



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ENGENHARIA DE ALIMENTOS
DEPARTAMENTO DE TECNOLOGIA DE ALIMENTOS



Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado

Maria Cecília Enes Ribeiro

Engenheira de Alimentos

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante

Orientadora

Dissertação apresentada à Faculdade de Engenharia de Alimentos da
Universidade Estadual de Campinas para obtenção de título de Mestre em
Tecnologia de Alimentos

Campinas/SP
2011

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FEA – UNICAMP

R354p Ribeiro, Maria Cecília Enes
Produção e caracterização de iogurte probiótico batido adicionado de *Lactobacillus acidophilus* livre e encapsulado / Maria Cecília Enes Ribeiro. -- Campinas, SP: [s.n], 2011.

Orientador: Mirna Lúcia Gigante
Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas.
Faculdade de Engenharia de Alimentos.

1. Probióticos. 2. Microencapsulação. 3. Iogurte. 4. Viabilidade. 5. Simulação das condições gastrointestinais. I. Gigante, Mirna Lúcia. II. Universidade Estadual de Campinas.Faculdade de Engenharia de Alimentos. III. Título.

cars/bibfea

Título em inglês: Production and characteristics of stirred probiotic yoghurt with free and encapsulated *Lactobacillus acidophilus*

Palavras-chave em inglês (Keywords): Probiotics, Microencapsulation, Yoghurt, Viability, Simulated gastrointestinal conditions

Titulação: Mestre em Tecnologia de Alimentos

Banca examinadora: Mirna Lúcia Gigante
Ana Lúcia Barretto Penna
Ana Sílvia Prata

Programa de Pós Graduação: Programa em Tecnologia de Alimentos

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante
(Orientadora)

Profa. Dra. Ana Lúcia Barretto Penna
(Membro)

Profa. Dra. Ana Sílvia Prata
(Membro)

Profa. Dra. Adriane Elisabete Antunes de Moraes
(Membro)

Prof. Dr. Carlos Raimundo Ferreira Grosso
(Membro)

Este exemplar corresponde à redação final da dissertação defendida em ___/___/___
por Maria Cecília Enes Ribeiro aprovada pela comissão julgadora em ___/___/___.

*Aos meus pais, Newton e Maria
José, pela compreensão, apoio e
por sempre acreditarem em mim.*

DEDICO

AGRADECIMENTOS

À Deus pela vida e por mais esta conquista;

Aos meus familiares por todo apoio, incentivo e forças que me deram durante esta caminhada;

À Profa. Dra. Mirna Lúcia Gigante pela oportunidade, orientação, apoio, amizade e ensinamentos transmitidos no desenvolvimento deste trabalho;

Aos membros da banca examinadora pelas correções e sugestões na redação desta dissertação;

Ao Prof. Dr. Carlos Grosso, pelas sugestões e por disponibilizar a utilização dos laboratórios do DEPAN.

À Bete, técnica do Laboratório de Leite; à Diana, técnica do Laboratório de Microbiologia e à Yara, técnica do Laboratório de Microestrutura de Alimentos pela amizade, atenção e ajuda nos momentos de dúvida;

À Ana Lourdes pela valiosa contribuição durante a execução deste trabalho;

À Chr. Hansen pela doação da cultura probiótica, à CPKelco pela doação da pectina e à Arla Foods Ingredients pelo concentrado proteico de soro;

À Profa. Dra. Flávia Maria Netto e ao Prof. Dr. Flavio Luiz Schmidt por disponibilizar equipamentos que viabilizaram a realização deste estudo;

Aos amigos do laboratório de leite: Karina, Clarice, Diogo, Lígia, Mônica, Veridiana, Ana Carolina, Bia, Mirian, Francisco e Sofia pela força, amizade, respeito e pela agradável convivência;

Em especial à Clarice e Karina, que estiveram sempre presentes, me ajudando e apoiando; e, sem dúvida, à Karina pelo acolhimento;

Aos amigos que conquistei Graciela, Karol, Simone, Noelia, Ana, Letícia pela amizade e por todos os momentos que passamos juntas;

Aos colegas da pós-graduação, por toda amizade e companheirismo durante o mestrado;

À Flávia, Juliana e Grasi pela grande contribuição na execução deste trabalho;

Ao Paulinho, pela imprescindível ajuda na elaboração da parte estatística deste trabalho;

Aos funcionários por toda ajuda e apoio técnico dados durante a realização dos meus experimentos;

Aos meus amigos, que mesmo longe, me apoiaram e me deram forças nos momentos difíceis;

A todos os técnicos e funcionários da FEA, em especial os do DTA;

Ao CNPq pela bolsa de estudos concedida;

À FAPESP pelo apoio financeiro ao projeto de pesquisa;

A todos que de alguma forma me incentivaram e contribuíram para a realização deste trabalho.

Muito Obrigada!

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	ix
LISTA DE TABELAS	x
RESUMO	xi
ABSTRACT	xiii
1. INTRODUÇÃO	1
2. OBJETIVOS	3
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	4
3.1. Iogurte.....	4
3.2. Micro-organismos Probióticos.....	7
3.3. Iogurte Probiótico.....	10
3.4. Tolerância às condições gastrointestinais	12
3.5. Microencapsulação	14
4. MATERIAL E MÉTODOS	21
4.1. Material	21
4.2. Métodos	21
4.2.1. Preparo da cultura láctica tradicional	21
4.2.2. Manutenção e preparo da cultura probiótica	22
4.2.3. Produção das microcápsulas	23
4.2.3.1. Caracterização das microcápsulas	25
4.2.3.2. Avaliação da viabilidade de <i>Lactobacillus acidophilus</i> microencapsulado	25
4.2.4. Aplicação de <i>Lactobacillus acidophilus</i> livre e microencapsulado na produção de iogurte batido.....	25
4.3. Amostragem e indicação das análises realizadas	27
4.4. Determinações analíticas.....	28
4.4.1. Análises físico-químicas.....	28
4.4.2. Análises microbiológicas	28
4.5. Avaliação da viabilidade do <i>Lactobacillus acidophilus</i> no iogurte durante a simulação das condições gastrointestinais	30

4.5.1. Preparo do suco gástrico e solução de bile.....	30
4.5.2. Simulação das condições gastrointestinais.....	30
4.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados	31
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	32
5.1. Avaliação das características das microcápsulas.....	32
5.2. Caracterização dos iogurtes probióticos batidos	36
5.2.1. Caracterização do processo de fermentação.....	36
5.2.2. Efeito dos tratamentos sobre a composição dos iogurtes probióticos.....	38
5.2.3. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre as características dos iogurtes probióticos.	44
5.2.3.1. Avaliação da pós-acidificação.....	44
5.2.3.2. Avaliação da viabilidade dos micro-organismos	48
5.2.3.3. Avaliação da viabilidade dos micro-organismos após simulação das condições gastrointestinais.....	53
6. CONCLUSÕES	57
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	58
ANEXO I.....	67

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Fluxograma geral da produção de microcápsulas.....	24
Figura 2. Fluxograma de fabricação de iogurte (Adaptado de Tamime e Robinson, 1999).....	27
Figura 3. Imagens obtidas por microscopia óptica das microcápsulas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa contendo <i>L. acidophilus</i> . A e B: aumento de 25x. Barras de 50 µm.....	33
Figura 4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas liofilizadas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa contendo <i>L. acidophilus</i> . As setas azuis indicam a presença de gordura e as setas vermelhas indicam a presença de micro-organismos nas microcápsulas.	34
Figura 5. Curva de desenvolvimento de pH durante o processo de fabricação do iogurte.	37
Figura 6. Curva de desenvolvimento de acidez (% ácido láctico) durante o processo de fabricação do iogurte.....	37
Figura 7. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o pH (A) e acidez (B) dos iogurtes probióticos.	46
Figura 8. Porcentagem de sobrevivência do <i>L. acidophilus</i> após 35 dias de armazenamento refrigerado dos iogurtes probióticos.	52
Figura 9. Porcentagem de sobrevivência do <i>L. acidophilus</i> nos iogurtes probióticos após exposição dos produtos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.	55

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características do processo de fermentação dos iogurtes probióticos.	36
Tabela 2. Composição físico-química, característica microbiológica, desvio padrão e valor de <i>p</i> dos iogurtes probióticos (dia 1).....	39
Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação desses fatores sobre pH e acidez dos iogurtes probióticos.....	44
Tabela 4. Desenvolvimento de pH e acidez dos iogurtes probióticos nos 35 dias de armazenamento refrigerado.	45
Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre a viabilidade de <i>S. thermophilus</i> , <i>L. bulgaricus</i> e <i>L. acidophilus</i>	48
Tabela 6. Viabilidade das culturas durante 35 dias de armazenamento refrigerado.....	49
Tabela 7. Viabilidade de <i>L. acidophilus</i> (log UFC/g) presente nos iogurtes probióticos após incubação sequencial dos produtos em suco gástrico e intestinal artificial e exposição à solução de bile 1%.	53
Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência do <i>L. acidophilus</i> nos iogurtes após exposição dos produtos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.	54

RESUMO

A microencapsulação de micro-organismos probióticos tem se mostrado como uma técnica promissora para manter sua viabilidade tanto nos produtos aos quais são adicionados, bem como durante sua passagem pelo trato gastrointestinal. O objetivo geral deste trabalho foi avaliar a fabricação e as características durante o armazenamento refrigerado de iogurte batido probiótico adicionado de *Lactobacillus acidophilus* nas formas livre e encapsulada. O micro-organismo probiótico foi microencapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa, utilizando-se pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede. Antes de serem adicionadas ao iogurte, as microcápsulas foram avaliadas quanto à característica físico-química e viabilidade do micro-organismo probiótico. Os iogurtes foram fabricados com leite homogeneizado esterilizado e padronizado adicionado de 2,5% (v/v) da cultura láctica tradicional para fabricação de iogurte e submetidos aos seguintes tratamentos: **1)** adição de 1% (v/v) de *L. acidophilus* livre; **2)** adição de 10% (p/v) de microcápsulas úmidas contendo *L. acidophilus* e **3)** adição de 13% (p/v) de microcápsulas liofilizadas reidratadas contendo *L. acidophilus*. O tempo de fermentação foi considerado o necessário para que o produto atingisse pH $4,8 \pm 0,05$. Os produtos foram caracterizados quanto à sua composição centesimal e população dos micro-organismos. Após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado, os iogurtes foram avaliados quanto à pós-acidificação e viabilidade dos micro-organismos da cultura tradicional de iogurte e probiótica. A viabilidade do *L. acidophilus* durante a simulação da passagem do iogurte através das condições gastrointestinais foi avaliada após 35 dias. O experimento completo foi repetido três vezes e o delineamento experimental utilizado foi o *Split-plot*, em um planejamento do tipo fatorial 3 x 6, em blocos completamente aleatorizados. O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento bem como da interação desses fatores sobre as variáveis estudadas foi avaliado por ANOVA aplicando-se teste de Tukey para comparação entre as médias ao nível de 5% de significância. O tempo de fermentação dos produtos variou de 180 a 200 minutos. Um dia após a fabricação, o iogurte obtido com o micro-organismo livre apresentou menor pH que os iogurtes adicionados do micro-organismo encapsulado. Os iogurtes produzidos com o micro-organismo encapsulado apresentaram maior teor

de proteína quando comparados ao produzido com o *L. acidophilus* livre. A interação entre os tratamentos e o tempo de armazenamento refrigerado afetou significativamente a pós-acidificação e o número de células viáveis de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus* no iogurte. Os iogurtes probióticos adicionados de *L. acidophilus* na forma microencapsulada apresentaram menor pós-acidificação e maior sobrevivência do micro-organismo probiótico após 35 dias de armazenamento quando comparado ao iogurte com probiótico adicionado na forma livre. Na forma livre, a população de células viáveis de *L. acidophilus* reduziu 0,98 ciclos logarítmicos, enquanto na forma encapsulada (úmida e liofilizada) essa redução foi de 0,20 ciclos logarítmicos. Esses resultados indicam a sobrevivência de aproximadamente 10% e 62% do *L. acidophilus* nas formas livre e encapsulada, respectivamente. Após 35 dias de armazenamento refrigerado, a simulação da passagem dos produtos pelo trato gastrointestinal indicou maior sobrevivência do *L. acidophilus* encapsulado do que do micro-organismo livre. A microencapsulação do *L. acidophilus* por gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se pectina e proteína de soro como materiais de parede, conferiu proteção ao micro-organismo, tanto durante o armazenamento refrigerado do produto por 35 dias, como durante a simulação gastrointestinal.

Palavras-chave: probióticos, microencapsulação, iogurte, viabilidade, simulação das condições gastrointestinais.

ABSTRACT

Microencapsulation of probiotic microorganisms has been shown to be a promising technique to maintain their viability either in products to which they are added and during their passage through the gastrointestinal tract. The aim of this study was to evaluate the manufacture and characteristics during refrigerated storage of probiotic stirred yoghurt added of *Lactobacillus acidophilus* in both free and encapsulated forms. The probiotic microorganism was microencapsulated by ionotropic gelation and complex coacervation, using pectin and whey protein concentrate as wall materials. Before being added to yoghurt, the microcapsules were evaluated for physical chemical characteristics and viability of the probiotic microorganism. The yoghurts were manufactured with sterilized, homogenized and standardized milk added of 2.5% (v/v) yoghurt starter culture and submitted to the following treatments: 1) addition of 1% (v/v) of free *L. acidophilus*, 2) addition of 10% (w/v) of moist microcapsules containing *L. acidophilus* and 3) addition of 13% (w/v) of rehydrated freeze-dried microcapsules containing *L. acidophilus*. The fermentation period was considered the enough time for the product to reach $\text{pH } 4.8 \pm 0.05$. The products were characterized to their centesimal composition and population of microorganisms. After 1, 7, 14, 21, 28 and 35 days of refrigerated storage, the yoghurts were evaluated for post-acidification and viability of yoghurt starter culture and probiotic microorganism. The viability of *L. acidophilus* during simulation of the passage of yoghurt through gastrointestinal conditions was also evaluated after 35 days. The complete experiment was repeated three times and the experimental design was a Split-Plot in a factorial design of the type 3 x 6, in completely randomized blocks. The effect of treatments, storage time and the interaction of these factors on these studied variables was evaluated by ANOVA according to the Tukey test for comparison between the averages, in 5% of significance level. The fermentation period of the products ranged from 180 to 200 minutes. One day after manufacturing, the yoghurt obtained with free microorganism showed lower pH than the yoghurt produced with added encapsulated microorganism. The yoghurts produced with the encapsulated microorganism showed higher protein content than that produced with free *L. acidophilus*. The interaction between treatments and time of refrigerated storage

affected significantly the post-acidification and the number of viable cells of *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* and *L. acidophilus* in yoghurt. The probiotics yoghurts added by *L. acidophilus* in microencapsulated form showed less post-acidification and increased survival of probiotic microorganism after 35 days of storage than yoghurt added of probiotic in free form. The counting of viable cells of *L. acidophilus* reduced 0.98 log cycles in free form, while in encapsulated form (moist and freeze-dried) the reduction was 0.20 log cycles. These results indicate the survival of approximately 10% and 62% of *L. acidophilus* in both free and encapsulated forms, respectively. After 35 days of refrigerated storage, the simulation of the passage of yoghurts through the gastrointestinal tract showed a higher survival of *L. acidophilus* encapsulated than the free microorganism. Microencapsulation of *L. acidophilus* by ionotropic gelation and complex coacervation, using pectin and whey protein concentrate as wall materials provide protection to microorganism, both during refrigerated storage for 35 days and during simulated gastrointestinal conditions.

Keywords: probiotics, microencapsulation, yoghurt, viability, simulated gastrointestinal conditions.

1. INTRODUÇÃO

O iogurte é definido como “o produto incluído na definição de leites fermentados cuja fermentação se realiza com cultivos protosimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus*¹ e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais, de forma complementar, outras bactérias ácido-láticas podem acompanhar devido à sua atividade, que pode contribuir para a determinação das características do produto final”. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade. O iogurte pode variar quanto à sua composição química, método de produção, sabor e consistência. Em relação à consistência, o iogurte pode ser firme, batido ou líquido (BRASIL, 2007).

Na área de laticínios, a produção de iogurtes e leites fermentados funcionais possui grande aceitação pelo público em geral e apresentam excelente valor nutritivo, sendo considerados os “veículos” mais utilizados para o consumo de probióticos. (ANTUNES et al., 2007). Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como promotores de bem estar e saúde, devido à redução do risco de doenças (ROBERFROID, 2000; SIRÓ et al., 2008). Dentro deste contexto, os probióticos têm sido amplamente estudados para sua aplicação em alimentos, devido a inúmeras atribuições em relação aos seus benefícios à saúde.

Com o avanço das pesquisas, um crescente número de evidências tem mostrado os benefícios promovidos pelos probióticos para a aplicação em humanos, como a redução da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, efeitos anti-mutagênicos, anti-carcinogênicos e anti-hipertensivos (CHARTERIS et al., 1998a; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; TUOHY et al., 2003; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

¹ Apesar de constar desta forma na legislação brasileira, na taxonomia de bactérias ácido-láticas a denominação atual é *S. thermophilus*. (SCHLEIFER et al., 1991)

O uso dos probióticos *Bifidobacterium* sp. e/ou *Lactobacillus acidophilus* em leites fermentados tornou-se popular no final da década de 70 como resultado de grande aumento no conhecimento da taxonomia e ecologia das bifidobactérias. (GOMES e MALCATA, 1999).

Para exercerem efeitos probióticos, os micro-organismos adicionados em produtos comercializados devem atender alguns requisitos, incluindo a sua sobrevivência, atividade e estabilidade durante o armazenamento do produto (HELLER, 2001). Após a produção do iogurte e posterior resfriamento, o produto pode sofrer pós-acidificação, podendo causar uma substancial perda de viabilidade dos micro-organismos probióticos, uma vez que em pH menor que 4,4 estes não se desenvolvem bem e uma redução da população normalmente é observada (SHAH, 2000; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

Outro fator que pode ocasionar uma perda na viabilidade dos micro-organismos probióticos após sua ingestão é o trato gastrointestinal (TGI), onde estes devem resistir ao suco gástrico, à bile e à secreção pancreática mantendo-se viáveis para colonizar o intestino e promover seu efeito benéfico (DEL PIANO et al., 2006a). Com isso, a perda da viabilidade dos micro-organismos probióticos tem levado a busca por novas estratégias para sua manutenção, sendo a microencapsulação um método promissor para a proteção dos probióticos.

Diferentes micro-organismos, técnicas de encapsulação e materiais de parede têm sido utilizados com sucesso na manutenção da viabilidade dos probióticos em iogurte (KAILASAPATHY, 2006; SULTANA et al., 2000; KRASAEKOOPT et al., 2003; ADHIKARI et al., 2003). Dessa forma, o objetivo geral do trabalho foi avaliar a fabricação e as características durante o armazenamento refrigerado de iogurte batido probiótico adicionado de *Lactobacillus acidophilus* nas formas livre e encapsulada, utilizando-se gelificação iônica e coacervação complexa como técnicas de encapsulação, e pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede.

2. OBJETIVOS

Os objetivos específicos deste trabalho foram:

1. Caracterização física, química e microbiológica de microcápsulas contendo *L. acidophilus* obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede;
2. Avaliar o efeito da adição de *L. acidophilus*, livre e encapsulado, sobre a produção e composição do iogurte probiótico batido;
3. Avaliar a pós-acidificação e a viabilidade do *L. acidophilus*, nas formas livre e microencapsulada, no iogurte probiótico batido durante o armazenamento refrigerado;
4. Avaliar a resistência do *L. acidophilus* às condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal após 35 dias de armazenamento refrigerado do iogurte probiótico batido.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Iogurte

De acordo com o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007) “entende-se por Leites Fermentados os produtos adicionados ou não de outras substâncias alimentícias, obtidas por coagulação e diminuição do pH do leite, ou reconstituído, adicionado ou não de outros produtos lácteos, por fermentação láctica mediante ação de cultivos de micro-organismos específicos”.

A mesma legislação, com relação ao iogurte, define que é “o produto incluído na definição de leites fermentados cuja fermentação se realiza com cultivos protossimbóticos de *Streptococcus salivarius* subsp. *thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, aos quais, de forma complementar, outras bactérias ácido-lácticas podem acompanhar devido à sua atividade, que pode contribuir para a determinação das características do produto final”. Estes micro-organismos específicos devem ser viáveis, ativos e abundantes no produto final durante seu prazo de validade.

As bactérias do iogurte *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* crescem melhor quando presentes juntas no leite do que separadamente, devido a protocooperação. Os bacilos proteolíticos promovem o desenvolvimento dos estreptococos pela formação de pequenos peptídeos e aminoácidos, sendo o principal deles a valina. O leite contém pouca quantidade desses aminoácidos e os cocos, que são pouco proteolíticos, produzem ácido lentamente. Os cocos, por sua vez, favorecem o crescimento dos bacilos pela formação de ácido fórmico sob condições anaeróbias e pela formação de CO₂. Devido ao estímulo mútuo durante o desenvolvimento das bactérias no leite, o ácido láctico é produzido mais rapidamente com as culturas em conjunto quando comparado com a produção individual. Os bacilos são menos susceptíveis ao ácido e continuam desenvolvendo. Os cocos, assim como os bacilos contribuem significativamente para as propriedades do iogurte e ambas as espécies devem estar presentes em grandes quantidades no produto final (WALSTRA et al., 2006).

Segundo a mesma legislação (BRASIL, 2007), o iogurte pode apresentar consistência firme, pastosa, semi-sólida ou líquida, cor branca ou de acordo com a substância alimentícia e/ou corante adicionado. Seu odor e sabor devem ser característicos ou de acordo com a substância alimentícia e/ou substância aromatizante/saborizante adicionada. Deve apresentar acidez (g de ácido láctico/100g) variando de 0,6 a 1,5 e a contagem de bactérias lácticas totais deve ser de no mínimo 10^7 UFC/g durante todo o período de validade.

De acordo com Tamime e Robinson (1999), as principais etapas de fabricação do iogurte incluem: recepção do leite, padronização e/ou fortificação, homogeneização, tratamento térmico, inoculação, fermentação e coagulação, resfriamento, embalagem e armazenamento do produto. O iogurte é usualmente classificado em dois tipos básicos, de acordo com seu método de produção e estrutura física do coágulo: iogurte firme ou tradicional (*set yoghurt*) e o iogurte batido (*stirred yoghurt*). O iogurte firme é fermentado após a inoculação seguida de envase e é incubado à temperaturas de 40 - 43°C por 2 a 4 horas. Já no iogurte batido, o leite é inoculado e incubado em tanques de fermentação, sendo o gel do iogurte quebrado durante os estágios de batimento e resfriamento. O iogurte líquido (*fluid yoghurt*) pode ser considerado como um iogurte batido de baixa viscosidade.

