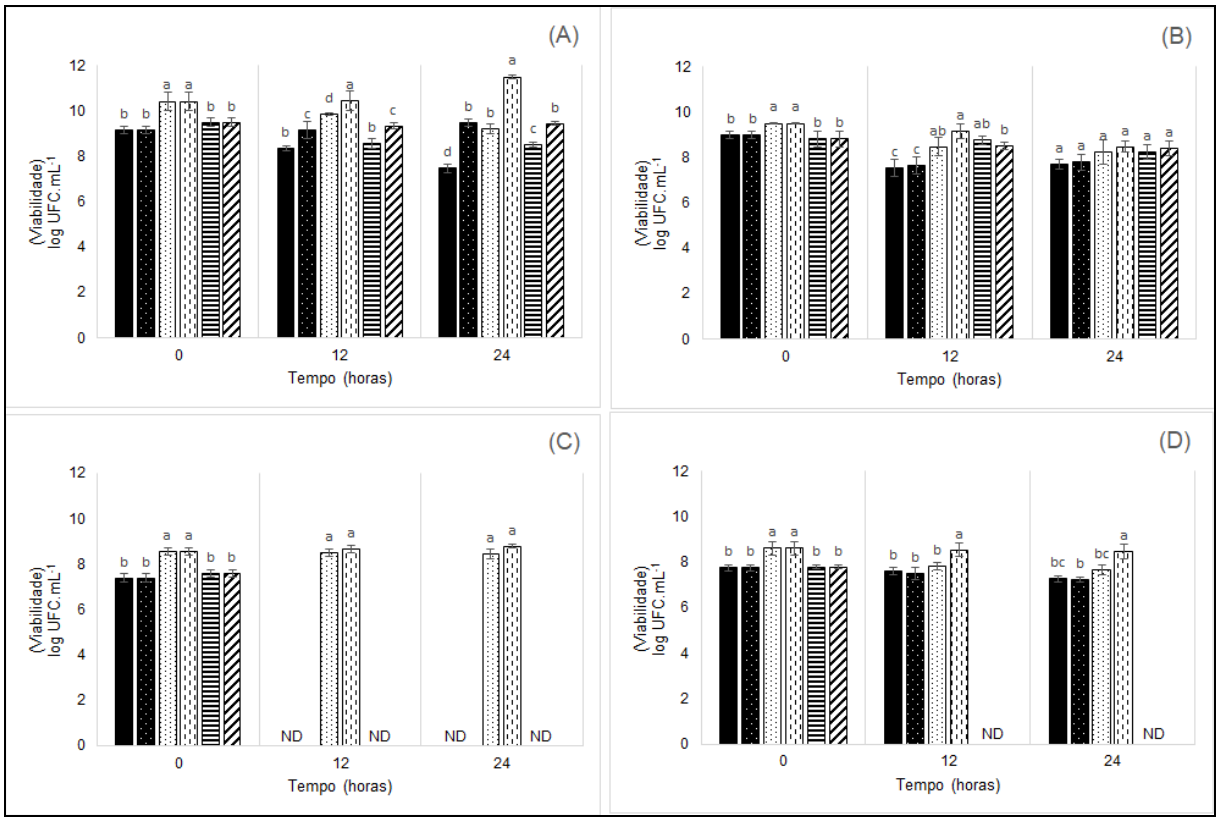
Shi et al. (2013a) encapsularam com a mesma tecnologia deste estudo *L. bulgaricus* com alginato e leite, e concluíram que o material de parede foi eficiente, visto que as células encapsuladas apresentaram maior sobrevivência quando comparadas às células livres em pH 2,0 e 2,5, assim como em concentrações de sais biliares de 1,0 e 2,0%, após armazenamento de 1 mês. Shi et al. (2013b) microencapsularam *L. bulgaricus* com leite, e confirmaram que o microrganismo livre é sensível ao pH do estômago (extinto após 1 min de exposição em pH 2,5), já o *L. bulgaricus* encapsulado foi preservado após 2 h de incubação em pH 2,0, tendo preservado 8 log de viabilidade. Os autores acreditam que estes resultados se devem a proteção da proteína do leite, que propicia baixa porosidade na superfície das microesferas devido à formação de uma densa rede entre o hidrogel e os constituintes do soro, que reduzem a taxa de difusão de compostos nas microesferas, protegendo o encapsulado principalmente de condições ácidas. A maioria dos microrganismos probióticos não resiste às condições ácidas estomacais. Desta forma, o encapsulamento com proteínas do soro apresenta uma excelente barreira ao baixo pH, contribuindo com a alta sobrevivência de microrganismos encapsulados (SHI et al., 2013ab). Estas observações são reafirmadas pelo estudo de Prasanna e Charalampopoulos (2018), onde os encapsulados a base de leite foram mais eficientes na proteção das células em suco intestinal simulado, atribuindo este resultado aos ingredientes do leite, que podem modificar as propriedades de textura da micropartícula, melhorando a resistência a difusão do sal biliar nas mesmas.

Portanto, conclui-se que os microrganismos, em especial *L. paracasei* ML 33, foram protegidos, principalmente nas amostras microencapsuladas com soro de queijo bovino e bubalino, criando um ambiente adequado para a sobrevivência desses em condições ácidas e sais biliares simulando o TGI. A viabilidade das bactérias à passagem pelo TGI pode ser melhorada pelo processo de microencapsulamento por extrusão com tecnologia de vibração, propiciando assim a aplicação de uma bactéria endógena (cepa isolada no Vale do Taquari/ RS) em produtos alimentícios.

5.9 Resistência dos encapsulados e não encapsulados ao *stress* osmótico

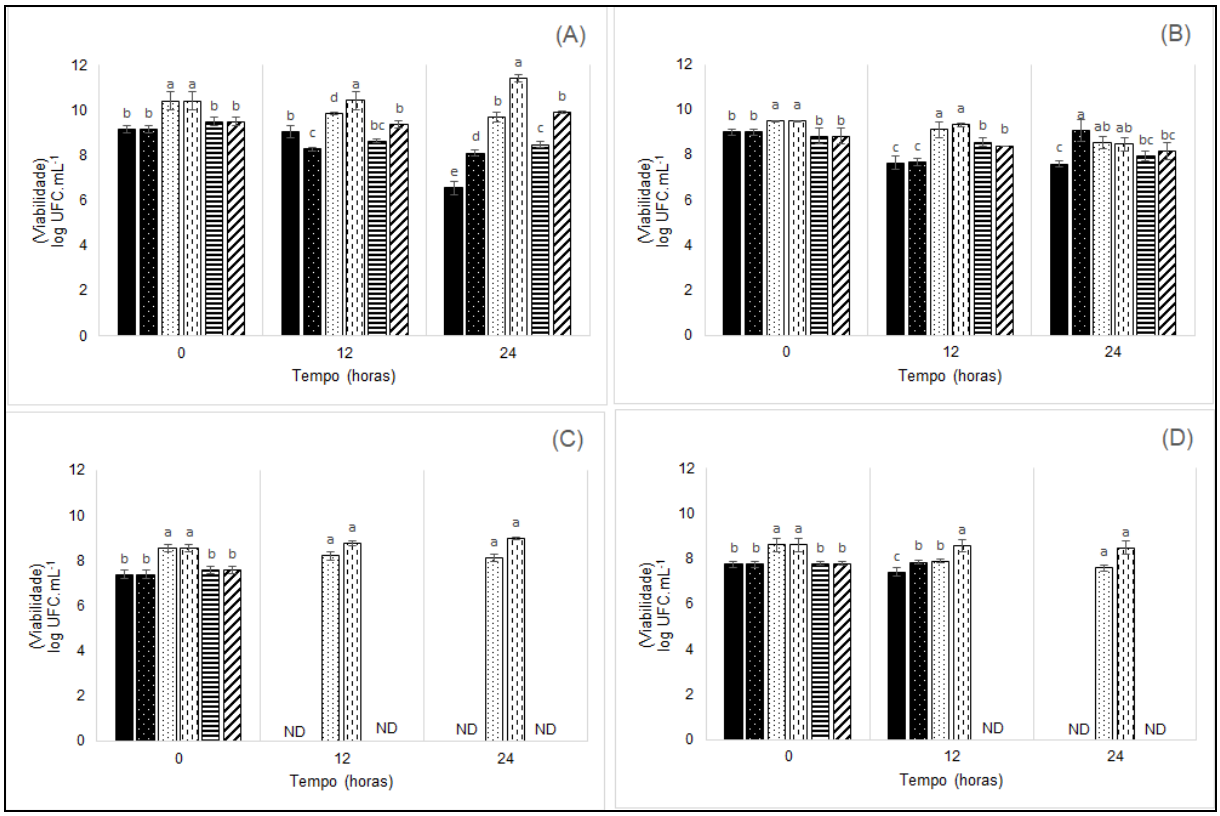
As micropartículas produzidas e os microrganismos livres foram avaliados quanto à resistência às condições de *stress* osmótico, logo após o processo de encapsulamento. As mesmas foram incorporadas em solução de sal (NaCl) e sacarose ($C_{12}H_{22}O_{11}$), nas temperatudas de 4, 37 e 50 °C e avaliadas nos tempos 0, 12 e 24 horas. Os resultados de viabilidade dos microrganismos a essas condições são apresentadas nas Figuras 7, 8 e 9.