A padronização do teor de sólidos do leite na produção de iogurte pode ser realizada através da adição de leite em pó (integral ou desnatado), leite em pó, soro em pó (concentrado ou isolado proteico de soro) ou caseína em pó. Destes, o leite em pó desnatado é o sólido mais empregado na fabricação de iogurtes, uma vez que melhora a viscosidade, textura e a sensação bucal do iogurte, além de reduzir a sinérese (TAMIME e DEETH, 1980).

A concentração de leite em pó adicionada ao iogurte pode variar entre 1 e 6%, sendo recomendado entre 3 e 4%, já que a adição de elevados níveis pode resultar em sabor de pó no iogurte. Em geral, os pós devem ser livres de agentes inibidores, possuírem elevada qualidade microbiológica e cumprirem os padrões físico-químicos. Os processos de concentração por evaporação a vácuo ou por filtração em membranas

são outras formas empregadas na etapa de padronização do teor de sólidos do leite (TAMIME e DEETH, 1980).

O leite é submetido à homogeneização para prevenir a separação da gordura durante o repouso (especialmente nos tanques de fermentação durante o período de incubação). Na homogeneização, o leite é forçado a passar por um pequeno orifício sob alta pressão, assim há redução do diâmetro dos glóbulos de gordura para tamanhos menores que 2 μm , prevenindo a formação de *clusters* e a separação de gordura (AFONSO e MAIA, 1999).

O tratamento térmico empregado ao leite para a produção de iogurte pode ser realizado em diferentes temperaturas e a escolha do binômio tempo-temperatura é baseada em vários fatores. Além de eliminar patógenos e outros micro-organismos indesejáveis, o tratamento térmico pode alterar as propriedades físico-químicas dos constituintes do leite, as quais são relevantes na produção do iogurte (TAMIME e ROBINSON, 1999).

Segundo Lucey et al. (1998), o gel obtido de leite não aquecido pode ter grande rearranjo de partículas durante sua formação, resultando na formação de *clusters* densos de agregados de caseína, e na formação de um gel fraco com propensão à sinérese. Por outro lado, o tratamento térmico mais intenso (85°C/20 minutos ou 95°C/5 minutos) aumenta as propriedades hidrofílicas do coágulo e a estabilidade do gel do iogurte devido à desnaturação das proteínas do soro, especialmente β -lactoglobulina, e sua associação com k-caseína através de pontes dissulfeto.

De acordo com Tamime e Robinson (1999), durante a produção de iogurte, o leite tratado termicamente é resfriado à temperatura de incubação das culturas lácticas (*Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*), e geralmente, o leite é fermentado entre 40 e 45°C, que é a temperatura ótima para o crescimento da cultura mista.

Alguns dos fatores que influenciam na proporção de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* ao final do processo fermentativo, segundo

Walstra et al. (2006) são: temperatura de incubação, que sendo maior ou menor que 45°C favorece, respectivamente, *L. bulgaricus* e *S. thermophilus*; tempo de incubação, sendo que longo favorece *L. bulgaricus* e curto é favorável ao *S. thermophilus*; e porcentagem de inóculo, que maior estimula *L. bulgaricus*, enquanto que menor estimula *S. thermophilus*.

A lactose no leite é fonte de energia para as culturas lácticas, mas as proteínas desempenham importante papel na formação do coágulo e, portanto, a consistência/viscosidade do produto é diretamente proporcional ao nível de proteína presente, além de depender do manuseio do coágulo após a fermentação do leite (TAMIME e ROBINSON, 1999).

Após a coagulação do leite, deve-se resfriar o produto com o objetivo de controlar a atividade metabólica das culturas lácticas e suas enzimas. O resfriamento do coágulo se inicia logo após o produto ter atingido acidez desejável, que ocorre aproximadamente em pH 4,6 ou 0,9% de ácido láctico. A temperatura do coágulo deve diminuir de aproximadamente 45°C para menos que 10° C o mais rápido possível para controlar a acidez final do produto (TAMIME e DEETH, 1980).

Apesar do resfriamento, o iogurte pode sofrer pós-acidificação, a qual é caracterizada pelo decréscimo do pH durante o armazenamento refrigerado. A pós-acidificação pode causar uma substancial perda de viabilidade dos micro-organismos probióticos, uma vez que em pH menor que 4,4 estes não se desenvolvem bem e uma redução da população normalmente é observada. Além da pós-acidificação, outros fatores como concentração de açúcares e toxicidade do oxigênio também podem afetar a viabilidade de probióticos durante a estocagem refrigerada do produto (SHAH, 2000; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

3.2. Micro-organismos Probióticos

Nas últimas décadas a busca por alimentos funcionais aumentou consideravelmente, uma vez que os alimentos passaram a ser vistos não somente como uma fonte de nutrientes, mas também como um promotor de bem estar e saúde,

devido à redução do risco de doenças (ROBERFROID, 2000; SIRÓ et al., 2008). Dentro deste contexto, os probióticos têm sido amplamente estudados para sua aplicação em alimentos, devido a inúmeras atribuições em relação aos seus benefícios à saúde.

Os probióticos são descritos como micro-organismos vivos, que quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro (FAO/WHO, 2001).

Os benefícios à saúde atribuídos à ingestão dos probióticos têm sido evidenciados em inúmeros estudos para sua aplicação em humanos, como a redução da intolerância à lactose, redução dos níveis de colesterol, estimulação do sistema imune, alívio da constipação, aumento da absorção de minerais, efeitos anti-mutagênicos, anti-carcinogênicos e anti-hipertensivos (CHARTERIS et al., 1998a; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; TUOHY et al., 2003; VASILJEVIC e SHAH, 2008).

As alegações funcionais atribuídas aos probióticos têm gerado grande interesse das indústrias, uma vez que representam um forte nicho entre os alimentos funcionais, e muitas pesquisas estão sendo desenvolvidas com o objetivo de incorporar estes micro-organismos aos alimentos (STANTON et al., 2001).

Diversos micro-organismos podem ser considerados potencialmente probióticos, sendo aplicadas comercialmente diversas espécies de bactérias ácido-lácticas, como *Lactobacillus* sp., além de linhagens do gênero *Bifidobacterium* (VASILJEVIC e SHAH, 2008; O'SULLIVAN, 2006). A principal razão para esta escolha é o fato destes gêneros serem habitantes predominantes do intestino humano, sendo *Bifidobacterium* do intestino grosso e *Lactobacillus* do intestino delgado.

Bactérias do gênero *Bifidobacterium* de forma geral são bastonetes podendo apresentar uma bifurcação em sua extremidade, Gram positivas, anaeróbias, catalase negativas, não esporulam, não apresentam motilidade e, apresentam uma via metabólica especial, permitindo-lhes produzir ácido acético, além de ácido láctico na proporção molar de 3:2 (BALLONGUE, 2004; VASILJEVIC e SHAH, 2008). Possuem

temperatura de crescimento entre 20°C e 46°C, com valores ótimos entre 37°C e 41°C, e o pH ótimo está situado na faixa de 6,5 a 7,0 (ARUNACHALAM, 1999).

O gênero *Lactobacillus* contém grande número de espécies com propriedades bioquímicas e fisiológicas variadas, capazes de crescer em temperaturas que variam de 2°C a 53°C, com valores ótimos, geralmente, de 30°C a 40°C, e pH ótimo entre 5,5 e 6,2 (KANDLER e WEISS, 1986). Destes micro-organismos, o *L. acidophilus* é o mais utilizado e estudado como probiótico nos últimos anos (O'SULLIVAN, 2006). Algumas linhagens de *L. acidophilus* podem melhorar o valor nutricional dos produtos aos quais forem adicionados por serem capazes de sintetizar ácido fólico, niacina, riboflavina e vitamina K (GOMES e MALCATA, 1999).

Estudos sugerem que a ingestão de uma dose diária de 10^8 a 10^{10} UFC de micro-organismos probióticos, o que representa o consumo de 100 g do alimento contendo no mínimo 10^6 UFC/g, é necessária para que esses possam desempenhar seu efeito probiótico (FULLER, 1989; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002, REID et al., 2003).

Heller (2001) relata que para exercerem o efeito probiótico, os micro-organismos adicionados em produtos comercializados devem atender alguns requisitos, incluindo a sua sobrevivência, atividade e estabilidade durante o armazenamento sem afetar o sabor, aroma e textura dos produtos aos quais forem adicionados. Além destes requisitos tecnológicos, os de segurança e funcionalidades destes micro-organismos devem ser avaliados no processo de seleção para sua aplicação do uso em humanos (SAARELA et al., 2000). Dentre os requisitos de segurança, o probiótico não deve ser patogênico ou apresentar toxicidade, resistir a antimicrobianos e sua origem, deve ser o trato gastrointestinal de humanos saudáveis (FULLER, 1989; KAILASAPATHY e CHIN, 2000; MATTILA-SANDHOLM et al., 2002).

A capacidade de aderir à mucosa intestinal, atividade antagonista, produção de substâncias antimicrobianas e a resistência ao suco gástrico e aos sais biliares são algumas características avaliadas durante a seleção dos micro-organismos (SAARELA et al., 2000).

A tolerância às condições ácidas do estômago e aos sais biliares são os principais requisitos de funcionalidade a serem avaliados, uma vez que o ambiente intestinal age como uma barreira física a esses micro-organismos, ocasionando perda significativa na viabilidade (KAILASAPATHY, 2002).

Na área de laticínios, a produção de iogurtes e leites fermentados funcionais possui grande aceitação pelo público em geral e apresentam excelente valor nutritivo, além de serem veículos em potencial para o consumo de probióticos (ANTUNES et al., 2007).

3.3. Iogurte Probiótico

O iogurte probiótico, conhecido também como bio-iogurte, é o produto ao qual incorporam-se micro-organismos probióticos, os quais devem permanecer viáveis em concentração mínima de 10^6 UFC/g até o final da vida de prateleira do produto (SHAH, 2000; AKALIN et al., 2007).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) o “Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos, Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde” da Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002, regulamenta que a quantidade do probiótico em unidades formadoras de colônia (UFC), contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação. Na rotulagem dos produtos deve constar uma alegação indicando que “O (indicar a espécie do micro-organismo probiótico) contribui para o equilíbrio da flora intestinal. Seu consumo deve estar associado a uma alimentação equilibrada e hábitos de vida saudáveis” (BRASIL, 2002). De acordo com o mesmo regulamento, a quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação diária do produto pronto para o consumo, conforme indicação do fabricante, sendo que valores menores podem ser aceitos, desde que a empresa comprove sua eficácia. No caso do iogurte, a resolução RDC nº 359 da ANVISA, de 23 de dezembro de 2003 estabelece que a porção recomendada para leites fermentados e iogurtes é de 200 g ou mL (BRASIL, 2003).

A viabilidade da incorporação de bactérias probióticas em iogurte depende de uma série de fatores intrínsecos e extrínsecos, entre eles as cepas utilizadas, interações entre as espécies presentes, condições da cultura, composição química do meio de fermentação, acidez final do produto, teor de sólidos no leite, disponibilidade de nutrientes, presença de promotores e inibidores de crescimento, concentração de açúcar, oxigênio dissolvido, nível e temperatura de inoculação, tempo de fermentação e temperatura de estocagem (KAILASAPATHY e RYBKA, 1997; SHAH, 2000).

Leites fermentados e iogurtes adicionados de micro-organismos probióticos comercializados no mercado brasileiro têm sido avaliados por alguns pesquisadores. Barreto et al. (2003) avaliaram a presença de *L. acidophilus* e *Bifidobacterium* sp. em produtos comerciais nos quais os micro-organismos eram declarados no rótulo. Os autores encontraram contagens abaixo de 10^5 UFC/mL em grande parte das amostras analisadas. Botelho (2005) comparou as informações dos rótulos de leites fermentados probióticos em relação à presença dos micro-organismos e observou que nem todas as espécies declaradas eram encontradas nos produtos, particularmente *L. acidophilus* e *B. bifidum*.

Algumas características do iogurte contribuem para a perda de viabilidade celular dos probióticos como o acúmulo de ácidos orgânicos resultante do crescimento e fermentação dos micro-organismos da cultura do iogurte e o decréscimo do pH durante o armazenamento do produto (pós-acidificação) (HOOD e ZOTTOLA, 1988; SHAH e JELEN, 1990; SHAH, 2000; SHAH e RAVULA, 2000).

Donkor et al. (2006), estudaram o efeito de diferentes pHs de iogurte na atividade de bactérias probióticas durante armazenamento refrigerado. *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium lactis* e *Lactobacillus paracasei* foram inoculados juntamente com a cultura tradicional de iogurte. Ao atingir temperatura de 42°C, o iogurte foi dividido em 4 porções e fermentados até alcançarem pH de 4,45; 4,50; 4,55 e 4,60, respectivamente. O iogurte controle foi produzido somente com adição de cultura tradicional constituída de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Streptococcus thermophilus*. Os iogurtes foram armazenados a 4°C por 28 dias. A viabilidade do *L. bulgaricus* aumentou

significativamente na presença de micro-organismos probióticos, obtendo contagens em torno de 8 log UFC/g ao final de 28 dias de armazenamento refrigerado. *L. acidophilus* tolerou condições ácidas melhor que os outros dois micro-organismos probióticos, tendo se observado um declínio seguido de recuperação dos micro-organismos, que apresentou contagens de 8 log UFC/g ao final do armazenamento. As contagens de *B. lactis* não apresentaram diferença significativa até o 21º dia de armazenamento, porém, após 28 dias observou-se um decréscimo de 83% nas contagens de *B. lactis*, que foi acompanhando do decréscimo de pH. Desta forma, os resultados indicaram que o menor pH pode ter sido um fator crucial para a sobrevivência desse micro-organismo. O *L. paracasei* apresentou contagens constantes nos diversos pHs avaliados durante o armazenamento refrigerado, variando de 7,38 log UFC/g até 7,80 log UFC/g.

3.4. Tolerância às condições gastrointestinais

A principal barreira dos micro-organismos probióticos após sua ingestão é o trato gastrointestinal (TGI), onde estes devem resistir ao suco gástrico, à bile e à secreção pancreática mantendo-se viáveis para colonizar o intestino e promover seu efeito benéfico (DEL PIANO et al., 2006a).

Os gêneros *Lactobacillus* e *Bifidobacterium* apresentam algumas estirpes sensíveis ao ácido e sais biliares, características que representam um desafio à indústria para a utilização dessas bactérias (CHARTERIS et al., 1998b; HANSEN et al., 2002). O pH do suco gástrico puro varia de 1,3 a 2,5, mas a capacidade tampão dos alimentos quando ingeridos pode elevar temporariamente o pH para 4,5 a 5,3 (KONG e SINGH, 2008).

O suco gástrico é o maior obstáculo para os probióticos, sendo os principais componentes da secreção gástrica, o ácido clorídrico (HCl) e a pepsina. O baixo pH do estômago e a ação antimicrobiana da pepsina representam uma barreira eficaz à entrada de bactérias no trato intestinal (KONG e SINGH, 2008). Os sais biliares e a pancreatina também são um obstáculo para os micro-organismos, sendo responsáveis por mais de 35% da perda de sua viabilidade (DEL PIANO et al., 2006 a).

Nas avaliações *in vitro* da tolerância gastrointestinal tais como pH, concentração de bile, concentração inicial de micro-organismos e composição do fluido gástrico, há uma grande variação nas faixas estudadas para diferentes estirpes de lactobacilos e bifidobactérias. O pH apresenta uma variação de 1,0 a 5,0 (PARK et al., 2006; OLIVEIRA et al., 2007), a concentração de sais biliares de 0,3% a 5,0% (PARK et al., 2006; CHAMPAGNE e GARDNER, 2008; PIMENTEL-GONZÁLEZ et al., 2009) e a concentração de pancreatina de 0,195% a 0,45% (PICOT e LACROIX, 2004; ANNAN et al., 2008), sendo que as variações observadas fornecem uma previsão da quantidade de células viáveis presentes no intestino após a ingestão, mas dificulta a comparação de estudos para diferentes estirpes.

Hansen et al. (2002) avaliaram a capacidade de sobrevivência de quatro estirpes de bifidobactérias em baixos valores de pH (1,0 a 3,0) e tolerância à bile (0,5% e 1%). Neste estudo os autores observaram que as estirpes apresentaram uma boa tolerância às diferentes concentrações de bile e que o pH afetou a viabilidade das estirpes de bifidobactérias. O pH 3,0 foi o menos prejudicial à sobrevivência das bactérias bífidas quando comparado com o pH controle (pH 6,0). O pH 1,0 foi o mais drástico, sendo que os micro-organismos que apresentavam uma contagem entre 10^6 e 10^8 UFC/mL, após 30 minutos de contato apresentaram uma contagem menor que 10 UFC/mL.

L. casei NCDC-298 apresentou redução de 4 ciclos logarítmicos após 3 horas de exposição em pH 1,5 e na presença de 2% de sais biliares (MANDAL et al., 2006). *B. animalis* subsp. *lactis* Bb-12 também teve sua viabilidade afetada quando submetido às condições que simulam a passagem pelo TGI, com redução de 3,6 ciclos logarítmicos na sua população (LISERRE et al., 2007).

A resistência aos sais biliares foi avaliada utilizando-se bile humana e sais biliares bovino na concentração de 0,3%. As estirpes de *L. plantarum* apresentaram maior sensibilidade à bile humana (42-83%) do que aos sais biliares bovino (5-48%) (DEL PIANO et al., 2006b).

Estudos indicam que elevada população viável de bactéria probiótica em produtos alimentícios no momento do consumo não garante a mesma sobrevivência

depois da chegada das células ao intestino. O baixo pH do estômago, juntamente com a presença de sais biliares no intestino delgado, são as principais razões para um declínio drástico na viabilidade das células (MORTAZAVIAN e SOHRABVANDI, 2006).

A perda da viabilidade dos micro-organismos probióticos durante a passagem pelo trato gastrointestinal tem levado a busca por novas estratégias para a manutenção da viabilidade, dentre elas, a seleção de estirpes resistentes; a adição de prebióticos que atuam estimulando seletivamente a atividade de algumas bactérias do cólon; e a utilização de tecnologias, como a microencapsulação, que tem sido sugerido como um método promissor para a proteção dos probióticos (VASILJEVIC e SHAH, 2008).

3.5. Microencapsulação

O conceito de microencapsulação tem sua origem na idealização do modelo celular, no qual o núcleo é envolvido por uma membrana semipermeável que o protege do meio externo e ao mesmo tempo controla a entrada e a saída de substâncias na célula (JIZOMOTO et al., 1993). Na prática, o material de parede envolve um recheio, com o objetivo de protegê-lo das condições adversas do meio, tais como luz, umidade, oxigênio e interações com outros compostos, estabilizando o produto, e, conseqüentemente, aumentando sua vida útil (SHAHIDI e HAN, 1993). O material coberto ou encapsulado é conhecido como ativo, material de recheio, fase interna, *fill* ou *payload* e o material de cobertura pode ser chamado de cápsula, material de parede, membrana, carregador ou casca (GIBBS et al., 1999).

O tamanho das microcápsulas pode variar de alguns micrômetros até vários milímetros, sendo normalmente entre 0,2 e 500 μm . A forma das microcápsulas é bastante variável em função do método e agente encapsulante utilizado para prepará-las (JACKSON e LEE, 1991). Esses fatores podem ser alterados para atender características de composição, mecanismo de liberação, tamanho de partícula, morfologia e custo, referentes à aplicação específica das microcápsulas (DESAI e PARK, 2005).

A liberação do material ativo microencapsulado varia de acordo com a natureza do agente encapsulante, e pode ocorrer por mecanismos de variação de temperatura e de pH, ruptura mecânica, dissolução em solventes, ação de força osmótica, ação de enzimas, por difusão e permeabilidade seletiva (BRANNON-PEPPAS, 1993; REINECCIUS, 1995; GOUIN, 2004).

De acordo com Jackson e Lee (1991), a escolha do agente encapsulante depende de uma série de fatores, entre eles a não reatividade com o material a ser encapsulado, o processo utilizado para a formação da microcápsula e o mecanismo de liberação ideal. Muitos materiais podem ser utilizados para a cobertura das microcápsulas, como as gomas (goma arábica, ágar, alginato e carragena); os carboidratos (amido, amidos modificados, dextrinas e sacarose); as celuloses (carboximetilcelulose, acetilcelulose, nitrocelulose); os lipídios (parafina, mono e diacilgliceróis, óleos e gorduras); os materiais inorgânicos (sulfato de cálcio e silicatos); e as proteínas (do glúten, caseína, gelatina e albumina).

O alginato é o polissacarídeo mais utilizado como material encapsulante nas técnicas de extrusão e emulsão, visto que esse não é tóxico, apresenta um baixo custo e forma facilmente uma matriz ao redor das células. No entanto, uma desvantagem desse polissacarídeo é a formação de poros na superfície das cápsulas, tornando-as sensíveis as condições ácidas do meio (MORTAZAVIAN et al., 2007). Para suprir esse problema, alguns pesquisadores têm recoberto as cápsulas e usado uma combinação desse polissacarídeo com outros compostos poliméricos, a fim de garantir um maior efeito protetor aos micro-organismos (KRASAEKOOPT et al., 2004; GBASSI et al., 2009; CHÁVARRI et al., 2010).

Outro polissacarídeo que tem sido utilizado é a pectina que é um polímero natural extraído do material péctico de algumas frutas, e encontrado em maior quantidade em frutas cítricas e maçãs (BRANDÃO e ANDRADE, 1999). A pectina pode ser classificada de acordo com o seu grau de metilação, podendo ser de alto (> 50%) e baixo teor de esterificação (< 50% dos grupos carboxílicos esterificados). O grau de esterificação é determinado por meio da porcentagem de unidades de ácidos

galacturônicos que são metil esterificados (DZIEZAK, 1991; PRATA, 2006). Pectina de alto teor de esterificação geleifica por meio da formação de pontes de hidrogênio e interações hidrofóbicas na presença de ácidos e açúcares. Já as de baixo teor de esterificação, geleificam na presença de cátions divalentes (cálcio), apresentando um comportamento similar ao alginato, formando estruturas conhecidas como *egg box* (RALET et al., 2001; PRATA, 2006; FANG et al., 2008).

Diversas técnicas podem ser utilizadas para microencapsulação de ingredientes alimentícios, e a escolha do método depende da aplicação que será dada à microcápsula, tamanho, mecanismo de liberação e propriedades físico-químicas, tanto do material ativo, quanto do agente encapsulante (JACKSON e LEE, 1991). Os métodos utilizados podem ser classificados da seguinte forma (SHAHIDI e HAN, 1993; DESAI e PARK, 2005):

- Métodos Físico-químicos: Coacervação simples e complexa, lipossomas, lipoesferas, evaporação de solvente, inclusão molecular;
- Métodos Químicos: Polimerização interfacial, polimerização *in situ*;
- Métodos Físicos: Secagem por atomização (*spray drying*), atomização a frio (*spray cooling*), gelificação iônica, leite fluidizado, co-cristalização.

A microencapsulação de probióticos tem sido proposta para diversos produtos lácteos fermentados por melhorar a viabilidade dos micro-organismos nos produtos e no trato gastrointestinal. Além disso, pode promover o aumento da proteção de células contra bacteriófagos no interior das cápsulas e o aumento de sobrevivência dos micro-organismos durante a liofilização, congelamento e armazenamento (RAO et al., 1989; CHAMPAGNE et al., 1992; SHEU e MARSHALL, 1993). Algumas técnicas disponíveis, tais como secagem por atomização ou envolvimento lipossômico, podem não ser adequadas para a microencapsulação de bactérias probióticas, pois requerem o emprego de altas temperaturas ou solventes orgânicos, o que pode ser prejudicial aos micro-organismos (LAMBERT et al., 2008). Por outro lado, a utilização de outras técnicas de encapsulação como gelificação iônica e coacervação complexa podem

conferir maior proteção aos micro-organismos encapsulados em função das condições utilizadas para a produção das micropartículas através dessas técnicas (KRASAEKOOPT et al., 2003).

A gelificação iônica ocorre por ligação de um hidrocolóide com íons, tipicamente gelificação de polissacarídeos negativamente carregados mediada por cátions, por exemplo, entre alginato, carragena ou pectina com íons como o cálcio (BUREY et al., 2008). Na coacervação complexa, a formação dos complexos de biopolímeros deve-se principalmente às interações eletrostáticas que dependem do grau de ionização dos polímeros e, portanto do pH (WEINBRECK et al., 2004). A coacervação depende da carga líquida do sistema, sendo conseqüentemente influenciada pela estequiometria, por parâmetros estruturais dos biopolímeros e pelas condições do meio como pH, força iônica, temperatura e natureza dos reagentes (PRATA, 2006).

Kailasapathy (2006) estudou o efeito da incorporação de culturas probióticas microencapsuladas através da técnica de emulsão, utilizando como material de parede alginato de cálcio e amido e avaliou a sobrevivência dessas culturas em iogurte firme. Foram produzidos três iogurtes, sendo um controle sem adição de micro-organismos probióticos. *L. acidophilus* DD910 e *B. lactis* DD920 foram adicionados tanto na forma livre quanto microencapsulada juntamente com a cultura tradicional de iogurte. A viabilidade dos micro-organismos probióticos foi estudada durante 7 semanas de armazenamento refrigerado (4°C) e os resultados mostraram que houve perdas significativas no número de células tanto livres quanto encapsuladas. Houve, aproximadamente, redução de 4 e 3 ciclos logarítmicos no número de células livres para *L. acidophilus* e *B. lactis*, respectivamente. Já para ambos os micro-organismos na forma encapsulada, houve redução de 2 ciclos logarítmicos nesse mesmo período. Pós-acidificação mais lenta do iogurte foi observada pelo mesmo autor. Os iogurtes produzidos com adição de microcápsulas apresentaram pH maior (pH 4,25) quando comparados aos adicionados de micro-organismos probióticos livres (pH 4,21) e o iogurte controle sem adição de probiótico (pH 3,95) ao fim de 6 semanas de armazenamento refrigerado.

Kailasapathy e Sureeta (2004) avaliaram o efeito da microencapsulação de micro-organismos probióticos adicionados em iogurte firme sendo que *L. acidophilus* e *B. infantis* foram encapsulados com alginato de cálcio ou isolado proteico de soro através da técnica de gelificação iônica. A avaliação foi realizada através da viabilidade dos micro-organismos probióticos após 4 semanas sob armazenamento refrigerado (4°C). Após este período, observou-se redução de 2,7; 1,7 e 2 ciclos logarítmicos para *L. acidophilus*, na forma livre, encapsulado com alginato de cálcio ou com isolado proteico de soro, respectivamente. No mesmo período, observou-se redução de 3,7 ciclos logarítmicos para *B. infantis* na forma livre e de 2,3 e 2,4 ciclos logarítmicos para o micro-organismo encapsulado com alginato de cálcio ou com isolado proteico de soro, respectivamente.

Sultana et al. (2000) estudaram o efeito da adição de prebióticos e crioprotetores na produção de microcápsulas contendo *Lactobacillus casei* 2603. O amido modificado (Hi-Maize, Starch Austrália Ltda) foi adicionado em diferentes concentrações (0,1, 2 e 4%) ao alginato para microencapsular o micro-organismo através da técnica de emulsão. Os resultados obtidos mostraram que a adição de 2% de amido resultou em recobrimento de maior número de micro-organismos obtendo contagens de $3,1 \times 10^{11}$ UFC/g, quando comparados a nenhuma adição de amido, com contagens de 4×10^8 UFC/g. Entretanto, a adição de 4% de amido não melhorou a eficiência de encapsulação dos micro-organismos. O amido e o alginato tendem a possuir um sinergismo durante a gelificação, fornecendo assim uma proteção adicional às células microencapsuladas em determinadas concentrações, sendo que o aumento do número de bactérias viáveis pode também ser atribuído à ação prebiótica do amido modificado. Já, a adição de diferentes concentrações de glicerol (15, 20 e 30%) às microcápsulas de alginato de sódio e 2% de amido conferiu proteção ao *L. casei* durante a liofilização. A proteção conferida pelo glicerol apresentou-se mais eficiente conforme o aumento da concentração utilizada. Na concentração de 30% de glicerol a contagem de *L. casei* 2603 manteve-se constante, na ordem de 10^{12} UFC/g, antes e depois da liofilização.

Os mesmos autores avaliaram a sobrevivência de *L. acidophilus* 2409 e *B. infantis* 1912 nas formas livre e encapsulada com alginato de sódio, amido e glicerol

através da técnica de emulsão, adicionados em iogurte tradicional e armazenados sob refrigeração por 8 semanas. Houve um declínio de aproximadamente 1 ciclo logarítmico tanto para células livres de *L. acidophilus* quanto para *B. infantis* nesse período. E, houve um decréscimo de aproximadamente 0,5 ciclo logarítmico nesse mesmo período para ambos os micro-organismos encapsulados. Os autores concluíram que o aumento nas contagens dos micro-organismos viáveis pode ser atribuído à adição de amido modificado, que age como prebiótico.

Adhikari et al. (2003) produziram iogurte batido com adição de *B. longum* B6 e *B. longum* ATCC 15708 livres e encapsulados com k-carragena por técnica de emulsão e observou 100% de sobrevivência após 30 dias de armazenamento refrigerado para os iogurtes com micro-organismos encapsulados. Já, *B. longum* B6 e *B. longum* ATCC 15708 adicionados ao iogurte na forma livre obtiveram sobrevivência de 10,7% e 8,2%, respectivamente.

Brinques e Ayub (2011) avaliaram a viabilidade de *L. plantarum* BL011 livre e encapsulado durante o armazenamento refrigerado. A técnica de emulsão foi utilizada na encapsulação do micro-organismo probiótico aplicando-se diferentes materiais de parede e de recobrimento. Avaliou-se a sobrevivência de *L. plantarum* BL011 após 38 dias de armazenamento refrigerado e observou-se que houve menor perda de viabilidade do micro-organismo quando encapsulado com pectina ou alginato recoberto com quitosana dentre os diferentes materiais testados. Dentre essas condições que apresentaram melhor viabilidade do micro-organismo, a microcápsula produzida com alginato recoberta com quitosana foi aplicada na produção de iogurte e avaliada durante 38 dias de armazenamento refrigerado do produto, indicando que a microencapsulação conferiu proteção ao micro-organismo. Outra variável estudada foi a viabilidade do micro-organismo livre e encapsulado com diferentes materiais após simulação das condições gastrointestinais. Os resultados mostraram que após exposição ao suco gástrico artificial, houve uma redução drástica dos micro-organismos em todas as condições testadas, observando-se porém que não houve diferença significativa entre os tratamentos.

A exposição em pH 2,0 por 3 horas de *L. acidophilus* CSCC 2400, livre e microencapsulado em alginato de cálcio por técnica de gelificação iônica, apresentou redução de 5 e 3 ciclos logarítmicos da sua população, respectivamente (CHANDRAMOULI et al., 2004). Fávaro-Trindade e Grosso (2000) também observaram que a microencapsulação de *L. acidophilus* La-05 e *B. lactis* Bb-12 em alginato de sódio por gelificação iônica conferiu proteção aos micro-organismos, os quais não apresentaram redução significativa na população quando submetidos em pH 2,0 por 3 horas. Entretanto, no pH 1,0, ambos os micro-organismos, livres ou encapsulados, foram dizimados após 1 hora de exposição.

Os resultados dos diversos estudos discutidos indicam que a microencapsulação pode proteger os micro-organismos probióticos de condições adversas, mantendo maior estabilidade durante o armazenamento e na passagem pelo trato gastrointestinal quando comparados aos micro-organismos não encapsulados (KRASAEKOOPT et al., 2003).

4. MATERIAL E MÉTODOS

O trabalho foi realizado em duas etapas: na primeira foi feita a produção e caracterização das microcápsulas contendo *Lactobacillus acidophilus* e na segunda foi realizada a aplicação do micro-organismo probiótico, tanto na forma livre quanto encapsulada, ao iogurte batido.

4.1. Material

- Leite integral homogeneizado e esterilizado (Shefa)
- Leite em pó desnatado instantâneo MOLICO (Nestlé)
- Cultura láctica mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* YF-L812 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil)
- Cultura probiótica *Lactobacillus acidophilus* La-5 (Christian Hansen, Valinhos, Brasil)
- Pectina de baixo grau de metoxilação amidada (grau de esterificação entre 32 e 38% e grau de amidação entre 12 e 18%) (CPKelco, Limeira, Brasil)
- Concentrado proteico de soro (CPS – 77% proteína) (Arla Foods Ingredients, Dinamarca)
- Manteiga comercial comum sem sal (Marca Aviação)

Os produtos foram adquiridos do mesmo lote de produção em quantidade suficiente para a realização de todos os experimentos, sem variação da matéria prima.

4.2. Métodos

4.2.1. Preparo da cultura láctica tradicional

A cultura láctica mista de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, liofilizada (DVS 50U) foi utilizada para a fermentação do leite e obtenção dos iogurtes. Em função do pequeno volume de leite utilizado para cada processamento (9 litros) e, conseqüentemente, da pequena quantidade de cultura necessária para a coagulação, optou-se por ativar a cultura preparando-se uma cultura

mãe para fabricação do iogurte. A cultura foi ativada, segundo proporção recomendada pelo fabricante, em leite esterilizado desnatado reconstituído a 11% de sólidos totais e incubada a 45°C até coagulação, por aproximadamente 3 horas. Em seguida, a cultura foi mantida sob refrigeração e utilizada para a produção do iogurte. Para cada repetição do experimento foi preparada uma nova cultura seguindo-se o mesmo procedimento.

4.2.2. Manutenção e preparo da cultura probiótica

A cultura probiótica utilizada para a produção do iogurte e microcápsulas foi uma cultura comercial liofilizada de *L. acidophilus* La-5. O envelope completo da cultura foi reidratado em leite esterilizado desnatado reconstituído a 11% de sólidos totais, adicionado de um crioprotetor (glicerol 10%), distribuído em microtubos tipo *ependorf* e armazenado sob congelamento (-18 °C) até sua utilização.

Para a obtenção da suspensão de células de *L. acidophilus* La-5 retirou-se aleatoriamente uma amostra congelada e a cultura foi repicada (1% v/v) três vezes consecutivas em caldo MRS (Oxoid), tendo sido incubada a 37°C por 15 horas. Após o desenvolvimento do micro-organismo, a cultura foi transferida para tubos de centrífuga de polipropileno, com tampas rosqueáveis, previamente esterilizados. Seguiu-se então a centrifugação (Centrífuga Sorvall Instruments RC5C – DUPONT) a 7000 rpm por 10 minutos, a 4°C. O sobrenadante foi descartado e o concentrado de células foi ressuspensionado em água peptonada 0,1% (p/v) para a lavagem das células, seguindo-se nova centrifugação nas mesmas condições. Após a lavagem das células, estas foram ressuspensionadas em água peptonada 0,1% (p/v). A contagem de células foi determinada por meio de plaqueamento em profundidade em placas de Petri utilizando-se ágar MRS (DE MAN et al., 1960). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em jarra anaeróbia, utilizando-se gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid). A suspensão de células foi utilizada subsequentemente na produção do iogurte com micro-organismo livre e na produção das microcápsulas.

4.2.3. Produção das microcápsulas

O micro-organismo probiótico foi microencapsulado combinando-se as técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa conforme descrito por Gigante et al. (2010). Utilizou-se pectina de baixo grau de metoxilação amidada e concentrado proteico de soro (CPS) como materiais de parede. A solução de pectina passou por um pré-filtro microbiológico (AP20 04700 - 0,8 a 8µm - Millipore) e a solução de concentrado proteico de soro foi submetida a um tratamento térmico em banho-maria de 80°C por 15 minutos sob agitação constante. Após o preparo da solução de pectina e de CPS ajustou-se o pH para 4,0. Todos os materiais de laboratório utilizados para a produção das microcápsulas foram previamente esterilizados (121°C/15 minutos) e a produção foi realizada em ambiente asséptico.

As microcápsulas foram produzidas pela mistura de uma solução de 1500 mL de pectina (2% p/v) em pH 4 e manteiga (2% p/v) que foram submetidas a agitação em ultraturrax (IKA, Works do Brasil) a 14000 rpm/3min para formar uma emulsão, conforme fluxograma geral de produção apresentado na Figura 1. Em seguida, adicionou-se o concentrado de células de *L. acidophilus* contendo aproximadamente 10¹⁰ UFC/mL, agitando novamente em ultraturrax (6000rpm/1min) para incorporação desse concentrado de células à emulsão.

A emulsão obtida foi aspergida em uma solução de cloreto de cálcio (2% p/v) em pH 4,0 sob agitação magnética (410 rpm) através de um bico atomizador duplo fluido (diâmetro de 1 mm), com auxílio de uma bomba peristáltica com pressão de ar de 0,15 kgf/cm². As microcápsulas foram mantidas sob agitação constante por 30 minutos na solução de CaCl₂ para completa gelificação. Após esse período, as microcápsulas foram removidas, lavadas com água deionizada pH 4,0 em peneira (diâmetro da abertura de 125µm) e colocadas em solução de CPS (4% p/v) em pH 4,0. As microcápsulas foram mantidas nessa solução por 30 minutos para ocorrer a coacervação. Em seguida, foram transferidas para uma peneira e lavadas novamente com água deionizada pH 4,0.

As microcápsulas obtidas foram submetidas a dois tratamentos: mantidas sob refrigeração (temperatura < 10°C) ou secas por liofilização. Para a obtenção de microcápsulas secas, essas foram congeladas em freezer a -80°C e, em seguida, foram submetidas ao processo de liofilização (liofilizador Edwards Pirani 501) por aproximadamente 48 horas, nas seguintes condições operacionais: temperatura do condensador -60 °C, pressão 10⁻¹ mbar e temperatura final de 25°C.

Após a secagem, as microcápsulas liofilizadas foram armazenadas a -18°C até o momento de utilização. Após a produção das microcápsulas, realizou-se a caracterização física, química e microbiológica das partículas.

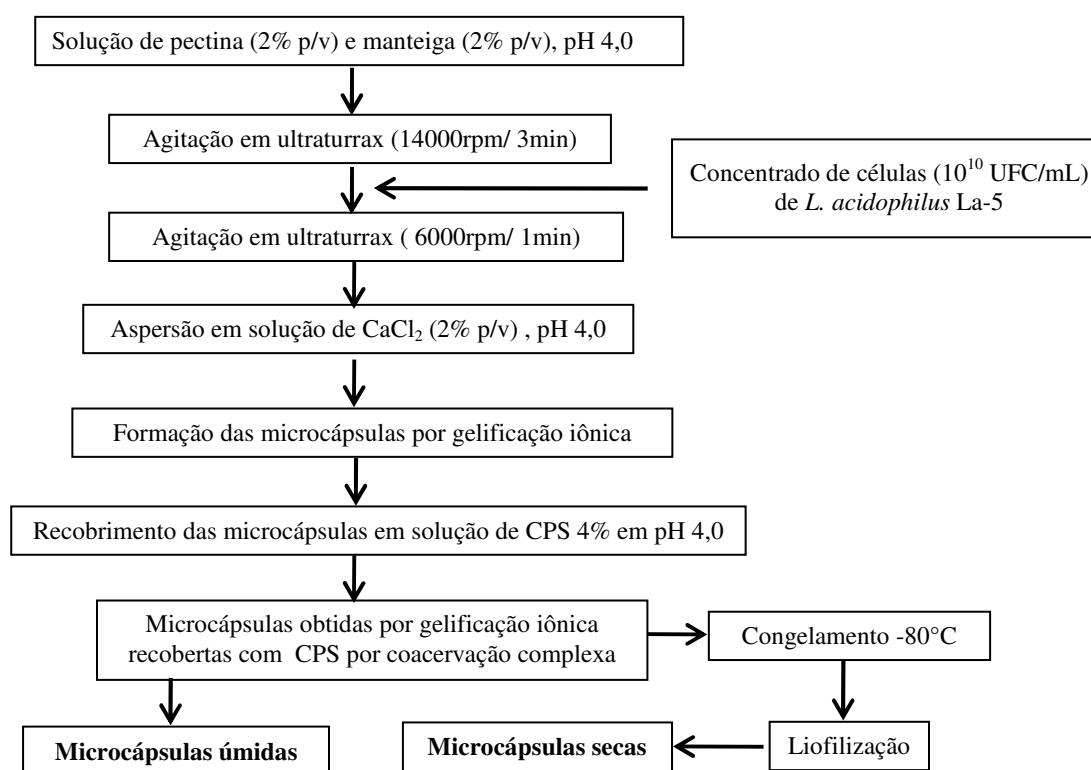


Figura 1. Fluxograma geral da produção de microcápsulas.

4.2.3.1. Caracterização das microcápsulas

As microcápsulas foram caracterizadas quanto à umidade, conteúdo de proteína, diâmetro médio, distribuição de tamanho, morfologia e microestrutura. A umidade foi determinada por secagem em estufa a 105°C *overnight* (AOAC, 1995). A proteína foi determinada pelo método de Kjeldahl, utilizando como fator de correção 6,38 (AOAC, 1995). A avaliação do diâmetro médio e distribuição de tamanho foram realizadas utilizando o analisador de tamanho de partículas Mastersizer 2000 (Malvern *Instruments* Ltda). A morfologia foi observada em microscópio óptico (Jenaval) utilizando objetiva de 25x e optovar de 1,25x com captação de imagens por câmera digital. Para a avaliação da microestrutura, a amostra liofilizada foi colocada em almofariz e adicionada de nitrogênio líquido, sendo posteriormente quebrada com pistilo. Em seguida, a amostra foi pulverizada sobre a fita adesiva condutora (cobre) já previamente fixada em *stubs* de alumínio (1 cm x 1 cm), recoberta com ouro por meio de um evaporador Baltzer (BaltecSCD50, Áustria) e avaliada em microscópio eletrônico de varredura (Scanning microscope JSM-5800LV - Jeol) com aceleração de voltagem de 20 kV (SOUZA, 1998).

4.2.3.2. Avaliação da viabilidade de *Lactobacillus acidophilus* microencapsulado

A viabilidade dos micro-organismos microencapsulados foi determinada por meio da contagem de células viáveis. Inicialmente as microcápsulas foram rompidas com citrato de sódio (2% p/v) em pH 7,0 sob vigorosa agitação para promover o rompimento das mesmas e liberação dos micro-organismos. Em seguida, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada (0,1% p/v), e plaqueamento em profundidade em placas de Petri utilizando ágar MRS. As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em jarra anaeróbia, utilizando-se gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid), com posterior contagem da população de micro-organismos probióticos.

4.2.4. Aplicação de *Lactobacillus acidophilus* livre e microencapsulado na produção de iogurte batido

A produção do iogurte batido contendo o micro-organismo probiótico livre e microencapsulado foi realizada conforme o procedimento tradicional de fabricação

(Figura 2). Foram realizadas três repetições dos processamentos. O micro-organismo probiótico foi adicionado ao leite juntamente com a cultura láctica tradicional para fabricação de iogurte antes da fermentação. As microcápsulas mantidas sob refrigeração (temperatura < 10°C) foram utilizadas no dia seguinte à sua produção para fabricação de iogurte com microcápsulas úmidas. As microcápsulas secas foram reidratadas em água peptonada 0,1% (p/v) em pH 4,0 por 12 horas. Posteriormente, essas foram filtradas para a remoção do excesso de água e utilizadas na fabricação do iogurte, considerando o produto fabricado com microcápsulas liofilizadas.

Para cada processamento de fabricação do iogurte, leite homogeneizado esterilizado (9 litros) foi padronizado (13% sólidos totais) por meio da adição de leite em pó desnatado. A mistura foi submetida ao tratamento térmico (85°C/ 5 minutos), resfriada a 42°C e dividida em três porções, as quais foram adicionadas de 2,5% (v/v) da cultura láctica tradicional para fabricação de iogurte, constituída de *Streptococcus thermophilus* e *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e submetidas aos seguintes tratamentos: **1**) adição de 1% (v/v) de *L. acidophilus* livre; **2**) adição de 10% (p/v) de microcápsulas úmidas contendo *L. acidophilus* e **3**) adição de 13% (p/v) de microcápsulas liofilizadas reidratadas contendo *L. acidophilus*.

As amostras submetidas a esses tratamentos foram colocadas em recipientes de aço inoxidável (3 litros) e levadas ao banho-maria (42 ± 1°C) para fermentação. Uma pequena porção foi distribuída em tubos de rosca (50 mL), os quais foram incubados em banho-maria a 42 ± 1°C. Para avaliação do tempo de fermentação, amostras foram retiradas a cada 20 minutos, resfriadas em banho de gelo e utilizadas para avaliação do pH e acidez titulável. O tempo de fermentação dos iogurtes foi considerado o necessário para que o produto atingisse pH 4,8 ± 0,05. Ao final da fermentação, os iogurtes foram retirados do banho-maria, resfriados em banho de gelo até a temperatura 10°C e armazenados em câmara fria por 24 horas. Após esse período, os iogurtes foram batidos lentamente, com o auxílio de um agitador de inox perfurado, e acondicionados em copos de 200 mL que foram selados com tampa de alumínio termo-soldável e armazenados em câmara fria (5°C). O batimento foi feito manualmente e foi padronizado para todos os processamentos e amostras.