Figura 7 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 4 °C



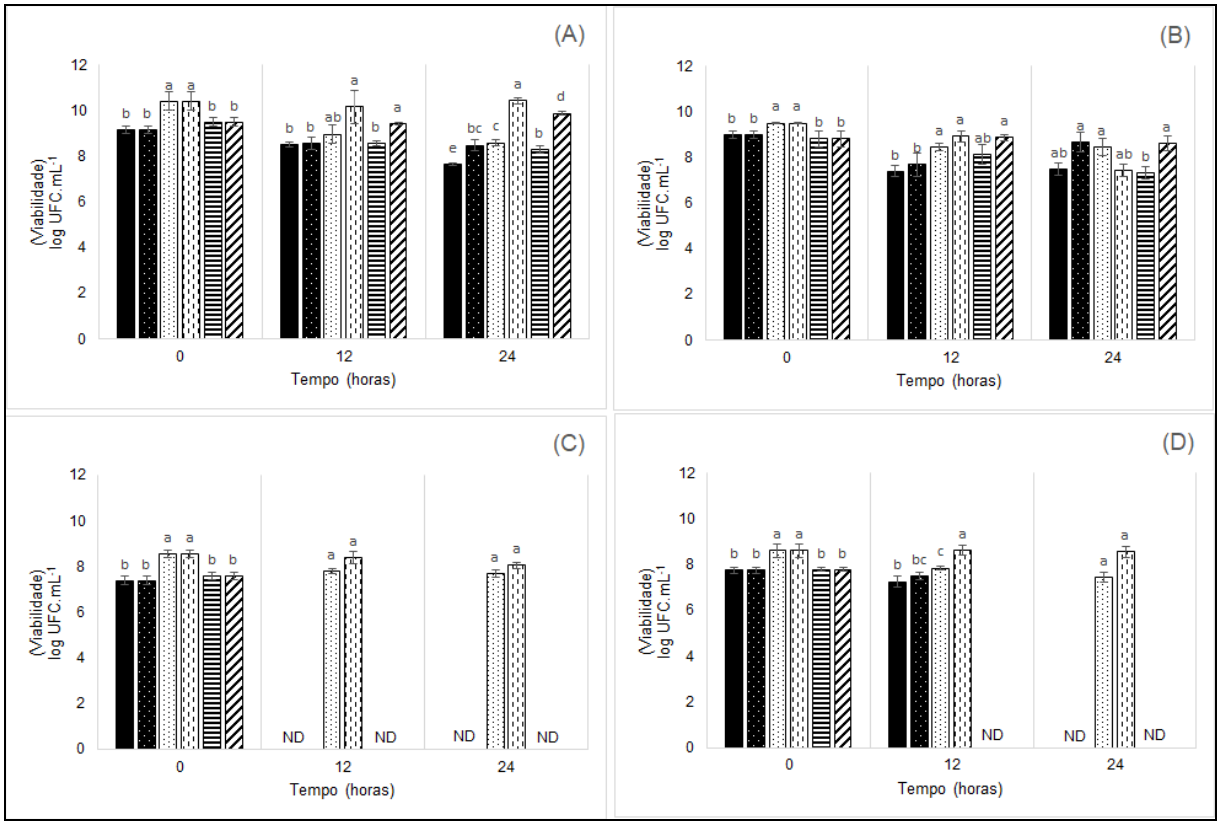
Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. [abcd] (comparativo entre os três microrganismos, frente as soluções, em cada tempo, para cada material de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sal 100 g/L; ■ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sacarose 100 g/L; ▯ *L. paracasei* ML 33 + solução de sal 100 g/L; ▯ *L. paracasei* ML 33 + solução de sacarose 100 g/L; ▤ *L. pentosus* ML 82 + solução de sal 100 g/L; ▨ *L. pentosus* ML 82 + solução de sacarose 100 g/L; ND = não detectado.

Figura 8 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 37 °C



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. ^{abcde} (comparativo entre os três microrganismos, frente as soluções, em cada tempo, para cada material de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sal 100 g/L; ▩ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sacarose 100 g/L; ▭ *L. paracasei* ML 33 + solução de sal 100 g/L; ▩ *L. paracasei* ML 33 + solução de sacarose 100 g/L; ▤ *L. pentosus* ML 82 + solução de sal 100 g/L; ▨ *L. pentosus* ML 82 + solução de sacarose 100 g/L; ND = não detectado.

Figura 9 - Viabilidade dos encapsulados (log UFC.mL^{-1}) durante a exposição por 0, 12 e 24 horas ao ambiente de *stress* osmótico a 50 °C



Resultados médios, n = 3. As barras representam o desvio padrão. [abcde] (comparativo entre os três microrganismos, frente as soluções, em cada tempo, para cada material de parede), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tuckey ($p < 0,05$). Materiais de parede: (A) Alginato-Amido-Soro de queijo bovino; (B) Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino; (C) Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino; (D) Alginato-Amido-Permeado de soro bovino. ■ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sal 100 g/L; ■ *L. plantarum* ATCC 8014 + solução de sacarose 100 g/L; ▭ *L. paracasei* ML 33 + solução de sal 100 g/L; ▭ *L. paracasei* ML 33 + solução de sacarose 100 g/L; ▤ *L. pentosus* ML 82 + solução de sal 100 g/L; ▨ *L. pentosus* ML 82 + solução de sacarose 100 g/L; ND = não detectado.

A metodologia utilizada neste estudo foi adaptada de Corbo et al. (2013) que encapsularam *L. plantarum* c19 com alginato de sódio, por extrusão manual com uma seringa, e realizaram vários estudo a fim de avaliar o efeito de algumas variáveis sobre a taxa de liberação. Uma destas avaliações consistiu em submeter as micropartículas as temperaturas de 4, 15 e 30 °C, sob condições estática ou dinâmica a 150 rpm em solução salina por 24 horas. Também se utilizou para desenvolvimento da técnica o experimento de De Prisco et al. (2015) que encapsularam *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 e avaliaram a resistência ao *stress*

osmótico, inoculando as micropartículas em geléia de damasco (com alta concentração de açúcar). Ambos observaram que o microencapsulamento auxiliou na proteção das células, ocasionando baixa redução da viabilidade.

No presente estudo foram realizados testes prévios e não observou-se variação nos resultados de viabilidade quando variou-se o parâmetro agitação, para tanto determinou-se que o experimento seria realizado de forma estática, em estufa bacteriológica.

Durante o processamento e armazenamento de alimentos, as bactérias probióticas, quando adicionadas em matrizes alimentares, inevitavelmente ficam expostas as várias condições estressantes (*stress* oxidativo, temperatura, variações de pH e *stress* osmótico), que por sua vez, afetam sua sobrevivência. Ao considerar os efeitos dos fatores de *stress* supracitados, é importante reconhecer a exigência mínima de bactérias probióticas viáveis (10^6 UFC.mL^{-1} ou g^{-}1) que qualquer produto alimentar probiótico deve conter, a fim de propiciar efeitos benéficos sobre a saúde humana (FAO/WHO, 2006).

Na temperatura de 4 °C (Figura 7), a taxa média de sobrevivência entre todos os encapsulados foi de 93,7% após 24 horas de incubação, com exceção das micropartículas RBO-8014, RBO-82 e PBO-82 (Figuras 7C e 7D) que não apresentaram viabilidade após 12 horas de incubação para ambas as soluções. As micropartículas com soro de queijo bovino apresentaram diferença significativa ($p < 0,05$) para viabilidade, após 12 e 24 horas.

Já a 37 °C (Figura 8), a taxa média de sobrevivência dos encapsulados que apresentaram viabilidade após a exposição por 24 horas em solução de sal e sacarose foi de 87,7% e 98,5%, respectivamente. Pode-se observar novamente taxa elevada para solução de sacarose, em virtude da viabilidade de alguns microrganismos ter aumentado ao longo do tempo. A micropartícula PBO-8014 (Figura 8D) novamente não resistiu ao *stress* osmótico do sal e da sacarose após 24 horas de incubação a 37 °C. Observou-se também decréscimo de viabilidade considerável para micropartícula SBO-8014 (Figura 8A) após 24 horas de incubação a 37 °C em solução salina, de 9,15 log UFC.mL^{-1} para 6,56 log UFC.mL^{-1} (taxa de sobrevivência de 71,7%).

As micropartículas RBO-8014 e RBO-82 (Figura 9C), e PBO-82 (Figura 9D) não resistiram após 12 horas de incubação a temperatura de 50 °C, já a micropartícula PBO-8014 (Figura 9D) resistiu até 12 horas, porém não foi evidenciada após 24 horas, em ambas as soluções. As micropartículas SBO-33 e SBO-82 (Figura 9A) apresentaram taxa de sobrevivência superior a 100% em solução de sacarose a 50 °C após 24 horas.

Observou-se aumento na viabilidade de algumas micropartículas em solução de sacarose após 24 horas de incubação, a 4 °C para SBO-8014 (0,33 ciclos de log – Figura 7A), SBO-33 (1,08 ciclos de log – Figura 7A) e RBO-33 (0,24 ciclos de log – Figura 7C), a 37 °C para SBO-82 (0,40 ciclos de log – Figura 8A) e RBO-33 (0,43 ciclos de log – Figura 8C), e a 50 °C para SBO-82 (0,39 ciclos de log – Figura 9A), evidenciando assim que os mesmos consumiram a sacarose e utilizaram-a para o seu desenvolvimento. Situação similar foi evidenciada por Iyer e Kailasapathy (2005) que produziram encapsulados de *Lactobacillus acidophilus* CSCC 2400 e CSCC 2409 com alginato de sódio, revestidas com prebióticos (poli-L-lisina, quitosana e alginato). Os autores observaram aumento de quase 0,6 ciclos de log na contagem celular viável das cápsulas revestidas com quitosana após 3 h em condições ácidas *in vitro*, em comparação com as cápsulas revestidas com alginato ou poli-L-lisina. Atribuíram este aumento na viabilidade à utilização do prebiótico como fonte de carbono para o crescimento do microrganismo, já que no tratamento controle (sem carbono) houve grande taxa de mortalidade.