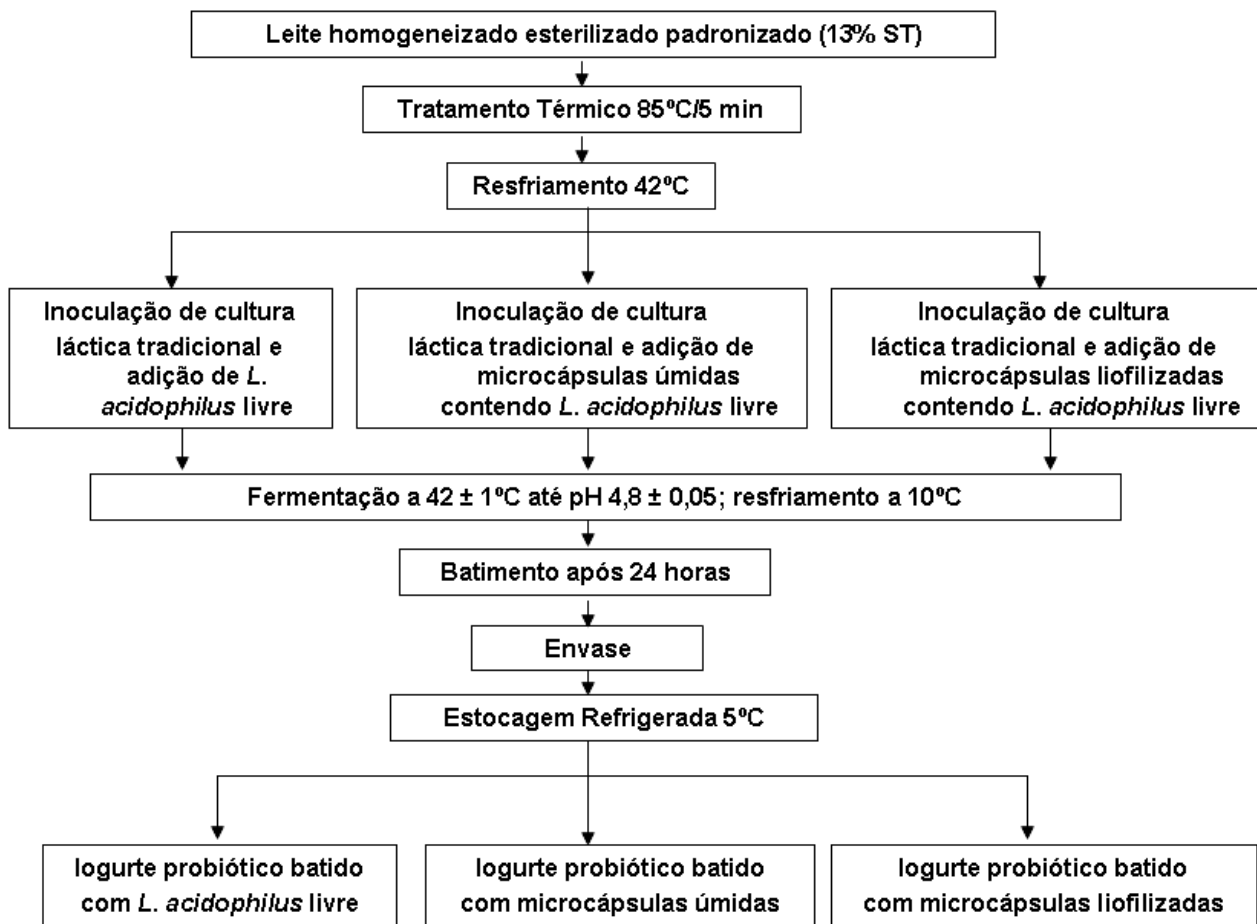


Figura 2. Fluxograma de fabricação de iogurte (Adaptado de Tamime e Robinson, 1999).

4.3. Amostragem e indicação das análises realizadas

Uma amostra representativa do lote de leite homogeneizado esterilizado e os iogurtes obtidos de cada processamento foram analisados quanto ao pH, acidez, extrato seco total, proteína total, gordura e cinzas. O teor de lactose foi calculado por diferença. O leite em pó desnatado utilizado para a padronização dos sólidos totais do iogurte foi avaliado quanto ao extrato seco total. As determinações físico-químicas dos iogurtes foram realizadas após o batimento e envase. Todas as análises foram realizadas em triplicata.

A avaliação da pós-acidificação e viabilidade dos micro-organismos foi realizada após 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado. A pós-acidificação foi avaliada através do comportamento do pH e acidez titulável das amostras. A contagem de micro-organismos viáveis presentes nos iogurtes probióticos foi realizada por meio

de contagem seletiva de *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* e *Lactobacillus acidophilus*.

A avaliação da viabilidade do *L. acidophilus* no iogurte durante a simulação das condições gastrointestinais foi realizada após 35 dias de armazenamento refrigerado. Todas as análises microbiológicas foram realizadas em duplicata.

O cálculo da porcentagem de sobrevivência dos micro-organismos foi realizado à partir da população de células viáveis expressas em UFC/g (ADHIKARI et al., 2003; MORTAZAVIAN et al., 2008).

4.4. Determinações analíticas

4.4.1. Análises físico-químicas

- **pH:** determinado por potenciômetro previamente calibrado, introduzindo o eletrodo diretamente nas amostras homogeneizadas.
- **Acidez titulável:** determinada por titulação da amostra com hidróxido de sódio N/9 em presença do indicador fenolftaleína (AOAC, 1995).
- **Extrato seco total (EST):** determinado por secagem em estufa a 105°C (AOAC, 1995).
- **Proteína total:** o nitrogênio total foi determinado pelo método micro-Kjeldahl, sendo que a determinação da proteína total foi calculada multiplicando-se a porcentagem de nitrogênio total pelo fator de correção igual a 6,38 (AOAC, 1995).
- **Gordura:** determinada gravimetricamente após extração em frascos de Mojonnier (AOAC, 1995).
- **Cinzas:** determinado por incineração em forno mufla a 550°C (AOAC, 1995).

4.4.2. Análises microbiológicas

Todo material utilizado foi previamente esterilizado, sendo que as análises microbiológicas foram realizadas em câmara de fluxo laminar.

Pesou-se 1 g de microcápsulas úmidas e adicionou-se 9 mL de citrato de sódio (2% p/v) em pH 7,0 sob vigorosa agitação para liberação do micro-organismo, sendo esta considerada a primeira diluição. Para a contagem de *L. acidophilus* presente nas microcápsulas liofilizadas, pesou-se 0,1 g, adicionou-se 10 mL de água peptonada 0,1% (p/v) em pH 4,0, hidratando-as por aproximadamente 15 minutos. Em seguida, adicionou-se 90 mL de citrato de sódio (2% p/v) em pH 7,0. A mistura foi homogeneizada por 15 minutos em velocidade normal em *Stomacher* 400 (Seward) e imediatamente utilizada para a avaliação da viabilidade dos micro-organismos.

Para o preparo das amostras de iogurte, pesou-se 25 g em saco para *Stomacher* (Seward) e adicionou-se 225 mL de citrato de sódio (2% p/v) pH 7,0. A mistura foi homogeneizada por 15 minutos em velocidade normal em *Stomacher* 400 (Seward) e imediatamente utilizada para a avaliação da viabilidade dos micro-organismos. Posteriormente, foram realizadas diluições sucessivas em água peptonada 0,1% (p/v) e plaqueamento em profundidade em placas de Petri. Utilizou-se solução de citrato de sódio como primeira diluição para promover o rompimento das microcápsulas e liberação dos micro-organismos.

A contagem de *L. acidophilus* livre e microencapsulado foi determinada em ágar MRS (Oxoid) adicionado de 0,15% de bile (Sigma). As placas foram incubadas a 37°C por 72 horas em anaerobiose, com posterior contagem da população de micro-organismos probióticos (VINDEROLA e REINHEIMER, 1999).

A contagem dos micro-organismos da cultura tradicional de iogurte foi realizada utilizando-se ágar ST para *Streptococcus thermophilus*, e as placas foram incubadas a 30°C por 72 horas em aerobiose (ZACARCHENCO e MASSA GUER-ROIG, 2004). Os ingredientes utilizados para o preparo de 1 L de meio ágar ST foram: 10 g de triptona, 10 g de sacarose, 5 g de extrato de levedura e 2 g de K₂HPO₄ dissolvidos em 1 L de água destilada. O pH foi ajustado para 6,8 ± 0,1 e adicionado 6 mL de bromocresol púrpura e 12 g de ágar. Para a contagem de *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus*, utilizou-se o ágar RCA (Difco) ajustando para pH 5,3 e as placas foram incubadas a 45°C por 72 horas em anaerobiose (DAVE e SHAH, 1996).

As placas incubadas em anaerobiose foram acondicionadas em jarras anaeróbias, utilizando gerador de anaerobiose Anaerogen (Oxoid).

4.5. Avaliação da viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* no iogurte durante a simulação das condições gastrointestinais

4.5.1. Preparo do suco gástrico e solução de bile

O suco gástrico artificial (SGA) foi preparado a partir de cloreto de potássio 1,12 g.L⁻¹; cloreto de sódio 2,0 g.L⁻¹; cloreto de cálcio 0,11 g.L⁻¹; hidrogenofosfato de potássio 0,4 g.L⁻¹ e mucina 3,5 g.L⁻¹, sendo o pH dessa solução ajustado para 3,0 com HCl. Foi utilizada uma solução de bile (Bile bovina B3883 – Sigma-Aldrich) na concentração de 1% e ajustado o pH para 7,0. As soluções de suco gástrico artificial e bile foram esterilizadas a 121°C por 15 minutos, sendo que a pepsina foi adicionada na solução de SGA apresentando uma concentração final de 1 mg.mL⁻¹ (MOZZI et al., 2009; SULTANA et al., 2000).

4.5.2. Simulação das condições gastrointestinais

A metodologia modificada de Wang et al. (2009) foi utilizada na avaliação da viabilidade do micro-organismo livre e microencapsulado nos iogurtes durante a simulação das condições gastrointestinais. A contagem de células viáveis foi realizada em ágar MRS-bile (VINDEROLA e REINHEIMER, 1999).

Um grama de iogurte foi adicionado em 10 mL de suco gástrico artificial (pH 3,0) e incubado a 37°C sob agitação. A viabilidade foi avaliada nos intervalos de tempo de 0, 60 e 120 minutos. O pH das amostras foi ajustado para 7,0 após 120 minutos de contato com o suco gástrico artificial. Uma solução de pancreatina (1,95 g.L⁻¹) foi adicionada e a viabilidade avaliada após 300 minutos para simulação do suco intestinal artificial (PICOT e LACROIX, 2004).

A tolerância à bile foi avaliada na concentração de 1,0%. Um grama de iogurte foi adicionado em 10 mL da solução de bile. A amostra foi incubada a 37°C sob agitação e

a viabilidade avaliada nos tempos de 0, 60 e 300 minutos.

Antes de cada plaqueamento, as amostras de iogurte contendo microcápsulas foram diluídas em citrato de sódio (2% p/v) pH 7,0 sob vigorosa agitação para rompimento das cápsulas e liberação dos micro-organismos.

4.6. Delineamento experimental e análise estatística dos dados

O delineamento experimental utilizado foi o de parcelas subdivididas (*Split-plot*) com três repetições, em um planejamento do tipo fatorial 3 x 6, em blocos completamente aleatorizados. O fator principal foram os tratamentos, com 3 níveis de variação : (1) iogurte com *L. acidophilus* livre; (2) iogurte com microcápsulas úmidas contendo *L. acidophilus* e (3) iogurte com microcápsulas liofilizadas e reidratadas contendo *L. acidophilus*. O fator secundário foi o tempo de armazenamento, com 6 níveis de variação (1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias após a fabricação). Os processamentos foram considerados como blocos (processo 1, 2 e 3).

O efeito dos tratamentos sobre a composição físico-química foi analisado por análise de variância (ANOVA) de acordo com este delineamento. O efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação destes fatores foi analisado por análise de variância de dois fatores (ANOVA) e o Teste de Tukey, ao nível de 5% de significância foi utilizado para comparação de médias.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Avaliação das características das microcápsulas

Antes da secagem, as microcápsulas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa, utilizando-se pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede, contendo *Lactobacillus acidophilus*, apresentaram, em média, $96,9 \pm 0,7\%$ de umidade e $20,0 \pm 4,1\%$ de proteína em base seca.

As microcápsulas úmidas apresentaram uma distribuição de tamanho na faixa de 96,7 a 610,0 μm e diâmetro médio de $253,3 \pm 23,8 \mu\text{m}$ e as microcápsulas reidratadas (microcápsulas liofilizadas que foram mantidas em água peptonada 0,1% (p/v) pH 4,0 por 12 horas antes de serem submetidas à produção dos iogurtes) apresentaram distribuição de tamanho na faixa de 157,6 a 772,6 μm e diâmetro médio de $367,4 \pm 10,9 \mu\text{m}$, para as condições estudadas. O Anexo I apresenta os gráficos de distribuição de tamanho das microcápsulas úmidas e liofilizadas reidratadas.

Através da microscopia óptica (Figura 3) foi possível observar a morfologia externa e estrutura interna das microcápsulas estudadas, o tamanho e a distribuição de recheio (micro-organismos) na matriz. Em geral, as microcápsulas apresentaram forma esférica em sua maioria com gotículas de gordura heterogêneas e distribuição do recheio por toda a matriz.

Após a secagem e com auxílio de microscopia eletrônica de varredura (Figura 4) observou-se claramente as gotículas de gordura e a presença dos micro-organismos nas microcápsulas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa, utilizando-se pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede, contendo *Lactobacillus acidophilus*.

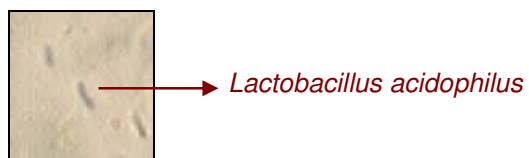
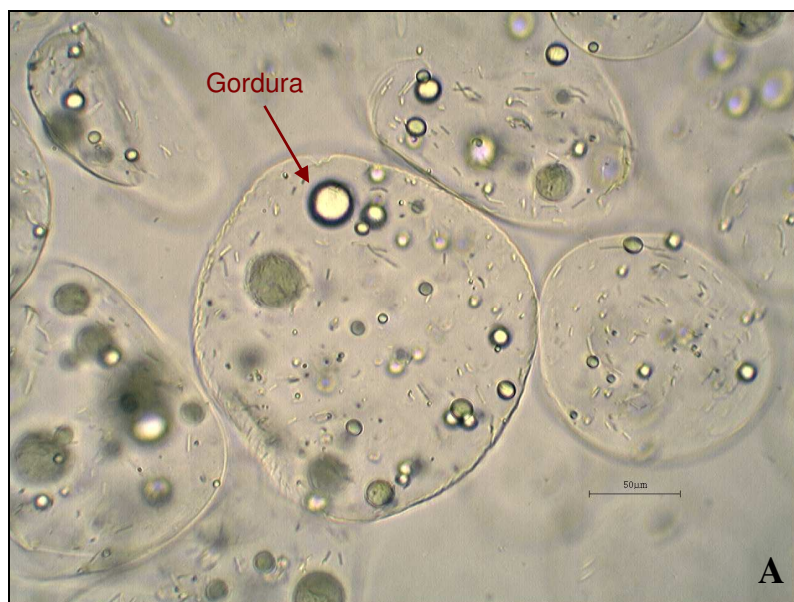


Figura 3. Imagens obtidas por microscopia óptica das microcápsulas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa contendo *L. acidophilus*. A e B: aumento de 25x. Barras de 50 μm.

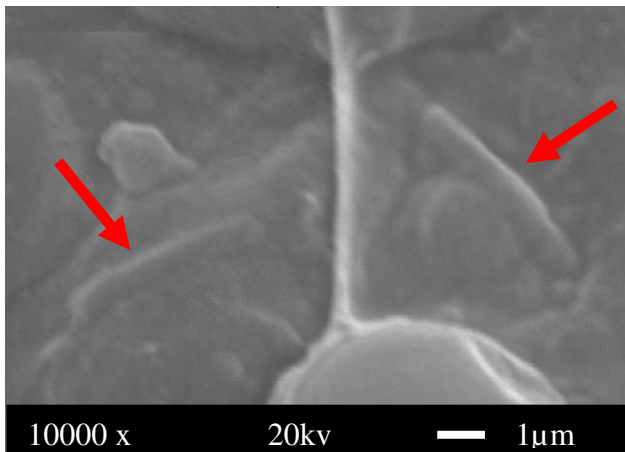
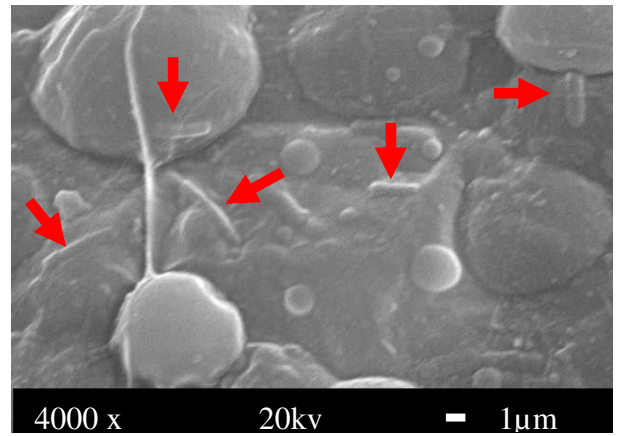
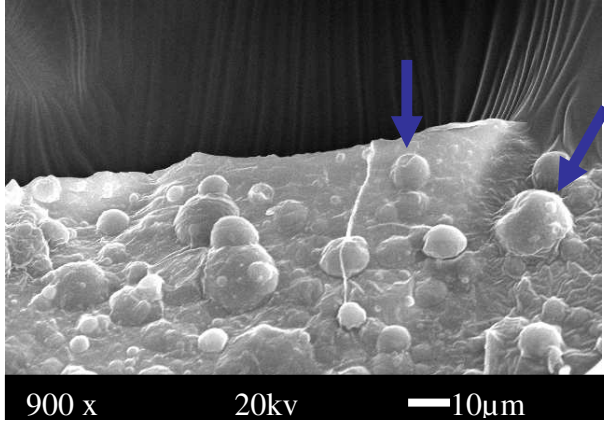


Figura 4. Imagens obtidas por microscopia eletrônica de varredura das microcápsulas liofilizadas obtidas por gelificação iônica e coacervação complexa contendo *L. acidophilus*. As setas azuis indicam a presença de gordura e as setas vermelhas indicam a presença de micro-organismos nas microcápsulas.

5.1.1. Viabilidade do *Lactobacillus acidophilus* durante a produção das microcápsulas

Durante a produção das microcápsulas úmidas não se observou perda da viabilidade do *L. acidophilus*. O concentrado de células de *L. acidophilus* obtido após a centrifugação e ressuspendido em água peptonada 0,1% (p/v) apresentou $1,25 \times 10^{10}$ UFC/mL. Uma porção de 30 mL desse concentrado, portanto, com $3,75 \times 10^{11}$ UFC, foi adicionado a 1500 mL de emulsão de pectina com manteiga para a produção das microcápsulas. Desta forma, considerando-se a diluição da porção adicionada, a emulsão aspergida em CaCl_2 apresentava, inicialmente, $2,5 \times 10^8$ UFC/mL e a população de *L. acidophilus* nas microcápsulas úmidas foi, em média, $2,29 \times 10^8$ UFC/g. Do ponto de vista de rendimento, 1000 mL de emulsão de pectina com manteiga rende, em média, 823 ± 118 g de microcápsulas úmidas.

No entanto, durante o congelamento observou-se perda de viabilidade de *L. acidophilus* nas microcápsulas de 1,97 ciclos logarítmicos. Após o congelamento (-80°C) e antes da liofilização, observou-se uma redução na viabilidade das células de $2,29 \times 10^8$ UFC/g para $2,43 \times 10^6$ UFC/g e ao final da secagem as partículas apresentaram, em média, $6,98 \times 10^6$ UFC/g. Após a reidratação em água peptonada 0,1% (p/v) pH 4,0 por 12 horas, e antes de serem utilizadas na produção dos iogurtes, as cápsulas apresentaram, em média, $3,95 \times 10^6$ UFC/g. Desta forma, observou-se que o conjunto dos procedimentos entre a produção das microcápsulas e sua aplicação no iogurte, que envolveu o congelamento, secagem por liofilização, e reidratação, implicou na redução da viabilidade do *L. acidophilus* de 1,76 ciclos logarítmicos.

Esses resultados indicaram que microencapsulação de *L. acidophilus* mostrou-se eficiente utilizando-se a combinação das técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa e usando pectina e concentrado proteico de soro como materiais de parede, uma vez que a redução do número de células viáveis ocorreu apenas pelo fator diluição. No entanto, o processo de secagem precisa ser otimizado. A perda de viabilidade do micro-organismo ocorreu durante o congelamento e as cápsulas foram mantidas congeladas por 15 dias antes da liofilização. Desta forma, tanto um menor

tempo de congelamento como o uso de um crioprotetor, como o glicerol, poderiam contribuir para a manutenção de viabilidade do micro-organismo probiótico. Apesar da liofilização não parecer ter afetado a viabilidade celular, esse é uma método caro de secagem e outros métodos podem ser avaliados, como por exemplo, a secagem em estufa a vácuo ou em leite fluidizado.

5.2. Caracterização dos iogurtes probióticos batidos

5.2.1. Caracterização do processo de fermentação

A Tabela 1 apresenta as características do processo de fermentação dos iogurtes obtidos.

Tabela 1. Características do processo de fermentação dos iogurtes probióticos.

Características	Tratamentos*		
	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)
pH inicial	6,36 ± 0	6,31 ± 0,03	6,29 ± 0,01
pH final	4,81 ± 0,02	4,81 ± 0,01	4,82 ± 0
Acidez inicial (% ácido láctico)	0,23 ± 0	0,204 ± 0,007	0,202 ± 0,002
Acidez final (% ácido láctico)	0,658 ± 0,007	0,646 ± 0,001	0,63 ± 0
Tempo de fermentação (minutos)**	180 ± 0	180 ± 0	200 ± 0

* **1:** iogurte com *L. acidophilus* livre; **2:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; **3:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas

** tempo médio necessário para os produtos atingirem pH 4,8 ± 0,05

As Figuras 5 e 6 apresentam as curvas médias de desenvolvimento de pH e acidez durante o processo de fabricação dos iogurtes.

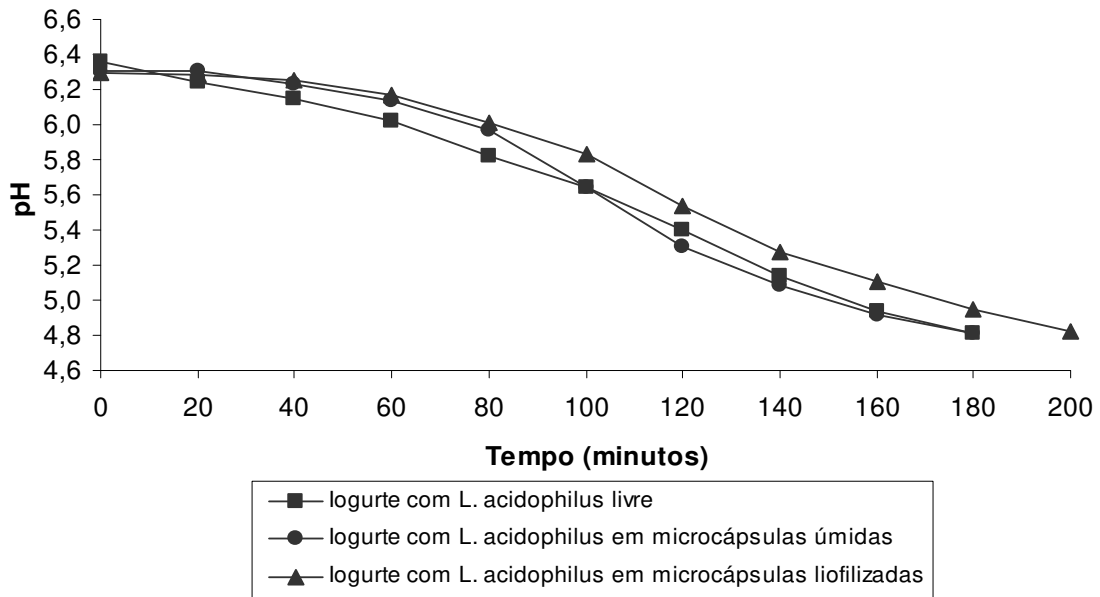


Figura 5. Curva de desenvolvimento de pH durante o processo de fabricação do iogurte.

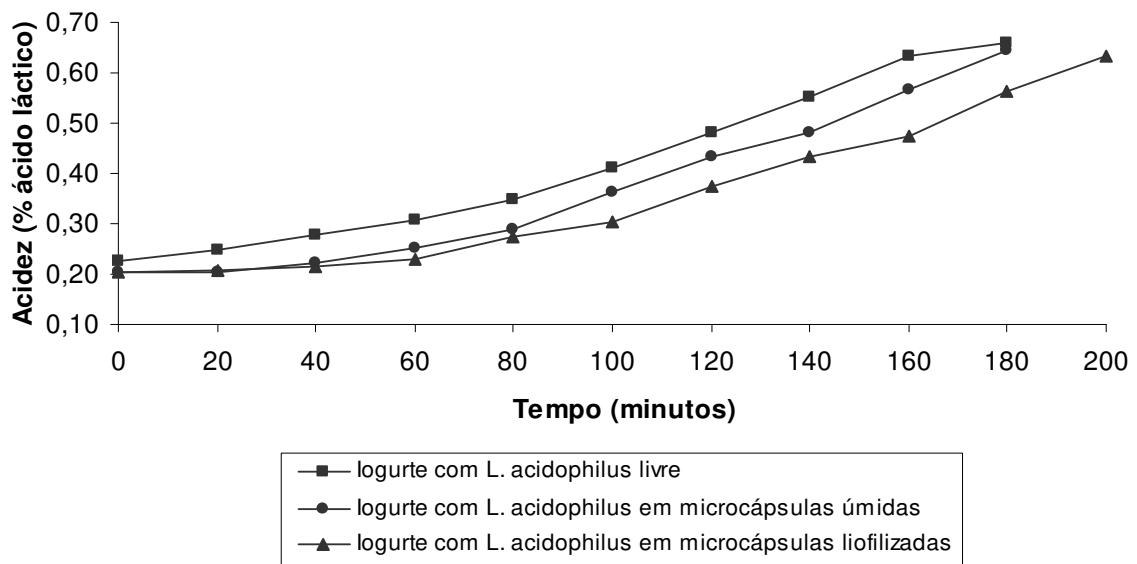


Figura 6. Curva de desenvolvimento de acidez (% ácido láctico) durante o processo de fabricação do iogurte.

Observa-se na Tabela 1 e nas Figuras 5 e 6 que o tempo necessário para que os iogurtes atingissem $\text{pH } 4,8 \pm 0,05$ foi o mesmo (180 minutos) para os iogurtes com *L. acidophilus* livre e *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas. Entretanto, o iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas apresentou um tempo de fermentação superior (200 minutos) quando comparado aos outros tratamentos. As Figuras 5 e 6 mostram o mesmo comportamento de decréscimo do pH e aumento da acidez com o tempo para todos os tratamentos.

5.2.2. Efeito dos tratamentos sobre a composição dos iogurtes probióticos

O leite integral homogeneizado esterilizado utilizado em todos os processamentos apresentava 11,82% de sólidos totais, 3,23% de gordura, 3,00% de proteína, 4,85% de lactose, 0,74% de cinzas, 0,15% ácido láctico e pH 6,79. O leite em pó desnatado utilizado para aumentar o teor de sólidos apresentava 95,67% de sólidos totais.

A Tabela 2 apresenta as características físico-químicas e microbiológicas dos iogurtes obtidos pelos três tratamentos: (1) iogurte adicionado de *L. acidophilus* livre, (2) iogurte com adição de microcápsulas úmidas contendo *L. acidophilus* e (3) iogurte com adição de microcápsulas liofilizadas contendo *L. acidophilus*.

Tabela 2. Composição físico-química, característica microbiológica, desvio padrão e valor de *p* dos iogurtes probióticos (dia 1).

Determinações Analíticas	Tratamentos*			Valor de <i>p</i>
	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)	
Análises físico-químicas				
pH	4,34 ± 0,02 ^b	4,50 ± 0,02 ^a	4,51 ± 0,04 ^a	0,0068
Acidez (% ácido láctico)	0,803 ± 0,002 ^a	0,749 ± 0,006 ^b	0,74 ± 0,01 ^b	0,0025
Proteína (%)	3,38 ± 0,01 ^b	4,04 ± 0,01 ^a	4,03 ± 0,01 ^a	< 0,0001
Gordura (%)	3,21 ± 0,02	3,22 ± 0,01	3,21 ± 0,03	0,1454
Sólidos totais (%)	12,707 ± 0,006 ^a	12,10 ± 0,01 ^b	12,04 ± 0,01 ^b	< 0,0001
Cinzas (%)	0,869 ± 0,004 ^a	0,847 ± 0,002 ^b	0,849 ± 0,006 ^b	0,0020
Lactose (%)**	5,26 ± 0,03 ^a	3,99 ± 0,02 ^b	3,96 ± 0,04 ^b	< 0,0001
Análises microbiológicas				
<i>S. thermophilus</i> (UFC/g)	1,41 x 10 ⁹ ^{ab}	1,67 x 10 ⁹ ^a	1,32 x 10 ⁹ ^b	0,034
<i>L. bulgaricus</i> (UFC/g)	4,46 x 10 ⁷ ^a	1,33 x 10 ⁷ ^b	5,23 x 10 ⁶ ^c	< 0,0001
<i>L. acidophilus</i> (UFC/g)	1,51 x 10 ⁸ ^a	1,80 x 10 ⁷ ^b	4,68 x 10 ⁵ ^c	< 0,0001
<i>L. acidophilus</i> (UFC/ 200 g)	3,02 x 10 ¹⁰	3,60 x 10 ⁹	9,36 x 10 ⁷	

* **1**: iogurte com *L. acidophilus* livre; **2**: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; **3**: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

** Calculada por diferença.

^{a, b} Médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Os iogurtes obtidos pelos diferentes tratamentos foram avaliados com base no Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados da Instrução Normativa nº 46 de 23 de outubro de 2007 (BRASIL, 2007) e no Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos, Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde da Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002 da Agência Nacional de Vigilância Sanitária (BRASIL, 2002), a qual regulamenta que a quantidade

do probiótico em UFC, contida na recomendação diária do produto pronto para consumo, deve ser declarada no rótulo, próximo à alegação.

Observa-se na Tabela 2 que os iogurtes obtidos por todos os tratamentos atenderam aos parâmetros exigidos pelo Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados, tanto do ponto de vista físico-químico como microbiológico. Os produtos apresentaram teor de matéria gorda láctea entre 3,0 e 5,9%, o que os classificariam como integrais, teor de proteínas lácteas acima do mínimo de 2,9%, acidez variando entre 0,6 e 1,5% ácido láctico e contagens de bactérias lácticas totais acima do mínimo de 10^7 UFC/g exigidos pelo respectivo regulamento.

No que diz respeito à característica probiótica dos produtos, observa-se (Tabela 2) que os iogurtes nos quais se introduziu o *L. acidophilus* nas formas livre e em microcápsulas úmidas, com contagens de $3,02 \times 10^{10}$ e $3,60 \times 10^9$ UFC/200 g, respectivamente, atenderam ao padrão estabelecido pela legislação, a qual recomenda a quantidade mínima de 10^8 a 10^9 UFC na recomendação de ingestão diária do produto pronto para o consumo, que é de 200 g ou mL para iogurtes (Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003) (BRASIL, 2003). Entretanto, essa contagem foi inferior ao recomendado quando o iogurte foi obtido com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas, o qual apresentou $9,36 \times 10^7$ UFC na porção de 200 g. É importante ressaltar que a quantidade ótima de bactérias probióticas necessária para promover benefícios nutricionais aos consumidores não é rigorosamente estabelecida e varia em função de vários fatores (GILLILAND et al., 2002). Autores sugerem que os micro-organismos probióticos devem permanecer viáveis em concentração mínima de 10^6 UFC/g até o final da vida de prateleira do produto (SHAH, 2000; AKALIN et al., 2007).

Além do atendimento aos padrões da legislação, observa-se que os tratamentos afetaram significativamente o pH, acidez, e os teores de proteína, sólidos totais, cinzas e lactose dos iogurtes (Tabela 2). Com relação à acidificação do produto, o iogurte produzido com *L. acidophilus* livre apresentou menor pH e maior acidez que os produzidos com o micro-organismo microencapsulado, tanto na forma úmida como liofilizada, os quais não apresentaram diferença entre si.

No caso dos experimentos realizados, pode-se constatar que a diferença na acidificação dos produtos frente aos tratamentos ocorreu nas primeiras 24 horas de armazenamento refrigerado, e não durante o processo de fabricação dos iogurtes probióticos. Imediatamente após a fermentação (Tabela 1), os iogurtes com *L. acidophilus* livre, em microcápsulas úmidas e liofilizadas apresentaram pH 4,81; 4,81 e 4,82, respectivamente. No entanto, após o primeiro dia de armazenamento refrigerado dos produtos (Tabela 2) verificou-se um maior decréscimo do pH do iogurte com *L. acidophilus* livre do que com o micro-organismo microencapsulado nas formas úmida ou liofilizada, os quais apresentaram pH 4,34; 4,50 e 4,51, respectivamente, sendo que os iogurtes com adição de microcápsulas não diferiram significativamente entre si. O mesmo comportamento pode ser observado para os valores de acidez.

A menor acidificação do produto contendo o micro-organismo probiótico microencapsulado pode ser uma vantagem, tanto para a característica sensorial do iogurte como para a própria sobrevivência do probiótico durante o armazenamento refrigerado do produto. Kailasapathy (2006) também observou uma menor acidificação quando comparou a adição de *L. acidophilus* DD910 e *B. lactis* livre e encapsulado na fabricação de iogurte firme.

Quanto à composição, o iogurte produzido com o micro-organismo livre apresentou maiores teores de sólidos totais, cinzas e lactose e menor teor de proteína do que os iogurtes produzidos com o *L. acidophilus* encapsulado nas formas úmida ou liofilizada, os quais não diferiram significativamente entre si para todos esses parâmetros. Além disso, o teor de gordura não foi significativamente afetado pelos tratamentos.

O maior teor de proteína encontrado nos iogurtes probióticos produzidos com microcápsulas úmidas e liofilizadas (4,04 e 4,03%, respectivamente) quando comparado ao iogurte produzido com o micro-organismo livre (3,38%) pode ser atribuído à composição das microcápsulas, as quais foram recobertas com proteína de soro através da coacervação complexa e apresentaram, em média, 20% de proteína em base seca. Embora esse não seja o foco do trabalho, o maior conteúdo proteico pode

afetar positivamente as características nutricionais do produto. Por outro lado, considerando-se que também se adicionou gordura láctea na produção de microcápsulas (2% de manteiga) é de se estranhar que não exista diferença no teor de gordura do iogurte, que foi de aproximadamente 3,2% para todos os tratamentos (Tabela 2). Uma hipótese é que a metodologia utilizada para determinação do teor de gordura do iogurte, o método de Mojonier, não possibilitou a extração da gordura do interior da partícula. O método prevê uma hidrólise alcalina da proteína através da adição de amônia com posterior extração da gordura através de lavagens sucessivas da amostra com álcool etílico, éter etílico e éter de petróleo (AOAC, 1995). Utilizando microscopia confocal, Gigante et al. (2010) mostraram que a gordura encontra-se no interior das micropartículas produzidas por gelificação iônica e coacervação complexa utilizando-se pectina e proteínas de soro como materiais de parede. Desta forma, é possível que a ligação eletrostática estabelecida entre as cargas negativas da pectina e as cargas positivas da proteína do soro para a formação da capa protetora da partícula não seja rompida por esse método de extração e, desta forma, não libere o conteúdo de gordura do seu interior não afetando, conseqüentemente, o teor de gordura do produto.

Apesar do leite utilizado para a fabricação dos iogurtes ter sido padronizado para 13% de sólidos totais, esse teor de sólidos não foi o obtido para os produtos prontos em todos os tratamentos (Tabela 2). No caso do iogurte com *L. acidophilus* livre, que apresentou 12,71% de sólidos totais, a diferença pode ser atribuída ao conteúdo de umidade do leite em pó desnatado, o qual não foi levado em consideração no momento dos cálculos. Já para os iogurtes com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas ou liofilizadas (reidratadas antes de serem adicionadas ao iogurte), que apresentaram 12,10% e 12,04% de sólidos totais, respectivamente, o menor teor de sólidos em relação à padronização do leite (13%) pode ser atribuído ao elevado conteúdo de umidade das microcápsulas, que é, em média, de 97%. Cabe lembrar que para a fabricação do iogurte com microcápsulas úmidas e liofilizadas adicionou-se 10 e 13% de microcápsulas em relação à quantidade de leite, respectivamente. Esses valores corresponderam a 300 g de microcápsulas úmidas e 390 g de microcápsulas liofilizadas (reidratadas) para os 3 litros de leite utilizados em cada um dos processamentos.

Apesar de significativa, a diferença apresentada em relação ao teor de cinzas (0,869; 0,847 e 0,849%) para os iogurtes com *L. acidophilus* livre, em microcápsulas úmidas e liofilizadas, respectivamente, foi muito pequena e pode ser considerada de pouca importância do ponto de vista nutricional e tecnológico.

O teor de lactose dos iogurtes foi calculado por diferença entre os demais constituintes do produto, e desta forma, o menor teor de lactose nos iogurtes com microcápsulas úmidas (3,99%) e liofilizadas (3,96%) quando comparado ao iogurte com *L. acidophilus* livre (5,26%) pode ser explicado pelo aumento no teor de proteínas e diminuição no teor de sólidos para esses produtos, conforme discutido anteriormente. A lactose sendo calculada por diferença soma as diferenças encontradas na composição, agrupando um possível erro.

Diversos artigos consultados (Adhikari et al. (2000), Adhikari et al. (2003), Kailasapathy (2006), Kailasapathy e Sureeta (2004), Krasaekoopt et al. (2006), Picot e Lacroix (2004), Sultana et al. (2000), Sun e Griffiths (2000)) sobre a produção de iogurte utilizando micro-organismos probióticos livres e encapsulados não comparam a composição físico-química dos produtos.

Quanto à caracterização microbiológica, observa-se (Tabela 2) que os tratamentos afetaram significativamente a população inicial de cada micro-organismo (*S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*). Apesar de significativa, a diferença apresentada em relação à população inicial de *S. thermophilus* ($1,41 \times 10^9$; $1,67 \times 10^9$ e $1,32 \times 10^9$ UFC/g) para os iogurtes com *L. acidophilus* livre, em microcápsulas úmidas e liofilizadas, respectivamente foi muito pequena. Para *L. bulgaricus*, essa diferença foi relativamente maior entre os tratamentos com *L. acidophilus* livre ($4,46 \times 10^7$ UFC/g), em microcápsulas úmidas ($1,33 \times 10^7$ UFC/g) e em microcápsulas liofilizadas ($5,23 \times 10^6$ UFC/g). Entretanto, essas diferenças podem ser consideradas de pouca importância do ponto de vista tecnológico, uma vez que os iogurtes apresentaram contagens de bactérias lácticas totais acima do mínimo de 10^7 UFC/g exigidos pelo regulamento técnico. A população inicial de *L. acidophilus* ($1,51 \times 10^8$; $1,80 \times 10^7$ e $4,68 \times 10^5$ UFC/g) para os iogurtes com *L. acidophilus* livre, em microcápsulas úmidas e liofilizadas,

respectivamente foi discutida anteriormente e com relação à característica probiótica dos produtos, os iogurtes com o micro-organismo livre e em cápsulas úmidas atenderam ao padrão estabelecido pela legislação na recomendação diária do produto, entretanto, essa contagem foi inferior ao recomendado quando o iogurte foi obtido com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

5.2.3. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre as características dos iogurtes probióticos

5.2.3.1. Avaliação da pós-acidificação

A Tabela 3 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento refrigerado, bem como da interação destes fatores sobre o pH e acidez dos iogurtes probióticos.

Tabela 3. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação desses fatores sobre pH e acidez dos iogurtes probióticos.

Fator de Variação	GL	Valores de <i>p</i>	
		pH	acidez
Tratamento*	2	< 0,0001	< 0,0001
Tempo**	5	< 0,0001	< 0,0001
Tratamento x Tempo	10	< 0,0001	< 0,0001

* tratamentos representam o iogurte com *L. acidophilus* livre; iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas

** tempo representa os dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado dos iogurtes.

GL (Graus de liberdade); *p* (probabilidade de significância ≤ 0,05)

A Tabela 4 e a Figura 7 apresentam o desenvolvimento de pH e acidez dos iogurtes probióticos durante 35 dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 4. Desenvolvimento de pH e acidez dos iogurtes probióticos nos 35 dias de armazenamento refrigerado.

Tempo (dias)	Tratamentos*		
	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)
pH			
1	4,34 ± 0,02 ^{aB}	4,50 ± 0,02 ^{aA}	4,51 ± 0,04 ^{aA}
7	4,33 ± 0,02 ^{aA}	4,34 ± 0,01 ^{bA}	4,33 ± 0,02 ^{bA}
14	4,14 ± 0,02 ^{bB}	4,32 ± 0,02 ^{bcA}	4,31 ± 0,01 ^{bA}
21	4,13 ± 0,01 ^{bB}	4,31 ± 0,02 ^{bcA}	4,31 ± 0,01 ^{bA}
28	4,09 ± 0,02 ^{bB}	4,29 ± 0,01 ^{cA}	4,30 ± 0,01 ^{bA}
35	4,01 ± 0,01 ^{cB}	4,28 ± 0,01 ^{cA}	4,29 ± 0,01 ^{bA}
Acidez (% ácido láctico)			
1	0,803 ± 0,002 ^{eA}	0,749 ± 0,006 ^{dB}	0,74 ± 0,01 ^{cB}
7	0,833 ± 0,007 ^{dA}	0,820 ± 0,004 ^{cA}	0,83 ± 0,02 ^{bA}
14	1,010 ± 0,006 ^{cA}	0,843 ± 0,005 ^{bB}	0,854 ± 0,001 ^{aB}
21	1,024 ± 0,004 ^{cA}	0,850 ± 0,007 ^{bB}	0,860 ± 0,001 ^{aB}
28	1,08 ± 0,01 ^{bA}	0,857 ± 0,007 ^{abB}	0,864 ± 0,003 ^{aB}
35	1,138 ± 0,003 ^{aA}	0,873 ± 0,003 ^{aB}	0,870 ± 0,006 ^{aB}

* **1:** iogurte com *L. acidophilus* livre; **2:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; **3:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas

^{A,B} Para cada característica (pH ou acidez), médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Para cada característica (pH ou acidez), médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

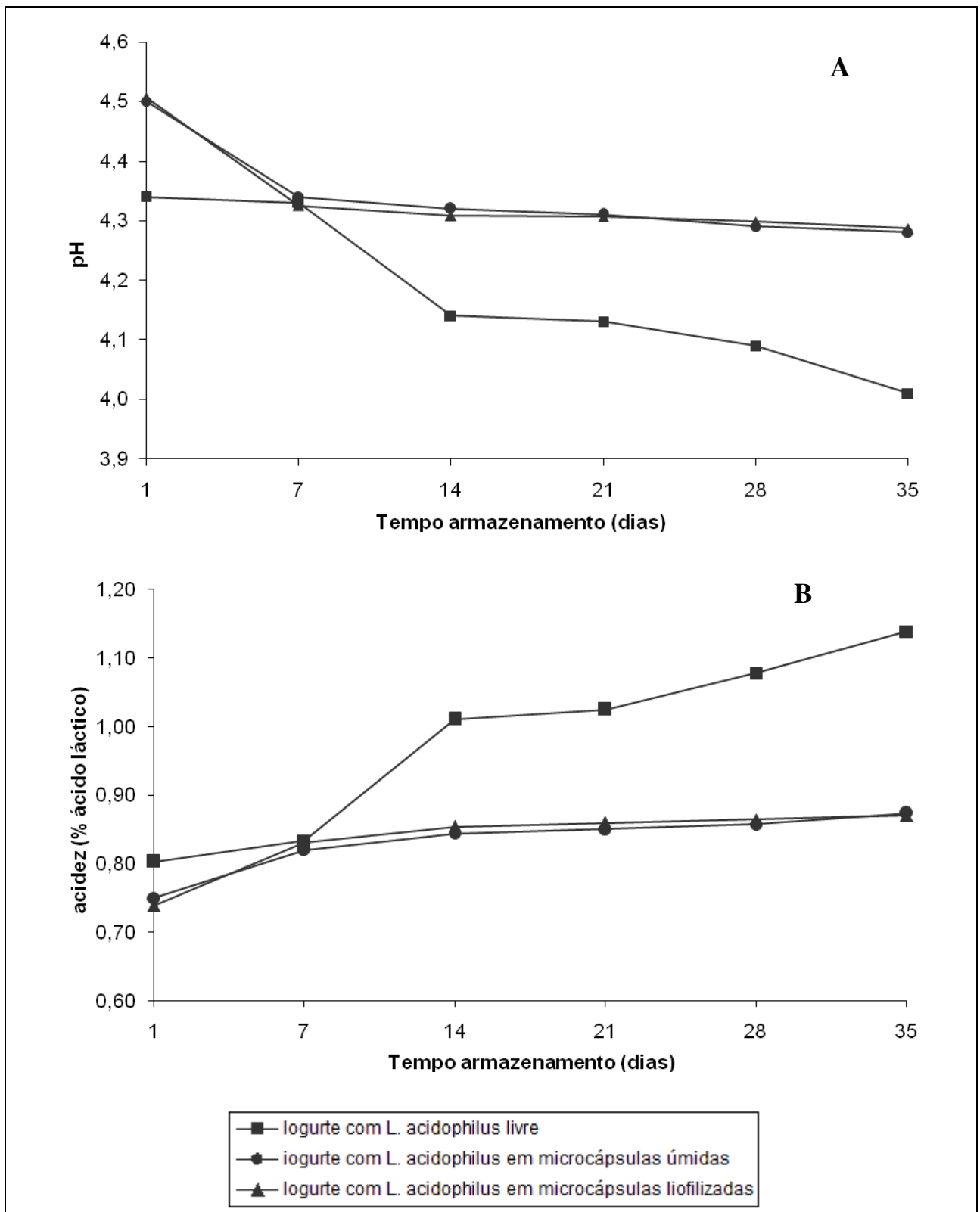


Figura 7. Efeito do tempo de armazenamento refrigerado sobre o pH (A) e acidez (B) dos iogurtes probióticos.