Dentre os materiais de parede utilizados para proteção dos três microrganismos, destacou-se o soro de queijo bovino com taxas de sobrevivência médias para ambas as soluções de 95,5% (4 °C – Figura 7), 92,7% (37°C – Figura 8) e 91,7% (50 °C – Figura 9). Já o soro de queijo de ricota apresentou menor taxa de sobrevivência média de 32,56% (Figuras 7C, 8C, 9C) para ambas as soluções, nas diferentes temperaturas. Quando comparamos os microrganismos utilizados no encapsulamento, o *L. paracasei* ML 33 apresentou maior resistência média ao *stress* osmótico, 89,8% para solução salina e 97,92% para solução de sacarose, nas diversas temperaturas avaliadas (Figuras 7, 8, 9). *L. plantarum* ATCC 8014 e *L. pentosus* ML 82 apresentaram sobrevivência média de 51,9% e 46,9% para ambas as soluções em diferentes temperaturas (Figuras 7, 8, 9). Importante ressaltar que, ao submeter as células livres as condições de *stress*, observou-se que as mesmas apresentaram viabilidade média de 5,51 e 5,33 log UFC.mL^{-1} após 24 horas em solução de sacarose a 4 e 37 °C, respectivamente. Já em solução salina, após 24 horas de incubação, as células livres apresentaram viabilidade média de 4,25 e 4,73 log UFC.mL^{-1}, a 4 e 37 °C, respectivamente. Entretanto, quando submetidas as soluções de sacarose e sal a 50 ºC, os probióticos livres não resistiram após 12 horas de incubação. Portanto, assim como na avaliação da resistência ao TGI simulado, detacam-se os resultados de resistência ao *stress* osmótico para micropartícula de *L. paracasei* ML 33 com soro de queijo bovino como material de parede.

5.10 Potencial de acidificação das micropartículas de bactérias lácticas

Determinou-se a capacidade de acidificação das micropartículas que obtiveram melhor viabilidade após processo de encapsulamento e melhor sobrevivência ao TGI simulado após 60 dias de armazenamento, para cada um dos microrganismos utilizados. A Tabela 9 apresenta a taxa média de sobrevivência para os parâmetros de viabilidade após processo de encapsulamento e taxa média de sobrevivência ao TGI simulado após 60 dias de armazenamento, para todas as micropartículas produzidas.

Tabela 9 - Taxa média de sobrevivência (%) para viabilidade após processo de encapsulamento e TGI simulado após 60 dias de armazenamento dos lactobacilos encapsulados utilizando diferentes soros lácteos como material encapsulante, visando determinar as micropartículas utilizadas na avaliação da capacidade de acidificação (*)

Micropartículas	**Taxa média de sobrevivência (%)**			**Micropartícula (*)**
	Viabilidade	**TGI simulado**	***Stress* Osmótico**	
SBO-8014	**98,71 (1,78)**	**89,81 (8,07)**	86,80 (0,79)	SBO-8014
SBU-8014	84,71 (1,53)	85,39 (3,28)	**89,07 (0,52)**	
RBO-8014	78,35 (1,81)	0,00 (0,00)	00,00 (0,00)	
PBO-8014	78,06 (1,58)	0,00 (0,00)	31,52(3,67)	
SBO-33	**97,56 (0,30)**	81,74 (6,81)	**96,92 (1,01)**	SBO-33
SBU-33	90,94 (0,41)	**92,07 (4,34)**	88,47 (0,49)	
RBO-33	88,52 (2,27)	86,93 (1,07)	95,91 (0,56)	
PBO-33	88,81 (2,71)	87,70 (1,29)	45,75 (0,48)	
SBO-82	87,33 (1,93)	87,79 (2,17)	**95,76 (0,59)**	SBU-82
SBU-82	**95,82 (2,20)**	**94,78 (2,23)**	93,84 (0,43)	
RBO-82	81,79 (0,86)	0,00 (0,00)	00,00 (0,00)	
PBO-82	82,87 (1,19)	0,00 (0,00)	00,00 (0,00)	

Média (desvio padrão), n=3. Legenda: SBO (Alginato-Amido-Soro de queijo bovino); SBU (Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino); RBO (Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino); PBO (Alginato-Amido-Permeado de soro bovino). 33 (*L. paracasei* ML 33); 82 (*L. pentosus* ML 82); 8014 (*L. plantarum* ATCC 8014).

Conforme evidenciado na Tabela 9, observa-se desvio padrão para taxa média de sobrevivência ao TGI simulado, e isso se deve ao cálculo da média ter sido realizado entre todas as soluções de pH do TGI, e evidentemente as micropartículas se comportaram de diferentes formas perante as soluções do TGI simulado.

Portanto, diante dos resultados expressos na Tabela 9, determinou-se que as micropartículas SBO-8014, SBO-33 e SBU-82 seriam avaliadas quanto à capacidade de acidificação. Para tanto, as mesmas foram incorporadas em uma solução base de leite fermentados, soro de queijo bovino e leite bovino pasteurizados 1:1 e incubadas a 37 e 42 °C, tendo sido avaliado o pH de hora em hora até atingir o valor correspondente ao ponte de corte, aproximadamente 4,60. As células livres também foram submetidas à mesma avaliação a fim de comparação (MARAFON et al., 2011; KRUNIĆ et al., 2015).

Na Tabela 10 estão os parâmetros cinéticos calculados avaliação do potencial de acidificação: V_{max} (taxa máxima de acidificação, em unidades de pH por hora ($x10^{-3}$ $pH.h^{-1}$)); t_{Vmax} (tempo em horas para atingir V_{max}); pH_{Vmax} (valor de pH correspondente ao V_{max}); e ΔpH (variação de pH entre o início e o final da incubação (pH_{Vmax})).

Tabela 10 - Parâmetros cinéticos de acidificação de cepas livres e encapsuladas, em leite fermentado a 37 e 42 ° C até atingir pH de 4,6

Amostras	**Temp. (°C)**	**Parâmetros cinéticos de acidificação**			
		V_{max} ($x10^{-3}$ $pH.h^{-1}$)	**t_{Vmax} (h)**	**pH_{Vmax}**	**ΔpH**
8014 livre	37	73,13 (0,29)	24 (0,00)	4,96 (1,01)	1,76 (1,01)
SBO-8014		76,05 (0,88)	24 (0,00)	4,92 (0,01)	1,83 (0,02)
33 livre		62,27 (0,74)	19 (0,00)	5,47 (0,02)	1,24 (0,01)
SBO-33		53,00 (0,71)	22 (0,00)	5,44 (0,01)	1,17 (0,13)
82 livre		82,50 (0,00)	16 (0,00)	5,41 (0,01)	1,32 (0,00)
SBU-82		63,69 (0,74)	19 (0,00)	5,26 (0,01)	1,26 (0,05)
8014 livre	42	53,58 (1,01)	14 (0,00)	5,97 (0,01)	0,75 (0,01)
SBO-8014		58,00 (0,71)	20 (0,00)	5,27 (0,02)	1,16 (0,01)
33 livre		52,29 (0,30)	24 (0,00)	5,45 (0,01)	1,26 (0,01)
SBO-33		48,16 (2,60)	19 (0,00)	5,61 (0,01)	0,92 (0,05)
82 livre		56,06 (0,37)	19 (0,00)	5,67 (0,02)	1,07 (0,01)

SBU-82	59,45 (0,78)	18 (0,00)	5,63 (0,01)	1,07 (0,01)

Média (desvio padrão), n=2. Vmáx: velocidade máxima de acidificação; T $_{Vmáx}$: tempo correspondente à velocidade máxima de acidificação; pH $_{Vmáx:}$ pH correspondente ao $V_{máx}$; ΔpH: $pH_{inicial}$ - $pH_{Vmáx}$. Legenda: SBO (Alginato-Amido-Soro de queijo bovino); SBU (Alginato-Amido-Soro de queijo bubalino); RBO (Alginato-Amido-Soro de queijo ricota bovino); PBO (Alginato-Amido-Permeado de soro bovino). 33 (*L. paracasei* ML 33); 82 (*L. pentosus* ML 82); 8014 (*L. plantarum* ATCC 8014).

Observou-se maior taxa máxima de acidificação para *L. pentosus* ML 82 livre ($82{,}50.10^{-3}$ $pH.h^{-1}$) e para micropartícula SBO-8014 ($76{,}05.10^{-3}$ $pH.h^{-1}$), a 37 °C. Já a menor velocidade máxima de acidificação foi observada para micropartícula SBO-33 ($48{,}16.10^{-3}$ $pH.h^{-1}$), a 42 °C. O tempo médio para atingir a velocidade máxima de acidificação foi de 21 e 19 horas, para 37 e 42 °C, respectivamente. As células livres e encapsuladas apresentaram o menor tempo médio (19 h) na incubação a 42 °C, possivelmente por que a temperatura mais elevada aumentou a capacidade de acidificação das mesmas. O pH correspondente a $V_{máx}$ apresentou-se inferior a 5,0 para o *L. plantarum* ATCC 8014 livre e encapsulado a 37 °C, sendo que o restante das amostras variou de 5,26 a 5,97. Já o ΔpH variou de 1,17 a 1,83 a 37 °C, e 0,75 a 1,26 a 42 °C. Estes resultados indicam que todos os materiais de parede forneceram uma barreira que dificultou a difusão do substrato nas micropartículas, afetando a atividade dos microrganismos em processos fermentativos.

Krunić et al. (2015) produziram micropartículas de alginato e quitosana com os seguintes microrganismos: 80% *Streptococcus salivarius subsp. thermophilus*, 13% *L. acidophilus*, 6% *B. bifidum* e 1% *L. delbrueckii subsp. bulgaricus*. Adicionaram as micropartículas em leite e avaliaram o perfil de acidificação, tendo obtido uma diferença de 1,5 h entre o tempo de fermentação das células não encapsuladas em relação às células encapsuladas. Já no presente estudo, a diferença no tempo de fermentação entre as células livres e encapsuladas variou de 0 a 2 h. Esta variação pode ser explicada devido a barreira formada pelo encapsulamento ao redor do microrganismo, que dificulta a difusão do meio.