Observa-se na Tabela 4 que o pH e a acidez dos iogurtes foram significativamente afetados pelos tratamentos, pelo tempo de armazenamento e pela interação entre esses dois fatores. O iogurte com *L. acidophilus* livre apresentou o menor pH médio (4,17) quando comparado aos iogurtes com *L. acidophilus* encapsulado nas formas úmidas e liofilizada, que apresentaram o mesmo pH médio de 4,34. Embora o comportamento geral dos iogurtes tenha se caracterizado pela redução do pH e aumento da acidez ao longo do tempo (Tabela 4 e Figura 7), esse comportamento foi significativamente diferente para cada tratamento. O iogurte com *L. acidophilus* livre apresentou maior pós-acidificação quando comparado aos outros dois tratamentos. Observa-se que após a acidificação ocorrida entre os dias 1 e 7 nos iogurtes com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e liofilizadas, o pH e a acidez se mantiveram praticamente constantes. No entanto, o iogurte com *L. acidophilus* livre apresentou visível redução do pH e aumento da acidez ao longo do armazenamento refrigerado, mais acentuado entre 7 e 14 dias de armazenamento.

Kailasapathy (2006) e Mortazavian et al. (2008) também observaram menor pós-acidificação em iogurte probiótico adicionado de *L. acidophilus* e *B. lactis* na forma encapsulada do que na forma livre. A pós-acidificação é indesejável tanto para manutenção da qualidade sensorial do iogurte, como para a manutenção da viabilidade dos micro-organismos presentes (WALSTRA et al., 2006). Segundo Beal et al. (1999), uma maior queda de pH nos primeiros dias de armazenamento, como a observada nos primeiros 7 dias de armazenamento para o iogurte com *L. acidophilus* encapsulado e com 14 dias para o iogurte com *L. acidophilus* livre, deve-se à maior atividade metabólica das bactérias lácticas em pHs mais elevados. No iogurte tradicional, o *L. bulgaricus* é o principal responsável pela pós-acidificação, mas por outro lado ele contribui consideravelmente para a produção de compostos aromáticos, especialmente o acetaldeído, característico do iogurte (RASIC e KURMANN, 1978; GUYOT, 1992). Neste trabalho, a menor pós-acidificação dos iogurtes probióticos adicionados de *L. acidophilus* encapsulado por gelificação iônica e coacervação complexa utilizando pectina e proteínas do soro como materiais de parede, indica que a encapsulação inibe a atividade dos micro-organismos, protegendo, conseqüentemente, o produto da pós-acidificação.

5.2.3.2. Avaliação da viabilidade dos micro-organismos

A Tabela 5 apresenta o efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento, bem como a interação desses fatores na viabilidade de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*. A Tabela 6 apresenta a população (log UFC/g) dos micro-organismos presentes nos iogurtes probióticos batidos durante 35 dias de armazenamento refrigerado.

Tabela 5. Resumo da análise de variância (ANOVA). Efeito dos tratamentos, do tempo de armazenamento e da interação tratamento x tempo sobre a viabilidade de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*.

Fator de Variação	GL	Valores de <i>p</i>		
		<i>S. thermophilus</i>	<i>L. bulgaricus</i>	<i>L. acidophilus</i>
Tratamento*	2	0,005	< 0,0001	< 0,0001
Tempo**	5	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
Tratamento x Tempo	10	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001

* tratamentos representam o iogurte com *L. acidophilus* livre; iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas

** tempo representa os dias 1, 7, 14, 21, 28 e 35 dias de armazenamento refrigerado dos iogurtes.
GL (Graus de liberdade); *p* (probabilidade de significância ≤ 0,05)

Tabela 6. Viabilidade das culturas durante 35 dias de armazenamento refrigerado.

Tempo armazenamento (dias)	Tratamentos*		
	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)
<i>S. thermophilus</i> (log UFC/g)			
1	9,15 ± 0,02 ^{aB}	9,22 ± 0,02 ^{aA}	9,12 ± 0,03 ^{aB}
7	9,07 ± 0,01 ^{bA}	9,07 ± 0,04 ^{bA}	9,10 ± 0,03 ^{aA}
14	8,99 ± 0,02 ^{cA}	9,01 ± 0,04 ^{cA}	9,01 ± 0,02 ^{bA}
21	8,96 ± 0,01 ^{cdA}	8,90 ± 0,01 ^{dB}	8,93 ± 0,03 ^{cAB}
28	8,91 ± 0,01 ^{dA}	8,87 ± 0,01 ^{deA}	8,88 ± 0,02 ^{cA}
35	8,653 ± 0,004 ^{eB}	8,84 ± 0,01 ^{eA}	8,81 ± 0,02 ^{dA}
<i>L. bulgaricus</i> (log UFC/g)			
1	7,64 ± 0,09 ^{bA}	7,12 ± 0,03 ^{aB}	6,71 ± 0,07 ^{aC}
7	7,67 ± 0,11 ^{abA}	7,11 ± 0,03 ^{aB}	6,70 ± 0,07 ^{aC}
14	7,82 ± 0,08 ^{aA}	7,08 ± 0,05 ^{aB}	6,61 ± 0,06 ^{abC}
21	7,78 ± 0,06 ^{abA}	7,03 ± 0,06 ^{aB}	6,51 ± 0,04 ^{bC}
28	7,67 ± 0,02 ^{abA}	6,98 ± 0,06 ^{aB}	6,45 ± 0,06 ^{bC}
35	6,99 ± 0,02 ^{cA}	6,28 ± 0,05 ^{bB}	6,44 ± 0,05 ^{bC}
<i>L. acidophilus</i> (log UFC/g)			
1	8,18 ± 0,03 ^{aA}	7,25 ± 0,04 ^{aB}	5,67 ± 0,02 ^{aC}
7	8,16 ± 0,03 ^{aA}	7,19 ± 0,03 ^{abB}	5,60 ± 0,02 ^{abC}
14	8,04 ± 0,01 ^{bA}	7,14 ± 0,05 ^{bcB}	5,54 ± 0,03 ^{bcC}
21	7,88 ± 0,02 ^{cA}	7,08 ± 0,05 ^{cdB}	5,53 ± 0,03 ^{bcC}
28	7,75 ± 0,03 ^{dA}	7,06 ± 0,06 ^{cdB}	5,52 ± 0,03 ^{bcC}
35	7,20 ± 0,05 ^{eA}	7,05 ± 0,06 ^{dB}	5,47 ± 0,03 ^{cC}

* 1: iogurte com *L. acidophilus* livre; 2: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; 3: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

^{A,B} Para cada micro-organismo, médias com a mesma letra na linha não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

^{a,b} Para cada micro-organismo, médias com a mesma letra na coluna não diferem significativamente entre si ($p \leq 0,05$).

Observa-se nas Tabelas 5 e 6 que os tratamentos, o tempo de armazenamento, bem como a interação desses dois fatores afetaram significativamente o número de células viáveis de *S. thermophilus*, *L. bulgaricus* e *L. acidophilus*. O número de células viáveis diminuiu ao longo do tempo, no entanto, de forma diferente para cada um dos tratamentos.

A redução do número de células viáveis é um comportamento típico durante o armazenamento refrigerado do iogurte e é afetada especialmente pela pós-acidificação do produto (TAMIME e ROBINSON, 1999). Por outro lado, a manutenção da viabilidade celular é desejada e inclusive estabelecida pela legislação. No caso do iogurte tradicional, o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados da Instrução Normativa nº 46, estabelece que a contagem total de bactérias lácticas viáveis deve ser no mínimo de 10^7 UFC/g no produto final durante o período de validade (BRASIL, 2007). Desta forma, pode-se observar (Tabela 6) que o número de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* dos iogurtes obtidos em todos os tratamentos atende aos critérios estabelecidos pela legislação. O número médio de células viáveis de *S. thermophilus* e *L. bulgaricus* após 35 dias de armazenamento foi, respectivamente, $4,50 \times 10^8$ UFC/g e $9,77 \times 10^6$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* livre, $6,92 \times 10^8$ UFC/g e $1,91 \times 10^6$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e $6,46 \times 10^8$ UFC/g e $2,75 \times 10^6$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

De um modo geral, a população de células viáveis do *S. thermophilus* foi de 1,9 ciclos logarítmicos maior que a população de células viáveis de *L. bulgaricus* (Tabela 6). Segundo Lourens-Hatting e Viljoen (2001), uma excessiva pós-acidificação ocorre, principalmente, devido ao crescimento incontrolável de *L. bulgaricus* nas temperaturas de refrigeração e em baixos valores de pH. Portanto, as indústrias fabricantes de culturas lácteas fornecem culturas tradicionais de iogurte com uma menor concentração de *L. bulgaricus* e uma maior concentração de *S. thermophilus*. O resultado obtido é semelhante ao encontrado por Pereira (2002), no qual a população de *S. thermophilus* foi 1,5 ciclos logarítmicos maior que a população de *L. bulgaricus* em 35 dias de armazenamento refrigerado de iogurte tradicional.

O número médio de células viáveis de *L. acidophilus* após os 35 dias de armazenamento refrigerado foi de $1,58 \times 10^7$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* livre, $1,12 \times 10^7$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e $2,94 \times 10^5$ UFC/g para iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas. A quantidade mínima viável para os probióticos deve estar situada na faixa de 10^8 a 10^9 UFC na porção diária recomendada do produto para consumo, que é de 200 g no caso do iogurte. Desta forma, os iogurtes com *L. acidophilus* livre e com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas atendem ao padrão estabelecido pela legislação ao final da vida de prateleira apresentando contagens de $3,16 \times 10^9$ e $2,24 \times 10^9$ UFC na porção de 200 g de iogurte, respectivamente. Por outro lado, o iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas, que desde a sua fabricação não atendeu a esse parâmetro da legislação, apresentou contagem de $5,88 \times 10^7$ UFC na porção de 200 g após o armazenamento refrigerado de 35 dias.

Considerando a população inicial, observa-se na Tabela 6 que após 35 dias de armazenamento refrigerado houve redução de 0,98 ciclos logarítmicos na população de células viáveis de *L. acidophilus* no iogurte com *L. acidophilus* livre e de 0,20 ciclos logarítmicos para o iogurte com *L. acidophilus*, tanto em microcápsulas úmidas como liofilizadas. Com base nesses dados foi possível calcular a porcentagem de sobrevivência de *L. acidophilus* após 35 dias de armazenamento refrigerado dos iogurtes, a qual é apresentada na Figura 8. Desta forma, observa-se claramente a maior taxa de sobrevivência do *L. acidophilus* no iogurte probiótico quando encapsulado do que quando veiculado na forma livre. A porcentagem de sobrevivência do micro-organismo probiótico foi de aproximadamente 10,46% no iogurte com *L. acidophilus* livre, 62,26% no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e 62,83% no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

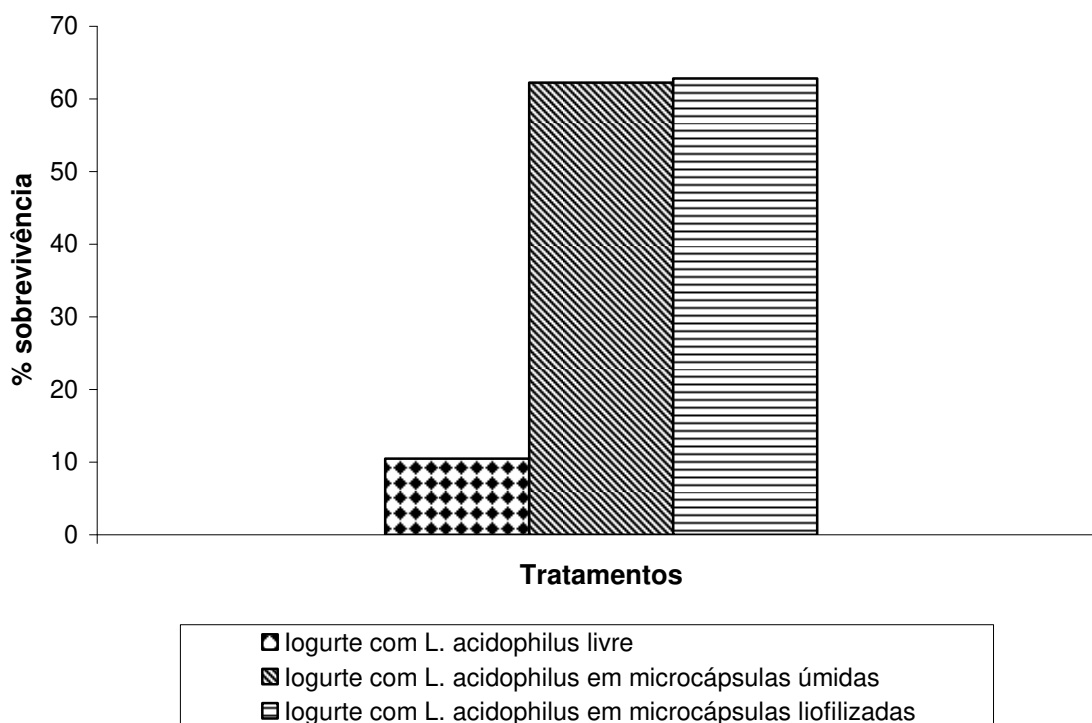


Figura 8. Porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* após 35 dias de armazenamento refrigerado dos iogurtes probióticos.

Os resultados desse trabalho quanto à viabilidade do micro-organismo probiótico vêm a corroborar com os dados da literatura que indicam, no geral, que a microencapsulação pode ser um recurso adequado para manter a viabilidade do micro-organismo no iogurte por maior tempo. Utilizando diferentes micro-organismos, técnicas de microencapsulação e materiais de parede, tais como, *L. acidophilus* DD910 e *B. lactis* DD920 encapsulados através da técnica de emulsão com alginato de cálcio e amido (KAILASAPATHY, 2006); *L. acidophilus* 2409 e *B. infantis* 1912 encapsulados pela técnica de emulsão com alginato de sódio, amido e glicerol (SULTANA et al., 2000); *L. acidophilus* 547, *L. casei* 01 e *B. bifidum* ATCC 1994 encapsulados por gelificação iônica com alginato de sódio e recobrimento de quitosana (KRASAEKOOPT et al., 2006) e *B. longum* B6 e *B. longum* ATCC 15708 encapsulados por técnica de emulsão com κ -carragena (ADHIKARI et al., 2003), todos os autores, assim como neste trabalho, observaram que a microencapsulação aumentou a viabilidade dos micro-organismos probióticos no iogurte em maior ou menor grau.

5.2.3.3. Avaliação da viabilidade dos micro-organismos após simulação das condições gastrointestinais

A Tabela 7 apresenta a viabilidade de *L. acidophilus* (log UFC/g) presente nos iogurtes probióticos batidos durante incubação sequencial dos produtos em suco gástrico artificial (SGA) pH 3,0 por 2 horas, suco intestinal artificial (SIA) pH 7,0 por 5 horas e bile 1% pH 7,0 por 5 horas.

Tabela 7. Viabilidade de *L. acidophilus* (log UFC/g) presente nos iogurtes probióticos após incubação sequencial dos produtos em suco gástrico e intestinal artificial e exposição à solução de bile 1%.

Incubação Sequencial		Tratamentos*		
		1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)
SGA pH 3,0	0 min.	6,08 ± 0,09	6,14 ± 0,08	4,25 ± 0,02
	60 min.	5,87 ± 0,09	6,04 ± 0,06	4,13 ± 0,01
	120 min.	5,70 ± 0,09	5,97 ± 0,09	4,07 ± 0,03
SIA pH 7,0	300 min.	5,74 ± 0,09	6,0 ± 0,1	4,06 ± 0,03
Bile 1% pH 7,0	0 min.	4,3 ± 0,3	5,47 ± 0,09	4,14 ± 0,03
	60 min.	2,2 ± 0,5	4,6 ± 0,3	3,92 ± 0,03
	300 min.	0,8 ± 0,3	4,1 ± 0,2	3,16 ± 0,01

* 1: iogurte com *L. acidophilus* livre; 2: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; 3: iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

Observa-se (Tabela 7) que após duas horas de exposição ao suco gástrico artificial em pH 3,0, a população de *L. acidophilus* reduziu aproximadamente 0,38 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* livre, 0,17 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e 0,18 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas. Após o pH ser ajustado para 7,0 simulando o suco intestinal artificial, a população de *L. acidophilus* praticamente não reduziu quando comparada com a população após duas horas de exposição ao suco gástrico artificial em pH 3,0.

Após cinco horas de exposição à solução de bile 1%, observou-se que houve redução na população de *L. acidophilus* de 3,5 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* livre, 1,37 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e 0,98 ciclos logarítmicos no iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

Portanto, observou-se que os iogurtes contendo *L. acidophilus* microencapsulado apresentou uma maior resistência tanto ao suco gástrico e suco intestinal artificiais quanto à bile.

A Tabela 8 e a Figura 9 apresentam a porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* nos iogurtes probióticos batidos após exposição dos produtos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

Tabela 8. Porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* nos iogurtes após exposição dos produtos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

Sobrevivência (%)	Tratamentos*		
	1 (n=3)	2 (n=3)	3 (n=2)
SGA e SIA / 7 horas	45,68	68,49	65,57
Bile 1% / 5 horas	0,03	5,61	10,56

* **1:** iogurte com *L. acidophilus* livre; **2:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas; **3:** iogurte com *L. acidophilus* em microcápsulas liofilizadas.

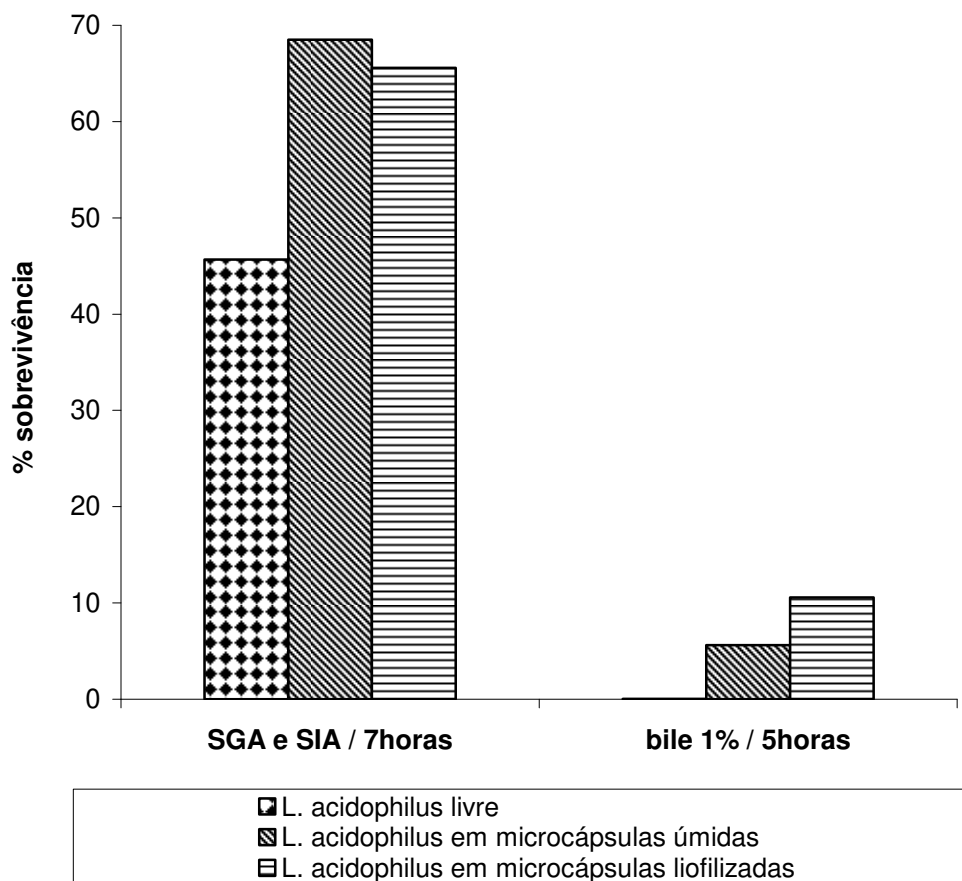


Figura 9. Porcentagem de sobrevivência do *L. acidophilus* nos iogurtes probióticos após exposição dos produtos à simulação da passagem pelo trato gastrointestinal.

Observa-se (Tabela 8 e Figura 9) uma maior sobrevivência de *L. acidophilus* (68,49% e 65,57%) para os iogurtes com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas e em microcápsulas liofilizadas, respectivamente quando comparados ao iogurte com *L. acidophilus* livre (45,68%) ao serem submetidos à exposição ao suco gástrico artificial pH 3,0 por duas horas, seguido de exposição ao suco intestinal artificial pH 7,0 por cinco horas.

Pode-se observar que após exposição por cinco horas em solução de bile 1%, a sobrevivência de *L. acidophilus* na forma livre foi inferior (0,03%) quando comparada aos iogurtes com *L. acidophilus* em microcápsulas úmidas (5,61%) e em microcápsulas liofilizadas (10,56%), indicando maior sobrevivência nos iogurtes contendo *L.*

acidophilus na forma encapsulada em condições que simulam a passagem pelo trato gastrointestinal.

Os resultados de diversos trabalhos indicam que a microencapsulação pode proteger os micro-organismos probióticos contra as condições drásticas encontradas durante a passagem pelo trato gastrointestinal. Diversos autores avaliaram a exposição desses micro-organismos às condições que simulam essa passagem, e obtiveram melhores resultados para os micro-organismos na forma encapsulada quando comparados aos micro-organismos livres (CHANDRAMOULI et al., 2004; FÁVARO-TRINDADE e GROSSO, 2000; MANDAL et al., 2006; SULTANA et al., 2000).

6. CONCLUSÕES

As microcápsulas produzidas através da combinação das técnicas de gelificação iônica e coacervação complexa contendo *Lactobacillus acidophilus* apresentaram em sua maioria forma esférica e distribuição de recheio por toda a matriz (micro-organismos), indicando que durante sua produção não se observou perda de viabilidade do *L. acidophilus*.

O tempo de fermentação do iogurte adicionado de microcápsulas liofilizadas contendo *L. acidophilus* foi maior em relação aos outros dois tratamentos. Um dia após a fabricação, o iogurte com *L. acidophilus* livre apresentou menor pH do que os iogurtes adicionados com o micro-organismo encapsulado. Com relação à composição físico-química, os iogurtes contendo microcápsulas (úmidas e liofilizadas) não diferiram significativamente entre si e apresentaram maior teor de proteína quando comparados ao iogurte produzido com o *L. acidophilus* livre.

Os iogurtes probióticos nos quais o *L. acidophilus* foi adicionado na forma microencapsulada apresentaram menor pós-acidificação e maior sobrevivência do micro-organismo probiótico após 35 dias de armazenamento quando comparados ao iogurte com probiótico adicionado na forma livre, indicando que a microencapsulação conferiu proteção ao micro-organismo durante o armazenamento refrigerado.

O ensaio *in vitro* de simulação da passagem dos iogurtes pelo trato gastrointestinal realizado após 35 dias de armazenamento refrigerado indicou maior sobrevivência entérica do *L. acidophilus* encapsulado quando comparado ao micro-organismo livre, indicando que a microencapsulação conferiu proteção à viabilidade do micro-organismo.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRUN, I. U.; FERNANDO, L. Viability of microencapsulated Bifidobacteria in set yogurt during refrigerated storage. **Journal of Dairy Science**, v. 83, n. 9, p. 1946-1951, 2000.
- ADHIKARI, K.; MUSTAPHA, A.; GRUN, I. U. Survival and metabolic activity of microencapsulated *Bifidobacterium longum* in stirred yogurt. **Journal of Food Science**, v. 68, n. 1, p. 275-280, 2003.
- AFONSO, I. M.; MAIA, J. M. Rheological monitoring of structure evolution and development in stirred yoghurt. **Journal of Food Engineering**, v. 42, p. 183-190, 1999.
- AKALIN, A. S., GÖNÇ, S., ÜNAL, G., FENDERYA, S. Effects of fructooligosaccharide and whey protein concentrate on the viability of starter culture in reduced probiotic yogurt during storage. **Journal of Food Science**, v. 72, p. 222–227, 2007.
- ANNAN, N. T.; BORZA, A. D.; HANSEN, L. T. Encapsulation in alginate-coated gelatin microspheres improves survival of the probiotic *Bifidobacterium adolescentis* 15703T during exposure to simulated gastro-intestinal conditions. **Food Research International**, v. 41, p. 184–193, 2008.
- ANTUNES, A. E. C.; MARASCA, E. T. G.; MORENO, I.; DOURADO, F. M.; RODRIGUES, L. G.; LERAYER, A. L. S. Desenvolvimento de *buttermilk* probiótico. **Ciência e Tecnologia de Alimentos**, v. 27, n. 1, p. 83-90, 2007.
- ARUNACHALAM, K. D. Role of bifidobacteria in nutrition, medicine and technology. **Nutrition Research**, v. 19, n. 10, p. 1559-1597, 1999.
- ASSOCIATION OF OFFICIAL ANALYTICAL CHEMISTS. **Official methods of analysis of AOAC International**. 16^a Ed., Washington, 1995.
- BALLONGUE, J. Bifidobacteria and Probiotic Action. In: **Lactic Acid Bacteria – Microbiological and Functional Aspects**. SALMINEM, S.; von WRIGHT, A.; OUWEHAND, A., 3^{ed.}, 2004.
- BARRETO, G. P. M.; SILVA, N.; SILVA, E. N.; BOTELHO, L.; YIM, D. K.; ALMEIDA, C. G.; SABA, G. L. Quantificação de *Lactobacillus acidophilus*, bifidobactérias e bactérias lácticas totais em produtos probióticos comercializados no Brasil. **Brazilian Journal of Food Technology**, v. 6, n. 120, p. 119-126, 2003.
- BEAL, C.; SKOKANOVA, J.; LATRILLE, E.; MARTIN, N.; CORRIEU, G. Combined effects of culture conditions and storage time on acidification and viscosity of stirred yogurt. **Journal of Dairy Science**, v. 82, n. 4, p. 673-681, 1999.
- BOTELHO, L. **Isolamento e identificação de Lactobacilos e Bifidobactérias em**

alimentos probióticos disponíveis no mercado brasileiro. Tese (Doutorado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 203 p., 2005.

BRANDÃO, E. M.; ANDRADE, C. T. Influência de fatores estruturais no processo de gelificação de pectinas de alto grau de metoxilação. **Polímeros: Ciência e Tecnologia**, p. 38-44, Jul/Set 1999.

BRANNON-PEPPAS, L. Controlled release in the food and cosmetics industries In: **Polymeric delivery systems: properties and applications**, 1993, 411p.

BRASIL - Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento – MAPA. Instrução Normativa nº46, de 23 de outubro de 2007, que adot a o Regulamento Técnico de Identidade e Qualidade de Leites Fermentados. Publicado no **Diário Oficial da União**: Brasília, Distrito Federal, em 24 de outubro de 2007. Seção 1, página 5. 2007.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução nº 2 de 7 de janeiro de 2002. Regulamento Técnico de Substâncias Bioativas e Probióticos, Isolados com Alegação de Propriedades Funcionais e ou de Saúde. Lista de alegações de propriedade funcional aprovadas. Publicado no **Diário Oficial da União** em 9 de janeiro de 2002, Seção 1, pág. 191. Atualizado em julho de 2008. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/alimentos/comissoes/tecno_lista_alega.htm. Acesso em setembro de 2010.

BRASIL - Agência Nacional de Vigilância Sanitária - ANVISA. Resolução RDC nº 359, de 23 de dezembro de 2003. Regulamento Técnico de Porções de Alimentos Embalados para Fins de Rotulagem Nutricional. Publicado no **Diário Oficial da União** em 26 de dezembro de 2003. Disponível em: http://www.anvisa.gov.br/legis/resol/2003/rdc/359_03rdc.pdf. Acesso em setembro de 2010.

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

BUREY, P.; BHANDARI, B. R.; HOWES, T.; GODLEY, M. J. Hydrocolloid gel particles: formation, characterization, and application. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 48, p. 361-377, 2008.

CHAMPAGNE, C. P.; GAUDY, C.; PONCELET, D.; NEUFELD, R. J. *Lactococcus lactis* release from calcium alginate beads. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 58, n. 5, p. 1429–1434, 1992.

CHAMPAGNE, C. P.; GARDNER, N. J. Effect of storage in a fruit drink on subsequent survival of probiotic lactobacilli to gastro-intestinal stresses. **Food Research International**, v. 41, p. 539–543, 2008.

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

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Ingredient selection criteria for probiotic microorganisms in functional dairy foods. **International Journal of Dairy Technology**, v. 51, n. 4, p. 123-136, 1998a.

CHARTERIS, W. P.; KELLY, P. M.; MORELLI, L.; COLLINS, J. K. Development and application of an *in vitro* methodology to determine the transit tolerance of potentially probiotic *Lactobacillus* and *Bifidobacterium* species in the upper human gastrointestinal tract. **Journal of Applied Microbiology**, v. 84, 759–768, 1998b.

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

DAVE, R. I.; SHAH, N. P. Evaluation of media for selective enumeration of *Streptococcus thermophilus*, *Lactobacillus delbrueckii* ssp. *bulgaricus*, *Lactobacillus acidophilus*, and Bifidobacteria. **Journal of Dairy Science**, v. 79, p. 1529-1536, 1996.

DE MAN, J. C.; ROGOSA, M.; SHARPE, M. E. A medium for the cultivation of lactobacilli. **Journal of Applied Microbiology**, v. 23, p. 130–135, 1960.

DEL PIANO, M.; MORELLI, L.; STROZZI, G. P.; ALLESINA, S.; BARBA, M., DEIDDA, F.; LORENZINI, P., BALLARÉ, M., MONTINO, F.; ORSELLO, M.; SARTORI, M.; GARELLO, E.; CARMAGNOLA, S.; PAGLIARULO, M.; CAPURSO, L. Probiotics: from research to consumer. **Digestive and Liver Disease**, v. 38 (2) S248–S255, 2006a.

DEL PIANO, M.; ANDERLONI, A.; BALLARÉ, M.; CARMAGNOLA, S.; MONTINO, F.; GARELLO, E.; ORSELLO, M.; PAGLIARULO, M.; MORELLI, L.; CAPURSO, L. In vitro sensitivity of probiotics to human bile. **Digestive and Liver Disease**, v. 38, 130, 2006b (abstract).

DESAI, K. G. H.; PARK, H. J. Recent developments in microencapsulation of food ingredients. **Drying Technology**, v. 23, n. 7, p. 1361-1394, 2005.

DONKOR, O. N.; HENRIKSSON, A.; VASILJEVIC, T.; SHAH, N. P. Effect of acidification on the activity of probiotics in yoghurt during cold storage. **International Dairy Journal**, v. 16, p. 1181-1189, 2006.

DZIEZAK, J. D. A focus on gums. **Food Technology**, v.45, p. 115-121, 1991.

FAO/WHO. FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS; WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Evaluation of health and nutritional properties of probiotics in food including powder milk with live lactic acid bacteria**. Córdoba,

Argentina 2001. 34 p. Disponível em: http://www.who.int/foodsafety/publications/fs_management/en/probiotics.pdf. Acesso em novembro de 2010.

FANG, Y.; AL-ASSAF, S.; PHILLIPS, G. O.; NISHINARI, K.; FUNAM, I. T.; WILLIAMS, P. A. Binding behavior of calcium to polyuronates: Comparison of pectin with alginate. **Carbohydrate Polymers**, v. 72, p. 334–341, 2008.

FÁVARO-TRINDADE, C. S.; GROSSO, C. R. F. The effect of the immobilisation of *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium lactis* in alginate on their tolerance to gastrointestinal secretions. **Milchwissenschaft**, v. 55, n. 09, p. 496-499, 2000.

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

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

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

GIGANTE, M. L.; GEREZ, C. L.; FONT DE VALDEZ, G.; GROSSO, C. R. F. **Viability of *L. casei* microencapsulated under gastrointestinal conditions**. XVIII International Conference on Bioencapsulation. Porto, Portugal, 2010.

GILLILAND, S. E., REILLY, S. S., KIM, G. B., KIM, H. S. Viability during storage of selected probiotic lactobacilli and bifidobacterias in a yogurt-like product. **Food Microbiology and Safety**, v. 67, n. 8, p. 3091-3095, 2002.

GOMES, A. M. P.; MALCATA, F. X. *Bifidobacterium* spp. and *Lactobacillus acidophilus*: biochemical, technological and therapeutical properties relevant for use as probiotics. **Trends in Food Science and Technology**, v. 10, n.4/5, p. 139-157, 1999.

GOUIN, S. Microencapsulation: industrial appraisal of existing technologies and trends. **Food Science and Technology**, v. 15, p. 330-347, 2004.

GUYOT, A. Les yoghourts. **Le Lait et Nous**, n. 2, p. 6-12, 1992.

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

HELLER, J. K. Probiotic bacteria in fermented foods: Product characteristics and starter organisms. **American Journal of Clinical Nutrition**, 73(Suppl.), 374S–379S, 2001.

- HOOD, S. K., ZOTTOLA, E. A. Effects of low pH on the ability of *Lactobacillus acidophilus* to survive and adhere to human intestinal cells. **Journal of Food Science**, v. 53, p. 1514–1516, 1988.
- JACKSON, L. S.; LEE, K. Microencapsulation and Food Industry. **LWT – Food Science and Technology**, v. 24, n. 4, p. 289-297, 1991.
- JIZOMOTO, H.; KANAOKA, E.; SUGITA, K.; HIRANO, K. Gelatin-acacia microcapsules for trapping micro oil droplets containing lipophilic drugs and ready disintegration in the gastrointestinal tract. **Pharmaceutical Research**, v. 10, n. 8, p. 1115-1122, 1993.
- KAILASAPATHY, K. Microencapsulation of probiotic bacteria: technology and potential applications. **Current Issues in Intestinal Microbiology**, v. 3, p. 39-48, 2002.
- KAILASAPATHY, K. Survival of free and encapsulated probiotic bacteria and their effect on the sensory properties of yoghurt. **LWT - Food Science and Technology**, v. 39, n. 10, p. 1221-1227, 2006.
- KAILASAPATHY, K.; RYBKA, S. *L. acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. – their therapeutic potential and survival in yogurt. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 52, p. 28-35, 1997.
- KAILASAPATHY, K.; CHIN, J. Survival and therapeutic potential of probiotic organisms with reference to *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium* spp. **Immunology and Cell Biology**, v. 78, p. 80-88, 2000.
- KAILASAPATHY, K.; SUREETA, B. S. Effect of storage on shelf life and viability of freeze-dried and microencapsulated *Lactobacillus acidophilus* and *Bifidobacterium infantis* cultures. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 59, n. 3, p. 204-208, 2004.
- KANDLER, O.; WEISS, N., 1986. Genus *Lactobacillus* Beijerinck 1901, 212^{AL}, p. 1209-1234. In: SNEATH, P.H.A., MAIR, N.S., SHARPE, M.E. and HOLT, J.G. (eds), **Bergey's Manual of Systematic Bacteriology**, v. 2. Baltimore: Williams & Wilkins.
- KONG, F.; SINGH, R. P. Disintegration of solid foods in human stomach. **Journal of Food Science**, v. 73, p. 67-80, 2008.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Review: Evaluation of encapsulation techniques of probiotics for yoghurt. **International Dairy Journal**, v. 13, p. 3-13, 2003.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. The influence of coating materials on some properties of alginate beads and survivability of microencapsulated probiotic bacteria. **International Dairy Journal**, v. 14, p. 737-743, 2004.
- KRASAEKOOPT, W.; BHANDARI, B.; DEETH, H. Survival of probiotics encapsulated in chitosan-coated alginate beads yoghurt from UHT and conventionally treated milk during

storage. **LWT**, v. 39, p. 177-183, 2006.

LAMBERT, J. M.; WEINBRECK, F.; KLEEREBEZEM, M. In vitro analysis of protection of the enzyme bile salt hydrolase against enteric conditions by whey protein – gum arabic microencapsulation. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 56, p. 8360-8364, 2008.

LISERRE, A. M.; RÉ, M. I.; FRANCO, B. D. G. M. Microencapsulation of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* in modified alginate-chitosan beads and evaluation of survival in simulated gastrointestinal conditions. **Food Biotechnology**, v. 21, p. 1-16, 2007.

LOURENS-HATTINGH, A., VILJEON, C. B. Yoghurt as probiotic carrier food. **International Dairy Journal**, v. 11, p. 1–17, 2001.

LUCEY, J. A.; TEO, C. T.; MUNRO, P. A.; SINGH, H. Microstructure, permeability and appearance of acid gels made from heated skim milk. **Food Hydrocolloids**, v. 12, p. 159-165, 1998.

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

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

MORTAZAVIAN, A. M.; SOHRABVANDI, S. **Probiotics and Food Probiotic Products: based on Dairy Probiotic Products** (Ed. A.M. MORTAZAVIAN). Eta Publication, Iran, 2006.

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

MORTAZAVIAN, A. M.; EHSANI, M. R.; AZIZI, A.; RAZAVI, S. H.; MOUSAVI, S. M.; SOHRABVANDI, S.; REINHEIMER, J. A. Viability of calcium-alginate-microencapsulated probiotic bacteria in Iranian yogurt drink (Doogh) during refrigerated storage and under simulated gastrointestinal conditions. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 63, n.1, p. 24-29, 2008.

MOZZI, F.; GERBINO, E.; FONT DE VALDEZ, G.; TORINO M. I. Functionality of exopolysaccharides produced by lactic acid bacteria in an in vitro gastric system. **Journal of Applied Microbiology**, v. 107, p. 56–64, 2009.

OLIVEIRA, A. C.; MORETTI, T. S., BOSCHINI, C.; BALIERO, J. C. C.; FREITAS, O. FAVARO-TRINDADE, C. S. Stability of microencapsulated *B. lactis* (BI 01) and *L.*

acidophilus (LAC 4) by complex coacervation followed by spray drying. **Journal of Microencapsulation**, v. 24 p.685–693, 2007.

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

PARK, S. C.; HWANG, M. H.; KIM, Y. H.; KIM, J. C.; SONG, J. C.; LEE, K. W.; JEONG, K. S., RHEE, M. H.; KIM, K. S.; KIM, T. W. Comparison of pH and bile resistance of *Lactobacillus acidophilus* strains isolated from rat, pig, chicken, and human sources. **World Journal of Microbiology & Biotechnology**, v. 22, p. 35–37, 2006.

PEREIRA, M. A. G. **Efeito do teor de lactose e do tipo de cultura na acidificação e pós-acidificação de iogurtes**. Dissertação (Mestrado em Tecnologia de Alimentos), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 86 p., 2002.

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

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

PRATA, A. S. **Estudo dos parâmetros físico-químicos envolvidos na formação de microcápsulas produzidas por coacervação complexa**. Tese (Doutorado em Alimentos e Nutrição), Faculdade de Engenharia de Alimentos, Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP), 242 p., 2006.

RALET, M. C.; DRONNET, V.; BUCHHOLT, H. C.; THIBAUT, J. F. Enzymatically and chemically de-esterified lime pectins: characterisation, polyelectrolyte behaviour and calcium binding properties. **Carbohydrate Research**, v.336, p. 117-125, 2001.

RAO, A. V.; SHIWNARAIN, N.; MAHARAJ, I. Survival of microencapsulated *Bifidobacterium pseudolongum* in simulated gastric and intestinal juices. **Canadian Institute of Food Science and Technology Journal**, v. 22, n. 4, p. 345–349, 1989.

RASIC, J. L.; KURMAN, J. A. **Yoghurt: Scientific grounds technology, manufacture and preparation**. Copenhagen: Technical Dairy Publishing House, 1978.427 p.

REID, G.; SANDERS, M. E.; GASKINS, R.; GIBSON, G. R.; MERCENIER, A.; RASTALL, R.; ROBERFROID, M.; ROWLAND, I.; CHERBUT, C.; KLAENHAMMER, T. R. New Scientific paradigms for probiotics and prebiotics. **Journal of Clinical Gastroenterology**, v. 37, n. 2, p. 105-118, 2003.

REINECCIUS, G. A. Controlled release techniques in the food industry. In: Encapsulation and controlled release of food ingredients. ACS Symposium Series. **American Chemical Society**, Washington, 1995.

ROBERFROID, M. B. A European Consensus of Scientific Concepts of Functional Foods. **Nutrition**, v. 16, p. 689-691, 2000.

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

SCHLEIFER, K. H.; EHRMANN, M.; KRUSCH, U.; NEVE, H. **Systematic and Applied Microbiology**, v. 14, p. 386-388, 1991.

SHAH, N. P., JELEN, P. Survival of lactic acid bacteria and their lactases under acidic conditions. **Journal of Food Science**, v. 55, p. 506–509, 1990.

SHAH, N. P. Probiotic bacteria: Selective enumeration and survival in dairy foods. **Journal of Dairy Science**, v. 83, p. 894–907, 2000.

SHAH, N. P.; RAVULA, R. R. Influence of water activity on fermentation, organic acids production and viability of yoghurt and probiotic bacteria. **Australian Journal of Dairy Technology**, v. 55, p. 127–131, 2000.

SHAHIDI, F.; HAN, X. Q. Encapsulation of food ingredients. **Critical Reviews in Food Science and Nutrition**, v. 33, n. 6, p. 501-547, 1993.

SHEU, T. Y.; MARSHALL, R. T. Microencapsulation of lactobacilli in calcium alginate gels. **Journal of Food Science**, v. 54, n. 3, p. 557–561, 1993.

SIRÓ, I.; KÁPOLNA, E.; KÁPOLNA, B.; LUGASI, A. Functional food. Product development, marketing and consumer acceptance - A review. **Appetite**, v.51, p. 456–467, 2008.

SOUZA, W. **Técnicas básicas de microscopia eletrônica aplicadas às ciências biológicas**. Rio de Janeiro, Sociedade Brasileira de Microscopia, 1998.

STANTON, C; GARDINER, G.; MEEHAN, H.; COLLINS, K.; FITZGERALD, G.; LYNCH, P. B.; ROSS, R. P. Market potential for probiotics. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 73, n. 3, p. 476-483, 2001.

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

SUN, W.; GRIFFITHS, M. W. Survival of bifidobacteria in yogurt and simulated gastric juice following immobilization in gellan-xanthan beads. **International Journal of Food Microbiology**, v. 61, p. 17-25, 2000.

TAMIME, A. Y.; DEETH, H. C. Yoghurt technology and biochemistry. **Journal of Food Protection**, v. 43, n. 12, p. 939-977, 1980.

TAMIME, A. Y.; ROBINSON, R. K. **Yoghurt: Science and Technology**. Ed 2. CRC Press, Cambridge, 1999, 605p.

TUOHY, K. M.; PROBERT, H. M.; SMEJKAL, C. W.; GIBSON, G. R. Using probiotics and prebiotics to improve gut health. **Drug Discovery Today**, v. 8, p. 692-700, 2003.

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

VINDEROLA, C. G.; REINHEIMER, J. A. Culture media for the enumeration of *Bifidobacterium bifidum* and *Lactobacillus acidophilus* in the presence of yoghurt bacteria. **International Dairy Journal**, v. 9, p. 497-505, 1999.

WALSTRA, P.; WOUTERS, J. T. M.; GEURTS, T. J. **Dairy Science and Technology**. Ed. 2. CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, London, New York, 2006, 744p.

WANG, J.; GUO, Z.; ZHANG, Q.; YAN, L.; CHEN, W.; LIU, M. X.; ZHANG, H. P. Fermentation characteristics and transit tolerance of probiotic *Lactobacillus casei* Zhang in soymilk and bovine milk during storage. **Journal of Dairy Science**, v. 92, p. 2468-2476, 2009.