Em contraste, Eckert et al. (2018) encapsularam *Lactobacillus* spp. com alginato-pectina e soro de queijo e observaram diferença no tempo de fermentação entre as células livres e encapsuladas de aproximadamente 18 h, podendo esta diferença estar relacionada a presença de pectina, diferente deste estudo. Assim como, Marafon et al. (2011) que estudaram os parâmetros cinéticos de acidificação de iogurtes probióticos contendo *S. thermophilus*, *L. delbrueckii subs. bulgaricus* e *B. lactis subs*. *animalis*, suplementados com proteínas (leite em pó desnatado, proteína de soro concentrada e caseinato de sódio), onde para todas as bases lácteas suplementadas, o tempo de acidificação foi de 6 h. Este tempo relativamente baixo em

relação ao presente estudo pode estar relacionado ao delineamento do procedimento, pois Marafon et al. (2011) utilizaram uma base láctea de iogurte no experimento, enquanto que neste estudo utilizou-se apenas uma das matérias-primas do iogurte, o leite.

Sendo assim, a diminuição do potencial de acidificação de bactérias lácticas encapsuladas pode ser atribuída ao encapsulamento, que reduz a taxa de fermentação e, consequentemente, aumenta o tempo necessário para que os produtos lácteos atinjam o pH correspondente ao ponto isoelétrico da caseína.

5.11 Leite fermentado produzido com bactérias lácticas encapsuladas, não encapsuladas e cultura láctica comercial

5.11.1 Resultados físico-químicos e reológicos dos leites fermentados

Na Tabela 11 são apresentados os resultados físico-químicos das formulações dos leites fermentados elaborados.

Tabela 11 - Caracterização físico-química e reológica dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial

Análises	LF-ENC	LF-LIVRE	LF-COM
Lipídeos (% m/v)	0,15 (0,00)^{c}	0,16 (0,00)^{b}	0,23 (0,00)^{a}
Proteína (% m/v)	3,89 (0,03)^{b}	4,07 (0,12)^{b}	4,29 (0,01)^{a}
Umidade (% m/v)	72,20 (0,57)^{b}	71,17 (0,54)^{b}	76,12 (0,17)^{a}
Cinzas (% m/v)	0,76 (0,01)^{a}	0,80 (0,02)^{a}	0,80 (0,01)^{a}
Acidez (% $C_3H_6O_3$)	1,16 (0,03)^{a}	1,18 (0,01)^{a}	0,88 (0,03)^{b}
pH	4,27 (0,06)^{b}	4,26 (0,05)^{b}	4,45 (0,01)^{a}
Extrato Seco Total (% m/v)	27,80 (0,57)^{a}	28,83 (0,54)^{a}	23,88 (0,17)^{b}
Carboidratos (% m/v)	22,99 (0,52)^{a}	23,80 (0,40)^{a}	18,55 (0,16)^{b}
Atividade de água	0,999 (0,001)^{a}	0,998 (0,001)^{a}	0,993 (0,001)^{b}
Açúcar total (°Brix)	46,17 (0,06)^{a}	46,03 (0,06)^{ab}	45,93 (0,06)^{b}
Dureza (g)	8,33 (1,15)^{b}	6,33 (0,58)^{ab}	16,00 (1,00)^{a}
Adesividade (mJ)	0,10 (0,00)^{b}	0,27 (0,06)^{a}	0,27 (0,05)^{a}
Elasticidade (mm)	0,89 (0,04)^{b}	0,44 (0,03)^{c}	1,45 (0,10)^{a}

abcd Média (desvio padrão), n=3. Diferentes letras sobrescritas na mesma linha indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). adm: adimensional. LF-ENC: leite fermentado elaborado com a micropartícula SBO-33. LF-LIVRE: leite fermentado elaborado com *L. paracasei* ML 33. LF-COM: leite fermentado elaborado com cultura láctea comercial (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), contendo os microrganismos *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis e Streptococcus thermophilus.*

As formulações atenderam aos parâmetros exigidos por legislação como, acidez (0,6 a 2,0% $C_3H_6O_3$) e proteína (mínimo de 2,9%), entretanto o teor de lipídeos encontrado foi baixo (BRASIL, 2007). Dimitrellou et al. (2016) avaliaram *Lactobacillus casei* ATCC 393 microencapsulado por *spray dryer* em leite fermentado, e assim como neste estudo não observaram diferença significativa ($p < 0,05$) para acidez titulável entre a formulação com a bactéria livre e encapsulada. Também pode-se observar diferença não significativa para as demais características físico-químicas avaliadas, entre as formulações de leite fermentado elaborados com *L. paracasei* ML 33 livre e encapsulada, evidenciando assim que o encapsulamento não causa alterações importantes na composição do produto.

Houve diferença significativa ($p < 0,05$) para os parâmetros de textura, onde a formulação LF-COM apresentou o valores mais elevados para dureza e elasticidade, características estas que podem estar relacionadas a ação dos demais microrganismos presentes na cultura láctica comercial utilizada. Segundo Krasaekoopt et al. (2003), a adição de bactérias probióticas encapsuladas não altera significativamente a aparência, cor, acidez e sabor de produtos fermentados, mas pode afetar as propriedades texturais.

5.11.2 Resultados microbiológicos e de resistência ao TGI das bactérias lácticas presentes nas formulações de leite fermentado

Conforme delineamento experimental, considerando que a micropartícula SBO-33 obteve os melhores resultados para viabilidade, restência ao TGI simulado e ao *stress* osmótico, bem como para acidificação, a mesma foi utilizada para elaboração do leite fermentado. Também foi elaborada uma formulação com *L. paracasei* ML 33 livre e com uma cultura láctea comercial. A fermentação transcorreu por 40 horas (leite fermentado com a *L. paracasei* ML 33 livre e cultura comercial) e 42 horas (leite fermentado com micropartículas SBO-33), sendo considerada uma diferença relativamente baixa entre ambos os tempo, o que não compromete os custos do processo. As formulações foram submetidas à avaliação microbiológica (Tabela 12) para avaliar o atendimentos às boas práticas de fabricação durante o processo, bem como a viabilidade dos lactobacilos.

Tabela 12 - Resultados microbiológicos dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial

Microrganismos avaliados	**Crescimento microbiano (log UFC.mL^{-1})**		
	LF-ENC	**LF-LIVRE**	**LF-COM**
Coliforme 35 ºC	Ausência	Ausência	Ausência
Coliforme 45 ºC	Ausência	Ausência	Ausência
Bolores e Leveduras	Ausência	Ausência	Ausência
Salmonella sp.	Ausência	Ausência	Ausência
Lactobacillus spp.	7,93 (0,02)	7,81 (0,06)	6,24 (0,13)

Média ± desvio padrão, n=3. LF-ENC: leite fermentado elaborado com a micropartícula SBO-33. LF-LIVRE: leite fermentado elaborado com *L. paracasei* ML 33. LF-COM: leite fermentado elaborado com cultura láctea comercial (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), contendo os microrganismos *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis e Streptococcus thermophilus.*

A formulações elaboradas atendem aos parâmetros microbiológicos preconizados na legislação específica para leite fermentado (BRASIL, 2007), pois apresentaram ausência para microrganismos patogênicos. A mesma legislação ainda define que o leite fermentado precisa ter a presença mínima de 10^6 UFC.mL^{-1} de bactérias lácticas totais. Sendo assim, todas formulações de leites fermentados elaboradas neste estudo atendem à essa concentração mínima de bactérias lácticas (apenas lactobacilos foram avaliados), conforme preconizado em legislação. Ainda, conforme indicação da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), as formulações de leite fermentado apresentam potencial probióticos (BRASIL, 2002).

Neste contexto, Abd El-Salam et al. (2011) elaboraram um iogurte probióticos fortificado com ácido linoleico, e obtiveram viabilidade acima de 8 log UFC.g^{-1} para *L. acidophilus* e de *L. casei*, sugerindo que este resultado está relacionado ao alto teor de sólidos totais do produto (acima de 30%), relação aplicável também à este estudo, onde observa-se viabilidades mais elevadas para as formulações LF-ENC (7,93 log UFC.mL^{-1}) e LF-LIVRE (7,81 log UFC.mL^{-1}), que possuem os teores mais elevados de sólidos, conforme Tabela 10, 27,80% e 28,83%, respectivamente. Na Tabela 13 são apresentados os resultados da resistência das bactérias lácticaas ao trato gastrointestinal simulado.

Tabela 13 - Resultados da sobrevivência ao TGI dos Lacobacilos presentes nas formulações dos leites fermentados elaborados com as micropartículas SBO-33, com *L. paracasei* ML 33 livre e com a cultura láctica comercial

TGI simulado	Sobrevivência das bactérias lácticas (log UFC.mL^{-1})		
	LF-ENC	LF-LIVRE	LF-COM
TG (a)	7,40 (0,04)^{Ab}	7,18 (0,03)^{Bb}	4,71 (0,01)^{Cb}
TG (b)	7,45 (0,02)^{Aab}	7,38 (0,02)^{Aa}	5,11 (0,16)^{Bb}
TG (c)	7,51 (0,01)^{Aa}	7,44 (0,03)^{Aa}	6,08 (0,07)^{Ba}
TI (d)	7,12 (0,05)^{Ac}	6,11 (0,03)^{Bd}	5,08 (0,03)^{Cb}
TI (e)	6,97 (0,02)^{Ad}	6,25 (0,02)^{ABc}	5,45 (0,58)^{Bab}

abcd Média ± desvio padrão, n=3. ^{abcd} (comparativo entre a mesma formulação de leite fermentado, frente as diferentes soluções de TGI), ABCD (comparativo entre as diferentes formulações de leite fermentado, frente a mesma solução de TGI), diferentes letras sobrescritas indicam diferença significativa pelo Teste de Tukey ($p < 0,05$). LF-ENC: leite fermentado elaborado com a micropartícula SBO-33. LF-LIVRE: leite fermentado elaborado com *L. paracasei* ML 33. LF-COM: leite fermentado elaborado com cultura láctea comercial (BioRich®, Chr. Hansen, Dinamarca), contendo os microrganismos *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium lactis e Streptococcus thermophilus.* TG (Trato gástrico): Suco gástrico durante 180 minutos (a) pH 2,0 (b) pH 2,5 e (c) pH 3,0; TI (Trato intestinal): Suco intestinal durante 240 minutos (d) pH 8,0 sem sais biliares e (e) pH 8,0 com 0,5% (m/v) de sais biliares.

Conforme Iravani et al. (2014), os probióticos geralmente mostram baixa viabilidade em leites fermentados, porque crescem lentamente e também por que perdem sua viabilidade durante a fermentação e armazenamento refrigerado. Além disso, mesmo havendo uma população de bactérias probióticas considerável nos produtos alimentícios no momento do consumo, isso não garante a mesma taxa de sobrevivência após a chegada das células no intestino, pois o baixo pH do estômago e a presença de sais biliares no intestino delgado são as principais áreas de declínio drástico da viabilidade de células probióticas (TAMIME et al., 2005; KOSIN; RAKSHIT, 2006; KORBEKANDI et al. 2011).

Mortazavian et al. (2008) observaram que a viabilidade de células probióticas após o encapsulamento, inoculadas em iogurte, sob condições gastrointestinais simuladas, foi aumentada em 18,0 e 9,5%, e em 0,6 e 0,2% para células livres, sob condições gastrointestinais (pH 1,5, 90 min/ 2% de sais biliares, 90 min). Já sob condições gastrointestinais simuladas normais (pH 2,0, 30 min/ 0,6% sais biliares, 60 min), as taxas de sobrevivência celular foram de 16% para *L. acidophilus* e 21% para bifidobactérias antes do encapsulamento e 26 e 34% (*L. acidophilus* e bifidobactérias, respectivamente) após o encapsulamento. Neste estudo observou-se que o microrganismo *L. paracasei* ML 33 (livre e

encapsulado), bactéria láctica endógena da região do Vale do Taquari/ RS, apresentou resistência ao TGI simulado, mantendo o produto com características probióticas frente a todas as soluções avaliadas.

Neste estudo, a redução de viabilidade mais expressiva foi observada para formulação LF-LIVRE (21,76%), seguida pela LF-COM (18,58%), para a solução TI (d). Enquanto a formulação LF-ENC apresentou os valores mais elevados de viabilidade frente à resistência ao TGI, o que evidência a proteção efetiva conferida pela micropartícula ao microrganismo, perante condições adversas, assim como observado por Mortazavian et al. (2008). Outros pesquisadores já haviam observado que o encapsulamento de bactérias lácticas com amido poderiam aumentar a capacidade de sobrevivência desses organismos (MATTILA-SANDHOLM et al., 2002), conforme comprovado através deste estudo. Talwalkar e Kailasapathy (2003) relataram que o encapsulamento de *L. acidophilus* e *B. lactis* com amido-alginato preveniu as bactérias da ação do oxigênio. Assim como, Sultana et al. (2000) avaliaram os efeitos do encapsulamento de bactérias probióticas com amido e alginato em condições gastrointestinais simuladas e iogurtes, e observaram um declínio maior das células livres em iogurte, em relação às culturas encapsuladas de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* spp., após um período de 8 semanas de armazenamento.

Outro material de parede utilizado no encapsulamento neste estudo foi o soro de queijo, material conveniente, barato e eficiente para o revestimento de micropartículas de alginato carregadas com bactérias, fato este também observado por Picot e Lacroix (2004) que encapsularam com sucesso as cepas de Bifidobactérias em micropartículas à base de proteína de soro de queijo, e obtiveram alta taxa de sobrevivência durante a secagem por pulverização, e ainda, perceberam que as células encapsuladas mostraram viabilidade mais elevada do que as não encapsuladas durante 28 dias de armazenamento em iogurtes de baixo pH e ambiente gastrointestinal simulado.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste estudo objetivou-se avaliar o potencial dos microrganismos *Lactobacillus paracasei* ML 33 e *Lactobacillus pentosus* ML 82, ambas isoladas de amostras de leite *in natura* do Vale do Taquari, e o microrganismo *Lactobacillus plantarum* ATCC 8014, quando encapsulados através da técnica de extrusão com tecnologia de vibração, usando como um dos materiais de parede subprodutos da indústria de laticínios, os soros lácteos. Para tanto, diversas avaliações e estudos foram realizados com objetivo de garantir a viabilidade das micropartículas produzidas perante condições adversas, com intuito de garantir que atingiriam o local de ação em número suficiente e promovessem os benefícios esperados.

Neste contexto, foram determinadas as composições dos soros de queijo utilizados e percebeu-se que alguns possuíam teor mais elevado de proteínas (soro de queijo bovino e bubalino), o que conferiu maior proteção aos microrganismos encapsulados com estes materiais de parede, e influenciou nos parâmetros de viscosidade e dureza da formulação encapsulante. Outra avaliação importante para aplicação futura da micropartícula em produto alimentício foi a morfologia, que permitiu observar o formato esférico e parede contínua das mesmas, além do diâmetro médio de 13,0 $\pm$ 0,02 μm, características que viabilizam a aplicação das micropartículas em produtos alimentícios.

O método de encapsulamento utilizado, nas respectivas condições estudadas, demonstrou não ser prejudicial para as células probióticas, pois a viabilidade média após processo de encapsulamento, para todos os encapsulados foi de 8,8 UFC.mL^{-1}, indicando também que o uso dos diferentes soros lácteos proporcionou efeito protetor aos microrganismos, principalmente os SBO e SBU. Quando armazenadas, as micropartículas mantiveram-se viáveis (acima de 7 log UFC.mL^{-1}) no período de 60 dias de armazenamento a 4 ºC, com exceção de RBO-82 e PBO-82. Além disso, as micropartículas com os materiais de parede SBO e SBU promoveram elevadas taxas de resistência ao TGI simulado para todos os

microrganismos logo após o encapsulamento, 94,44 e 96,01%, respectivamente. Ainda, observou-se que o microrganismo endógeno *L. paracasei* ML 33 destacou-se por apresentar a maior resistência ao TGI simulado, 92,5% e 87,1% após 30 e 60 dias de armazenamento, respectivamente.

Os resultados de avaliação da resistência ao *stress* osmótico também foram satisfatórios, com taxa média de sobrevivência de todos os encapsulados de 93,7% após 24 horas de incubação a 4 °C para ambas as soluções (sal e sacarose), com exceção das micropartículas RBO-8014, RBO-82 e PBO-82. Quanto ao potencial de acidificação, a menor velocidade máxima de acidificação foi observada para micropartícula SBO-33 ($48{,}16.10^{-3}$ $pH.h^{-1}$), a 42 °C, e o tempo médio para atingir a velocidade máxima de acidificação foi de 21 e 19 horas, para 37 e 42 °C, respectivamente.

E por fim, o leite fermentado elaborado com *Lactobacillus paracasei* ML33 livre e encapsulado, e com uma cultura láctica comercial, evidenciou viabilidades elevadas para as formulações LF-ENC (7,93 log $UFC.mL^{-1}$) e LF-LIVRE (7,81 log $UFC.mL^{-1}$), bem como os teores mais elevados de sólidos para as mesmas formulações (27,80% e 28,83%, respectivamente). E quanto à resistência ao TGI simulado das bactérias lácticas presentes nas formulações, a formulação LF-ENC apresentou os valores mais elevados de viabilidade, o que evidência a proteção efetiva conferida pela micropartícula ao microrganismo durante a elaboração de um produto fermentado.

De modo geral, conclui-se, portanto que os soros lácteos utilizados como materiais encapsulantes forneceram proteção aos microrganismos, juntamente com o amido e o alginato de sódio, sendo o soro de queijo bovino e bubalino com maior efeito protetor, quando comparado ao soro de queijo de ricota e permeado de soro. O processo de extrusão com tecnologia de vibração é eficiente na proteção de probióticos, simples e de baixo custo, entretanto existem dificuldades em relação à ampliação da escala de operação.

Como perspectiva futura sugere-se aprimorar este estudo, submetendo as micropartículas desenvolvidas no processo de extrusão com tecnologia de vibração ao processo de secagem, com intuito de melhorar ainda mais a sua estabilidade ao armazenamento. Bem como, avaliação da sobrevivência ao TGI dos Lacobacilos nas formulações de leites fermentados ao final da vida de prateleira. Dessa forma, os probióticos encapsulados serão coadjuvantes no aumento da eficácia dos alimentos funcionais, assim como poderão melhorar as propriedades nutricionais e os benefícios à saúde.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABD EL-SALAM, M. H.; HIPPEN, A. R.; EL-SHAFIE, K.; ASSEM, F. M.; ABBAS, H.; ABD EL-AZIZ, M.; SHARAF, O.; EL-AASSAR, M. Preparation and properties of probiotic concentrated yoghurt (labneh) fortified with conjugated linoleic acid. **International Journal of Food Science & Technology**, 46, 2103-2110, 2011.

AGOSTINI, C.; ECKERT, C.; VICENZI, A.; MACHADO, B., L.; JORDON, B., C.; KIPPER, J., P.; DULLIUS, A.; DULLIUS, C., H.; LEHN, D.; SPEROTTO, R.; POZZOBON, A.; GRANADA, C., E.; MACIEL, M., J.; SOUZA, C., F., V. Characterization of technological and probiotic properties of indigenous *Lactobacillus* spp. from south Brazil. **Biotech,** v. 8, n. 451, 2018.

ALBENZIO, M.; SANTILLO, A.; CAROPRESE, M.; RUGGIERI, D.; NAPOLITANO, F.; SEVI, A. Physicochemical properties of Scamorza ewe milk cheese manufactured with different probiotic cultures. **Journal Dairy of Science,** 96, n. 5, p. 2781-2791, 2013.

ALVES, E. A.; GUIMARÃES, A. C. R. **Cultivo celular**, Fiocruz, 2010.

AMINE, K. M.; CHAMPAGNE, C. P.; SALMIERI, S.; BRITTEN, M.; ST-GELAIS, D.; FUSTIER, P.; et al. Effect of palmitoylated alginate microencapsulation on viability of Bifidobacterium longum during freeze-drying. **LWT- Food Science and Technology**, v. 56, p. 111-117, 2014.

ANAL, A. K.; SINGH, H. Recent advances in microencapsulation of probiotics for industrial applications and targeted delivery**. Trends Food Science and Technology**, v. 18 (5), p. 240–251. 2007.

ANANDHARAMAKRISHNAN, C., RAGHAVENDRA, S., BARHATE, R., HANUMESH, U., RAGHAVARAO, K. Aqueous two-phase extraction for recovery of proteins from cheese whey. **Food Bioprod. Process**. v. 83 (3), p. 191–197, 2005.

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

APPELS, L.; BAEYENS, J.; DEGRÈVE, J.; DEWIL, R. Principles and potential of the anaerobic digestion of waste-activated sludge. **Prog. Energy Combust. Sci.** v. 34, n. 6, p. 755-781. 2008.

ARSLAN, S.; ERBAS, M.; TONTUL, I.; TOPUZ, A. Microencapsulation of probiotic Saccharomyces cerevisiae var. boulardii with different wall materials by spray drying. **LWT-Food Science and Technology,** v. 63 (1), p. 685–690, 2015.

BARILE, D.; TAO, N.; LEBRILLA, C. B.; COISSON, J.; ARLORIO, M.; GERMAN, J. B. Permeate from cheese whey ultrafiltration is a source of milk oligosaccharides. **International Dairy Journal**, v. 19, p. 524–530, 2009.

BERESFORD, T. P.; FITZSIMONS, N. A.; BRENNAN, N. L.; COGAN, T. M. Recent advances in cheese microbiology. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 259-274, 2001.

BRASIL. Resolução RDC nº 2, de 07 de janeiro de 2002. **Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos Isolados com Alegação de Propriedades Funcional e ou de Saúde.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento**.** Instrução Normativa n°62, de 26 de agosto de 2003. **Oficializa os Métodos Analíticos Oficiais para Análises Microbiológicas para Controle de Produtos de Origem Animal e Águas.**

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Instrução Normativa n°46, de 23 de outubro de 2007. **Regulamento técnico de identidade e qualidade de leites fermentados.**

BRASIL. Ministério da Agricultura e do Abastecimento. Secretaria de Defesa Agropecuária. Instrução Normativa n° 68 de 12 de dezembro de 2006. **Oficializa Métodos Analíticos Oficiais Físico-Químicos, para controle de leite e produtos Lácteos**.

BRINQUES, G. B.; AYUB, M. A. Z. Effect of microencapsulation on survival of Lactobacillus plantarum in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, and yogurt. **Journal of Food Engineering**, v. 103 (2), p. 123–128, 2011.

BRUN-GRAEPPI, A. K. A. S.; RICHARD, C.; BESSODES, M.; SCHERMAN, D.; MERTEN, O. W. Cell microcarriers and microcapsules of stimuli-responsive polymers. **Journal of Controlled Release**, v. 149 (3), p. 209–224, 2011.

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

CARR, F. J.; CHILL, D.; MAIDA, N. The lactic acid bacteria: a literature survey. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 28, p. 281-370. 2002.

CARVALHO, F.; PRAZERES, A. R.; RIVAS, J. Cheese whey wastewater: Characterization and treatment. **Sci. Total Environ**, v. 445-446, p. 385-396, 2013.

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

CHAWDA. P. J.; SHI, J.; XUE, S.; QUEK, S. Y. Co-encapsulation of bioactives for food applications. **Food Quality and Safety**, v. 1, p. 302-309, 2017.

CHEN, S., CAO, Y., FERGUSON, L. R., SHU, Q., GARG, S. Evaluation of mucoadhesive coatings of chitosan and thiolated chitosan for the colonic delivery of microencapsulated probiotic bacteria. **Journal of Microencapsulation**, v. 30, p. 103–115. 2013.

CHEW, S. C.; TAN, C. P.; LONG, K.; NYAM, K. L. In-vitro evaluation of kenaf seed oil in chitosan coated-high methoxyl pectin-alginate microcapsules. **Industrial Crops and Products**, v. 76, p. 230–236, 2015.

CHEW, S.; NYAM, K. Microencapsulation of kenaf seed oil by co-extrusion technology. **Journal of Food Engineering**, v. 175, p. 43-50, 2016.

CODEX Alimentarius Commission. **CODEX standard for fermented milks.** Codex Stan 243. 2003.

COGHETTO, C. C.; BRINQUES, G. B.; SIQUEIRA, N. M.; PLETSCH, J.; SOARES, R. M. D.; AYUB, M. A. Z. Electrospraying microencapsulation of Lactobacillus plantarum enhances cell viability under refrigeration storage and simulated gastric and intestinal fluids. **Journal of Functional Foods**, v. 24, p. 316–326, 2016.

CORBO, M. R.; BEVILACQUA, A.; GALLO, M.; SPERANZA, B.; SINIGAGLIA, M. Immobilization and microencapsulation of *Lactobacillus plantarum*: Performances and in vivo applications**. Innovative Food Science and Emerging Technologies,** v. 18, p.196–201, 2013.

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

DE PRISCO, M.; MARESCA, D.; ONGENG, D.; MAURIELLO, G. Microencapsulation by vibrating technology of the probiotic strain *Lactobacillus reuteri DSM 17938* to enhance its survival in foods and in gastrointestinal environment. **LWT - Food Science and Technology**, v. 61, p. 452-462, 2015.

DE SOUZA SIMÕES, L., MADALENA, D. A., PINHEIRO, A. C., TEIXEIRA, J. A., VICENTE, A. A.; RAMOS, Ó. L. Micro- and nano bio-based delivery systems for food applications: In vitro behavior. **Advances in Colloid and Interface Science**, v. 243, p. 23–45. 2017.

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.

DE WIT, J. N. **Lecturer's Handbook on Whey and Whey Products**. European Whey Products Association, Brussels: Belgium, 2001.

DHAWAN, S., SINGLA, A. K., SINHA, V. R. Evaluation of mucoadhesive properties of chitosan microspheres prepared by different methods. **American Association of Pharmaceutical Scientists**, v. 5, p. 122–128. 2004.

DIMITRELLOU, D.; KANDYLIS, P.; PETROVI, T.; DIMITRIJEVIC-BRANKOVI, S.; LEVI, S.; NEDOVI, V.; KOURKOUTAS, Y. Survival of spray dried microencapsulated Lactobacillus casei ATCC 393 in simulated gastrointestinal conditions and fermented milk. **LWT - Food Science and Technology**, v. 71, p. 169 – 174, 2016.

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

DRAGONE, G.; MUSSATTO, S. I.; OLIVEIRA, J. M.; TEIXEIRA, J. A.; SILVA, J. B. A. Characterisation of volatile compounds in an alcoholic beverage produced by whey fermentation**. Braz. J. Food Technol**., VII BMCFB, p. 121-124. 2009.

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 (3), p. 1782–1788, 2013.

ECKERT, C., AGNOL, W. D., DALLÉ, D., SERPA, V. G., MACIEL, M. J., LEHN, D. N., SOUZA, C. F. V. Development of alginate-pectin microparticles with dairy whey using vibration technology: Effects of matrix composition on the protection of Lactobacillus spp. from adverse conditions. **Food Research International**, v. 113, p. 65-73. 2018.

EL-SALAM, M. A.; EL-SHIBINY, S. Formation and potential uses of milk proteins as nano delivery vehicles for nutraceuticals: a review. **International Journal of Dairy Technology**, v. 65, p. 13–21, 2012.

EL-SALAM, M. H. A.; EL-SHIBINY, S. Preparation and properties of milk proteins- based encapsulated probiotics: A review. **Dairy Science & Technology**, v. 95(4), p. 393–412, 2015.

EL SOHAIMY, S. A. Functional foods and nutraceuticals - modern approach to food science. **World Applied Sciences Journal**, v. 20, p. 691-708. 2012.

FAO/WHO. **Probióticos en los alimentos.** Propiedades saludables y nutricionales y directrices para la evaluación: Estudio FAO Alimentación y Nutrición, Roma, p. 45, 2006.

FATHI, M., MARTÍN, A., MCCLEMENTS, D. J. Nanoencapsulation of food ingredients using carbohydrate based delivery systems. **Trends in Food Science and Technology**, v. 39, p. 18-39. 2017.

FÁVARO-TRINDADE, C. S., PINHO, S. C., ROCHA, G. A. Review: Microencapsulation of food ingredients. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 11, n. 2, p. 103 – 112, 2008.

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 Hydrocoll**. 27: p. 1–13, 2012.

FOX, P. F.; GUINEE, T. P.; COGAN, T. M.; McSWEENEY, P. L. H**. Fundamentals of cheese Science** - Aspen Publication, USA, 2000.

FOX, P. F.; MCSWEENEY, P. L. H. Cheese: Chemistry, Physics and Microbiology. **Elsevier Academic Press**, London, v. 2, p. 345–346, 2004.

FRANZ, C. M. A. P.; STILES, M. E.; SCHLEIFER, K. H.; HOLZAPFEL, W. H. Enterococci in foods—a conundrum for food safety. **International Journal of Food Microbiology**, v. 88, p. 105 – 122, 2003.

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

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.

GEBARA, C.; CHAVES, K. S.; RIBEIRO, M. C. E.; SOUZA, F. N.; GROSSO, C. R.; GIGANTE, M. L. Viability of lactobacillus acidophilus La5 in pectin–whey protein microparticles during exposure to simulated gastrointestinal conditions. **Food ResearchInternational,** v. 51 (2), p. 872–878, 2013.

GHOSH, D., BAGCHI, D., KONISHI, T. Clinical aspects of functional foods and nutraceuticals. **Boca Raton: CRC Press**. 2014.

GOGINENI, V.; MARROW, L. E.; MALESKER, M. Probiotics: mechanisms of action and clinical applications. **Journal of Probiotics & Health**, v. 1, p. 101, 2013.

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**, 80, 374-381, 2013.

GOMBOTZ, W. R., WEE, S. F. Protein release from alginate matrices. **Advanced Drug Delivery Review**, v. 64, p. 194–205. 2012.

GUGLIELMOTTI, D. M. et al. Streptococcus thermophillus phage monitoring in a cheese factory: Phage characteristics and starter sensitivity. **International Dairy Journal,** v. 19, n. 8, p. 476-480, 2009.

HAGENS, S.; OFFERHAUS, M. L. Bacteriophages - New weapons for food safety. **Food Technology**, v. 62, n. 4, p. 46-54, 2008.

HAAS, P. A. Formation of uniform liquid-drops by application of vibration to laminar jets. **Industrial & Engineering Chemistry Research**, v. 31, p. 959–67. 1992.

HARAGUCHI, F. K.; ABREU, W. C.; DE PAULA, H. Whey protein: composition, nutritional properties, appications in sports and benefits for human health. **Rev. Nutr**., Campinas, v. 19 (4), p. 479-488, 2006.

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

HEINZEN, C.; BERGER, A.; MARISON, I. W. Use of vibration technology for jet break-up for encapsulation of cells and liquids in monodisperse microcapsules. In: Nedovic V, Willaert R, editors. Fundamentals of cell immobilization technology. **Dordrecht: Kluwer Academic Publishers**. p. 257–75, 2004.

HUGENSCHMIDT, S.; MIESCHER SCHWENNINGER, S.; LACROIX, C. Concurrent high production of natural folate and vitamin B12 using a co-culture process with *Lactobacillus plantarum SM39* and *Propionibacterium freudenreichii DF13*. **Process Biochemistry**, v. 46, p. 1063-1070, 2011.

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.

ILIČIĆ, M. D.; MILANOVIĆ, S. D.; CARIĆ, M. D.; KANURI Ć, K. G.; VUKIĆ, V. R.; HRNJEZ, D. V.; RANOGAJEC, M. I. Volatile compounds of functional dairy products. **Acta Periodica Technologica**, v. 43, p. 11-19, 2012.

INSTITUTO ADOLFO LUTZ. **Normas analíticas: métodos químicos e físicos para análise de alimentos.** 4.ed. São Paulo. 2008.

IRAVANI, S.; KORBEKANDI, H.; MIRMOHAMMADI, S. V. Technology and potential applications of probiotic encapsulation in fermented milk products**. J Food Sci Technol**, v. 52, n. 8, p. 4679-96, 2014.

ISLAM SHISHIR, M. R., XIE, L., SUN, C., ZHENG, X., CHEN, W. Advances in micro and nano-encapsulation of bioactive compounds using biopolymer and lipid-based transporters, **Trends in Food Science and Technology**, v. 78, p. 34-60. 2018.

IYER, C., KAILASAPATHY, K. Effect of co-encapsulation of probiotics with prebiotics on increasing the viability of encapsulated bacteria under in vitro acidic and bile salt conditions and in yogurt. **Journal of Food Science,** v. 70, p. 18-23. 2005.

JAIN, A., THAKUR, D., GHOSHAL, G., KATARE, O. P., SHIVHARE, U. S. Characterization of microcapsulated β-carotene formed by complex coacervation using case in and gum tragacanth. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 87, p. 101–113. 2016.

JELEN, P. **Whey processing**. In: ROGINSKI, H.; FUQUAY, J.W. AND FOX, P.F. (eds.). Encyclopedia of Dairy Sciences, Academic press ,v. 4, p.2739-2751, 2003.

JENSEN, H.; GRIMMER, S.; NATERSTAD, K.; AXELSSON, L. In vitro testing of commercial and potential probiotic lactic acid bacteria. **Int J Food Microbiol**, v. 153, p.216–222. 2012.

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

KAILASAPATHY, K.; IYER, C. Effect of Co-encapsulation of Probiotics with Prebiotics on Increasing the Viability of Encapsulated Bacteria under In Vitro Acidic and Bile Salt Conditions and in Yogurt. **Journal of Food Science**, v. 70, n. 1, 2005.

KIM, S. J.; CHO, S. Y.; KIM, S. H.; SONG, O. J.; SHIN, I. S.; CHA, D. S.; PARK, H. J. Effect of microencapsulation on viability and other characteristics in *Lactobacillus acidophilus ATCC 43121*. **LWT-Food Science and Technology**, v. 41, n.3, p. 493-500, 2008.

KITCHENER, B. G. B.; WAINWRIGHT, J.; PARSONS, A. J. A review of the principles of turbidity measurement. **Progress in Physical Geography**, v. 41, n. 5, p. 620-642, 2017.

KOSIN, B.; RAKSHIT, S. K. Microbial and processing criteria for production of probiotics: A review. **Food Technol Biotechnol**, v. 44, p. 371-379. 2006.

KORBEKANDI, H.; MORTAZAVIAN, A. M.; IRAVANI, S. Technology and stability of probiotic in fermented milks containing probiotics and prebiotics In: Probiotic and prebiotic foods: technology, stability and benefits to the human health. Shah, N.P., da Cruz, A.G., Faria, J.A.F. (Eds.), **Nova Science Publishers**, Inc. USA, 2011.

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

KRUNIĆ, T.Ž.; BULATOVIĆ, M. L.; OBRADOVIĆ, N. S.; VUKAŠINOVIĆ-SEKULIĆ, M. S.; RAKIN, M. B. Effect of immobilisation materials on viability and fermentation activity of dairy starter culture in whey-based substrate. **Journal of the Science of Food and Agriculture,** v. 96 (5), p. 1723–1729, 2015.

KUSHWAHA, J. P.; SRIVASTAVA, V. C.; MALL, I. D. An overview of various technologies for the treatment of dairy wastewaters**. Crit. Rev. Food Sci. Nutr.** v. 51, p. 442–452, 2011.

LAVARI, L.; PAEZ, 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.

LIAN, W. C.; HSIAO, H. C.; CHOU, C. C. Viability of microencapsulated *bifidobacteria* in simulated gastric juice and bile solution. **Int J Food Microbiol**, v. 86, p. 293–301, 2003.

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. **Rev. Ciênc. 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 & Interface Science**, v. 15, p. 73–83, 2010.

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

MARAFON, A. P.; SUMI, A.; ALCANTARA, M. R.; TAMIME, A. Y.; DE OLIVEIRA, M. N. Optimization of the rheological properties of probiotic yoghurts supplemented with milk proteins. **LWT-Food Science and Technology,** v. 44 (2), p. 511–519, 2011.

MARESCA, D.; DE PRISCO, A.; LA STORIA, A.; CIRILLO, T.; ESPOSITO, F.; MAURIELLO, G. Microencapsulation of nisin in alginate beads by vibrating technology: Preliminary investigation. **LWT - Food Science and Technology**, v. 66 p. 436-443, 2016.

MARTIN, 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. **Innov Food Sci Emerg**, v. 27, p. 15–25, 2015.

MARTONI, C.; BHATHENA, J.; URBANSKA, A. M.; PRAKASH, S. Microencapsulated bile salt hydrolase producing *Lactobacillus reuteri* for oral targeted delivery in the gastrointestinal tract. **Appl Microbiol Biotechnol**, v. 81, p. 225–233, 2008.

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

MEIRA, S. M. M.; HELFER, V.T.; VELHO, R.V.; LOPES, F.C.; BRANDELLI, A. Probiotic potential of lactobacillus spp. Isolated from Brazilian regional ovine cheese. **Journal of Dairy Research**. v. 79, p. 119–127, 2012.

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

MOSILHEY, S. **Influence of different Capsule Materials on the physiological properties of microencapsulated *Lactobacillus acidophilus*.** Ph.D. Thesis, Department of Food Technology, University of Bonn, 2003.

MOURA, S. C. S. R., BERLING, C. L., GERMER, S. P. M., ALVIM, I. D., HUBINGER, M. D. Encapsulating anthocyanins from Hibiscus sabdariffa L. calyces by ionic gelation: Pigment stability during storage of microparticles. **Food Chemistry**, v. 241, p. 317-327, 2018.

NEDOVIC, V.; KALUSEVIC, A.; MANOJLOVIC, V.; LEVIC, S.; BUGARSKI, B. An overview of encapsulation technologies for food applications. **Procedia Food Sci**, v. 1, p. 1806–1815, 2011.

NEMETHOVA, V.; LACIK, I.; RAZGA F.; Vibration Technology for Microencapsulation: The Restrictive Role of Viscosity. **J Bioproces Biotech**, v. 5, n. 1, 2014.

NOGUEIRA, J. C. R.; GONÇALVEZ, M. C. R. Probióticos – Revisão da Literatura. Revista Brasileira de Ciências da Saúde. v. 15, n. 4, p. 487-492, 2011.

OLIVEIRA, M. N.; SIVIERI, K.; ALEGRO, J. H. A.; SAAD, S. M. I. Technological aspects of functional foods containing probiotics. B**razilian Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 38, n. 1, 2002.

OLIVARES, A., SILVA, P., ALTAMIRANO, C. Microencapsulation of probiotics by eficiente vibration technology. **Journal of Microencapsulation**, v. 34, p. 667-674. 2017.

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

O'SULLIVAN, D. J. **Primary Sources of Probiotic Cultures.** In: Probiotics in food safety and human health. Boca Raton: Taylor & Francis, 2006.

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

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

PINTO, S. S.; FRITZEN-FREIRE, C. B.; BENEDETTI, S.; MURAKAMI, F.; 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, 2015.

PISPONEN, A.; PAJUMAGI, S.; MOOTSE, H.; KARUS A.; POIKALANEINEM, V. The lactose from ricota cheese whey: The effect of pH and concentration on size and morphology of lactose crystals. **Dairy Sci. Technol**. v. 93, p. 477-486, 2013.

PRASANNA, P. H. P.; CHARALAMPOPOULOS, D. Encapsulation of Bifidobacteriumlongum in alginate-dairy matrices and survival in simulated gastrointestinal conditions, refrigeration, cow milk and goat milk. **Food Bioscience**, v. 21, p. 72–79, 2018.

QUIBERONI, A. et al. Comparative analysis of *Streptococcus thermophillus* bacteriophages isolated from a yogurt industrial plant. **Food Microbiology**, v. 20, n. 4, p. 461-469, 2003.

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

RAZGA, F., NEMETHOVA, V., MATVEJOVA, M., LACIK, I. Production of Ca-alginate microspheres using Buchi Encapsulator B-395 Pro. Proceedings of the XXII **International Conference on Bioencapsulation**. Bratislava, Slovakia. 2014.

REIG, A. L. C.; ANESTO, J. B. Prebióticos y probióticos, una relación beneficiosa. Instituto de Nutrición e Hiene de los Alimentos**. Revista Cubana de Alimentação e Nutrição**, v. 16, n. 1, p. 63-8, 2002.

RODILES-LÓPEZ, J. O.; JARAMILLO-FLORES, M. E.; GUTIÉRREZ-LÓPEZ, G. F.; HERNÁNDEZ-ARANA, A.; FOSADO-QUIROZ, R. E.; BARBOSA-CÁNOVAS, G. V.; HERNÁNDEZ-SÁNCHES, H. Effect of high hydrostatic pressure on bovine [alpha]-lactalbumin functional properties. **Journal of Food Engineering**, v. 87, p. 363-370, 2008.

SALMINEN, S.; WRIGHT, A.; OUWEHAND, A. Lactic acid bacteria: microbiological and functional aspects. 3rd ed. New York: Marcel Dekker. p.1-66. 2004.

SANDHOLM, M. T.; MYLLĒINEN, P.; CRITTENDEN, R.; MOGENSEN,G.; FONDO, R.; SAARELA, M. Tecnological challenges for future probiotic foods. **International Dairy Journal**, n.12, p.173-182, 2002.

SANSONETTI, S.; CURCIO, S.; CALABRO, V.; IORIO, G. Bio-ethanol production by fermentation of ricota cheese whey as na effective alternative non-vegetable source. **Biomass Bioenergy**, v. 33, p.1687-1692, 2009.

SEMBA, D., TRUSEK-HOLOWNIA, A. Generation of homo- and heterogeneous microcapsules and their application. Technical Transactions, v. 4, p. 197-208. 2017.

SHAH, N. P.; ALI, J. F.; RAVULA, R. R. Populations of *Lactobacillus acidophilus, Bifidobacterium spp., and Lactobacillus casei* in Commercial Fermented Milk Products. **Bioscience and Microflora**, v. 2000, n. 1, p. 35-39, 2000.

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

SHI, L.; LI, Z.; ZHANG, Z.; ZHANG, T.; YU, W.; ZHOU, M.; TANG, Z. 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.

SHIBY, V. K.; MISHRA, H. N. Fermented milks and milk products as functional foods–a review. Critical Reviews in **Food Science and Nutrition**, v. 53, p. 482–496, 2013.

SHIMADZU CORPORATION. Shimadzu High-Performance Liquid Chromatograph LC-10A/C-R7A **Amino Acid Analysis System Instruction Manual**. Kyoto, Japan, 1993.

SILVA; STAMFORD. **Alimentos probióticos: Uma revisão**. Higiene Alimentar, v. 14, p. 68-69. 2000.

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

SOGIAS, I. A.; KHUTORYANSKIY, V. V.; WILLIAMS, A. C. Exploring the factors affecting the solubility of chitosan in water. **Macromolecular Chemistry and Physics**, v. 211, p. 426–433, 2010.

SOLANKI, H. K.; 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**, p. 1-21, 2013.

STEELE, C. M.; ALSANEI, W. A.; AYANIKALATH, S.; BARBON, C. E. A.; CHEN, J.; CICHERO, J. A. Y.; COUTTS, K.; DANTAS, R. O.; DUIVESTEIN, J.; GIOSA, L.; HANSON, B.; LAM, P.; LECKO, C.; LEIGH, C.; NAGY, A.; NAMASIVAYAM, A. M.; NASCIMENTO, W. V.; ODENDAAL, I.; SMITH, C.; WAN, H. The Influence of Food Texture and Liquid Consistency Modification on Swallowing Physiology and Function: A Systematic Review. **Dysphagia**, v. 30, n. 1, p.22–26, 2015.

STEPHEN, A. M., PHILLIPS, G. O., WILLIAMS, P. A. Food polysaccharides and their applications. (2nd ed.). **Taylor & Francis Group**, LLC, Broken Sound Parkway NW, Chapter 1. 2006.

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

TAMIME, A. Y.; SAARELA, M.; KORSLUND SONDERGAARD, A.; MISTRY, V. V.; SHAH N. Production and maintenance of viability probiotics micro-organism in dairy products. In: Tamime A (ed) Probiotic Dairy Products. **Blackwell Publishing Ltd**, UK, p 39–72, 2005.

TEJAYADI, S.; CHERYAN, M. Original paper: lactic acid from cheese whey permeate. Productivity and economics of a continuous membrane bioreactor. **Appl. Microbiol. Biotechnol.** v. 43, n. 2, p. 242-248. 1995.

TROJANOWSKA, A., GIAMBERINI, M., NOWAK, M., MARCINIAK, L., JATRZAB, R., TYLKOWSKI, B. Microencapsulation in Food Chemistry. **Journal of Membrane Science and Research**, v. 3, p. 265-271. 2017.

VÁSQUEZ, A.; MOLIN, G.; PETTERSSON, B.; ANTONSSON, M. Ahrne S.DNA-based classification and sequence heterogeneities in the 16S rRNA genes of Lactobacillus casei/paracasei and relatedspecies. **Syst Appl Microbiol.** v. 28 (5), p. 430-441, 2005.

VENETSANEAS, N.; ANTONOPOULOU, G.; STAMATELATOU, K.; KORNAROS, M., LYBERATOS, G. Using cheese whey for hydrogen and methane generation in a two-stage continuous process with alternative pH controlling approaches. **Bioresour. Technol.** v. 100, n. 15, p. 3713-3717. 2009.

VENTURINI, K. S.; SARCINELLI, M. F.; SILVA, L. C. **Características do Leite.** Boletim Técnico – PIE UFES: 01007. Editado: 26.08. 2007.

VICENZI, A.; MACIEL, M.; BURLANI, E. L.; OLIVEIRA, E. C.; VOLPATO, G.; LEHN, D. N.; SOUZA, C. F. V. Ethanol Bio-Production from Ricotta Cheese Whey by Several Strains of the Kluyveromyces. **American Journal of Food Technology**. 2014.

VINDEROLA, C.G., BAILO, N., REINHEIMER, J.A. Survival of probiotic microflora in Argentinian yoghurts during refrigerated storage. **Food Res. Int.**, Amsterdam, v. 33, p. 97-102, 2000.

VIVEK, K. B. Use of encapsulated probiotics in dairy based foods. **International Journal of Food, Agriculture and Veterinary Sciences,** v. 3, p. 188–199, 2013.

WHELEHAN, M.; MARISON, I. W. Microencapsulation using vibrating technology. **J Microencapsul.** v. 28, p. 669–688, 2011.

WANG, W., JUNG, J., ZHAO, Y. Chitosan-cellulose nanocrystal microencapsulation to improve encapsulation efficiency and stability of entrapped fruit anthocyanins. **Carbohydrate Polymers**, v. 157, p. 1246–1253. 2017.

WHELEHAN, M. Encapsulator B-390/B-395 Pro - Laboratory Guide. **BÜCHI Labortechnik AG**, CH-9230, Flawil, Switzerland. 2014.

WIELE, T. V.; BOON, N.; POSSEMIERS, S.; JACOBS, H.; VERS TRAETE W. Prebiotic effect of chicory inulin in the simulator of the human intestinal microbial ecosystem. **FEMS Microbiology Ecology**, v. 51, p. 143 - 153, 2004.

WÜRTH, R.; HÖRMANNSPERGER, G.; WILKE, J.; FOERST, P.; HALLER, D.; KULOZIK, U. Protective effect of milk protein based microencapsulation on bacterial survival in simulated gastric juice versus the murine gastrointestinal system. **Journal of functional foods,** v. 15, p. 116–125, 2015.

WYSS, A.; VON STOCKAR, U.; MARISON, I. W. Production and characterization of liquid-core capsules made from cross-linked acrylamide copolymers for biotechnological applications. **Biotechnol Bioeng**, v. 86, p. 563–72, 2004.

YEUNG, T. W., ÜÇOK, E. F., TIANI, K. A., MCCLEMENTS, D. J., SELA, D. A. Microencapsulation in alginate and chitosan microgels to enhance viability of Bifidobacterium longum for oral delivery. **Journal Frontiers in Microbiology**, v. 7, p. 1-11. 2016.

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.