WEINBRECK F., NIEUWENHUIJSE H., ROBIJN, G. W.; DE KRUIF, C. G. Complexation of whey proteins with carrageenan. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 52, n.11, p. 3550– 3555, 2004.

ZACARCHENCO, P. B.; MASSAGUER-ROIG, S. Enumeration of *Streptococcus thermophilus* in the presence of *Bifidobacterium longum* and *Lactobacillus acidophilus* – effect of incubation temperature and atmospheric conditions. **Milchwissenschaft**, v. 59, p. 370-372, 2004.

ANEXO I



Result Analysis Report

Sample Name:
capsulas frescas ph 4 - Average

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
Flávia

Result Source:
Averaged

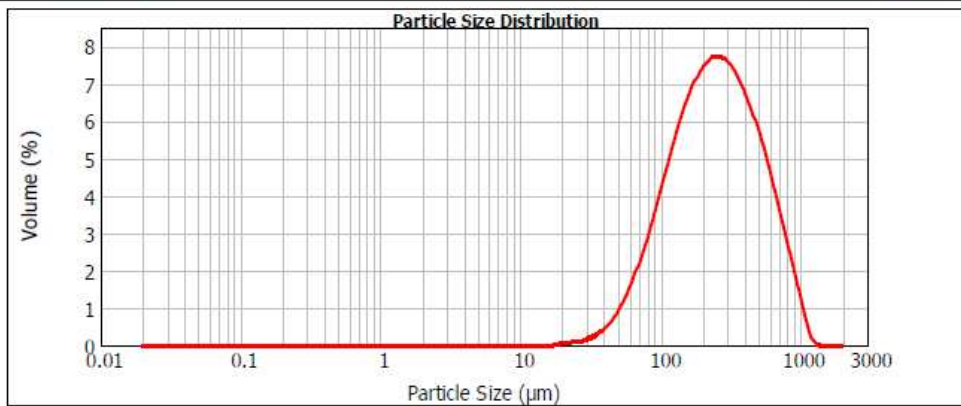
Measured:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:41:13

Analysed:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:41:15

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 um	Obscuration: 12.30 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 0.283 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.3402 %Vol	Span : 2.146	Uniformity: 0.659	Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.0329 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 182.546 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 308.042 um	

d(0.1): 91.440 um d(0.5): 246.855 um d(0.9): 621.135 um



capsulas frescas ph 4 - Average, quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:41:13

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.020	0.00	0.156	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	2.86	630.957	3.54
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.462	0.00	91.201	3.61	724.436	2.72
0.029	0.00	0.209	0.00	1.660	0.00	13.183	0.00	104.713	4.36	831.764	1.91
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.226	5.07	954.993	1.09
0.035	0.00	0.275	0.00	2.188	0.00	17.378	0.03	138.038	5.72	1096.478	0.29
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.963	0.07	158.499	6.29	1258.925	0.00
0.048	0.00	0.363	0.00	2.894	0.00	22.909	0.09	181.970	6.67	1445.440	0.00
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.12	209.930	6.82	1659.567	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.19	239.883	6.96	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.560	0.00	4.385	0.00	34.674	0.31	275.423	6.90	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.49	316.228	6.84	2187.762	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.77	363.078	6.24		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.461	1.14	418.999	5.71		
0.120	0.00	0.966	0.00	7.588	0.00	60.266	1.63	478.630	5.08		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	2.21	549.541	4.34		
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433		630.957			

Operator notes:



MASTERSIZER



Result Analysis Report

Sample Name:
capsulas frescas ph 4 - 2 corrida -

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
Flávia

Result Source:
Averaged

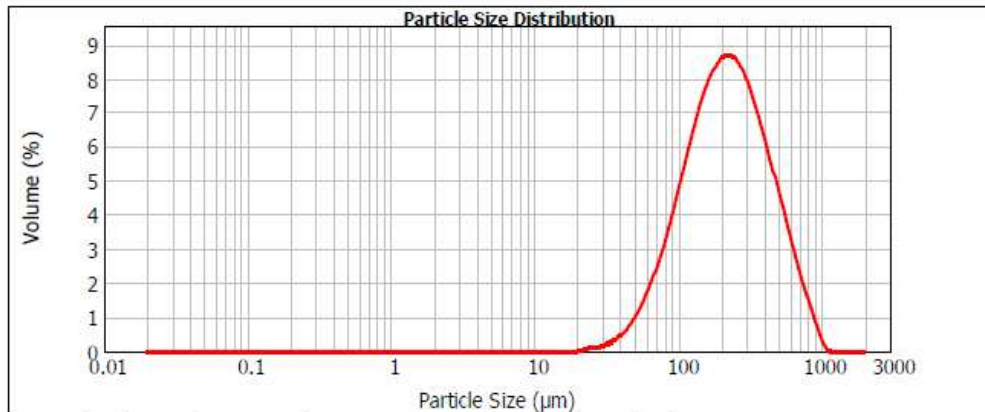
Measured:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:43:34

Analysed:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:43:35

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 um	Obscuration: 6.97 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 0.263 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.1743 %Vol	Span : 1.954	Uniformity: 0.601	Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.0353 m ² /g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 169.942 um	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 266.387 um	

d(0.1): 88.502 um d(0.5): 218.728 um d(0.9): 515.958 um



capsulas frescas ph 4 - 2 corrida - Average, quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:43:34

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.020	0.00	0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	3.22	630.957	2.33
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.462	0.00	91.201	4.08	724.436	1.57
0.028	0.00	0.209	0.00	1.660	0.00	13.183	0.00	104.713	4.99	831.764	1.57
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.228	5.87	954.993	0.90
0.035	0.00	0.275	0.00	2.188	0.00	17.378	0.00	138.038	6.67	1096.478	0.27
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.963	0.00	158.489	7.30	1258.825	0.00
0.048	0.00	0.363	0.00	2.894	0.00	22.909	0.03	181.970	7.71	1445.440	0.00
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.09	208.930	7.84	1659.567	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.12	239.883	7.68	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.550	0.00	4.365	0.00	34.674	0.20	275.423	7.27	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.33	318.228	6.83	2187.762	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.53	363.078	5.86		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.481	0.82	418.899	4.96		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.588	0.00	60.256	1.23	478.830	4.08		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	1.77	549.541	3.18		
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	2.43	630.957			

Operator notes:



Result Analysis Report

Sample Name:
capsulas frescas ph 4 - 4 corrida -

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
Flávia

Result Source:
Averaged

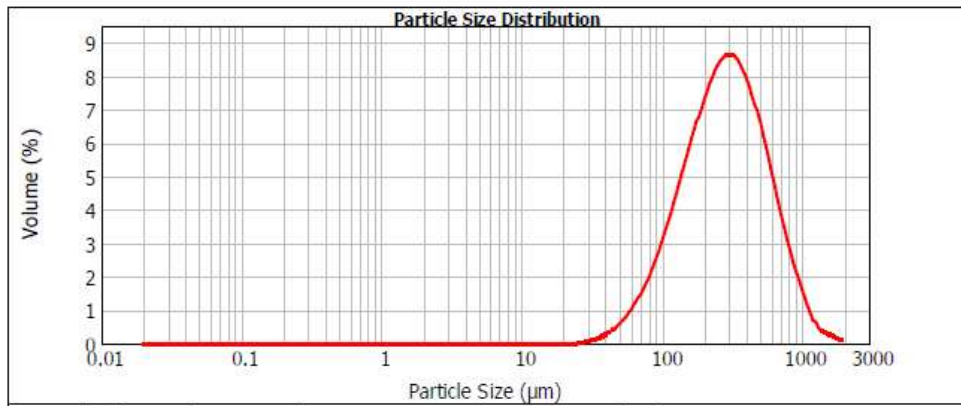
Measured:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:48:17

Analysed:
quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:48:19

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 μm	Obscuration: 4.68 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 0.411 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.1462 %Vol	Span : 1.964	Uniformity: 0.619	Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.028 m^2/g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 214.029 μm	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 346.799 μm	

d(0.1): 109.042 μm d(0.5): 283.531 μm d(0.9): 665.842 μm



capsulas frescas ph 4 - 4 corrida - Average, quinta-feira, 14 de outubro de 2010 17:48:17

Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.020	0.00	0.156	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	2.02	630.957	3.80
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.482	0.00	91.201	2.64	724.436	2.86
0.028	0.00	0.209	0.00	1.660	0.00	13.183	0.00	104.713	3.34	831.784	2.05
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.228	4.11	954.993	1.39
0.035	0.00	0.275	0.00	2.188	0.00	17.378	0.00	138.038	4.92	1096.478	0.74
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.963	0.00	158.480	5.72	1258.025	0.36
0.048	0.00	0.363	0.00	2.884	0.00	22.909	0.00	181.970	6.48	1445.440	0.24
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.00	208.930	7.12	1659.587	0.13
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.05	239.893	7.58	1905.461	0.08
0.069	0.00	0.560	0.00	4.395	0.00	34.674	0.19	275.423	7.79	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.30	316.228	7.70	2187.782	
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.48	363.078	7.32		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.461	0.73	416.889	6.85		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.598	0.00	60.256	1.07	478.630	5.78		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	1.50	549.541	4.79		
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433		630.957			

Operator notes:



MASTERSIZER



Result Analysis Report

Sample Name:
LIOFILIZADAS REIDRATADAS 1

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
GRASIELA

Result Source:
Averaged

Measured:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:08:49

Analysed:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:08:51

Particle Name:
Fraunhofer

Particle RI:
0.000

Dispersant Name:
Water

Accessory Name:
Hydro 2000S (A)

Absorption:
0

Dispersant RI:
1.330

Analysis model:
General purpose (spherical)

Size range:
0.020 to 2000.000 um

Weighted Residual:
1.222 %

Sensitivity:
Normal

Obscuration:
23.50 %

Result Emulation:
Off

Concentration:
1.0337 %Vol

Span :
1.679

Uniformity:
0.519

Result units:
Volume

Specific Surface Area:
0.0221 m²/g

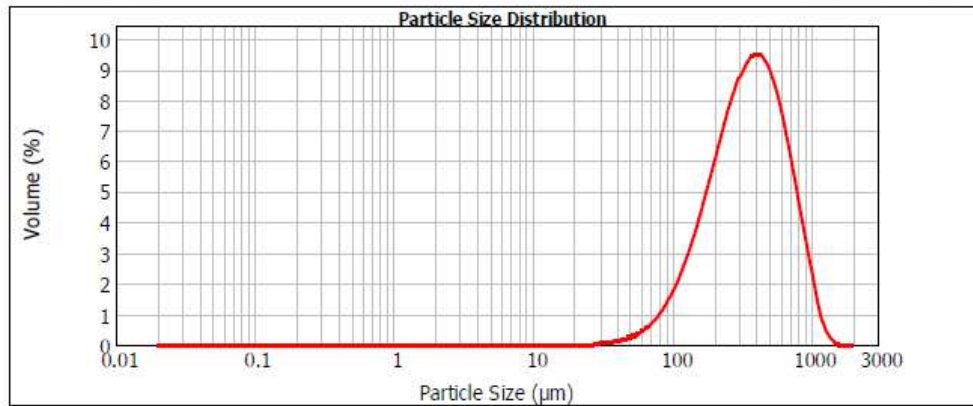
Surface Weighted Mean D[3,2]:
271.767 um

Vol. Weighted Mean D[4,3]:
408.479 um

d(0.1): 144.246 um

d(0.5): 358.897 um

d(0.9): 746.858 um



— LIOFILIZADAS REIDRATADAS 1 CORRIDA - Average, terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:08:49

Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %	Size (µm)	Volume In %
0.020	0.00	0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	1.02	630.957	5.99
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.482	0.00	91.201	1.43	724.436	4.86
0.026	0.00	0.209	0.00	1.660	0.00	13.183	0.00	104.713	1.96	831.764	3.31
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.228	2.59	964.993	2.05
0.035	0.00	0.276	0.00	2.188	0.00	17.378	0.00	138.038	3.35	1096.478	0.85
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.953	0.00	158.489	4.19	1258.925	0.27
0.046	0.00	0.363	0.00	2.884	0.00	22.909	0.00	181.970	5.12	1445.440	0.01
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.01	208.930	6.06	1659.587	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.902	0.00	30.200	0.07	239.883	6.96	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.550	0.00	4.365	0.00	34.674	0.07	275.423	7.73	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.09	316.228	8.29	2187.762	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.14	363.078	8.56		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.461	0.21	416.869	8.47		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.588	0.00	60.256	0.31	478.830	7.99		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.163	0.46	549.541	7.14		
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.71	630.957			

Operator notes:



Result Analysis Report

Sample Name:
LIOFILIZADAS REIDRATADAS 2

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
GRASIELA

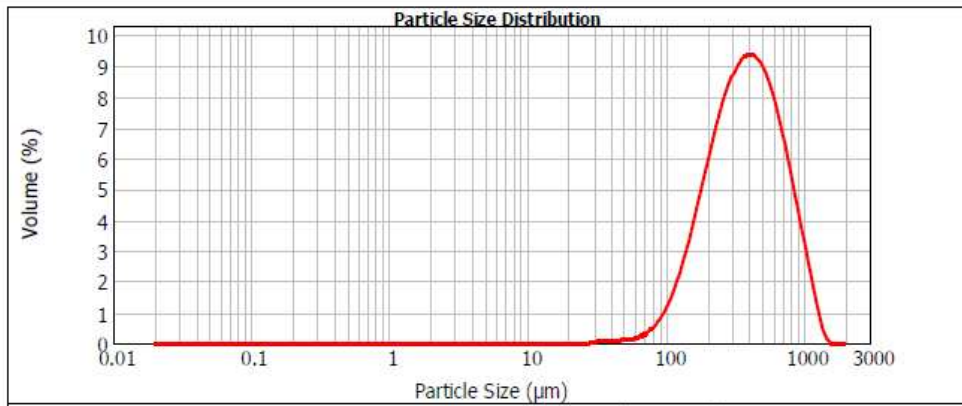
Result Source:
Averaged

Measured:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:14:41

Analysed:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:14:43

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 μm	Obscuration: 5.87 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 1.418 %	Result Emulation: Off
Concentration: 0.2608 %Vol	Span : 1.691	Uniformity: 0.523	Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.0198 m^2/g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 302.494 μm	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 441.360 μm	

d(0.1): 164.881 μm d(0.5): 382.189 μm d(0.9): 811.213 μm



— LIOFILIZADAS REIDRATADAS 2 CORRIDA - Average, terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:14:41

Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.020	0.00	0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.55	630.957	6.43
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.482	0.00	91.201	0.91	724.436	5.30
0.028	0.00	0.209	0.00	1.680	0.00	13.183	0.00	104.713	1.44	831.784	4.07
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.229	2.13	954.993	2.86
0.035	0.00	0.275	0.00	2.188	0.00	17.378	0.00	138.038	2.99	1096.478	1.63
0.040	0.00	0.318	0.00	2.512	0.00	19.953	0.00	158.489	3.96	1258.925	0.56
0.048	0.00	0.363	0.00	2.884	0.00	22.909	0.00	181.970	5.01	1445.440	0.01
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.01	208.930	6.03	1659.587	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.06	239.863	7.71	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.550	0.00	4.365	0.00	34.674	0.08	275.423	9.22	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.08	316.228	8.46	2187.782	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.10	363.078	8.40		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.461	0.12	416.889	8.04		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.588	0.00	60.256	0.19	478.630	7.36		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	0.32	549.541			
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433		630.957			

Operator notes:



Result Analysis Report

Sample Name:
LIOFILIZADAS REIDRATADAS 3

SOP Name:

Measured:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:21:11

Sample Source & type:

Measured by:
GRASIELA

Analysed:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:21:13

Sample bulk lot ref:

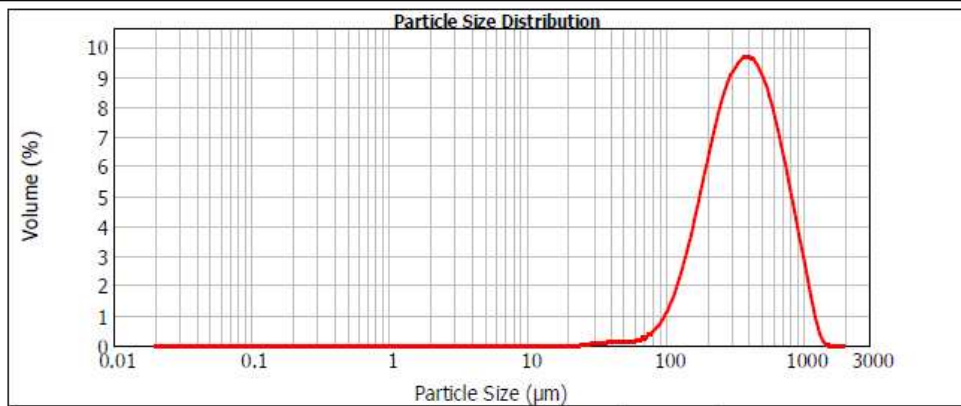
Result Source:
Averaged

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 μm	Obscuration: 4.93 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 1.104 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.2148 %Vol	Span : 1.642	Uniformity: 0.507	Result units: Volume
-------------------------------	-----------------	----------------------	-------------------------

Specific Surface Area: 0.0201 m^2/g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 298.152 μm	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 428.833 μm
--	--	---

d(0.1): 166.326 μm d(0.5): 373.423 μm d(0.9): 779.580 μm



— LIOFILIZADAS REIDRATADAS 3 CORRIDA - Average, terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:21:11

Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.020	0.00	0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.48	630.957	6.25
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.482	0.00	91.201	0.82	724.436	6.06
0.028	0.00	0.209	0.00	1.680	0.00	13.183	0.00	104.713	1.36	831.784	3.78
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.229	2.07	954.993	2.51
0.035	0.00	0.275	0.00	2.188	0.00	17.378	0.00	138.038	2.99	1096.478	1.23
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.963	0.00	158.480	4.05	1258.925	0.27
0.048	0.00	0.363	0.00	2.884	0.00	22.909	0.00	181.970	5.20	1445.440	0.00
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.00	208.930	6.31	1659.587	0.00
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.04	239.893	7.31	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.550	0.00	4.395	0.00	34.674	0.08	275.423	8.08	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.09	316.228	8.57	2187.782	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.10	363.078	8.74		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.461	0.11	416.889	8.57		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.598	0.00	60.256	0.13	478.930	8.08		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	0.17	549.541	7.29		
0.158	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.27	630.957			

Operator notes:



Result Analysis Report

Sample Name:
LIOFILIZADAS REIDRATADAS 4

Sample Source & type:

Sample bulk lot ref:

SOP Name:

Measured by:
GRASIELA

Result Source:
Averaged

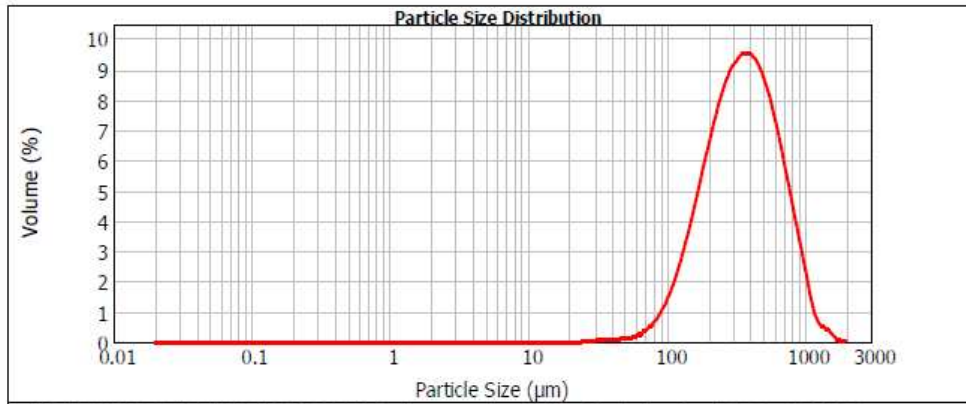
Measured:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:24:27

Analysed:
terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:24:28

Particle Name: Fraunhofer	Accessory Name: Hydro 2000S (A)	Analysis model: General purpose (spherical)	Sensitivity: Normal
Particle RI: 0.000	Absorption: 0	Size range: 0.020 to 2000.000 μm	Obscuration: 4.42 %
Dispersant Name: Water	Dispersant RI: 1.330	Weighted Residual: 1.228 %	Result Emulation: Off

Concentration: 0.1828 %Vol	Span : 1.683	Uniformity: 0.524	Result units: Volume
Specific Surface Area: 0.0212 m^2/g	Surface Weighted Mean D[3,2]: 283.171 μm	Vol. Weighted Mean D[4,3]: 413.005 μm	

d(0.1): 155.068 μm d(0.5): 355.237 μm d(0.9): 752.766 μm



LIOFILIZADAS REIDRATADAS 4 CORRIDA - Average, terça-feira, 11 de janeiro de 2011 09:24:27

Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %	Size (μm)	Volume In %
0.020	0.00	0.156	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.89	630.957	5.73
0.023	0.00	0.182	0.00	1.445	0.00	11.482	0.00	91.201	1.12	724.436	4.48
0.026	0.00	0.209	0.00	1.660	0.00	13.183	0.00	104.713	1.73	831.764	3.25
0.030	0.00	0.240	0.00	1.905	0.00	15.136	0.00	120.228	2.50	954.998	2.03
0.035	0.00	0.275	0.00	2.198	0.00	17.378	0.00	138.038	3.44	1096.478	0.94
0.040	0.00	0.316	0.00	2.512	0.00	19.963	0.00	158.489	4.48	1256.925	0.45
0.046	0.00	0.363	0.00	2.884	0.00	22.909	0.00	181.970	5.56	1445.440	0.28
0.052	0.00	0.417	0.00	3.311	0.00	26.303	0.00	208.930	6.56	1659.567	0.05
0.060	0.00	0.479	0.00	3.802	0.00	30.200	0.03	239.883	7.47	1905.461	0.00
0.069	0.00	0.550	0.00	4.365	0.00	34.674	0.06	275.423	8.13	2000.000	0.00
0.079	0.00	0.631	0.00	5.012	0.00	39.811	0.09	316.228	8.52	2187.762	0.00
0.091	0.00	0.724	0.00	5.754	0.00	45.709	0.10	363.078	8.80		
0.105	0.00	0.832	0.00	6.607	0.00	52.481	0.14	416.889	8.34		
0.120	0.00	0.955	0.00	7.588	0.00	60.256	0.23	478.630	7.75		
0.138	0.00	1.096	0.00	8.710	0.00	69.183	0.40	549.541	6.85		
0.156	0.00	1.259	0.00	10.000	0.00	79.433	0.40	630.957			

Operator notes: